



UNIVERSITE  
Abdelhamid Ibn Badis  
MOSTAGANEM

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE  
ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS DEMOSTGANEM  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA MER ET DE  
L'AQUACULTURE

LABORATOIRE DE PROTECTION, VALORISATION DES RESSOURCES  
MARINES ET LITTORALES ET SYSTEMATIQUE MOLECULAIRE  
(LPVRMLSM)

**THÈSE présentée par : Asmaa MECHETA**

En vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT (L.M.D)

**Spécialité :** Hydrologie marine et continentale

**Option :** Gestion et valorisation des ressources marines et littorales

**Intitulé :**

***Gestion et valorisation du stock d'holothuries  
Aspidochirotes de la côte Ouest Algérienne  
(Mostaganem)***

Soutenue à Mostaganem le : 24 /06 /2021

**Devant la commission du jury composée de :**

Noms et prénoms	Grade	Qualité	Université
SOUALILI Dina Lila	Prof	Présidente	UMAB Mostaganem
ABI-AYAD Sidi-Mohammed El-Amine	Prof	Examineur	Univ. Oran 1 Ahmed Ben Bella
NEMCHI-BELHAKEM Fadela	MCA	Examineur	UMAB Mostaganem
MEZALI Karim	Prof	Directeur de thèse	UMAB Mostaganem

**Année Universitaire : 2019/2020**



## Avant-propos

Depuis le début de cette thèse en 2014 à aujourd'hui, la classification des "concombres de mer" a connu plusieurs mises à jour dû aux révisions systématiques par le biais de nouvelles techniques tel que la phylogénie moléculaire. Les anciennes classifications des Holothuroidea sont confirmées et parfois revues et corrigées, c'est le cas de l'ordre Aspidochirotida, qui depuis 2018 a été remplacé par l'ordre Holothuriida. Du fait que cette nouvelle classification est acceptée par les bases de données taxinomiques modernes comme WoRMS (Registre mondial des espèces marines), nous avons utilisé tout le long de cette thèse le nouvel ordre "Holothuriida" et vue qu'on ne peut changer le titre initiale de la thèse (selon les recommandations de la VRPG de l'université de Mostaganem), nous proposons de changer l'ordre "Aspidochirototes" mentionné dans le titre initial par l'ordre "Holothuriida". Ainsi il est souhaitable de changer le titre de la thèse de : "Gestion et valorisation du stock d'holothuries Aspidochirototes de la côte Ouest Algérienne (Mostaganem)" a : "Gestion et valorisation du stock d'holothuries de l'ordre des Holothuriida de la côte Ouest Algérienne (Mostaganem)"

*Dédicace*

*A mon grand-père paix à son âme*

## Remerciements

A l'issue cette recherche, j'ai appris que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, ce travail de doctoral n'aurait jamais vu le jour sans le soutien d'un grand nombre de personnes, qui m'ont permis de progresser dans mon travail.

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu de m'avoir donné la force et la patience d'accomplir ce travail.

Mes plus sincères remerciements vont tout particulièrement à mon directeur de thèse, **M. Karim MEZALI**, Professeur à l'Université Abdelhamid In Badis de Mostaganem et Directeur du Laboratoire de Protection, Valorisation des Ressources Marine et Littoral et Systématique Moléculaire. Je lui adresse toute ma gratitude pour m'avoir accompagné durant ce long chemin, et pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant la direction scientifique de mes travaux. Je lui suis reconnaissante de m'avoir fait bénéficier tout au long de ce travail de sa grande compétence, de sa rigueur intellectuelle, et de son efficacité. Qu'il trouve ici le témoignage de ma gratitude et mon profond respect.

Je tiens également à témoigner toute ma reconnaissance au Professeur **M<sup>me</sup> Dina Lila SOUALILI**, doyenne de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abdelhamid In Badis de Mostaganem, pour son aide, ses conseils judicieux qu'elle a sus me donner, et pour l'honneur qu'elle me fait, en acceptant la présidence du jury. Qu'elle trouve ici l'expression de ma plus profonde gratitude.

Je voudrais exprimer mes plus profonds remerciements à **M. Sidi Mohamed El Amine ABIAYAD**, Professeur à l'Université Ahmed Ben Bella d'Oran 1 et Directeur du Laboratoire d'Aquaculture et Bioremédiation, pour avoir accepté d'examiner ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma plus profonde gratitude.

Je tiens également à exprimer mes vifs remerciements à **M<sup>me</sup> Fadela NEMCHI-BELHAKEM**, Maître de conférences A à l'Université Abdelhamid In Badis Mostaganem, pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail. Recevez, Madame l'expression de ma plus profonde gratitude.

Je remercie tout particulièrement **M. Michel Linder**, Professeur à l'Université Lorraine-Nancy (France) et Responsable de la mention Nutrition Sciences des Aliments (Master

2) pour son accueil chaleureux au sein du Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio) (Nancy, France), et pour avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires pour le bon déroulement de mon stage. Je lui suis également reconnaissant pour le temps conséquent qu'il m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques, pour ses encouragements et sa gentillesse. J'ai beaucoup appris à ses côtés, je lui adresse mon profond respect et ma gratitude pour tout cela. Je suis honorée qu'il ait accepté d'examiner ce modeste travail.

Je remercie la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem), de m'avoir fourni une partie de l'aide financière nécessaire pour effectuer un stage au niveau du Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio) (Nancy, France).

Je remercie **M<sup>me</sup> Nouria**, technicienne du laboratoire biologie animale et **M. Benbouziane Djilali**, technicien au laboratoire de microbiologie pour m'avoir autorisé à travailler au sein du laboratoire de la SNV-UMAB-Mostaganem.

Mes sincères remerciements à la directrice du Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio) Professeur **Anne-Marie Revol-Junelles**, à tout le personnel du Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules pour leur aide et leur collaboration lors du séjour de recherche au LIBio en particulier les deux techniciennes, **M<sup>me</sup> Carole Jeandel** et **M<sup>me</sup> Carole Perroud**. Je tiens également à remercier tous mes amis du LiBio : **Aldjia, Aurélie, Amine, Lila, Tristan, Kamil, Marie, Loic, Jiaqi** et **Elvis**, qui ont fait de mon séjour une période exceptionnelle, pleine de joie et de bonne humeur, ils resteront à jamais dans mon cœur.

Je ne remercierai jamais assez **M. Kadi**, le plongeur qui a aidé pendant le travail sur terrain. Je tiens aussi à remercier **M<sup>me</sup> Tamani Kara-Mostefa**, une personne formidable que j'ai eu la chance et de l'honneur rencontrer grâce à cette thèse, et qui est devenue au fil des jours un membre de ma famille.

A titre plus personnel, Je remercie chaleureusement mes parents **Nacer** et **Fatiha**, mon grand frère **Abdelhadi** et mes petites sœurs **Chaimaa** et **Ferdaous**, pour leur grande patience, leurs encouragements et la confiance qu'il m'ont témoigné. Je tiens à les remercier surtout pour leur soutien moral ininterrompu et leurs nombreux conseils tout le long de ma thèse, ainsi que pour leur soutien financier, qui m'a été bien utile durant ma thèse. Je tiens à leur exprimer toute ma reconnaissance et gratitude, car sans eux je n'en serais pas là aujourd'hui.

Ce travail est aussi le fruit de leur investissement, leurs efforts, et leurs sacrifices. J'espère que mon travail reflétera la moitié de tout ce qu'ils ont fait pour moi, et leur fera honneur.

Enfin, Je remercie toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse.



## ملخص

"خيار البحر" هي من اللاقريات البحرية ذات أهمية اقتصادية، بيئية وغذائية كبيرة. هذه الأنواع تحظى بتقدير كبير في آسيا وفي الشرق الأقصى بسبب آثارها المفيدة العديدة على صحة الإنسان في بعض البلدان الآسيوية، يعد خيار البحر أهم مورد سمكي، ويزدهر تحولها لمنتج جاف أو "bêches-de-mer". في الأونة الأخيرة، ظهرت مصائد "خيار البحر" في البحر الأبيض المتوسط بسبب انهيار مخزونات المحيطين الهندي والهادئ. من أجل تعزيز الإمكانات الاقتصادية والتغذية والغذائية لأربعة أنواع من "خيار البحر" عينات تتكون من :

[*Holothuria poli* (Delle Chiaje, 1824), *H. tubulosa* (Gmelin, 1791), *H. arguinensis* (Koehler et Vaney, 1906)] and *H. sanctori* (Delle Chiaje, 1823)]

تم جمعها من خمس محطات على الساحل الغربي الجزائري [ستيديا وحجاج (مستغانم)؛ ميناء كريستل، ميناء وهران، وكابالكون (وهران)]. [لقد قمناب: 1) دراسة بيومترية على عينات جديدة لتقدير حجم، وزن وسماك جدار الجسم. 2) تحويلهم إلى "bêches-de-mer" وهضمها بالتريسين لتقدير القيمة الغذائية لل "bêches-de-mer"؛ 3) تقدير التركيبة التقريبية لجدار الجسم، التركيبة الدهنية ودراسة النشاط المثبط لإنزيم تحويل الأنجيوتنسين (ACE)؛ 4) اعداد جسيمات نانوية وتغليف البيبتيدات باستخدام الدهون الفوسفاتية التي تم الحصول عليها من "خيار البحر"؛ 5) وصف الفيزيائي-الكيميائي للجسيمات نانوية والبيبتيدات؛ 6) تحليل في المختبر لتقدير السمية الخلوية النانوية على خلايا الوسيطة (MSC).

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أنه على الرغم من أن حجم ووزن "خيار البحر" الأربعة أقل من الأنواع الموجودة في المحيطين الهندي والهادئ، إلا أن قيمتها الغذائية تظل مهمة، لأن جدارها يسهل هضمه بواسطة التريسين. أظهرت النتائج نسبة عالية من البروتين (49,26-69,34%)، وتركيبه دهنية مثيرة للإعجاب مكونة من 27 حمض دهني، تتكون بشكل رئيسي من الأحماض الدهنية القطبية (91,16-93,85%)، مع نسبة عالية من الأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة (50,90-71,80%) (PUFAs).

على وجه الخصوص حمضي (4,86-7,25%) Docosahexaenoic (DHA) و Eicosapentaenoic (EPA) (5,07-8,76%). كما تم العثور على كمية عالية من الدهون الفوسفاتية (20,55-85,69%)، تتكون بشكل رئيسي من فوسفاتيديلكولين (PC) (56,58-48,51%). لجزيئات البيبتيد نشاط مثب ل ACE (مل / مجم 0,30-0,51). IC<sub>50</sub>. وأظهرت النتائج أيضًا أن جسيمات نانوية لا تسبب تسممًا للخلايا أو موت الخلايا الوسيطة البشرية ولم يلاحظ أي اضطراب في الانتشار في جميع التركيزات المختبرة، بالإضافة إلى جسيمات نانوية والهيدرولات (HTS) مجمعة بتركيز 0,1 مل /مجم.

لخيار البحر الأربعة إمكانات حقيقية كمغذيات لأنها تمثل مصدرًا جديدًا للبروتين، أو ميغا 3، أو ميغا 6، والبيبتيدات النشطة بيولوجيًا.

الكلمات الرئيسية: "خيار البحر"؛ "bêche-de-mer"؛ تقييم؛ PUFA؛ البيبتيدات؛ ACE؛ جسيمات نانوية؛ والدهون الفوسفاتية؛ الساحل الغربي الجزائري.

## Résumé

Les holothuries ou "concombres de mer" sont des invertébrés marins d'une grande importance écologique, économique et nutritionnelle. Ils sont très appréciés par les peuples d'Asie et de l'Extrême-Orient dû à leurs nombreux effets bénéfiques sur la santé humaine. Dans certains pays d'Asie, les holothuries constituent la ressource halieutique la plus importante et leurs transformations en "bêches-de-mer" (produit sec) est florissante. Récemment, la pêche aux "concombres de mer" est en train d'émerger en Méditerranée en raison de l'effondrement des stocks de l'Indo-Pacifique. Afin promouvoir le potentiel économique, nutritionnelle et nutraceutique de quatre espèces de "concombres de mer" [*Holothuria poli* (Delle Chiaje, 1824), *H. tubulosa* (Gmelin, 1791), *H. arguinensis* (Koehler et Vaney, 1906), et *H. sanctori* (Delle Chiaje, 1823)], récoltées sur cinq stations de la côte ouest Algérienne [Stidia et Hadjadj (Mostaganem) ; Port de Kristel, Port d'Oran, et Cap Falcon (Oran)], nous avons réalisé : 1) une étude biométrique sur des échantillons frais afin d'estimer la taille, le poids et l'épaisseur du tégument ; 2) une transformation en "bêche-de-mer" et une digestion à la trypsine afin d'estimer leurs valeurs nutritionnelles ; 3) Une estimation de la composition approximative de la paroi du corps, du profil lipidique et de l'activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) ; 4) une élaboration de nanoliposomes et encapsulation des peptides en utilisant des phospholipides obtenus à partir de la même source ; 5) une caractérisation physico-chimique des nanoliposomes et des peptides ; 6) des analyses *in vitro* afin d'estimer la cytotoxicité des nanoliposomes sur des cellules mésenchymateuses humaines (CMSs).

Les résultats obtenus ont montré que malgré que la taille et le poids des quatre "concombres de mer" soient inférieurs à ceux des espèces Indo-Pacifique, leur valeur nutritionnelle reste néanmoins importante, car leur tégument est facilement digéré par la trypsine. Ces résultats ont démontré une teneur élevée en protéines (49,26-69,34 %), et un profil lipidique impressionnant constitué de 27 acides gras, principalement composés d'acides gras polaires (91,16-93,85 %), avec une teneur élevée en acides gras polyinsaturés (AGPI) (50,90-71,80 %), en particulier l'acide eicosapentaénoïque (EPA) (5,07-8,76 %) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) (4,86-7,25 %). Une quantité élevée de phospholipides a également été retrouvée (55,20-69,85%), principalement composée de phosphatidylcholine (PC) (51,48-58,56%). Leurs fractions peptidiques présentent une forte activité inhibitrice de l'ECA (CI<sub>50</sub> 0,30-0,51 mg/mL). Nos résultats ont également montré que les nanoliposomes n'induisent pas de cytotoxicité et de mort cellulaire dans les CMSs humaines et aucune perturbation de la prolifération n'est observée pour toutes les concentrations testées, ainsi que les nanoliposomes et hydrolysats (HTS) combinés à une concentration de 0,1 mg/mL. Les quatre espèces de "concombres de mer" ont un réel potentiel comme nutraceutique, car ils représentent une nouvelle source de protéines, d'oméga-3, d'oméga-6, et de peptides bioactifs.

**Mots clés :** "concombres de mer" ; "bêche-de-mer" ; valorisation ; AGPI ; peptides ; ACE ; nanoliposome ; phospholipides ; côte ouest algérienne.

## Abstract

Holothurians or "sea cucumbers" are marine invertebrates of great ecological, economic and nutritional importance. They are highly valued by Asian and the Far East due to the many beneficial effects they have on human health. In some Asian countries, "sea cucumber" are the most important fisheries resources and their transformation into a dry product or "bêche-de-mer" is flourishing. Recently, the "sea cucumber" fishery is emerging in the Mediterranean due to the collapse of Indo-Pacific stocks. In order to promote the economic, nutritional and nutraceutical potential of four species of "sea cucumbers" [*Holothuria poli* (Delle Chiaje, 1824), *H. tubulosa* (Gmelin, 1791), *H. arguinensis* (Koehler et Vaney, 1906)] and *H. sanctori* (Delle Chiaje, 1823)], harvested from three stations of the Algerian west coast [Stidia and Hadjadj, (Mostaganem) ; Kristel harbor, Oran Harbor, and Falcon Cap,(Oran)] we realized : 1) a biometric study on fresh samples in order to estimate the size, weight and thickness of the body wall; 2) a transformation into "bêches-de-mer" and a trypsin digestion in order to estimate the nutritional value of "bêches-de-mer"; 3) an estimation of the approximate composition of the body wall, the lipid profile and the inhibitory activity of the angiotensin converting enzyme (ACE); 4) elaboration of nanoliposomes and encapsulation of peptides using phospholipids obtained from the same source; 5) physico-chemical characterization of nanoliposomes and peptides; 6) *in vitro* analyses to estimate the cytotoxicity of nanoliposomes on human mesenchymal cells (MSCs).

The results obtained showed that although the size and weight of the four "sea cucumbers" are lower than those of the Indo-Pacific species, their nutritional value nevertheless remains important, because their integument is easily digested by trypsin. The results demonstrated a high protein content (49,26-69,34%), and an impressive lipid profile of 27 fatty acids, mainly composed of polar fatty acids (91,16-93,85%), with a high content of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (50,90-71,80%), in particular eicosapentaenoic acid (EPA) (5,07-8,76%) and docosahexaenoic acid (DHA) (4,86-7,25%). A high amount of phospholipids was also found (55,20-69,85%), mainly composed of phosphatidylcholine (PC) (51,48-58,56%). Their peptide fractions had strong ACE inhibitory activity ( $IC_{50}$  0,30-0,51 mg/mL). The results also showed that nanoliposomes do not induce cytotoxicity and cell death in human MSCs and no disturbance of proliferation was observed at all concentrations tested, as well as nanoliposomes and hydrolysates (HTS) combined at a concentration of 0,1 mg/mL. The four sea cucumbers have real potential as a nutraceutical as they represent a new source of protein, omega-3, omega-6, and bioactive peptides.

**Keywords :** "sea cucumber" ; "bêche-de-mer" ; valorization ; PUFA ; peptides; ACE ; nanoliposome ; phospholipids ; Algerian west coast.

## Liste des figures

- Figure 1.** Classification des échinodermes selon Cary et Hinman (2017 modifiée). ..... 9
- Figure 2.** Quelques types de sclérites (spicules) chez les holothuries : **1.** Tourelles ; **2.** Boucles ; **3.** plaques perforées ; **4.** Bâtonnets ; **5.** Ancre ; **6.** Corpuscule crépu ; **7.** Plaque anchorale ; **8.** Pseudo-bouton ; **9.** Roues ; **10.** Rosette (Rowe, 1969 ; Samyn *et al.*, 2006 modifiée). ..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 3.** Quelques types d'anneaux calcaires chez les holothuries : **1.** *H. edulis* ; **2.** *Pearsonothuria graeffei* ; **3.** *Bohadschia vitiensis* ; **4.** *B. argus* ; **5.** *B. atra* ; **6.** *H. flavomaculata* ; **7.** *H. fuscogilva* ; **8.** *H. leucospilota* (Cherbonnier et Féral, 1984 ; Cherbonnier, 1988 ; Massin *et al.*, 1999). ..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 4.** Morphologie externe d'une holothurie de l'ordre des Holothuriida (*in* Samyn *et al.*, 2006). ..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 5.** Les différentes formes de tentacules chez les "concombres de mer" (Lambert, 1997 modifiée). ..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 6.** Anatomie interne d'une holothurie de l'ordre des Holothuriida montrant les principaux organes (*in* Samyn *et al.*, 2006). ..... 16
- Figure 7.** Schéma du système aquifère chez les échinodermes (Tortonese et Vadon, 1987). ..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 8.** Schéma du système digestif des "concombres de mer" (Cuénot, 1948 modifié). ..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 9.** Le protozoaire endosymbiote *Boveria labialis* à l'intérieur de l'arbre respiratoire ..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 10.** Micrographie des gonades femelles et mâles matures de *Holothuria notabilis* (Razafimandimby, 2008 modifiée). ..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 11.** Reproduction sexuée et cycle de vie général des "concombres de mer" (Cameron et Frankboner, 1989 modifiée). ..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 12.** *Holothuria arenicola* induisant une fission : **A.** les parties antérieure et postérieure s'étirent avant de se fendre ; **B.** la partie antérieure après la fission ; **C.** la partie postérieure après la fission (Abdel Razek *et al.*, 2007 modifiée). ..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 13.** Schéma montrant le transit digestif d'une holothurie (*in* Conand, 1994 modifiée par Belbachir, 2012). ..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 14.** Observation au microscope électronique à balayage des contenus digestifs des holothuries. **A.** Nanoplancton ; **B.** Agglomérat organo-minéral ; **C.** Pelote fécale ; **D.** Quartz

encrouté par la matière organique ; <b>E.</b> Pelote fécale d'un bivalve ; <b>F.</b> Débri d'origine végétale (Khripounoff et Sibuet,1980). .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Figure 15.</b> Distribution mondiale des espèces de "concombres de mer" (Jenkins et Van Houtan, 2016). Le nombre d'espèce par région varie entre 1 (couleur verte) à 75 (couleur orange) espèces, avec une grande diversité dans l'océan Indo-Pacifique.	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Figure 16.</b> Bioturbation des sédiments par l'holothuride <i>Bohadschia argus</i> (Purcell <i>et al.</i> , 2016 modifiée). .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Figure 17.</b> Rôle écologique et biologique des holothuries ( <i>in</i> Wolfe et Byrne, 2017 modifiée). .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Figure 18.</b> L'anatomie de la partie postérieure de l' <i>Holothuria forskali</i> au niveau de l'attachement des tubes de Cuvier (VandenSpiegel et Jangoux, 1987 modifiée). .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Figure 19.</b> Plat à base de "bêche-de-mer" ( <i>in</i> Purcell <i>et al.</i> , 2010). .....	34
<b>Figure 20.</b> Marchés asiatiques d'holothuries en chine ( <i>in</i> Purcell, 2010 ; Purcell, 2014a).....	36
<b>Figure 21.</b> Activités biologiques des composés bioactifs dérivés des "concombres de mer" (Pangestuti et Arifin, 2018). .....	39
<b>Figure 22.</b> Expansion mondiale du commerce des "concombres de mer" : état des stocks et année d'établissement de la pêche ( <i>in</i> Bennett et Basurto, 2018). L'état du stock est indiqué par Purcell <i>et al.</i> (2013). Les années d'établissement des pêcheries sont indiquées dans Anderson <i>et al.</i> (2011)...	45
<b>Figure 23.</b> Sites d'échantillonnage (croix rouge) (d-map, 2020, modifiée).....	48
<b>Figure 24.</b> Mesures biométriques : <b>A.</b> prise de poids ; <b>B.</b> mesure de la longueur ; <b>C.</b> mesure de l'épaisseur de la paroi. ....	48
<b>Figure 25.</b> Les différentes étapes de préparation des "bêches-de-mer" selon la méthode traditionnelle (Purcell, 2014b). .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Figure 26.</b> Séchage du tégument des espèces d'holothuries étudiées dans l'étuve à 103°C pendant 6 h. ....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Figure 27.</b> Incinération du tégument sec dans un four à moufle à 600°C pendant 12 h. ....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Figure 28.</b> Lyophilisation des échantillons d'holothuries frais à -60°C pendant 72 h. .	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Figure 29.</b> Dosage de la matière azotée selon la méthode de Kjeldahl. ....	53
<b>Figure 30.</b> Extraction des lipides selon la méthode de Folch <i>et al.</i> (1957) : <b>A.</b> Filtration des lipides ; <b>B.</b> Evaporation du solvant. ....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>

<b>Figure 31.</b> Analyse des lipides totaux réalisée sur un Iatoscan®. .	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Figure 32.</b> Estérification des acides gras selon la méthode d'Ackman (1998).	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Figure 33.</b> Analyse des esters méthyliques de lipides totaux par CPG (CG-2010 Plus). .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Figure 34.</b> Purification des phospholipides par acétones froid. ....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Figure 35.</b> Calorimètre différentiel (Modèle Pyris1).....	59
<b>Figure 36.</b> Un spectromètre moyen FTIR Tensor 27.....	61
<b>Figure 37.</b> Montage pour l'hydrolyse enzymatique. ....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Figure 38.</b> Ultrafiltration des hydrolysats à l'aide d'une pompe péristaltique.....	64
<b>Figure 39.</b> Formulation des nanoliposomes : <b>A.</b> Nanoliposomes vide ; <b>B.</b> Sonication des nanoliposomes contenant l'hydrolysat.....	65
<b>Figure 40.</b> Zetasizer Nano ZS.....	66
<b>Figure 41.</b> Les "bêches-de-mer" obtenues : <b>A.</b> <i>H. poli</i> ; <b>B.</b> <i>H. tubulosa</i> ; <b>C.</b> <i>H. arguinensis</i> ; <b>D.</b> <i>H. sanctori</i> .....	1
<b>Figure 42.</b> Degré d'hydrolyse de ♦ <i>H. poli</i> ; ■ <i>H. tubulosa</i> ; ● <i>H. arguinensis</i> ; et ▲ <i>H. sanctori</i> , en utilisant l'Alcalase et Neutrase à 2% et 5%. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart-type.....	90
<b>Figure 43.</b> Impact des hydrolysats sur l'activité métabolique. Les CSMs humaines sont exposées à des concentrations croissantes d'hydrolysats (0,05, 0,25, 0,5 et 1 mg/ml) pendant 7 jours. Pour chaque condition testée, les résultats de l'activité métabolique des cellules sont présentés en % par rapport à la condition témoin (Cont.) (100 %). Les résultats indiqués sont la moyenne ± d'aux moins trois expériences individuelles. *p<0,01, ** p<0,001 par rapport au contrôle pour chaque point temporel.....	95
<b>Figure 44.</b> Impact des nanoliposome sans hydrolysats (Lipo 0,1) et avec hydrolysats (Lipo 0,1+ Hydrp 0,1) sur les CSMs humaines après 7 jours d'exposition. Les résultats indiqués sont la moyenne ± SD d'au moins trois expériences individuelles. ** p<0,001 par rapport au contrôle.....	96

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Taux de "concombres de mer" capturés rapporté par FAO au tonnage mondial total ( <i>in Bordbar et al.</i> , 2011 ; FAO, 2020). .....	37
<b>Tableau 2.</b> Gradients des différentes solutions utilisées lors de la séparation et quantification des classes de phospholipides par (HPLC). .....	58
<b>Tableau 3.</b> Gradients des différentes solutions utilisées lors de l'évaluation de l'activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) par HPLC. ....	67
<b>Tableau 4.</b> Mesures biométriques obtenues pour les quatre espèces d'holothuries étudiées comparées à d'autres espèces méditerranéennes et Indopacifiques.....	72
<b>Tableau 5.</b> Degré de digestibilité (%) des quatre espèces de "concombres de mer" par l'enzyme digestive pepsine en comparaison au viandes communément consommées.....	76
<b>Tableau 6.</b> Composition biochimique approximative (%) des "concombres de mer" en comparaison à d'autres espèces indopacifiques.....	77
<b>Tableau 7.</b> Détermination par TLC-FID des proportions de lipides neutres et polaires (%) des quatre holothuries.....	79
<b>Tableau 8.</b> Composition en acides gras (%) des lipides totaux des "concombres de mer". ....	82
<b>Tableau 9.</b> Les paramètres de fusion des huiles de "concombres de mer", de par calorimétrie à balayage différentiel (DSC).....	84
<b>Tableau 10.</b> La position des bandes d'absorption maximale à la vibration appropriée des quatre huiles détectées par FTIR. ....	87
<b>Tableau 11.</b> Les compositions de phospholipides de "concombres de mer" (%) purifiés par précipitation à l'acétone. ....	89
<b>Tableau 12.</b> Les valeurs $CI_{50}$ des hydrolysats de <i>H. poli</i> , <i>H. tubulosa</i> , <i>H. arguinensis</i> , et <i>H. sanctori</i> .....	92
<b>Tableau 13.</b> Taille (nm) et potentiel zêta (mV) des nanoliposomes vide ou avec hydrolysat.	93

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**°C** : Degré Celsius

**cm** : Centimètre

**E** : Est

**N** : Nord

**O** : Ouest,

**FAO** : Food and Agriculture Organisation of United Nation (Organisation des Nation Unies pour l'alimentation et l'Agriculture)

**OH** : oxhydryle

**COOH** : Acide carboxylique

**CH<sub>3</sub>** : Méthyle

**Kg/an** : Kilogramme par année

**g** : Gramme

**min** : Minute

**sec** : Seconde

**h** : Heure

**mm** : Millimètre

**t/an** : Tonne par année

**USD**: United States dollar (dollar américain)

**SOD**: Superoxyde dismutase

**CAT**: Catalase

**GSH**: Glutathion peroxidase

**Cyt c**: Cytochrome c

**WHO**: World Health Organization (Organisation mondiale de la santé)

**HCl** : Chlorure d'Hydrogène

**CSM** : cellules mésochymotenseuse

**tr/min** : tour par minute

**pH** : potentiel Hydrogène

**NaOH** : Hydroxyde de sodium

**M** : mole par litre

**ml** : millilitre

**AOAC** : Association of Official Analytical Chemists (Association officiels des chimistes analytiques)

**µl** : microlitre

**SiO<sub>2</sub>** : Dioxyde de silicium

**mg/ml**: milligramme par millilitre

**µm** : Micromètre

**ml/min** : Millilitre par minute

**J/g** : Joules par gramme

**Tf** : Température de fusion

**°C/min** : Degré Celsius par minute

**KHz** : kilohertz

**U/g** : Unité par gramme

**kDa** : kilodalton

**NaCl** : Chlorure de Sodium

**EDTA** : acide éthylènediaminetétraacétique

**mM** : Millimole par litre

**U** : unité d'activité enzymatique

**CHES** : N-cyclohexyl-2-aminoéthanesulfonique

**HHL**: Hippuryl-L-histidyl-L-leucine

**µM** : Micromole

**UF** : Ultrafiltration

**TRIS** : Hydroxyméthyl aminométhane, ou 2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol

**µg/ml** : Microgramme par millilitre

**nm** : Nanomètre

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone

**g** : Force centrifuge relative

**mV** : Millivolt

**N** : Normalité

**INFOPESCA** : Centre pour les services d'information et d'avis consultatifs sur la commercialisation des produits de la pêche en Amérique latine et dans les caraïbes

**WoRMS**: World Register of Marine Species (Registre mondial des espèces marines)

**LPVRMLSM** : Laboratoire de Protection, Valorisation des Ressources Marines et Littorales et Systématique Moléculaire

## Table des matières

<b>Introduction</b> .....	<b>4</b>
<b>Chapitre I : Etude bibliographique</b> .....	<b>7</b>
I.1. L'embranchement des Echinodermes .....	<b>8</b>
I.1.1. Généralités .....	<b>8</b>
I.2. Les holothuries .....	<b>10</b>
I.2.1. L'évolution des holothuroïdes .....	<b>10</b>
I.2.2. Identification des holothuries .....	<b>10</b>
I.2.3. Classification des Holothuroidea .....	<b>12</b>
I.2.4. Morphologie et anatomie des holothuries .....	<b>14</b>
I.2.4.1. Morphologie externe .....	<b>14</b>
I.2.4.2. Anatomie interne .....	<b>16</b>
I.2.4.3. Système aquifère .....	<b>17</b>
I.2.4.4. Système digestif .....	<b>17</b>
I.2.4.5. Système respiratoire .....	<b>19</b>
I.2.4.6. Système nerveux .....	<b>20</b>
I.2.4.7. Appareil reproducteur .....	<b>20</b>
I.2.5. Reproduction et cycle de vie chez les holothuries .....	<b>21</b>
I.2.5.1. Reproduction sexuée .....	<b>21</b>
I.2.5.2. Reproduction asexuée .....	<b>22</b>
I.2.6. Alimentation des holothuries .....	<b>23</b>
I.2.6.1. Les "suspension-feeders" .....	<b>23</b>
I.2.6.2. Les "deposit-feeders" .....	<b>23</b>
I.2.7. Habitat et distribution des holothuries .....	<b>25</b>
I.2.8. Rôle écologique et biologique des holothuries .....	<b>27</b>
I.2.8.1. Bioturbation .....	<b>27</b>
I.2.8.2. Nettoyage des sédiments .....	<b>28</b>
I.2.8.3. Recyclage des nutriments .....	<b>28</b>
I.2.8.4. Influence de la chimie de l'eau locale .....	<b>29</b>
I.2.8.5. Relations symbiotiques .....	<b>29</b>
I.2.9. Prédation des holothuries .....	<b>30</b>
I.2.10. Mécanismes de défense chez les holothuries .....	<b>30</b>
I.2.10.1. Toxine chimique .....	<b>30</b>
I.2.10.2. Auto-éviscération .....	<b>31</b>
I.2.10.3. Organe de Cuvier .....	<b>32</b>

I.2.11. Importance des holothuries .....	33
I.2.11.1. Consommation des holothuries .....	33
I.2.11.2. Marché de la "bêche-de-mer" .....	34
I.2.11.4. Application pharmacologique et thérapeutique.....	38
I.2.11.5. Valeur nutritionnelle des holothuries .....	40
I.2.12. Etat actuel des stocks d'holothuries .....	43
<b>Chapitre II : Matériel et Méthodes.....</b>	<b>47</b>
II.1. Echantillonnage .....	47
II.2. Mesures biométriques.....	47
II.3. Transformation des holothuries fraîches en produit sec .....	49
II.4. Digestion <i>in vitro</i> derme sec de "bêche-de-mer" à la pepsine .....	49
II.5. Analyse physicochimique du derme des holothuries.....	51
II.5.1. Humidité totale (Norme AOAC 950.01, 1990) .....	51
II.5.3. Lyophilisation .....	52
II.5.4. Matière azotée (Norme AOAC 960.52, 1997).....	55
II.5.5. Extraction des lipides.....	54
II.6. Caractérisation des fractions lipidiques du derme des holothuries.....	55
II.6.2. Estérification des acides gras.....	56
II.6.3. Chromatographie phase gazeuse (CPG) .....	57
II.6.4. Purification des phospholipides marins par acétone.....	57
II.6.6. Analyse thermique des huiles par calorimétrie différentielle (DSC).....	60
II.6.7. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier des huiles (FTIR) .....	60
II.7. L'hydrolyse enzymatique des protéines.....	61
II.7.1. Enzymes utilisées .....	61
II.7.2. Protocole expérimental .....	62
II.7.3. La technique du pH-stat.....	63
II.7.4. Ultrafiltration des hydrolysats .....	64
II.8.1. Activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) .....	64
II.8.2. Détermination $CI_{50}$ des hydrolysats.....	64
II.9.1 Préparation des liposomes .....	65
II.9.2. Mesures de la taille des liposomes et du potentiel zêta .....	66
II.10. Essais de biocompatibilité .....	66
II.10.1. Essais de cytotoxicité.....	66
II.10.2. Prolifération cellulaire .....	67
II.10.3. Activité métabolique des cellules .....	67
II.10.4. Analyse statistique .....	68

<b>Chapitre III : Résultats et Discussions</b> .....	<b>70</b>
III.1. Etudes biométrique des quatre espèces d'holothuries.....	71
III.2. Caractéristiques des "bêches-de-mer" .....	Erreur ! Signet non défini.
II.3. Digestibilité des quatre espèces d'holothuries.....	75
III.4. Analyses biochimiques approximatives des "concombres de mer" .....	77
III.5. Analyses des lipides .....	78
III.5.1. Classes lipidiques des quatre espèces d'holothurie.....	78
III.5.2. Analyse des acides gras des lipides totaux .....	79
III.5.3. Calorimétrie différentielle à balayage des lipides .....	83
III.5.5. Spectroscopie infrarouge.....	84
III.5.6. Composition de phospholipides .....	88
III.6. L'hydrolyse enzymatique des "concombres de mer" .....	89
III.7. Activité inhibitrice de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine (ECA) et la concentration inhibitrice médiane (CI <sub>50</sub> ).....	91
III.8. Taille des liposomes et mesures du potentiel zêta.....	92
III.9. Cytocompatibilité des hydrolysats .....	93
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	<b>94</b>
<b>Références Bibliographiques</b> .....	<b>96</b>
<b>Annexe</b> .....	<b>136</b>
<b>Travaux scientifiques réalisés</b> .....	<b>137</b>
<b>Communication en relation avec le sujet de thèse (Participation aux séminaires nationales)</b> .....	<b>170</b>

# **Introduction**

**Introduction**

Les holothuries ou "concombres de mer" sont des invertébrés marins à corps mou appartenant au phylum Echinodermata, ils présentent des formes variées, et leur taille va de 2 mm (Broszeit *et al.*, 2010), à plus de 2 m à l'état de relaxation [cas de l'holothurie apode de l'île de la Réunion *Synapta maculata* (Flammang et Conand, 2004)]. Ils se démarquent des autres échinodermes par l'existence d'un endosquelette constitué par des sclérites (ou spicules). Ce sont des pièces microscopiques formées à base de calcaires et éparpillées dans les couches dermiques du corps (*in* Mezali, 2008). Les "concombres de mer" sont bien connus pour leurs nombreuses caractéristiques étonnantes telles que : l'auto-éviscération (García-Arrarás et Greenberg, 2001), l'alimentation par suspension anale (Jaekle et Strathmann, 2013), l'autotomie (perte d'une partie du tégument) (Kropp, 1982). Ils constituent l'une des composantes les plus importantes et les plus abondantes des communautés benthique (Purcell *et al.*, 2016), avec plus de 1716 espèces appartenant à 160 genres et 25 familles, 70 espèces sont actuellement exploitées sur les marchés commerciaux et dans l'aquaculture (Smiley, 1994 ; Pawson, 2007 ; Navarro, 2012 ; Xu et Zhao, 2015 ; Pangestuti et Arifin, 2018). On les retrouve dans presque tous les milieux marins benthiques, y compris les régions polaires (O'Loughlin *et al.*, 2010), et la tranchée océanique profonde (Gallo *et al.*, 2015). En méditerranée, les "concombres de mer" sont les principaux représentant du compartiment benthique de l'écosystème à *Posidonia oceanica* (Harmelin *et al.*, 1980 ; Francour, 1990 ; Mezali, 2008 ; Mezali et Francour, 2012). Ces organismes benthiques participent de manière considérable au recyclage et à la reminéralisation de la matière organique, créant un "turnover" important ; ils ont un rôle essentiel dans le réseau trophique détritivore de l'écosystème à *Posidonia oceanica*, et dans l'oxygénation du substrat meuble (Zupo et Fresi, 1984 ; Mezali *et al.*, 2006 ; Mezali *et al.*, 2013 ; Belbachir *et al.*, 2014 ; 2019). Les "concombres de mer" sont très appréciée par les peuples d'Asie et d'Extrême-Orient, ils sont utilisés depuis des milliers d'années dans la médecine traditionnelle comme aliment fonctionnel et tonique (Afkhami *et al.*, 2012).

Les "concombres de mer" sont principalement récoltés en Chine et dans d'autres pays du Sud-Est asiatique (Ferdouse, 1999 ; To et Shea, 2012). La pêche et l'exportation de leur forme séchée non périssable relèvent d'une tradition déjà bien établie (Purcell, 2017). Les cueilleurs capturent généralement des "concombres de mer" à la main, à la lance, à l'hameçon, au filet en patageant, en plongeant avec un masque-tuba, ou avec un scaphandre autonome (Ander-

son *et al.*, 2011). Ils sont consommés crus ou après une préparation très simple. Ils sont proposés aux consommateurs après avoir été éviscérés, puis portés à ébullition, et enfin séchés à l'air (Jangoux, 2014). Le produit sec ainsi obtenu est commercialisé sous plusieurs noms : "bêche-de-mer" ou de "trépang" (Macknight, 1976).

Ces organismes continuent à être exploités à grande échelle, et leur industrie est en plein essor depuis les années 1980 en raison de l'intérêt croissant pour leurs propriétés nutritionnelles, biologiques et pharmaceutiques. (Fawzya *et al.*, 2015 ; Shi *et al.*, 2016 ; Li *et al.*, 2019). L'effondrement des stocks d'holothuries a imposé des moratoires sur la pêche ou les exportations dans 39% des pêcheries d'holothuries dans le monde (Robinson et Lovatelli, 2015), sans garantie que les stocks se rétabliront à l'avenir. La surexploitation entraîne le risque d'extinction des espèces les plus rentables. Les marchés asiatiques sont à la recherche de nouvelles espèces cibles provenant principalement de la mer Méditerranée et de l'océan Atlantique nord-est (González-Wangüemert *et al.*, 2014 ; 2015 ; 2016). Selon INFOPECSA et FAO (2013), certains pays européens exportent également les holothuries, comme la Grèce, l'Espagne et la France. Les nouvelles espèces cibles avec un intérêt commercial en Méditerranée sont *Holothuria tubulosa* (Gmelin, 1788) et *Holothuria poli* (Delle Chiaje, 1823), deux espèces endémiques en mer Méditerranée (Mezali *et al.*, 2006 ; Valente *et al.*, 2015), ainsi que l'espèce herculéenne *Holothuria arguinensis* (Koehler et Vaney, 1906), présente dans l'Atlantique du Nord-Est et qui s'est introduite en Méditerranée par le détroit de Gibraltar (Borrero-Pérez *et al.*, 2011 ; González-Wangüemert et Borrero-Pérez, 2012 ; Mezali et Thandar, 2014).

Les holothuries ont aussi fait l'objet d'une attention particulière en raison de la présence dans leurs corps de biomolécules qui présentent des avantages pour la santé humaine. Parmi ces biomolécules citons : 1) les sulfates de chondroïtine (Mou *et al.*, 2018) ; 2) les sulfates de fucan (Ustyuzhanina *et al.*, 2018) ; 3) les polysaccharides (Zhong *et al.*, 2019) ; 4) les glycosides triterpènes (saponines) (Caulier-Mezali *et al.*, 2016). Ces quatre biomolécules ont des applications dans l'industrie pharmaceutique en raison de leur large panel de bioactivités, telles que des activités antibactériennes, antifongiques, antiprotozoaires, anti-inflammatoires, anticoagulantes, antitumorales, antioxydantes et antivirales (Martins *et al.*, 2014 ; Shi *et al.*, 2016 ; Pangestuti et Arifin, 2018) ; 5) les peptides (Sila et Bougateg, 2016), inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) (Sadegh Vishkai *et al.*, 2016 ; Chim-Chi *et al.*, 2017 ; Dewi *et al.*, 2020), et 6) des acides gras polyinsaturés (AGPI) à longue chaîne qui

jouent un rôle essentiel dans les activités métaboliques (Anisuzzaman *et al.*, 2019), les maladies coronariennes, l'arthrite, la cicatrisation des plaies et la coagulation du sang (Abdulrazaq *et al.*, 2017 ; Rao, 2018 ; Harris *et al.*, 2019).

En Algérie, les holothuries sont exploitées à très petite échelle (principalement comme appâts de pêche), mais récemment, il a été révélé l'existence d'un réseau naissant de pêcheurs qui transforment les "concombres de mer" en "bêche-de-mer" par eux-mêmes (Mezali *et al.*, 2014; Mecheta *et al.*, 2019 ; Neghli *et al.*, 2019 ; Mezali et Slimane-Tamacha, 2020).

Afin de promouvoir le potentiel économique, nutritionnelle et nutraceutique de quatre espèces de "concombres de mer" [*Holothuria poli*, *H. tubulosa*, *H. arguinensis*, et *H. sanctori*], récoltées dans la côte ouest Algérienne, nous avons réalisé : 1) une étude biométrique sur des échantillons d'holothuries frais afin d'estimer la taille, le poids, et l'épaisseur du tégument; 2) une transformation en "bêche-de-mer" et une digestion à la trypsine afin d'estimer la valeur nutritionnelle des bêches-de-mer; 3) Une estimation de la composition approximative de la paroi du corps des échantillons lyophilisés, de leur profil lipidiques et de l'activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA); 4) une élaboration de nanoliposomes et encapsulation des peptides en utilisant des phospholipides obtenus à partir des quatre espèces d'holothuries ; 5) une caractérisation physico-chimique des nanoliposomes et des peptides et 6) des analyses *in vitro* afin d'estimer la cytotoxicité des nanoliposomes sur des cellules mésenchymateuses humaines (CSMs).

# **Chapitre I : Etude bibliographique**

## **I.1. L'embranchement des Echinodermes**

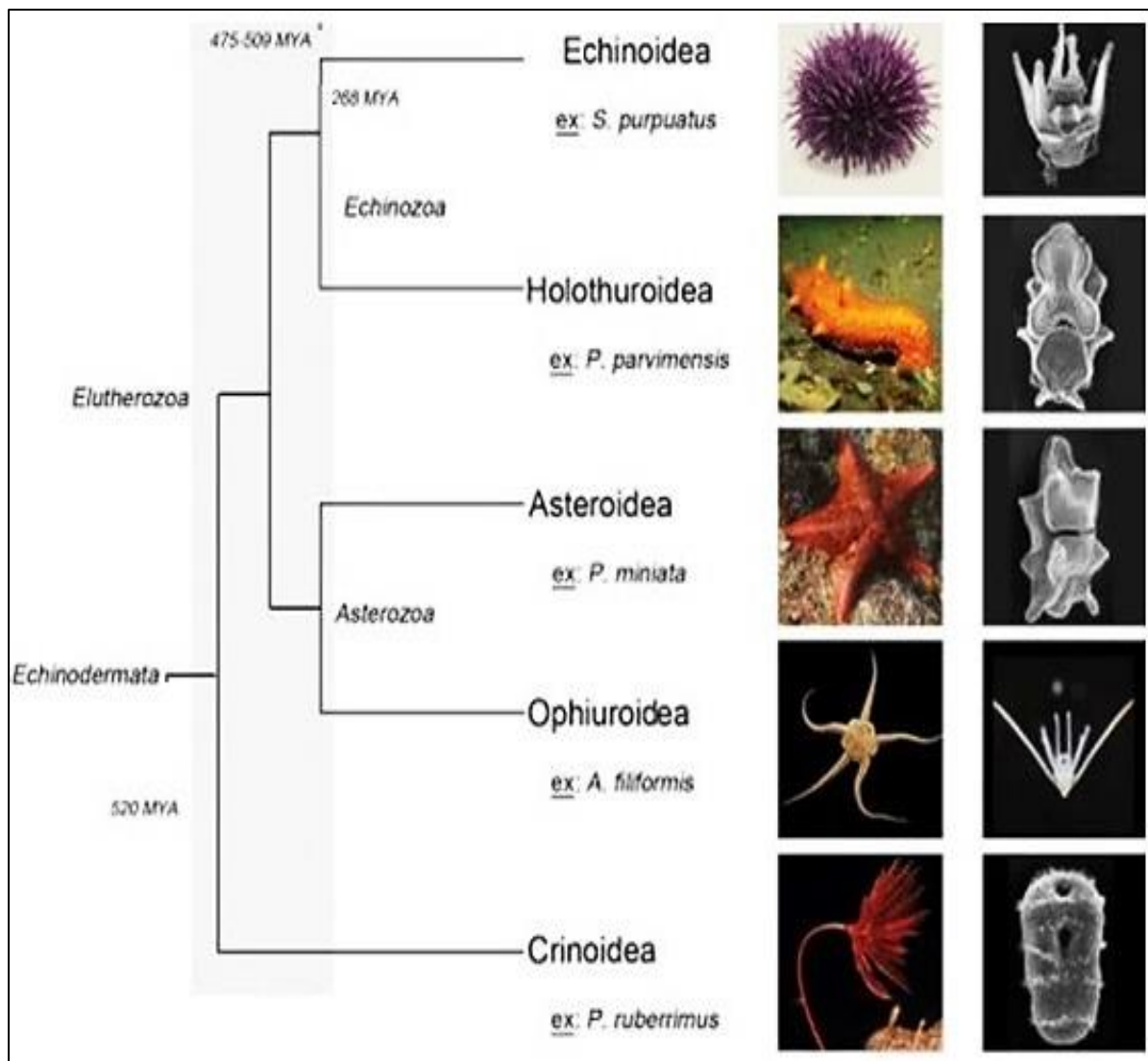
### **I.1.1. Généralités**

Les échinodermes sont un des plus anciens groupes du monde animal apparus dès le Cambrien, ils étaient alors asymétriques ou bilatéraux (Guille *et al.*, 1986). Le terme échinoderme provient du grec « *Echinodermata* » et signifie « peau épineuse » (Echino = épineux ; Derme = peau) (Lambert, 1997), ceci en raison des structures calcaires épineuses que l'on retrouve dans leur peau (Samyn *et al.*, 2006).

Les échinodermes comptent environ 7000 espèces, qui se distinguent par trois caractéristiques principales :

- Une symétrie pentalatrale parfois masquée par une symétrie bilatérale superposée (Guille *et al.*, 1986) ;
- Un squelette interne calcaire (squelette sous-épidermique formé de plaques ou spicules calcaires (Guille *et al.*, 1986) ;
- Un appareil aquifère appelé système ambulacraire formé d'un système de canaux internes connectés à des extensions externes, permettant principalement le mouvement et la nutrition des échinodermes (Guille *et al.*, 1986 ; Lambert, 1997 ; Samyn *et al.*, 2006).

Le phylum Echinodermata figure entre les invertébrés marins les plus connus, également le seul embranchement uniquement marin, réparti en cinq classes très différentes d'aspect : les étoiles de mer (Asterozoa), les ophiures (Ophiurozoa), les oursins de mer (Echinozoa), lys de mer (Crinozoa), et les holothuries ou "concombres de mer" (Holothurozoa) (Baker *et al.*, 1986 ; Guille *et al.*, 1986 ; Calva, 2002). Les cinq classes constituent des groupes monophylétiques. Les Crinozoa représentent la ligne évolutive la plus ancienne, les autres classes sont étroitement apparentées formant le sous-embranchement Eleutherozoa. Les Holothurozoa et les Echinozoa forment le groupe Echinozoa. Les liens de parenté entre les Asterozoa et les Ophiurozoa restent flous, mais les dernières études semblent indiquer que les astérides et les ophiures forment le groupe Asterozoa (Samyn *et al.*, 2006) (Figure 1).



**Figure 1.** Classification des échinodermes selon Cary et Hinman (2017 modifiée).

## **I.2. Les holothuries**

### **I.2.1. L'évolution des holothuroïdes**

Les holothuries remontent à l'ère l'ordovicien inférieur, et plus de 460 millions d'années d'évolution leur ont fallu pour arriver au stade de développement actuel (Gilliland, 1993 ; Reich, 1999 ; 2001). Les spicules endosquelettiques fossilisés représentent une base d'informations sur les fossiles d'échinodermes, ainsi que sur l'évolution des holothuroïdes (Croneis et Cormack, 1932 ; Frizzell et Exline, 1955 ; Gilliland, 1993). Selon Fell (1965), le premier "concombre de mer" aurait évolué de l'*Helicoplacus* au Cambrien (-541 à -485,4 millions d'années) ou de l'Eothurie à l'Ordovicien (-485,4 à -443,4 millions d'années). L'*Helicoplacus* est grêlé, recouvert de petites spicules en spirale, et possède des épines (sclérites spécialisés pointus). L'Eothurie est composée de spicules similaires à ceux des Ypsilothuriidae de Dactylochirotida. Plusieurs études se sont concentrées sur l'évolution des spicules des holothuries. Rowe (1969) a considéré que les spicules en forme de plaques et boutons se sont développés à partir de spicules en forme de rosettes et de bâtonnets, mais Deichmann (1958) et Levin (1999) ont déduit que les plaques et les boutons étaient la forme ancestrale des spicules (Figure 2).

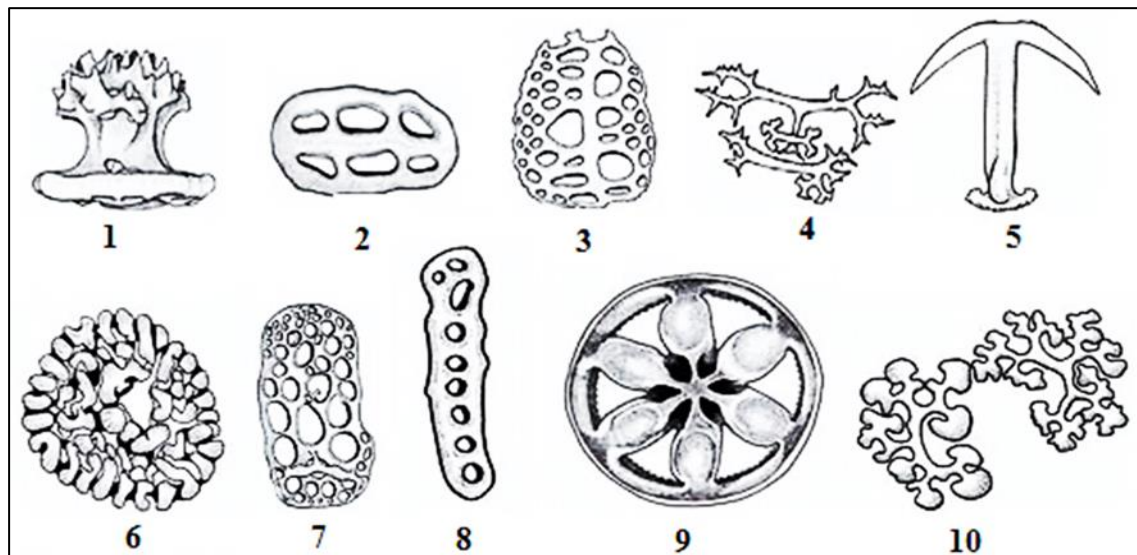
L'arrivée de nouvelles techniques d'analyses moléculaires, a facilité la compréhension de l'évolution des holothuries. Kerr *et al.* (2005) ont étudié la phylogénie moléculaire de huit espèces au sein de l'ordre des Holothuriida (anciennement appelé Aspidochirotida), les résultats ont confirmé l'augmentation de la complexité des spicules au fil du temps. Wen *et al.* (2011) ont étudié l'évolution des spicules de quinze espèces de Stichopodidae et d'Holothuroidea sur la base de séquences partielles du gène de l'ARNr 16S, les résultats ont montré que les plaques et les boutons étaient les formes ancestrales et ont ensuite évolué en bâtonnets et rosettes.

### **I.2.2. Identification des holothuries**

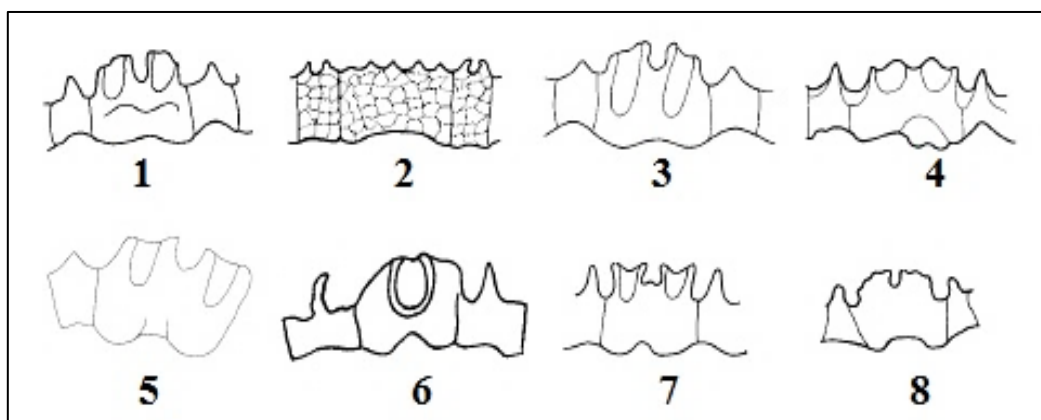
La description de caractères morphologiques externes et internes est largement utilisée dans la classification taxonomique des "concombres de mer" au niveau de l'ordre, de la famille, du genre et de l'espèce (Zetina *et al.*, 2002).

Les holothuries se distinguent des autres échinodermes par l'absence d'un squelette externe, et par la présence d'un endosquelette constitué de sclérites (Figure 2). Leur identification dépend presque entièrement de : la forme et la combinaison des spicules calcaires trouvés dans la paroi du corps et les podia, la forme de l'anneau calcaire (Figure 3), et la disposition des pieds ambulacraires (Rowe, 1969). Les sclérites soutiennent la paroi du corps des holothuries et leur tissus internes, elles

sont des caractéristiques taxonomiques importantes, et d'une grande utilité pour la systématique (Hampton, 1958 ; Rowe, 1969 ; Cutress, 1996 ; Zetina *et al.*, 2002). Elles représentent des millions de pièces calcaires microscopiques (environ vingt-et-un millions de spicules chez un seule individu), éparpillées dans leur couches dermiques (Samyn *et al.*, 2006, Mezali, 2008), et constituées d'un complexe isomorphe de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ), de magnésium (Mg), de carbonates ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) et d'éléments-traces (Hampton, 1958 ; Raup, 1966). Chez certaines espèces, les sclérites sont retrouvées dans pratiquement tous les organes, alors que chez d'autres espèces elles ne sont présentes que dans quelques parties du corps (Ahmed, 2009) (Figure 2).



**Figure 2.** Quelques types de sclérites (spicules) chez les holothuries : 1. Tourelles ; 2. Boucles ; 3. plaques perforées ; 4. Bâtonnets ; 5. Ancre ; 6. Corpuscule crépu ; 7. Plaque anchorale ; 8. Pseudo-bouton ; 9. Roues ; 10. Rosette (Rowe, 1969 ; Samyn *et al.*, 2006 modifiée).



**Figure 3.** Quelques types d'anneaux calcaires chez les holothuries : 1. *H. edulis* ; 2. *Pearsonothuria graeffei* ; 3. *Bohadschia vitiensis* ; 4. *B. argus* ; 5. *B. atra* ; 6. *H. flavomaculata* ; 7. *H. fuscogilva* ; 8. *H. leucospilota* (Cherbonnier et Féral, 1984 ; Cherbonnier, 1988 ; Massin *et al.*, 1999).

D'autres caractères anatomiques, tels que le nombre et la disposition des tentacules, la présence ou non de "dents anales", de papilles, de vésicules de Poli, et d'organes de Cuvier qui sont variables même au sein d'une même espèce, peuvent être utilisés mais de manière insuffisante pour la classification des espèces (Rowe, 1969). L'identification de nombreuses holothuries reste incertaine en raison de la grande variabilité morphologique intraspécifique (Zhao, 2015).

Avec l'augmentation de la surpêche ces dernières années, la classification des "concombres de mer" devient essentielle pour une meilleure gestion des populations naturelles. Les séquences d'ADN génomique mitochondrial (ADNmt) sont désormais utilisées pour identifier les espèces et déduire leurs relations phylogénétiques (Zhao, 2015).

### **I.2.3. Classification des Holothuroidea**

Cannon et Silver (1986 *in* Preston, 1993) proposèrent une classification basique des holothuries, basée sur des études réalisées sur des espèces d'holothuries d'Australie (Figure 1). Par la suite Kerr (2000) propose une classification basée principalement sur la forme de la couronne calcaire, des tentacules, ainsi que la présence ou non de certains organes, tel que les arbres respiratoires ou les muscles rétracteurs de la région orale. Il propose donc une description modifiée des différents ordres à partir de celle de Pawson (1982 *in* Kerr, 2000) et de Smiley (1994 *in* Kerr, 2000).

Les "concombres de mer" sont des animaux marins de l'embranchement des Echinodermata (Leuckart, 1854). Ils appartiennent tous à la classe des Holothuroidea, qui se distinguent par la présence ou l'absence des pieds ambulacraires, la forme des tentacules buccales (digités, dendritiques, pennés ou peltés), la présence ou l'absence de muscles rétracteurs oraux, d'arbres respiratoires, et de tubes de Cuvier (Hendler *et al.*, 1995).

Avec l'arrivée de nouvelles techniques tel que la phylogénie moléculaire, les anciennes classifications des Holothuroidea sont confirmées et parfois revues et corrigées. Leur classification acceptée par les bases de données taxinomiques modernes comme WoRMS, prend en compte les études phylogénétiques récentes publiées par Smirnov (2012) et Miller *et al.* (2017). Smirnov (2012) a publié une taxonomie des Holothuroidea après prise en compte des points de vue de Becher (1909) et Kerr et Kim (2001), ainsi que les résultats de recherches publiées précédemment (Smith, 1997 ; Lacey *et al.*, 2005) et non publiées (Solís-Marín, 2003) sur la phylogénétique moléculaire et la paléontologie (Reich, 2010a ; 2010b). Smirnov (2012) a proposé que le premier groupe (Synaptacea) comprend les holothuries avec des spicules en forme de roue et sans arbres respiratoires, et que le second groupe (Ho-

lothuriacea et Elpidiacea) comprennent les holothuries avec des arbres respiratoires absents. Il a également érigé un troisième groupe Mesothuriidae pour séparer les *Mesothuria* et *Zygothuria* des Synallactidae. Il a aussi établi quatre sous-familles au sein des Dendrochirotida.

Miller *et al.* (2017) ont publié la classification phylogénétique des Holothuroidea la plus récente. Les auteurs ont constaté que parmi les cinq ordres d'holothuries acceptées, trois sont non-monophylétiques. Miller *et al.* (2017) ont proposé de diviser la classe Holothuroidea en deux sous-classes : Apodida et Actinopoda. La sous-classe des Actinopoda est subdivisée en quatre ordres distincts : Elasipodida, Pneumonophora, Holothuriida et Neoholothuriida. Miller *et al.* (2017) ont aussi suggéré d'arrêter l'utilisation du terme Aspidochirotida qui est considéré comme un groupe paraphylétique (les descendants n'ont pas le même ancêtre), qui inclue les représentants de trois ordres (Molpadida, Dendrochirotida et Elasipodida), et d'ériger un nouvel ordre similaire à Pneumonophora, appelé Neoholothuriida. Ils ont aussi proposé de diviser les Neoholothuriida en quatre clades (groupes monophylétiques) majeurs bien soutenus : Dendrochirotida, Synallactida, Molpadida et Persiculida.

En résumé, la classe des Holothuroidea est divisée en deux sous-classes: Paractinopoda et Actinopoda (Ludwig, 1891; Miller *et al.*, 2017). Les Paractinopoda se composent d'un seul ordre Apodida. La sous-classe des Actinopodasont divisés en six ordres : Dendrochirotida, Elasipodida, Holothuriida, Molpadida, Persiculida, Synallactida (Miller *et al.*, 2017). L'ordre des Holothuriida se compose de deux familles : Holothuriidae et Mesothuriidae (Burmeister, 1837 ; Smirnov, 2012). La famille des Holothuriidae représente 11% de la diversité totale de la classe des Holothuroidea. Les Holothuriidae sont classées en cinq genres, *Actinopyga* (Bronn, 1860), *Bohadshia* (Jaeger, 1833), *Holothuria* (Linnaeus, 1767), *Labidodemas* (Selenka, 1867), et *Pearsonothuria* (Levin *et al.*, 1984) (in Mezali, 2008). Le genre *Holothuria* est actuellement reconnu pour inclure dix-huit sous-genres, présents dans la mer Méditerranée et l'Atlantique du Nord-Est. Les espèces appartenant au genre *Holothuria* présentent peu de caractéristiques morphologiques informatives sur le plan taxonomique, mais une grande diversité interspécifique (Clouse *et al.*, 2005).

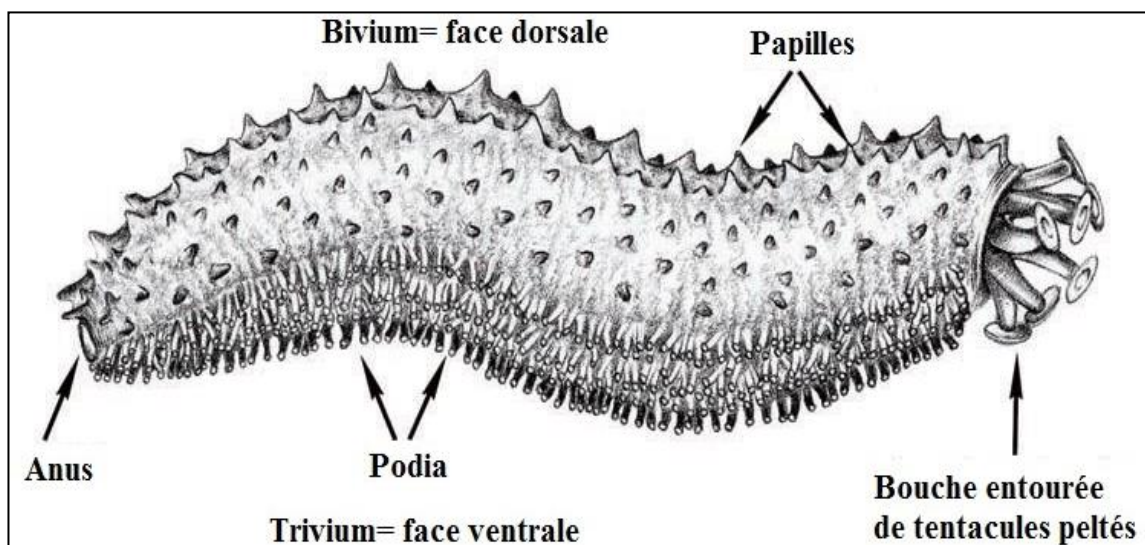
En Méditerranée, il existe environ trente-sept espèces d'holothuries appartenant neuf familles (Tortonese, 1965 ; Fischer *et al.*, 1987, Mezali *et al.*, sous presse). Les espèces les plus connues sont : *Holothuria tubulosa* (Gmelin, 1791), *Holothuria poli* (Delle Chiaje, 1824), *Holothuria stellati* (Delle Chiaje, 1824), *Holothuria mammata* (Grube 1840), *Holothuria sanctori* (Delle Chiaje, 1823),

*Holothuria forskali* (Delle Chiaje, 1823), et *Holothuria arguinensis* (Koehler et Vaney, 1906), une espèce invasive originaire de l'océan Atlantique rapporté par Mezali et Thandar (2014). Récemment, une espèce d'holothurie appartenant à l'ordre des Synallactida a été signalée par Benzait *et al.* (2020), il s'agit de l'holothurie royale *Parastichopus regalis* (Cuvier, 1817).

## **I.2.4. Morphologie et anatomie des holothuries**

### **I.2.4.1. Morphologie externe**

Les "concombres de mer" ont un corps cylindrique de taille variable (de quelques mm à plus de 2 m) (Flammang et Conand, 2004 ; Broszeit *et al.*, 2010), légèrement effilées aux extrémités, allongé le long d'un axe oral-aboral (Mezali, 2001 ; Samyn *et al.*, 2006) (Figure 4). Leur paroi (tégument) est généralement très coriace, épaisse, et parfois gluante ou cuirassée. Elle est constituée de plusieurs couches, de l'extérieur vers l'intérieur : une couche de cuticule fine, d'épiderme mince, de derme épais qui occupe la majeure partie de son épaisseur, et d'une couche musculaire circulaire qui est interrompue à cinq endroits par des paires de muscles longitudinaux. (Florkin et Schoffenibls, 1969 ; Nichols, 1969 ; Guille *et al.*, 1986 ; Tortonese et Vadon, 1987 ; Arnold et Birtles, 1989).

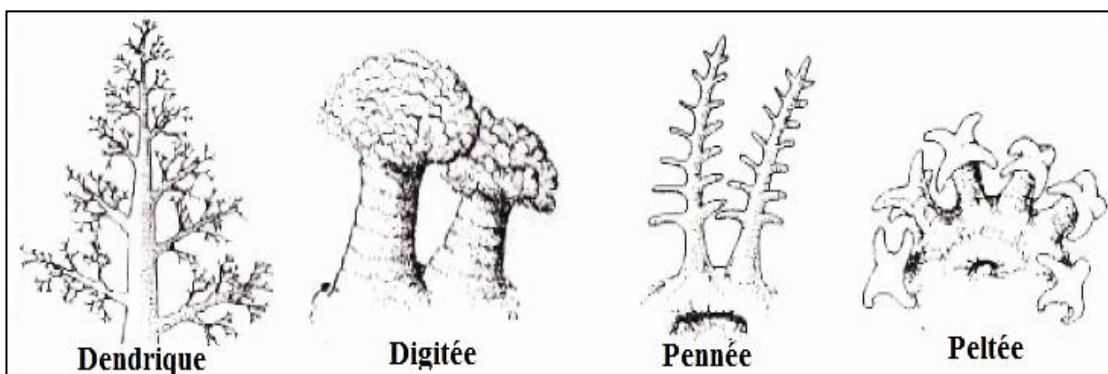


**Figure 4.** Morphologie externe d'une holothurie de l'ordre des Holothuriida (*in* Samyn *et al.*, 2006).

Les "concombres de mer" présentent souvent une symétrie bilatérale masquée par symétrie radiaire pentamérique, soulignée le long de cinq radius et rendus visibles par une ou plusieurs rangées de podia (Guille *et al.*, 1986 ; Tortonese et Vadon, 1987). Cette disposition n'est parfois pas visible pour certaines espèces d'holothuries, en particulier chez les Holothuriida et les Dendochirotida (Clark et

Rowe, 1971). La face ventrale des "concombres de mer" appelée trivium (Figure 4), est caractérisée par la présence de trois radius légèrement aplatis, elle est couverte de nombreux pieds ambulacraires (ou podia) qui se terminent par une ventouse, ces structures permettent à l'animal de se fixer et de se déplacer sur le substrat. Le nombre de pieds ambulacraires augmente avec l'âge de l'holothurie, mais a peu d'importance taxonomique (Clark, 1922). La face dorsale des "concombres de mer" est appelée bivium (Figure 3), elle est caractérisée par la présence de deux radius, et de podia sans ventouse appelés papilles (Tortonese et Vadon, 1987 ; Samyn *et al.*, 2006 ; Ahmed, 2009). Les papilles sont des podia spécialisées pour la perception sensorielle, leur nombre et leur proéminence varient avec l'âge du spécimen, ils augmentent à la maturité et diminuent pendant la sénescence (Figure 4).

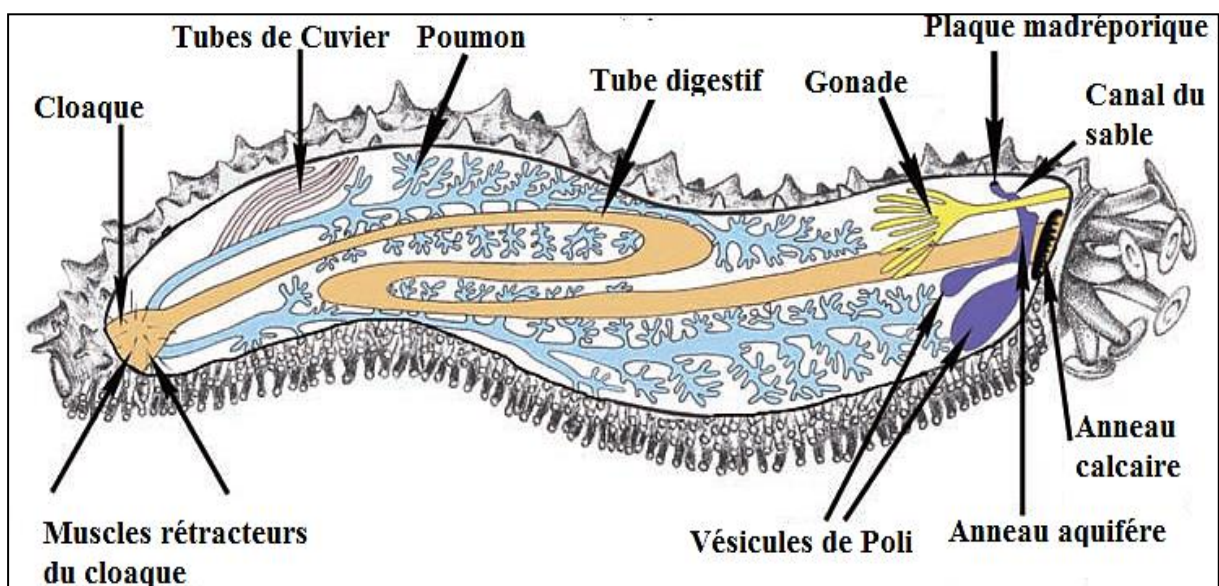
La bouche et l'anus des holothuries débouchent au niveau des extrémités opposées du corps (Florkin et Schoffenibls, 1969 ; Guille *et al.*, 1986 ; Pawson *et al.*, 2010). La bouche est entourée d'un anneau de huit à trente tentacules rétractables, des podia très développés qui servent essentiellement à l'ingestion des particules alimentaires. La structure des tentacules (Figure 5) diffère énormément entre les groupes d'holothuries, ce qui les rend utiles pour la séparation au niveau de la sous-classe et de l'ordre. Les tentacules prennent plusieurs formes : dendritiques, digitées, pennées, et peltées (Lambert, 1997). Cette modification de la forme et de la structure des tentacules est liée à leur mode d'alimentation, soit "suspensivores" ou "deposit-feeders". Les "suspensivores" ont des tentacules très ramifiés (dendritiques), constitués de nombreuses petites structures portant chacune un groupe de branches en forme de bouclier (Pawson *et al.*, 2010), capable de capturer les particules organiques en suspension dans les eaux en mouvement. Quant au "deposit-feeders", ils ont des tentacules peltés adaptés au broutage du substrat en masse (Rowe, 1969) (Figure 5). La position de la bouche dépend également des habitudes alimentaires : les suspensivores ont leur bouche orientée vers le haut de la face dorsale, alors que les "deposit-feeders" leur bouche est sur la face ventral.



**Figure 5.** Les différentes formes de tentacules chez les "concombres de mer" (Lambert, 1997, modifiée).

### I.2.4.2. Anatomie interne

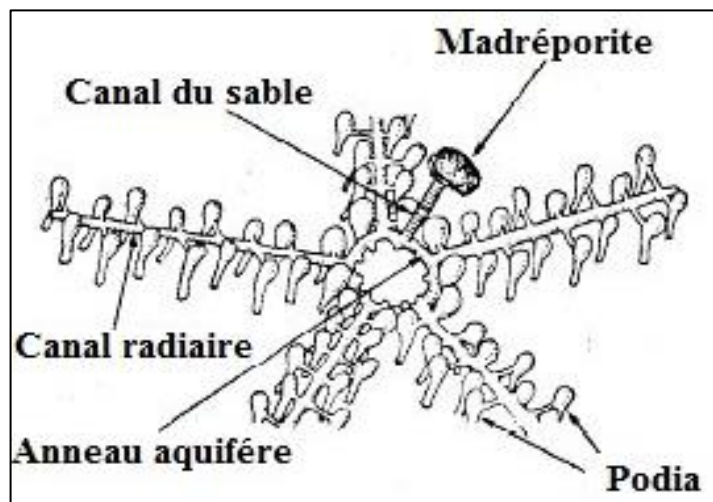
L'anatomie interne générale des "concombres de mer" est illustrée dans la figure 6. La bouche des holothuries mène au pharynx qui est situé au centre du bulbe aquapharyngien qui traverse l'anneau calcaire ainsi que l'anneau vasculaire (Khanna et Yadav, 2005). La couronne calcaire péripharyngienne est formée de cinq pièces radiales et de cinq pièces interradiales macroscopiques qui soutiennent le pharynx, l'anneau nerveux et l'anneau aquifère (Borradail *et al.*, 1963) (Figure 6). Ce dernier est constitué de cinq bandes musculaires longitudinales en position radiale, antérieurement attachés aux pièces radiales de la couronne calcaire et postérieurement attachés au cloaque via ses muscles rétracteurs (Guille *et al.*, 1986 ; Samyn *et al.*, 2006). Les muscles longitudinaux ainsi que les muscles circulaires du corps permettent au "concombre de mer" de se contracter et de se dilater. L'anneau calcaire sert également de point d'insertion pour les muscles longitudinaux et les muscles rétracteurs lorsqu'ils sont présents (Miller et Pawson, 1984), où ils sont fixés spécifiquement au niveau des plaques radiales qui sont plus grandes que les plaques interradiales (Arnold et Birtles, 1989) (Figure 6). Chez les dendrochirotes, les muscles longitudinaux se détachent antérieurement de la paroi avant de s'accrocher à la couronne calcaire. Ceci permet à la bouche et aux tentacules qui l'entourent et à une partie de la peau appelé introvert, de facilement se rétracter dans la cavité générale ou cœlome (Guille *et al.*, 1986 ; Samyn *et al.*, 2006). Le cœlome de l'holothurie est une vaste cavité remplie d'un liquide appelé liquide cœlomique (similaire à l'eau de mer) dans lequel baignent le tube digestif, les arbres respiratoires et les gonades (Figure 6).



**Figure 6.** Anatomie interne d'une holothurie de l'ordre des Holothuriida montrant les principaux organes (*in Samyn et al.*, 2006).

### I.2.4.3. Système aquifère

Les holothuries sont pourvues d'un système aquifère ou ambulacraire à symétrie pentaradiale. Le système aquifère est un réseau complexe de canaux remplis du liquide cœlomique, communiquant avec l'extérieur par la madréporite (Tortonese et Vadon, 1987). L'anneau aquifère à l'arrière de l'anneau calcaire dégage cinq canaux radiaux qui se connectent à deux appendices : les vésicules Poli et le canal de sable. Le canal de sable est un court tube calcaire qui relie la madréporite au canal radial (Figure 7). Il s'ouvre sur la surface médio-dorsale à travers un hydropore. A l'âge adulte, la connexion avec la surface est perdue à l'exception de quelques holothuries, en particulier de l'ordre Elaspodida (Miller et Pawson, 1984 ; Khanna et Yadav, 2005). La terminaison madréporite constitue un sac de forme ronde à allongée qui se trouve dans le cœlome. La position interne de la madréporite est caractéristique de la plupart des holothuries, unique ou au contraire multiples (Figure 7). Les madréporites débouchent dans la cavité de l'holothurie, chacun à l'extrémité d'un ou de multiples canaux hydrophores (Miller et Pawson, 1984 ; Guille *et al.*, 1986). La madréporite fonctionne comme régulateur de pression pour le canal radial par l'afflux ou la sortie d'eau à travers les pores de la plaque madréporite (Miller et Pawson, 1984) (Figure 7).

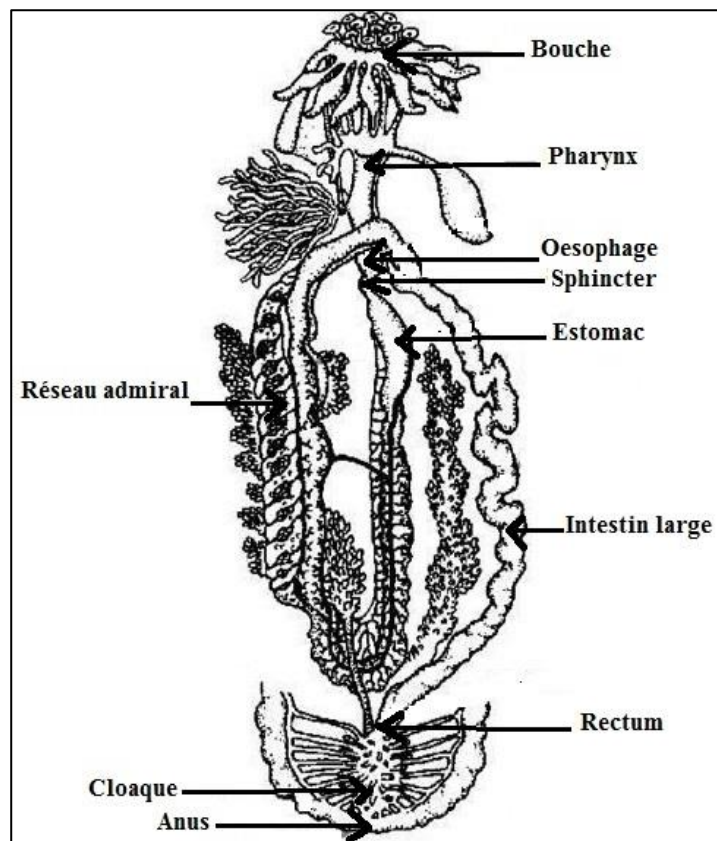


**Figure 7.** Schéma du système aquifère chez les échinodermes (Tortonese et Vadon, 1987).

### I.2.4.4. Système digestif

Le système digestif des holothuries est caractérisé par la présence d'un tube digestif long qui fait souvent deux à trois fois la taille du corps. Il occupe la majeure partie de la cavité générale et fait un tour de spire complet, cette longueur augmente la zone d'absorption des nutriments (Feral et Massin, 1982 ; Lambert, 1997 ; Samyn *et al.*, 2006) (Figure 8). Il est subdivisé en trois parties en fonction de leurs fonctions physiologiques respectives (Massin et Jangoux, 1976 ; Mezali, 1998).

Le tube digestif s'ouvre antérieurement au niveau de la bouche arrondie, entourée d'une couronne de tentacules qui se trouve dans le centre de la membrane buccale (péristome) (Feral et Massin, 1982 ; Samyn *et al.*, 2006). La bouche est suivie du pharynx, de l'œsophage et du sphincter, cette première partie représente la zone de stockage du sable. La deuxième partie dite zone digestive correspond au segment digestif entouré par le réseau admirable, composé de la région stomacale, l'intestin antérieur descendant, et l'intestin antérieur ascendant. La partie antérieure de l'intestin est suspendue à la paroi médio-dorsale du corps de l'holothurie par des mésentères ou des brides (Massin et Jangoux, 1976 ; Lambert, 1997 ; Mezali, 1998 ; Samyn *et al.*, 2006). La dernière partie dite zone d'élimination se compose de la quasi-totalité du deuxième tronçon digestif descendant : l'intestin postérieur (rectum), le cloaque et se termine postérieurement au niveau de l'anus (Massin et Jangoux, 1976 ; Mezali, 1998 ; Samyn *et al.*, 2006) (Figure 8). La partie postérieure de l'intestin au côté gauche est liée à la paroi ventrale du corps par des mésentères. La position de ces mésentères varie dans différents groupes de "concombres de mer", et cette disposition est un caractère important dans la classification des holothuries (Lambert, 1997) (Figure 8). Le tractus digestif peut avoir d'autres fonctions que la digestion et l'absorption, il a la capacité de stocker les lipides et les protéines, qui seront utilisés par l'animal durant l'hiver ou lors de la période de reproduction (Massin, 1982).

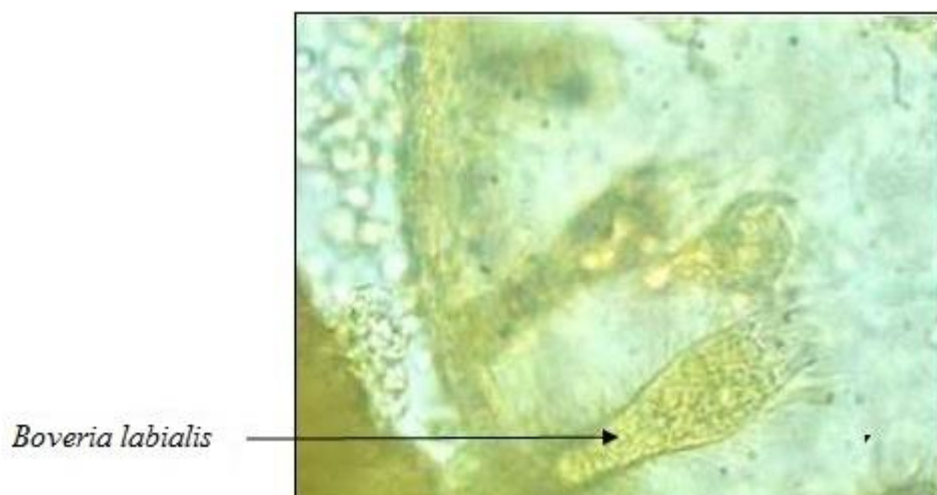


**Figure 8.** Schéma du système digestif des "concombres de mer" (Cuénot, 1948 modifié).

#### I.2.4.5. Système respiratoire

Le système respiratoire des holothuries consiste en deux arbres respiratoires appelés improprement "poumons", ils sont arborescents, ramifiés, et creux (Feral et Massin, 1982 ; Guille *et al.*, 1986 ; Mezali, 1998 ; Samyn *et al.*, 2006) (Figure 6). Ces organes se trouvent à l'intérieur de la cavité cœlomique de chaque côté de l'intestin, leur base est connectée au cloaque (Samyn *et al.*, 2006). Les arbres respiratoires droit et gauche sont des évaginations très ramifiées de la paroi du cloaque s'étendant le long de la cavité corporelle dans le cœlome périveriscéral et sont entourés de fluide cœlomique. Les arbres respiratoires sont ancrés à la paroi corporelle par de fins fils de tissu conjonctif et l'arbre respiratoire gauche est intimement associé à l'intestin (Slater et Chen, 2015). Les "concombres de mer" respirent en élargissant le cloaque pour aspirer l'eau oxygénée à travers l'anus. Le sphincter postérieur se ferme, puis les muscles cloacaux se contractent pour forcer l'eau vers les arbres respiratoires. L'oxygène est transféré à travers la membrane mince dans les fluides de la cavité cœlomique. Lorsque l'oxygène est épuisé, la paroi principale du corps se contracte pour évacuer l'eau des arbres respiratoires (Guille *et al.*, 1986 ; Samyn *et al.*, 2006).

Les arbres respiratoires jouent un rôle important dans la régulation de la consommation d'oxygène, la statique des holothuries, et sont lieu d'élection pour la phagocytose éliminatoire (Feral et Massin, 1982). En plus des arbres respiratoires, toute la peau du "concombre de mer" a une fonction respiratoire. La peau est capable de remplir pleinement toutes les fonctions respiratoires en cas d'éviscération des arbres respiratoires (Slater et Chen, 2015). Parfois des protozoaires symbiotiques ciliés (*Boveria labialis*) se trouvent à l'intérieur des arbres respiratoires (Figure 9).



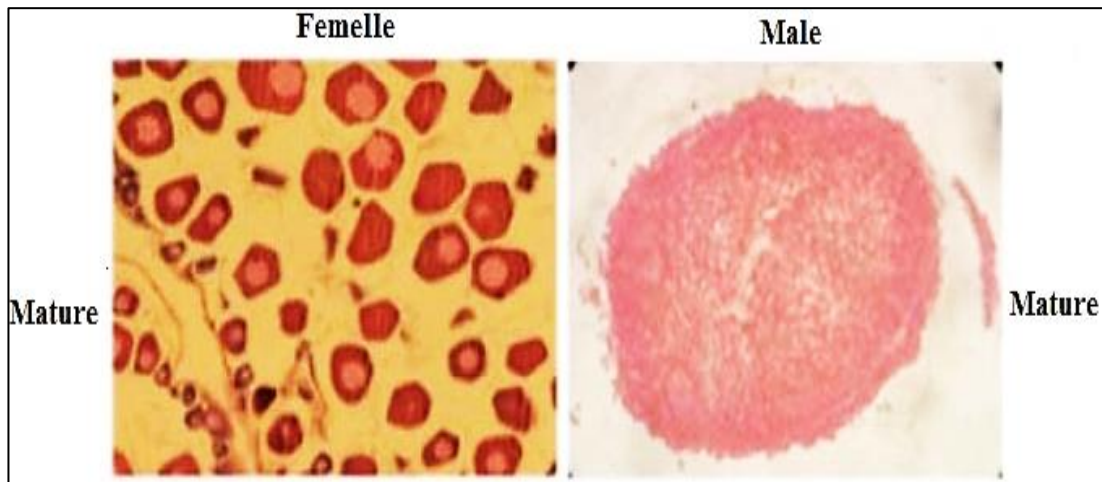
**Figure 9.** Le protozoaire endosymbiote *Boveria labialis* à l'intérieur de l'arbre respiratoire d'une holothurie (*in* Slater et Chen, 2015)

#### **I.2.4.6. Système nerveux**

Le système nerveux des holothuries est constitué comme chez tous autres échinodermes d'un anneau nerveux péri-stomacal, rond ou pentagonal, duquel partent cinq nerfs radiaux qui innervent tout le corps et notamment les aires ambulacraires. Les organes sensoriels des holothuries sont représentés par des cellules nerveuses intraépidermiques, réparties sur la surface du corps (Cauliet *et al.*, 2011). Les cellules nerveuses et de support qui aident à coordonner les signaux sensoriels et à contrôler les muscles et les glandes de l'animal (Mitu *et al.*, 2017). Il existe aussi un plexus nerveux dans le derme et des récepteurs chimiosensoriels et mécanosensoriels qui sont présents dans l'épiderme des holothuries. Une étude récente réalisée par Liu *et al.* (2020), a démontré que les "concombres de mer" pourraient avoir des photorécepteurs spécifiques pour percevoir l'intensité et la direction de la lumière.

#### **I.2.4.7. Appareil reproducteur**

Les holothuries sont généralement gonochoriques, certaines espèces comportent des individus hermaphrodites (Herrero-Pérezrul, 1994 ; Purcell *et al.*, 2016). Il n'y a cependant pas de dimorphisme sexuel, seul l'examen microscopique des gonades permet de reconnaître les mâles des femelles (Hawaida *et al.*, 2004 ; Mah *et al.*, 2015) (Figure 10). L'appareil reproducteur est constitué d'une seule gonade fixée à la paroi arrière du corps et formée par une ou deux touffes de tubes, ramifiés ou non. Un simple gonoducte s'étale du mésentère dorsal au gonopore, il est situé sur la ligne médiane dorsale avant l'anneau tentaculaire (Ruppert et Barnes, 1994 ; Hender *et al.*, 1995 ; Samyn *et al.*, 2006 ; Purcell *et al.*, 2016) (Figure 6). Lors de la maturation, la couche germinative de la gonade subit des changements marqués et s'épaissit, ce qui permet une augmentation significative de la surface de développement des gamètes (Costello, 1985 ; Cameron et Fankboner, 1986). La morphologie des gonades diffère entre les familles, et les espèces de la même famille par : la forme (tubules, nodules, sacs), la taille, le degré de ramification, l'épaisseur, et le stade de développement (Smiley, 1988 ; Hamel et Mercier, 1996 ; Sewell *et al.*, 1997 ; Foglietta *et al.*, 2004).



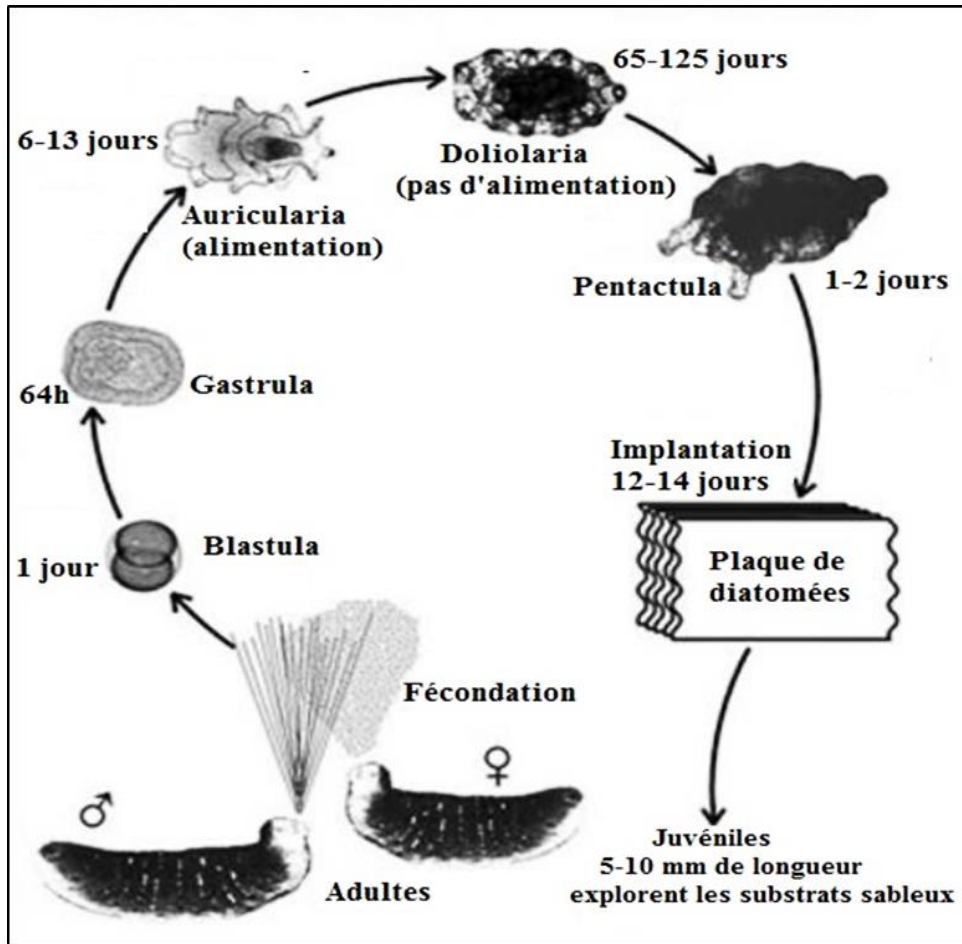
**Figure 10.** Micrographie des gonades femelles et mâles matures de *Holothuria notabilis* (Razafimandimby, 2008 modifiée).

## I.2.5. Reproduction et cycle de vie chez les holothuries

### I.2.5.1. Reproduction sexuée

Les holothuries peuvent avoir un cycle de reproduction annuel, bisannuel, voire ne pas avoir de cycle de reproduction particulier (Hamel et Mercier, 1996 ; Herrero-Pérezrul et *al.*, 1999 ; Shiell et Uthicke, 2006).

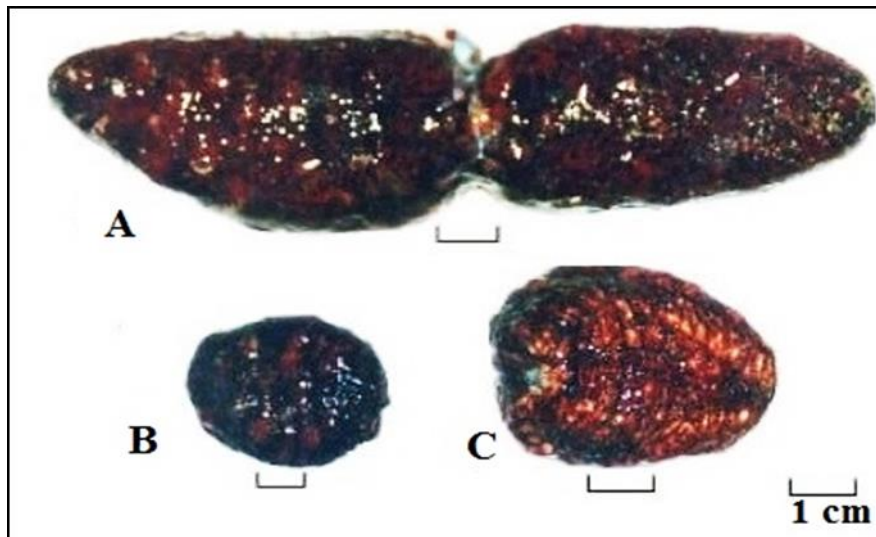
Pour la reproduction sexuée, les holothuries sont des reproducteurs à la volée (les gamètes matures sont rejetés dans l'eau de mer), où la femelle produira des ovocytes qui seront libérés dans la colonne d'eau, puis fécondés à l'extérieur par des spermatozoïdes mobiles libérés par un mâle. Lorsque l'œuf est fécondé et éclot, la minuscule larve planctonique dérive avec les courants océaniques. Elle finira par s'installer sur le fond marin et se développera en adulte. La réussite de la reproduction dépend de deux facteurs : la densité d'individus adultes (nombre important d'ovocytes et de spermatozoïdes), des courants marins essentiels au transport des gamètes (Toral-Granda, 2006a). Après fécondation, l'œuf fertilisé donne naissance à une larve nageuse appelée blastula après les premières 24 heures, à partir de ce stade une gastrula éclos après 64 heures, puis une larve *auricularia* qui se nourrit de microalgues éclos après 6 à 13 jours environ. Cette dernière se métamorphose à son tour en une larve *doliolaria* au bout de 65 à 125 jours, puis en une larve *pentacula* environ deux jours après le stade *doliolaria*. Les larves restent pélagiques avant de se fixer sur divers substrats lorsqu'ils atteignent le stade larvaire final (Cameron et Frankboner, 1989 ; Toral-Granda, 2006a) (Figure 10). La grande majorité des familles (environ vingt-deux familles), n'ont néanmoins pas de stade *auricularia*, leur développement passe du stade *doliolaria* au juvénile (Samyn et *al.*, 2006).



**Figure 11.** Reproduction sexuée et cycle de vie général des "concombres de mer" (Cameron et Frankbner, 1989 modifiée).

### I.2.5.2. Reproduction asexuée

Il existe plusieurs études sur la reproduction asexuée autonome des holothuries, la seule forme de reproduction asexuée rapportée pour ces organismes est la fission, destinée à la production de nouveaux individus, elle ne se produit que chez les Holothuriida et Dendrochirotida (Giese *et al.*, 1991 ; Mladenov et Campbell, 1996). La scission des holothuries se produit en trois étapes, l'animal est fixé au substrat à l'avant et à l'arrière par l'intermédiaire des pieds ambulacraires, les extrémités commencent à se déplacer doucement dans le sens opposé, le milieu du corps commence à se rétrécir et s'amincit jusqu'à ce qu'il se casse. Les deux parties séparées restent reliées par un petit résidu, qui se décompose ultérieurement (Giese *et al.*, 1991) (Figure 12).



**Figure 12.** *Holothuria arenicola* induisant une fission : **A.** les parties antérieure et postérieure s'étirent avant de se fendre ; **B.** la partie antérieure après la fission ; **C.** la partie postérieure après la fission (Abdel Razek *et al.*, 2007 modifiée).

### I.2.6. Alimentation des holothuries

Selon la physiologie alimentaire, il convient de distinguer deux grands groupes d'holothuries, les "suspensivores" ou les "suspension feeders" et "dépositivores" ou "deposit-feeders" (Robert et Bryce, 1982 ; Massin et Doumen, 1986 ; Berthon, 1987 ; Coulon *et al.*, 1991 ; Coulon et Jangoux, 1993).

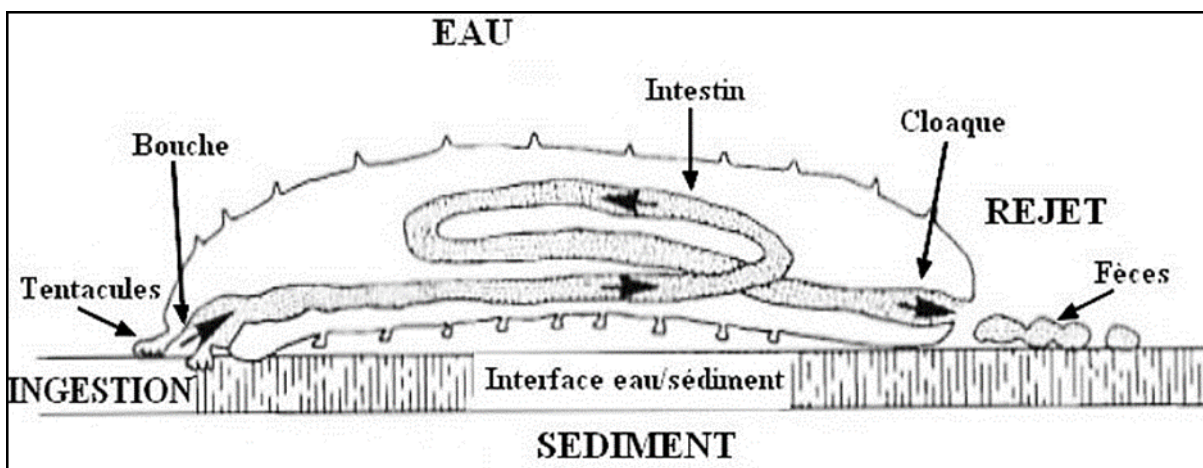
#### I.2.6.1. Les "suspension-feeders"

Les holothuries "suspension-feeders" ont des tentacules dendritiques et périto-dendritiques, avec lesquelles elles capturent les particules immobiles ou peu mobiles (Massin, 1982 ; Billett, 1991). En eau côtière, les holothuries "suspension-feeders" capturent le phytoplancton, le zooplancton, les protozoaires et la matière organique en suspension (Massin, 1982). Les juvéniles des holothuries peuvent être des "suspension-feeders" (Billett, 1991).

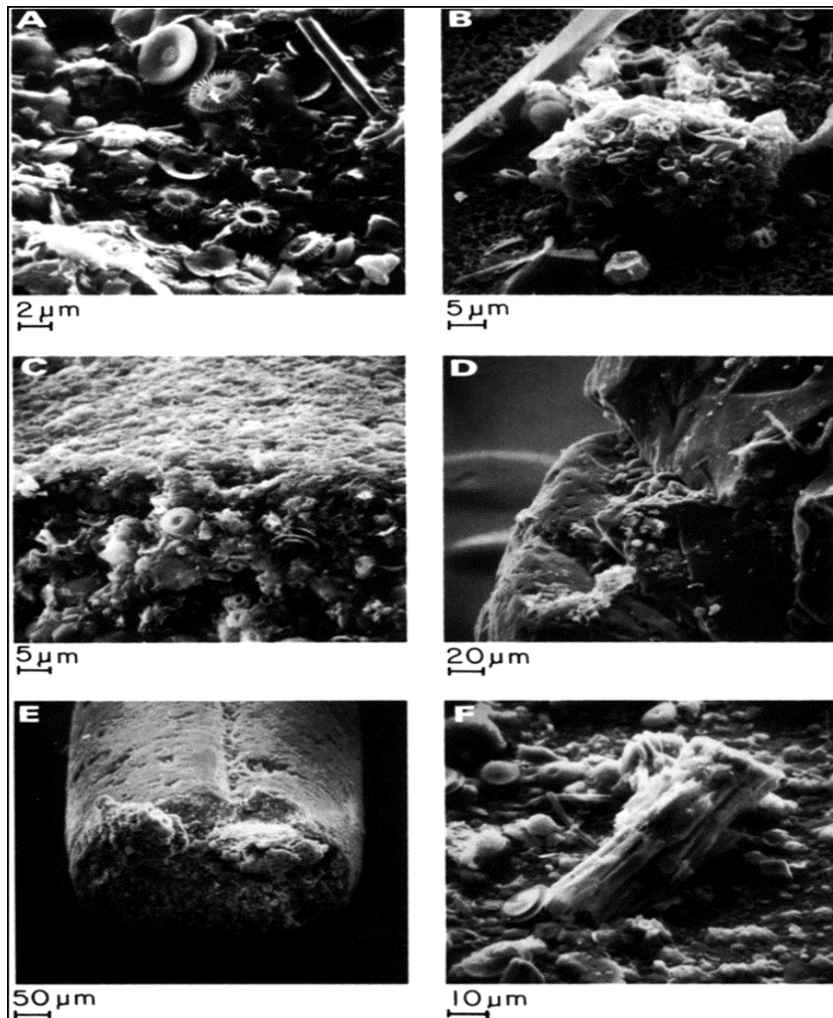
#### I.2.6.2. Les "deposit-feeders"

La plupart des "concombres de mer" sont dépositivores (Roberts *et al.*, 2000). La matière fécale d'holothuries ou d'autres animaux, les débris inorganiques (débris de corail, restes de mollusques gastéropodes, les foraminifères, et restes inorganiques du benthos), les débris organiques (feuilles de phanérogames marines, algues, et débris d'animaux marins en dégradation), les microorganismes

(bactéries, diatomées, protozoaires, et cyanobactéries) sont leurs principales sources d'alimentation (Massin, 1982 ; Moriarty, 1982; Amon et Herndl, 1991 ; Ramofafia *et al.*, 1997 ; Uthicke, 1999; Michio *et al.*, 2003) (Figure 13). Le taux d'assimilation de la matière organique serait relativement important chez les holothuries tropicales (environ 50 %) (Guille *et al.*, 1986). Les "concombres de mer" ingèrent de grandes quantités de sédiment, la plupart du temps en se déplaçant lentement sur le fond marin (Guille *et al.*, 1986). Les tentacules qui entourent leur bouche sont utilisés pour ingérer des particules alimentaires raclées à partir des cinq premiers millimètres de sédiments par des procédés mécaniques et adhésifs (Mezali, 1998 ; Roberts *et al.*, 2000 ; Chekaba, 2002). La sélection active des particules par taille et/ou le contenu organique a été suggéré précédemment pour les holothuries (Conand, 1990 ; 1994 ; Hudson *et al.*, 2005 ; Slater *et al.*, 2009 ; Zamora et Jeffs, 2011), avec un degré différent de sélectivité en fonction des espèces (Uthicke, 1999). Les choix alimentaires sont censés être entraîné par : la sélectivité granulométrique pour des particules plus fines ou plus grandes que la moyenne du sédiment environnant (Roberts, 1979 ; Franklin, 1980 ; Roberts et Bryce, 1982 ; Mezali *et al.*, 2003 ; Mezali, 2004b ; 2008 ; Slater *et al.*, 2011 ; Zamora et Jeffs, 2011). La capacité chémosensoriel est couplé avec le piégeage préférentiel dans les tentacules des particules riches en matières organiques (Conand, 1994 ; Slater *et al.*, 2011 ; Zamora et Jeffs, 2011). La taille des particules ingérées varie selon les espèces et les localités, parfois des sédiments de granulométries différentes peuvent être consommés par la même espèce (Guille *et al.*, 1986). Selon les espèces d'holothuries et les biotopes qu'elles fréquentent, le temps de transit digestif est de 2 à 36 heures (Figure 13).



**Figure 13.** Schéma montrant le transit digestif d'une holothurie (*in* Conand, 1994 modifiée par Belbachir, 2012).



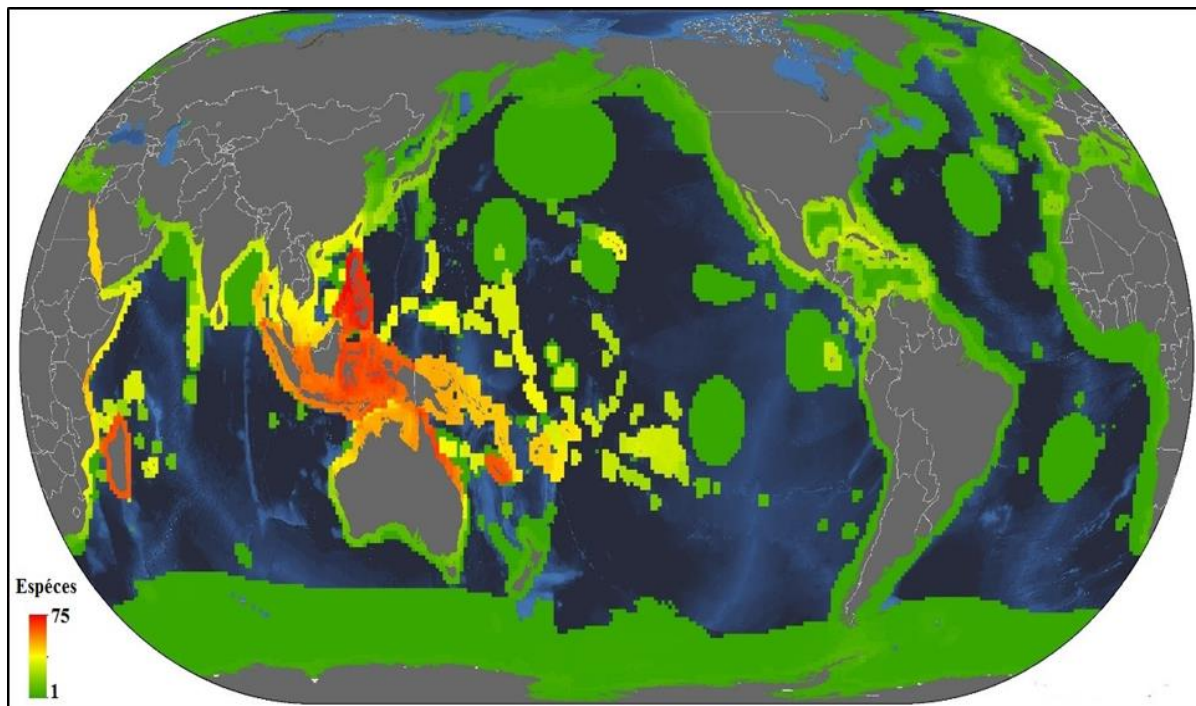
**Figure 14.** Observation au microscope électronique à balayage des contenus digestifs des holothuries. **A.** Nanoplancton ; **B.** Agglomérat organo-minéral ; **C.** Pelote fécale ; **D.** Quartz encrouté par la matière organique ; **E.** Pelote fécale d'un bivalve ; **F.** Débris d'origine végétale (Khripounoff et Sibuet, 1980).

### I.2.7. Habitat et distribution des holothuries

Les "concombres de mer" se trouvent dans l'ensemble des milieux marins, des mers intertidales de faibles profondeurs aux profondeurs abyssales. Beaucoup d'entre eux vivent dans les eaux côtières peu profondes où ils sont facilement accessibles aux pêcheurs (Bakus et Green, 1974 ; Pawson, 1977) (Figure 15). Ils peuvent être benthiques ou pélagiques (formes abyssales surtout), la plus grande densité d'espèces se trouve dans les océans Indien et Pacifique

Ouest (Toral-Granda, 2006a). La plupart des espèces sont sédentaires ou légèrement actif, mais certains sont capables de nager pour de courtes périodes, d'autre formes très rares sont devenues pélagiques (Florkin et Schoffenibls, 1969). Les holothuries peuvent vivre dans le sable, la vase, les rochers et les platiers, souvent en association avec des algues, des coraux et des zostères dans les

eaux chaudes et peu profondes (Higgins, 2000 ; Toral-Granda,2006 ; Ridzwan, 2007).



**Figure 15.** Distribution mondiale des espèces de "concombres de mer" (Jenkins et Van Houtan, 2016). Le nombre d'espèce par région varie entre 1 (couleur verte) à 75 (couleur orange) espèces, avec une grande diversité dans l'océan Indo-Pacifique.

La densité des population et la distribution spatiale des "concombres de mer" sont liées à plusieurs facteurs, la profondeur (Mercier *et al.*, 2000a ; Woodby *et al.*, 2000), la nature du substrat (Young et Chia, 1982; Hamel et Mercier, 1996 ; Mercier *et al.*, 2000a,b ; Woodby *et al.*, 2000; Slater et Jeffs, 2010; Dissanayake et Stefansson, 2012), la disponibilité alimentaire (Navarro *et al.*, 2013, 2014 ; van Dam-Bates *et al.*, 2016), l'intensité lumineuse, les fluctuations de température et de salinité (Navarro *et al.*, 2014), ainsi que la pression des prédateurs (Slater et Jeffs, 2010). Il a également été démontré que l'hydrodynamisme influence la distribution des "concombres de mer" suspension-feeders, qui dépendent des courants marins pour se nourrir (Fankboner, 1978 ; McKenzie, 1991). De nombreuses larves de "concombres de mer" ont un comportement diurne qui les rend moins vulnérables aux prédateurs en se terrant dans le sable, alors que les adultes peuvent être diurnes ou nocturnes, les diurnes sont plus actifs le jour et se cachent dans le sable ou recherchent des fissures pour passer la nuit. Les nocturnes peuvent se cacher ou se terrer la journée et être actifs la nuit (Toral-Granda,2006a). En Méditerranée, les holothuries de l'ordre des Holothuriida sont les principaux représentants des macrofaunes benthiques de l'habitat de *Posidonia oceanica* de la méditerranée

(Mezali *et al.*, 2014), et contribuent au recyclage des matières organiques (Francour, 1990 ; Mezali, 1998 ; 2008).

## **I.2.8. Rôle écologique et biologique des holothuries**

### **I.2.8.1. Bioturbation**

L'alimentation et la locomotion des holothuries entraînent un remaniement continu des particules de la couche supérieure des sédiments marins, ce qui affecte leur dynamique et permet l'enrichissement organique du substrat par les matières fécales (Sibuet et Lawrence, 1981 ; Sibuet, 1987 ; Uthicke, 1999 ; Roberts *et al.*, 2000 ; Michio *et al.*, 2003). Les holothuries jouent aussi un rôle important dans la réoxygénation des fonds marins. Lorsqu'ils s'enfouissent partiellement ou totalement sous la surface des sédiments, ils déplacent au moins leur propre corps en volume de sédiments inférieurs vers la surface, où ils interagissent avec l'oxygène de la colonne d'eau (Clouse, 1997, Mercier *et al.*, 1999 ; Purcell, 2004a ; Solan *et al.*, 2004 ; Toral-Granda, 2006a). La bioturbation participe à l'amélioration de la biodiversité de la faune et de la biomasse de la flore (Solan *et al.*, 2004) (Figure 16).



**Figure 16.** Bioturbation des sédiments par l'holothuride *Bohadschia argus* (Purcell *et al.*, 2016 modifiée).

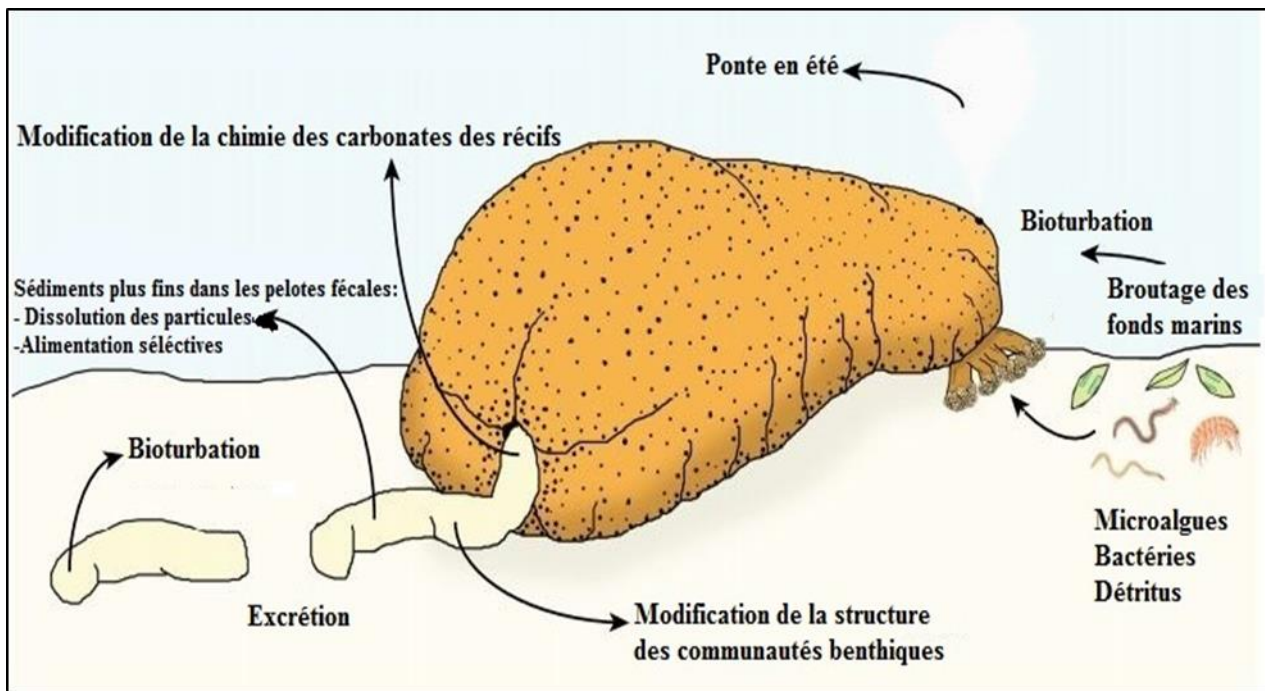
### **I.2.8.2. Nettoyage des sédiments**

Les "concombres de mer" sont essentiels au nettoyage des fonds marins, ils broient la matière organique en composés plus fins, et ils facilitent ainsi la décomposition bactérienne (MacTavish *et al.*, 2012). Les sédiments excrétés par les holothuries sont généralement moins riches en matières organiques que ceux qu'ils ont ingérés (Mercier *et al.*, 1999 ; Uthicke, 1999 ; Michio *et al.*, 2003 ; Paltzat *et al.*, 2008 ; MacTavish *et al.*, 2012 ; Yuan *et al.*, 2015). Le volume de sédiments ingéré par chaque holothurie a été estimé à 9 à 82 kg/an (Bonham et Held, 1963 ; Hammond, 1982 ; Coulon et Janguoux, 1993 ; Uthicke, 1999 ; Mangion *et al.*, 2004). Le nettoyage des fonds marins par les "concombres de mer" empêche l'accumulation de matières organiques, contribue à la régénération des sédiments de surface, et aide à contrôler les agents pathogènes (Toral-Granda, 2006a ; Purcell *et al.*, 2016).

### **I.2.8.3. Recyclage des nutriments**

La plupart des espèces commerciales de "concombres de mer" sont détritivores, et jouent un rôle clé au sein de l'écosystème marin par leurs fonctions, notamment dans le recyclage des nutriments (Uthicke et Klumpp, 1998 ; Uthicke, 1999 ; 2001a). Les principaux produits d'excrétion des holothuries sont l'ammonium, de petites quantités de phosphate, ainsi que des rejets d'azote et de phosphore organiques (Pomeroy et Kuenzler, 1969 ; Webb *et al.*, 1977 ; Mukai *et al.*, 1989 ; Uthicke 2001a). Les nutriments proviennent de la digestion et de la reminéralisation de divers composés organiques dans les sédiments. Le recyclage des nutriments est important pour maintenir la productivité élevée des écosystèmes oligotrophes (Entsch *et al.*, 1983 ; Furnas *et al.*, 1995 ; Uthicke 2001a) (Figure 17). Le flux quotidien de nutriments sur les récifs coralliens, tels que les débits de phosphate et d'ammonium dans les sédiments, dépend entièrement de la densité de population d'holothuries, (Wilkinson *et al.*, 1984 ; Hansen *et al.*, 1987 ; Capone *et al.*, 1992 ; Uthicke, 2001a). Les microalgues benthiques des récifs coralliens profitent aussi de la présence de ces animaux, pour bénéficier de niveaux de nutriments plus élevés, leur taux de production est nettement plus élevé en présence d'holothuries (Uthicke et Klumpp, 1997 ; 1998 ; Uthicke, 2001b ; Purcell *et al.*, 2016) (Figure 17). Plusieurs études ont également démontré l'existence d'une relation entre la présence d'holothuries, et la hausse de productivité des macroalgues et des herbiers sous-marins. Les macroalgues absorbent l'azote inorganique convertit par les holothuries à partir d'azote particulaire, ce qui leur permet d'augmenter leur productivité. Les herbiers sous-marins bénéficient également des nutriments reminéralisés provenant de l'alimentation des holothuries, ils absorbent rapidement l'ammonium et le phosphate recyclés. L'absence de certaines espèces d'holothuries affecte la productivité et la crois-

sance des herbiers sous-marins, ils se développent plus lentement et leur biomasse diminue (Wolkenhauer *et al.*, 2010 ; MacTavish *et al.*, 2012 ; Yuan *et al.*, 2015 ; Purcell *et al.*, 2016).



**Figure 17.** Rôle écologique et biologique des holothuries (*in* Wolfe et Byrne, 2017 modifiée).

#### I.2.8.4. Influence de la chimie de l'eau locale

Les "concombres de mer" peuvent augmenter l'alcalinité locale de l'eau de mer, grâce à leurs processus digestifs, ils facilitent ainsi la calcification des coraux et des algues calcaires (Schneider *et al.*, 2011 ; 2013) (Figure 16). L'augmentation de la capacité tampon de l'eau de mer par les holothuries est dû à leur rejet d'ammoniac et à la dissolution du sable contenant des carbonates, entraînant la production de pelotes fécales à pH élevé (Hammond, 1982 ; Uthicke et Klumpp 1997 ; Uthicke 2001a ; Schneider *et al.*, 2011 ; 2013) (figure 16). Leurs rejets d'ammoniac fournissent des nutriments aux symbiotes zooxanthelles, augmentant leur productivité et par la même occasion permettant la stimulation la calcification des coraux (Purcell *et al.*, 2016). L'Influence des holothuries sur la chimie de l'eau de mer, varie considérablement d'une espèce à l'autre, n'opère qu'à faible échelle, et à des débits d'eau de mer faible (Schneider *et al.*, 2013 ; Purcell *et al.*, 2016).

#### I.2.8.5. Relations symbiotiques

Plusieurs holothuries sont connues pour former des associations symbiotiques, notamment avec des espèces qui appartiennent à plusieurs phylums, tels que les plathelminthes, les polychètes, les arthropodes, les poissons, et les gastropodes (Eeckhaut *et al.*, 2004, Purcell *et al.*, 2016). Trois types

de relation symbiotique sont définie pour les holothuries, il s'agit du parasitisme, mutualisme, et commensalisme (Parmentier et Michel, 2013).

Les espèces ectocommensales sont connues pour vivre sur des holothuries commerciales. Le "piggy backing", les espèces ectocommensales s'accrochent au dos des holothuries, afin de se réfugier contre les prédateurs, et de se nourrir de sources alimentaires externes. Les endocommensals vivent librement dans divers organes d'holothuries, mais surtout dans le tube digestif où ils peuvent sortir des hôtes ou se réfugier en cas de danger, cas du poisson perle (*Carapus acus*) (Purcell *et al.*, 2016). Les endoparasites le plus souvent se produisent dans le tube digestif et dans la cavité cœlomique des "concombres de mer" hôtes (Jangoux 1990, Eeckhaut *et al.*, 2004). Les ectoparasites utilisent leur trompe pour pénétrer dans la paroi corporelle, et se nourrissent des protéines cœlomiques, mais sans conséquences graves pour l'hôte (Purcell *et al.*, 2016).

### **I.2.9. Prédation des holothuries**

Les "concombres de mer" sont des animaux marins lents, proie des poissons (au moins 26 espèces), des étoiles de mer (19 espèces), des gastéropodes (4 espèces) et des crustacés (17 espèces). (Francour, 1997). Les juvéniles et les larves sont la proie de poissons, notamment des familles Balistidae, Labridae, Lethrinidae et Nemipteridae (Dance *et al.*, 2003). Les espèces des genres *Cucumaria* et *Holothuria* sont les plus consommées par les animaux marins. Les dendrochirotes et les Holothuriida représentent respectivement 45% et 39% des espèces d'holothuries rapportées, suivies des apodides et des molpadides (8% chacun) (Francour, 1997). Les holothuries sont généralement ingérées intactes par les étoiles de mer (Mauzey *et al.*, 1968). Les poissons ne peuvent manger qu'une partie du corps comme les viscères, le reste du corps est rejeté en raison de la présence de toxines et de spicules (Bakus, 1968 ; De Vore et Brodie 1982 ; Francour, 1997).

### **I.2.10. Mécanismes de défense chez les holothuries**

#### **I.2.10.1. Toxine chimique**

Les holothuries possèdent des substances chimiques toxiques qui les protègent des prédateurs (Torral-Granda, 2006a). Ils possèdent des métabolites biologiquement actifs appelés saponines dans leur paroi du corps, viscères, tubes de Cuvier (Bakus, 1968 ; Bakus et Green, 1974, Caulier-Mezali *et al.*, 2016), et les gonades (Matsuno et Ishida, 1969). Les saponines possèdent un aglycone triterpénique, qui a dix-huit à vingt lactones appelé holostane, et une chaîne d'hydrates de carbone contenant jusqu'à six unités de sucre de xylose (Xyl), du glucose (GLC), quinovose (Qui), et 3-O-méthylglucose

(MeGlc), et dans certains groupes du sulfate (Kalinin *et al.*, 1996 ; 2005 ; 2015 ; Stonik *et al.*, 1999). Ces composés ont une action membranolytique sur les membranes cellulaires avec cinq à six stérols insaturés. Ils agissent sur la membrane en formant des complexes pour modifier leur structure et leurs propriétés, conduisant à la formation de pores cellulaires qui provoquent la lyse (Kalinin *et al.*, 1996 ; Stonik *et al.*, 1999 ; Popov, 2002). Ceci est la principale raison de la vaste gamme d'activités biologiques des saponines dont ichthyotoxicité. Par exemple les extraits de "concombres de mer" peuvent endommager les capillaires de poissons conduisant à la mort (Bakus, 1968).

La structure moléculaire de ces composés chimiques est préservée car elle fournit également des avantages internes (régulation de la reproduction) et externes (défense contre les prédateurs, les salissures ou les concurrents de l'espace) (Avilov, 2000). Ces molécules sont largement diffusées et sont très diverses parmi les holothuries. La diversité est due à la variation des fragments d'aglycone et du glycone. Ceux-ci comprennent la position des doubles liaisons et la présence de différents groupes fonctionnels ( $\text{OH}$ / $\text{COOH}$ / $\text{CH}_3$ ) et les groupes latéraux (par exemple acétoxy, des groupes cétone) dans l'un des glycone et le nombre de chaînes de sucre ainsi que le nombre et la position des groupes sulfates dans le glycone. Même si la diversité est grande, les saponines des espèces étroitement liées conservent le même motif moléculaire (Kalinin *et al.*, 1996 ; Stonik *et al.*, 1999). Chez les Holothuriidae seul, 59 types de saponines dans 41 espèces ont été découvertes et décrites chimiquement avec chaque espèce ayant un mélange congénère spécifique (Caulier *et al.*, 2011). Certains congénères sont partagés au sein de cette famille (par ex : Holothurines A et B). D'une part, certains congénères sont très spécifiques à chaque espèce et genre qui impliquent que ces composés peuvent être des marqueurs taxonomiques chimiques potentiels (Moraes *et al.*, 2004 ; Caulier *et al.*, 2011 ; Kalinin *et al.*, 2015).

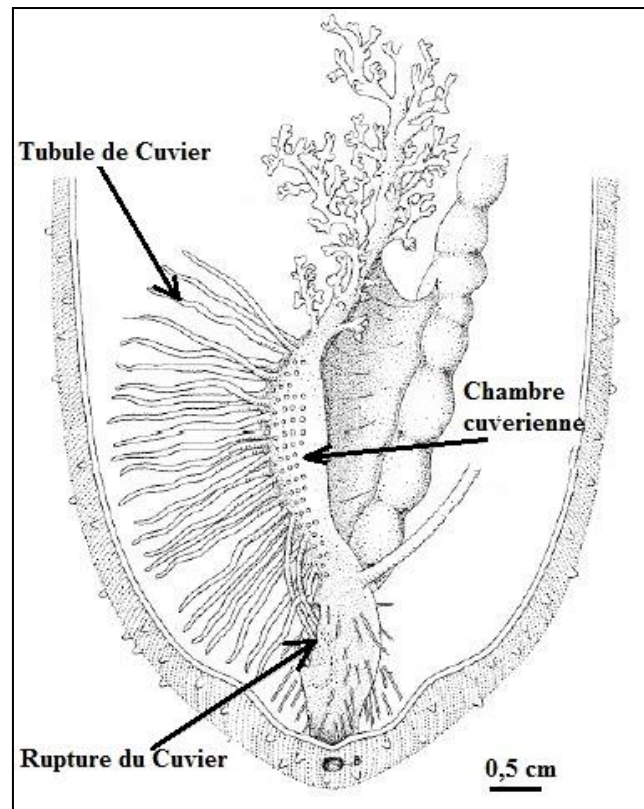
### **I.2.10.2. Auto-éviscération**

Pour se défendre contre les prédateurs, les "concombres de mer" adultes peuvent éviscérer leurs organes internes, qui se régénèrent ensuite. Ils sont connus pour présenter une capacité de régénération étendue et peuvent régénérer une partie du corps, par ex. la paroi du corps, le système nerveux et les organes internes, tels que le système digestif, les organes reproducteurs et les arbres respiratoires (Okada et Kondo, 2019). L'éviscération, l'éjection de la quasi-totalité des organes internes, se produit dans des conditions naturelles (Mosher, 1956), ainsi qu'en réponse à des signaux environnementaux non naturel, tels que l'eau insalubre. Lors de l'éviscération, le tube digestif s'autotomise d'abord aux extrémités postérieures ou antérieures, et est éjecté de la bouche

(éviscération antérieure) ou de l'anus (éviscération postérieure) (Okada et Kondo, 2019). Les "concombres de mer" de l'ordre Dendrochirotida et Holothuriida sont connus pour s'éviscérer. Les dendrochirotes et les Holothuriida s'éviscèrent principalement par la bouche et l'anus (García-Arrarás et Greenberg, 2001 ; Mashanov et García-Arrarás, 2011). Dans les deux cas, le mésentère demeure pour relier la paroi interne (mésothélium) de la cavité corporelle au tube digestif. Les espèces qui s'éviscèrent antérieurement libèrent tout le tube digestif, à l'exception du cloaque. Ceux qui s'éviscèrent postérieurement, éjectent la partie de l'intestin entre l'œsophage le cloaque (Okada et Kondo, 2019).

### I.2.10.3. Organe de Cuvier

Les tubes de Cuvier sont un système composé de nombreux tubules courts et blanchâtres dont les extrémités proximales sont fixées à la partie basale des arbres respiratoires et leurs extrémités distales flottent librement dans la cavité cœlomique (Van den Spiegel et Jangoux, 1987 ; Van den Spiegel *et al.*, 2000) (Figure 18). Les tubes de Cuvier sont utilisés par certaines espèces de "concombres de mer", comme mécanisme défensif ou comme répulsif pour se protéger de la prédation et des attaques. Le "concombres de mer" se courbe avec l'extrémité aborale tournée vers l'objet irritant et subit une forte contraction. Cela forcera les tubes de Cuvier à être expulsés par l'anus avec le liquide cœlomique. Les tubules émis s'allongent, deviennent instantanément collants immobilisent et piègent rapidement la plupart des organismes en contact (Van den Spiegel et Jangoux, 1987 ; Samyn *et al.*, 2006 ; Hernández-Sámano *et al.*, 2015). Des tubules éjectés seront régénérés (Hyman, 1955). La régénération complète des tubules se fait par épimorphose (régénération de l'organe par prolifération d'un groupe de cellules indifférenciées préexistantes ou de cellules différenciées qui se dédifférencient.), et peut durer jusqu'à cinq semaines lorsque de nombreux tubules ont été expulsés (Vanden Spiegel *et al.*, 2000). Cette structure particulière du tubule de Cuvier ne peut être trouvée que chez certaines espèces de l'ordre Holothuriida des genres *Actinopyga*, *Bohadscia* et *Holothuria* uniquement (Samyn *et al.*, 2006).



**Figure 18.** L'anatomie de la partie postérieure de l'*Holothuria forskali* au niveau de l'attachement des tubes de Cuvier (VandenSpiegel et Jangoux, 1987 modifiée).

## I.2.11. Importance des holothuries

### I.2.11.1. Consommation des holothuries

Les "concombres de mer" sont une ressource marine très appréciée des peuples d'Asie et d'Extrême-Orient, ils sont généralement utilisés comme remèdes traditionnels, aphrodisiaques, et consommés comme mets très raffinés dans de nombreux pays d'Asie depuis des milliers d'années (Toral-Granda, 2006b ; Borrero-Perez *et al.*, 2009 ; Afkhami *et al.*, 2012 ; Jangoux, 2014). Plus de 70 espèces d'holothuries sont exploitées commercialement (Xu et Zhao, 2015). En Chine, 134 espèces ont été trouvées, parmi lesquels seulement 20 espèces sont comestibles et ont des fonctions médicinales (Liao, 2001). Les "concombres de mer" sont généralement commercialisés sous forme congelée, cuits-séchés, cuits-salés et cuits-salés-séchés (FAO, 2008). La consommation d'holothuries, crus ou après une préparation très simple, est commune au Japon et en Corée (Conand, 1990). Au Japon, le tégument appelé 'namako' est consommée crue ou en tranches trempées dans un mélange de vinaigre et la sauce de soja (Figure 19). D'autres organes sont également considérés comme des mets de choix, tels que les ovaires ou 'Konoko' sont consommés secs ou salés et fermentés, même les intes-

tins appelés 'konowata' et les arbres respiratoires ou 'minowata' sont aussi consommés. L'intestin et gonades peuvent être transformés en plats à prix élevé (Tanikawa, 1955a ; Ke *et al.*, 1983 ; Kiew et Don, 2012 ; Robinson et Lovatelli, 2015), certains muscles du "concombre de mer" peuvent être préparés comme des palourdes de haute qualité, produit savoureux vendu aux États-Unis (Mottet, 1976). Un produit sec, connu sous le nom 'Iriko' "trévang" ou "bêche-de-mer" est aussi traditionnellement produit (Conand, 1990). Il est proposé aux consommateurs après avoir été éviscérés, portés à ébullition, et enfin séchés à l'air libre (Jangoux, 2014). Le liquide coelomique le bulbe aquapharyngien, et les organes internes, sont des sous-produits ou coproduits peu ou pas valorisés, ils représentent des quantités importantes de rejets pour les industries de transformation (Tripoiteau, 2015). Dans les eaux peu profondes de l'Indopacifique tropical on compte environ 350 espèces d'holothuries (Pangestuti et Arifin, 2018), parmi lesquelles une vingtaine sont actuellement recherchée pour la préparation du 'trévang'. Les espèces les plus récoltées pour le marché du 'trévang' sont *Actinopyga mauritania*, *Holothuria scabra* et *Thelenotia ananas*, d'autres espèces, tel que *Apostichopus japonicus*, *Parastichopus californicus* et *Cucumaria frondosa* sont consommées cuites, marinées ou même crues (FAO, 2012). Cependant, dans la plupart des régions du monde, les "concombres de mer" sont considérés comme non comestibles (Ke *et al.*, 1987). Ils ne sont consommés que sur les îles de l'ouest du pacifique et en Asie (Tanikawa, 1955a, b ; Bruce, 1983).



**Figure 19.** Plat à base de "bêche-de-mer" (in Purcell *et al.*, 2010).

### I.2.11.2. Marché de la "bêche-de-mer"

Le "concombre de mer" est commercialisé depuis plus de 1000 ans (Friedman *et al.*, 2011). Mondialement, depuis le milieu du XXe siècle, les tendances du marché révèlent une augmentation considérable dans le commerce des "concombres de mer", tant en termes de nombre d'espèces et de rendement de production, les prises mondiales ont été multipliées par 13, passant d'environ 2300 tonnes à

30500 tonnes (Kinch *et al.*, 2008 ; Anderson *et al.*, 2011 ; Bordbar *et al.*, 2011) (Tableau 1). Les espèces ciblées appartiennent la plupart à l'ordre des Holothuriida. Ce sont principalement les genres *Actinopyga*, *Bohadschia*, *Apostichopus*, *Stichopus*, *Cucumaria*, et *Holothuria* qui sont les plus visés (Purcell *et al.*, 2012). En plus de sa grande expansion dans les zones traditionnelles, la pêche des holothuries s'est étendue à une amplitude considérable, même dans des zones de pêche non traditionnelle, telles que les Galapagos, le Mexique et l'Amérique du Nord. Les stocks découverts sont exploités à un rythme de plus en plus rapide (Taiyeb-Ali, 2003 ; Hu, 2005 ; Anderson *et al.*, 2011). La collecte des "concombres de mer" pour la production de "bêche-de-mer", et son exportation vers le marché asiatique fourni une importante source de revenus pour les communautés dans les régions éloignées où les alternatives sont peu nombreuses (MacKnight, 1976 ; Preston, 1993 ; Purcell, 2010) (Tableau 1). Le marché des "bêches-de-mer" est contrôlé par la Chine, Hong-Kong, Singapour et Taïwan (Jaquemet et Conand, 1999). Selon le facteur de conversion utilisé le poids sec/humide, il est possible de déduire que les prises combinées pour l'Asie et les régions du Pacifique sont de l'ordre de 20000-40000 t/an (FAO, 2008). Les données statistiques indiquent qu'environ 1.000 tonnes de "bêches-de-mer" (soit 10000 tonnes d'holothuries fraîches) sont importées annuellement à Singapour, dont 80% sont réexportées vers d'autres pays comme la Chine, la Malaisie, Taiwan, le Japon, où elles sont vendues sur les marchés locaux. La quasi-totalité des holothuries importées à Singapour provient de l'Afrique de l'Est y compris les îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien (Fabinyi *et al.*, 2017 ; Purcell *et al.*, 2018). Dernièrement, Hong Kong et Guangzhou (Chine) sont devenus les plus grands importateurs d'holothuries tropicaux. Les prix moyens ont augmenté de 2011 à 2016, le prix par individu augmente de façon exponentielle avec la taille. En 2016, les prix moyens des espèces de "bêches-de-mer" étaient de 1,3 à 3,8 fois plus élevés à Hong Kong qu'à Guangzhou. L'espèce tropicale avec le prix maximum enregistré était *Holothuria scabra*, le produit qualité premium se vendait à plus de 1800 \$ US le kilogramme (Fabinyi *et al.*, 2017 ; Purcell *et al.*, 2018) (Figure 20). En Méditerranée, les principaux pays qui explorent cette ressource marine sont la Turquie, l'Espagne, la Grèce, l'Italie et le Portugal. En Turquie, la pêcherie d'holothuries a commencé en 1996 et a actuellement une production annuelle totale de 550000 kg, 80% des captures correspondent à *H. poli* et 20% à *H. tubulosa* et *H. mammata* (González-Wangüemert *et al.*, 2014, 2015 ; González-Wangüemert et Domínguez-Godino, 2016 ; Aydin, 2017). En Espagne, la pêche des "concombres de mer" se concentre sur *Parastichopus regalis* (Ramón *et al.*, 2010), en plus des espèces déjà exploitées (*H. tubulosa*, *H. forskali*, *H. mammata*, *H. arguinensis*), plus de 10 entreprises exportent les "concombres de mer" vers la Chine, dont certains avec 1 à 2 millions de dollars US de revenus totaux (González-Wangüemert et Domínguez-Godino, 2016). En Grèce, *H. tubulosa* est la principale

espèce récoltée depuis plus d'un siècle (Antoniadou et Vafidis, 2011), de nos jours certaines entreprises exportent les "concombres de mer" en Chine, en Australie, au Japon, au Canada et aux États-Unis (González-Wangüemert et Domínguez-Godino, 2016). Plus récemment, l'Italie a commencé la transformation des "concombres de mer" à petite échelle (Sicuro et Levine, 2011). Au Portugal, plusieurs entreprises vendent des "concombres de mer", principalement *H. arguinensis*, *H. sanctori*, *H. forskali* et *H. mammata*, offrant une capacité d'approvisionnement de 2 000 à 50 000 kg/mois et des prix variants entre 70 et 350 euros/kg selon la qualité du produit (González-Wangüemert et Domínguez-Godino, 2016).

La "bêche-de-mer" peut être classée à partir de sa valeur commerciale : haute, moyenne ou basse basée sur l'espèce, l'abondance, l'apparence, l'odeur, la couleur, l'épaisseur du corps (Telahigue *et al.*, 2010). Cependant, il n'y a aucune information sur l'évaluation de valeur commerciale sur la base de la composition chimique et la qualité nutritionnelle des "concombres de mer" (Afkhami *et al.*, 2012).



**Figure 20.** Marchés asiatiques d'holothuries en chine (*in* Purcell, 2010 ; Purcell, 2014a).

**Tableau 1.** Taux de "concombres de mer" capturés rapporté par FAO au tonnage mondial total (*in* Bordbar *et al.*, 2011 ; FAO, 2020).

Année	Prise totale mondiale (Milliers de tonne)
1988	19,905
1989	17,467
1990	19,976
1991	21,790
1992	20,892
1993	19,348
1994	24,505
1995	24,050
1996	26,795
1997	24,672
1998	22,004
1999	20,462
2000	24,509
2001	20,431
2002	23,445
2004-2013 (Moyenne par an)	22
2015	31
2016	34
2017	38
2018	48
Total	551,251
Pourcentage de la pêche totale en 2018	9

### **I.2.11.3. Aquaculture des holothuries (holothuriculture)**

Le prix attractif des "concombres de mer" et le déclin de leur pêche sauvage, a suscité parmi les organismes privés et publics un intérêt considérable pour le développement de méthodes alternatives de production de "bêches-de-mer", en particulier l'holothuriculture (Pitt et Duy, 2004 ; Giraspy et Ivy 2005 ; Purcell, 2005 ; Eeckhaut *et al.*, 2008). L'holothuriculture apporte une solution durable, permettant à la fois de repeupler les stocks appauvris en milieu naturel, et de produire suffisamment de "bêches-de-mer" pour répondre à la demande croissante du marché asiatique (Giraspy et Walsalam, 2010). La production d'holothuries en éclosérie a été menée de manière expérimentale dans la région pacifique en produisant des milliers de juvéniles (Purcell, 2004b, 2005 ; Pitt et Duy, 2004). Cependant, la production commerciale d'holothuries n'a été effectuée que récemment dans quelques pays, comme l'Australie, Maldives (Giraspy et Ivy, 2005), et à Madagascar (Eeckhaut *et al.*, 2008). Dans les écloséries commerciales, la production en grande quantité d'holothuries tropicales s'est heurtée à certains problèmes qui ont freiné leur production à grande échelle, tel qu'un taux élevé des procédures de gestion des écloséries, qui ne sont pas maximisées, afin de garantir le succès de la production massive de juvéniles, ainsi qu'un taux de mortalité élevé dans les sites de fixation des larves et au stade juvénile initial. Toutefois, la recherche continue a permis de grandes avancées pour surmonter ces obstacles en améliorant les régimes alimentaires et les substrats de fixation, ainsi "Sea Cucumber Consultancy" société internationale située à Brisbane (Queensland), fournit une technologie commerciale pour la production à grande échelle de "concombres de mer", a réussi ces dernières années à produire de manière régulière des millions d'holothuries juvéniles (Giraspy et Walsalam, 2010).

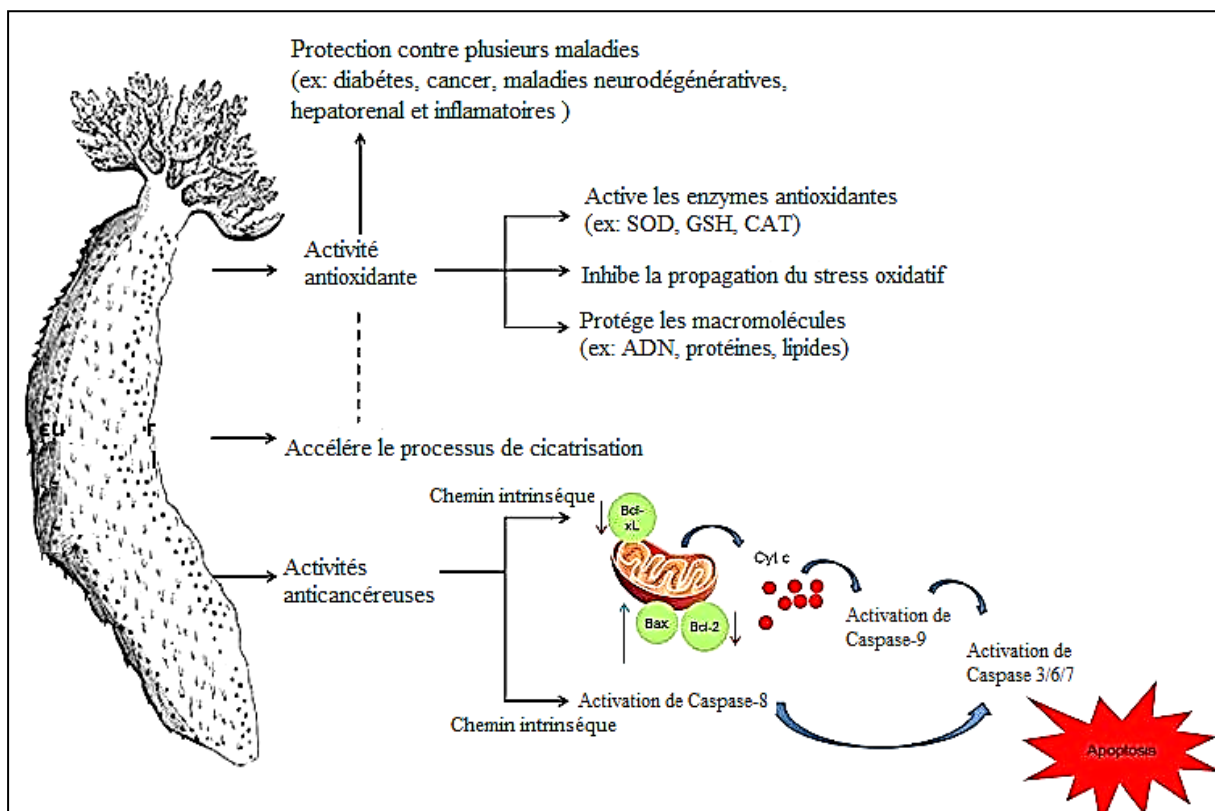
### **I.2.11.4. Application pharmacologique et thérapeutique**

Au cours des dernières décennies, de nombreux efforts ont été déployés pour isoler des composés biologiquement actifs provenant des ressources marines vivantes. Ces composés sont d'un grand intérêt pour le développement potentiel de nouveaux produits à diverses applications industrielles, agroalimentaires, pharmaceutiques, et nutraceutiques (Venugopal, 2008 ; Blunt *et al.*, 2018 ; Hu *et al.*, 2018 ; Khotimchenko, 2018 ; Jimenez *et al.*, 2020).

Parmi les invertébrés marins, les "concombres de mer" ont fait l'objet d'une attention particulière, en raison de leur haute valeur nutritive, et la présence de molécules bioactives, qui ont des effets bénéfiques sur la santé humaine (Khotimchenko, 2015 ; 2018) (Figure 21). Les "concombres de mer" sont utilisés dans la médecine traditionnelle asiatique pour maintenir, prévenir, réduire ou guérir plusieurs maladies comme la constipation, déficience rénale, l'arthrite, l'asthme, les rhumatismes, les coupures et les brûlures, l'impuis-

sance et la constipation (Mazliadiyana *et al.*, 2017 ; Salimi *et al.*, 2017 ; Youssef., 2017 ; Gianasi, 2018 ; lee *et al.*, 2018 ; Zhao *et al.*, 2018 ; Yin *et al.*, 2019).

Les molécules bioactives isolées des "concombres de mer" sont : les chondroïtines sulfatées (Li *et al.*, 2016 ; Mou *et al.*, 2018), les sulfates de fucan (Ustyuzhanina *et al.*, 2018), les polysaccharides (Marques *et al.*, 2016 ; Zhong *et al.*, 2019), les triterpènes glycosides (saponines) (Caulier-Mezali *et al.*, 2016 ; Cuong *et al.*, 2017), les cérébrosides (Xu *et al.*, 2011 ; Liu *et al.*, 2015), les lectines (Wang *et al.*, 2018)...etc. Elles ont des applications dans l'industrie pharmaceutique en raison de leur large éventail de bioactivités : antibactériennes, antifongiques, anti-inflammatoires, anticoagulantes, antitumorales, antioxydantes, et antivirales...etc (Chen *et al.*, 2011 ; Martins *et al.*, 2014 ; Shi *et al.*, 2016 ; Pangestuti et Arifin, 2018). Leur acides gras polyinsaturés (AGPI) à longue chaîne, jouent un rôle essentiel dans les activités métaboliques (Anisuzzaman *et al.*, 2019), telles que les maladies coronariennes, l'arthrite, la cicatrisation des plaies et la coagulation du sang (Abdulrazaq *et al.*, 2017; Rao, 2018 ; Harris *et al.*, 2019), leur peptides (Sila et Bougafef, 2016) ont un potentiel d'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) (Sadegh Vishkaei *et al.*, 2016 ; Chim-Chim *et al.*, 2017 ; Dewi *et al.*, 2020) (Figure 21).



**Figure 21.** Activités biologiques des composés bioactifs dérivés des "concombres de mer" (Pangestuti et Arifin, 2018).

En raison de la présence de certains acides aminés, les "concombres de mer" ont une fonction remarquable dans la régulation immunitaire (Qin *et al.*, 2008). Leur collagène est reconnu comme un composant précieux dans les tissus conjonctifs, en raison de son utilité et de sa distribution spécifique (Saito *et al.*, 2002 ; Rafiuddin *et al.*, 2004). Il est ensuite transformé en gélatine par ébullition pour devenir une substance bioactive fonctionnelle (Zhao *et al.*, 2007).

### **I.2.11.5. Valeur nutritionnelle des holothuries**

Traditionnellement, les Chinois consommaient les "concombres de mer" pour leur valeur tonique plutôt que pour leur goût de fruits de mer. Ils sont appréciés avec d'autres délices, tels que l'aileron de requin, le ginseng et le cordyceps, comme tonique et comme aliment de prévention de plusieurs maladies (*in* Kiew et Don, 2012). Ils sont donc célèbres sous le nom de "Hai Shen" en chinois, qui signifie en gros "ginseng de mer" (Bruckner *et al.*, 2003 ; Chen 2003). La médecine traditionnelle chinoise croit fermement que la nature salée et réchauffante des "concombres de mer", leur permet de nourrir le sang et l'essence vitale, de traiter les problèmes de troubles rénaux et des organes reproducteurs (*in* Kiew et Don, 2012). Plusieurs études ont été réalisées pour analyser les compositions d'acides aminés et d'acides gras de diverses espèces d'holothuries afin d'élucider leur valeur nutritionnelle pour les consommateurs (Wen *et al.*, 2010 ; Liu *et al.*, 2017 ; González-Wangüemert *et al.*, 2018a). Ils contiennent des acides aminés et des oligo-éléments essentiels pour la santé (Chen 2003). Les "concombres de mer" contiennent une combinaison d'acides aminés précieux, composaient de glycine, d'acide glutamique, d'acide aspartique, d'alanine et d'arginine, un faible rapport lysine/arginine et un taux élevé d'acides aminés essentiels (AAE) en raison de la présence d'une quantité considérable de thréonine, de tyrosine et de phénylalanine (Wen *et al.*, 2010). Comme la concentration de cholestérol dans le sérum et l'aorte est influencée par la composition des protéines et des acides aminés, un rapport plus faible de la lysine à l'arginine est préférable pour exercer des effets hypocholestérolémiques (Zhang *et al.*, 2016). La teneur en acides aminés totaux (AAT) est de 33,32 à 54,13 g/100 g (poids humide) (Wen *et al.*, 2010), elle ne présente pas de variation entre les espèces. Les lipides, les minéraux, ainsi que les polysaccharides et les glycosides, sont plus élevés dans l'intestin et des voies respiratoires que dans le tégument. Les rapports AAE/AAT et AAE/acides aminés non essentiels dans l'intestin et l'appareil respiratoire des "concombres de mer", sont plus proches du rapport idéal de la FAO/W.H.O (Yuan *et al.*, 2010), ce qui confirme la haute valeur nutritive des "concombres de mer". Des données rapportées sur la composition approximative des "concombres de mer" dans la littérature, indiquent que les teneurs en humidité, protéines, lipides, cendres et glucides des holothuries fraîches varient de 82,0 à 92,6 ; de 2,5 à 13,8 ; de 0,1 à 0,9 ; de 1,5 à 4,3 ;

et de 0,2 à 2,0%, respectivement (Aydin *et al.*, 2010 ; Omran, 2013 ; Fawzya *et al.*, 2015 ; Haider *et al.*, 2015 ; Liu *et al.*, 2017 ; González-Wangüemert *et al.*, 2018a). Leur composition biochimique approximative varie en fonction de l'espèce, les variations saisonnières et le régime alimentaire (Bordbar *et al.*, 2011). Généralement, ils contiennent des teneurs élevées en eau et en protéines, mais de faibles teneurs en lipides par rapport aux poissons et aux crustacés (Aydin *et al.*, 2011), donc ils représentent un aliment idéal pour les personnes qui souffrent d'hyperlipidémie (Wen *et al.*, 2010). Les "concombres de mer" transformés (séchés) constituent une riche source de protéines brutes par rapport à la plupart des produits de la mer utilisés. Jusqu'à présent, elles sont vendues comme nutraceutique sous forme de comprimés ou de capsules (Chen, 2003). Le tégument des "concombres de mer" est constitué principalement de collagène (environ 70% des protéines de la paroi) et de mucopolysaccharides (Saito *et al.*, 2002 ; Escudero *et al.*, 2010 ; Hur *et al.*, 2011 ; Pennings *et al.*, 2013). Plus de 21 types de collagène ont jusqu'à présent été identifiés dans divers tissus d'holothuries et leurs rôles ont été largement étudiés (Liu *et al.*, 2011 ; 2019 ; Tian *et al.*, 2020). Les collagènes des "concombres de mer" sont similaires à ceux des tortues à carapace molle et des cornes de cerf, ils servent comme complément nutritif à l'hématogenèse (production de globule rouge) et dans le traitement de l'anémie (Kiew et Don, 2012 ; Guo *et al.*, 2015). Les teneurs en matières grasses brutes des "concombres de mer" sont généralement inférieures à celles d'autres produits de la pêche tels que les poissons *Channa striatus*, *Channa micropeltes* et *Sparus aurata*, avec respectivement 5,7%, 9,3% et 14,7% (El Shehawy *et al.*, 2016 ; Tawali *et al.*, 2018 ; Pratama *et al.*, 2020). Néanmoins, leur profil lipidique est très intéressant, composés principalement d'acides gras polaires, avec une teneur élevée en acides gras polyinsaturés (AGPI), en particulier l'acide eicosapentaénoïque (EPA), l'acide arachidonique (ARA), l'acide alpha-linolénique (ALA), et l'acide docosahexaénoïque (DHA). Leur rapport *n-6/n-3* est similaire à celui recommandé par la FAO, entre 5:2 et 8:1 (W.H.O, 2003). Ces deux acides oméga présentent des propriétés hémodynamiques (le flux sanguin) et antiathérogènes (empêche la formation de cailloux sanguin), qui peuvent éliminer la coagulation sanguine dans les vaisseaux sanguins et réduire les triglycérides sériques ou le taux de cholestérol sérique (Blondeau, 2016 ; Balk et Lichtenstein, 2017). Ils aident aussi à réduire le taux de glycémie chez les patients souffrant de diabète de type 2 (Brown *et al.*, 2019). Les holothuries ont une grande valeur nutritive dû à la présence de plusieurs vitamines tels que la vitamine A, la vitamine B1 (thiamine), la vitamine B2 (riboflavine), la vitamine B3 (niacine). Comme le rapporte plusieurs auteurs divers minéraux se trouvent également dans les "concombres de mer" (Mohammadzadeh *et al.*, 2016 ; Mohsen *et al.*, 2019). Ces études sont très importantes afin d'estimer les risques réels pour la santé humaine liés à la consommation d'holothuries. Plusieurs maladies, désordres, dysfonctionne-

ments et malformations d'organes sont liés à la toxicité des métaux lourds, ils s'accumulent généralement dans les organes vitaux, tels que les reins, les os et le foie. Chaque métal présente des signes spécifiques de toxicité. Par conséquent, la sécurité des produits de la mer devient de plus en plus importante, compte tenu de la limite maximale de Pb dans les autres produits marins (poissons, mollusques, mollusques et crustacés) est de 0,3 mg/kg, ces concentrations sont acceptables chez les "concombres de mer". La limite maximale fixée pour le Cd est de 0,05 mg/kg pour les poissons (Codex Alimentarius, 2006). En comparaison au niveau défini des produits marins similaires, la concentration des métaux lourds dans les holothuries est généralement inférieures au niveau des normes internationales. Cependant, il faut prendre soin de toujours surveiller les niveaux de métaux lourds dans les holothuries (Sicuro *et al.*, 2012). Le chrome (Cr), le manganèse (Mn), le zinc (Zn), le fer (Fe), le nickel (Ni), le cobalt (Co) et le cuivre (Cu) sont les plus courants. Le Cr, Ni, le Cadmium (Cd) et le plomb (Pb) sont des métaux lourds toxiques ; la bioaccumulation des métaux lourds dans les organes des poissons d'eau douce est largement utilisée pour évaluer la santé des écosystèmes aquatiques car les polluants s'accumulent dans la chaîne alimentaire (Maurya *et al.*, 2019) ; les "concombres de mer" ne peuvent échapper aux effets néfastes de ces polluants. Cependant, à ce jour il n'existe pas de normes internationales (Codex Alimentarius, 2015), ou locales spécifique aux échinodermes pour les limites des métaux lourds. La teneur en minéraux diffère entre les espèces. La quantité de chrome dans certaines espèces peut atteindre 37 mg/g de poids sec, alors que les besoins quotidiens pour les humains est d'environ 59 mg (Ridzwan, 2007). Le chrome est nécessaire en tant que minéral essentiel, qui agit comme un résistant à l'insuline et aide à la régulation, ainsi qu'à améliorer l'activité de l'insuline dans le corps humain (Vincent, 2019). Des niveaux élevés de fer sont signalés chez *H. scabra*, qui contient jusqu'à 246,35 mg/g de poids sec (Ridzwan, 2007). La présence de fer dans l'hémoglobine (sang) et le pigment de myoglobine (tissus musculaires) souligne son importance en tant qu'ingrédient essentiel de l'alimentation quotidienne. Les besoins en fer chez l'homme dépendent de l'âge et du sexe de l'individu, mais la quantité suggérée dans le régime alimentaire est comprise entre 5 et 10 mg par jour (Belitz *et al.*, 2009). Le manganèse, par contre, est important pour faciliter divers processus métaboliques en agissant comme un cofacteur enzymatique (Li *et al.*, 2020). Le corps humain contient un total de 10 à 40 mg de manganèse, et les besoins quotidiens se situent entre 2 et 5 mg pour l'activation enzymatique (Belitz *et al.*, 2009). Les "concombres de mer" contiennent cet oligo-élément à 0,99 à 68,04 mg / g de poids sec, à l'exception du zinc, du nickel et du cuivre dans la gamme de 23,43 à 73,27, 21,65 à 129,20 et 0,99 à 34,58 mg / g de poids sec, respectivement (Ridzwan, 2007 ; Mohammadizadeh *et al.*, 2016 ; Mohsen *et al.*, 2019).

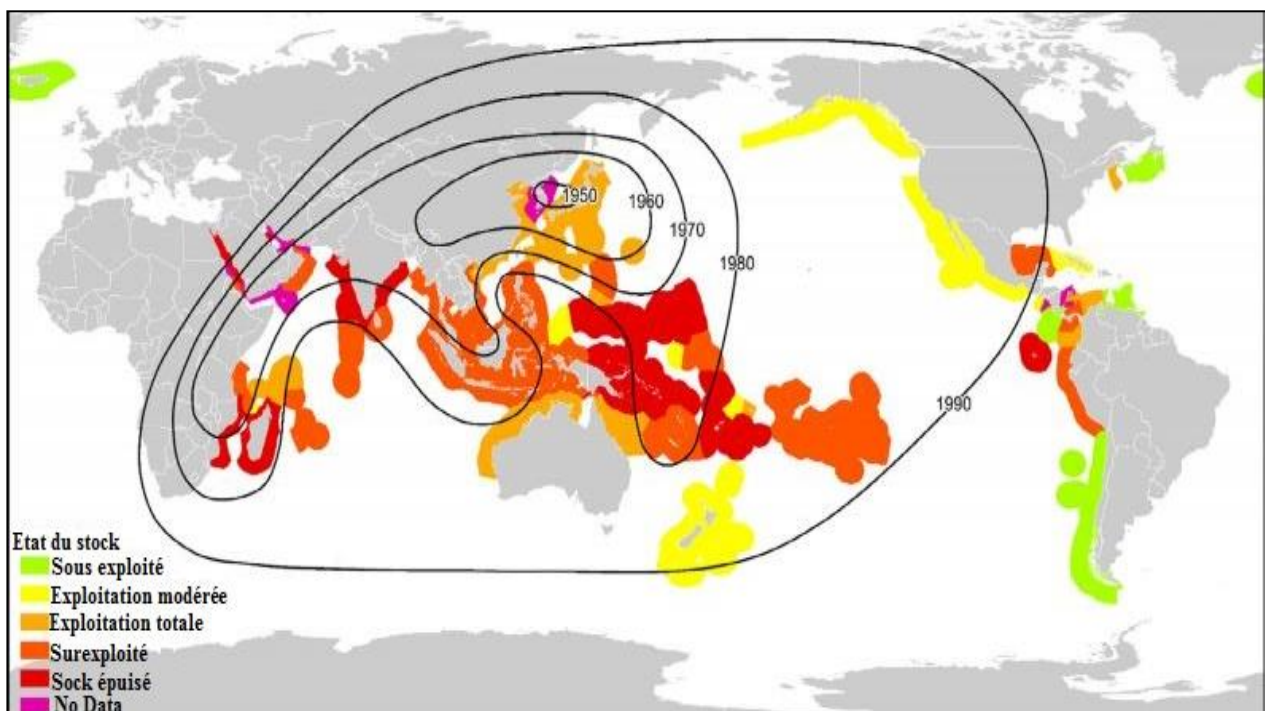
Plusieurs auteurs ont constaté que le niveau de plomb dans certaines espèces, dépasse le niveau maximal autorisé dans le corps humain à savoir 9 mg/g de poids corporel (Mohammadzadeh *et al.*, 2016 ; Mohsen *et al.*, 2019). Il existe une inquiétude au sujet des effets oncogènes menant au cancer causé par le niveau élevé de plomb. La cancérogénicité du plomb est associée à des dommages directs à l'ADN, à la clastogénicité (provoque des ruptures d'ADN), et à l'inhibition de la synthèse ou de la réparation de l'ADN. Un niveau élevé de plomb affiche également les risques d'affecter les capacités intellectuelles des enfants, ainsi que le retard de croissance intra-utérin et l'insuffisance pondérale à la naissance (Clemente *et al.*, 2017 ; Boyd *et al.*, 2018). En 2015, les chercheurs du Merinov (Centre d'Innovation de l'aquaculture et des pêches) ont réalisés une étude, afin de valoriser des coproduits (intestins, gonades...etc) de "concombre de mer" (*Cucumaria frondosa*). Les coproduits du concombre de mer sont essentiellement constitués d'eau, de protéines, de lipides et de minéraux. Les coproduits de "concombres de mer" contiennent en moyenne 7,73 g de protéines, 3,10 g de lipides, 2,18 g de cendres, 0,43 g de glycogène et 85,88 g d'eau pour 100 g d'échantillon. Cette différence s'explique par absence du liquide coelomique perdu pendant le procédé de transformation en usine. Leur composition en acides aminés essentiels démontre que les coproduits de de mer peuvent être une bonne source protéique. Leurs protéines sont riches en glycine, en acide glutamique et en arginine, trois acides aminés impliqués dans la régulation du système immunitaire (Wen *et al.*, 2010). Les coproduits renferment des lipides de haute qualité riches en phospholipides (41,9 %) et en caroténoïdes totaux (5 263 µg/g d'huile) (tableau 4). Ils sont pauvres en les acides gras saturés (32,5 mg/g d'huile) et en acides gras oméga-6 (5,3 mg/g d'huile). De plus, les lipides des coproduits de concombre de mer sont riches en les acides gras polyinsaturés (153,5 mg/g d'huile) et en acides gras oméga-3 (148,2 mg/g d'huile). Par contre, ils contiennent une forte quantité d'acides gras inconnus (145,9 mg/g d'huile environ) qu'il nous reste à identifier précisément. La proportion d'astaxanthine dans des caroténoïdes totaux est en moyenne de 49 %, 22 % sous forme libre et 27 % de forme mono estérifiée. Toutefois, la forme di estérifiée n'a pas été détectée.

### **I.2.12. Etat actuel des stocks d'holothuries**

La forte demande en "bêches-de-mer" a mis la pêche de "concombres de mer" dans le monde entier sous le stress, et de nombreuses pêcheries ont été fermées en raison de la surpêche (Purcell, 2010) (Figure 22). L'Etude réalisé par Conand (2018), confirme la surexploitation des pêcheries de "concombres de mer" dans les pays de l'océan Indien et du Pacifique occidental, alors que plusieurs pays d'Amérique latine ont maintenant des pêcheries actives. L'effondrement des stocks locaux a conduit à l'élaboration d'un marché d'importation international, ainsi qu'un réseau de braconnage visant

notamment les pays où le produit est inconnu ou n'est pas consommé. S'il s'agit encore aujourd'hui d'une activité traditionnelle qui consiste le plus souvent en, la collecte des individus (ramassage) à marée basse sur le récif, suivie du traitement par cuisson et séchage. La pression exercée sur les pêcheurs est de plus en plus forte, celle-ci les pousse à utiliser des systèmes comme les scaphandres autonomes, qui leurs permettent d'atteindre des profondeurs plus importantes avec tous les risques liés à ce type de plongées. Aujourd'hui, certaines espèces d'holothuries se trouvent face à un danger à cause des exploitations intensives qui durent depuis des années. Le problème de surpêche des holothuries dans le monde entier, a entraîné des prises de décision internationales, telles que « *la Convention sur le Commerce International des Espèces de faune et flore Sauvage menacées d'extinction* » (CITES), ainsi que l'inscription des espèces en danger dans la liste rouge de l'IUCN (*Union Internationale pour la Conservation de la Nature*) dans laquelle figure aujourd'hui le nom de sept espèces de "concombres de mer" à forte chance de disparition : quatre espèces du genre *Holothuria*, une espèce du genre *Apostichopus*, une espèce du genre *Isostichopus* et une espèce du genre *Thelenota* (Conand *et al.*, 2014). En 2004, Conand avait déjà recensé quarante-deux espèces qui subissaient un stress pour satisfaire le marché de la "bêche-de-mer". Plus tard, Bruckner (2006) a affiné cette liste en identifiant les espèces prioritaires pour la conservation et la protection internationales. L'atelier CITES (Bruckner, 2006) a classé chaque espèce selon son niveau de conservation en espèces : très préoccupantes (Cinq) ; préoccupantes dans certains pays (sept) ; susceptibles de devenir préoccupantes à mesure que l'exploitation augmente (quatre) ; non préoccupantes (quinze) ; et mineures (six). En juin 2013, la liste rouge de l'IUCN a été publiée, elle évalue les risques d'extinction de 377 espèces connues de "concombres de mer" de l'ordre des Holothuriida, qui contient la plupart des espèces exploitées commercialement. En bref, les évaluations de la Liste Rouge de l'IUCN étaient basées sur l'application des Catégories et Critères de la Liste Rouge de l'IUCN (IUCN, 2012), et sur un grand nombre de revues, études et rapports publiés sur les espèces. Une espèce se qualifie pour l'une des trois catégories de menaces : en danger critique d'extinction (CR), en danger (EN), et vulnérable (VU). Les espèces qui dont les critères de la liste rouge ne s'appliquent pas, ont été considérées comme étant les moins préoccupantes (LC), et les espèces pour lesquelles les données sont insuffisantes pour appliquer les critères de la liste rouge, ont été évaluées comme insuffisantes (DD). Les évaluations des espèces ont été examinées et éditées par un groupe séparé d'experts internationaux en taxonomie et en méthodologie d'évaluation (IUCN, 2013b). La plupart des espèces qui ont atteint le seuil d'une catégorie de menace ont été évaluées selon le critère A (IUCN, 2013a), qui mesure le risque d'extinction en fonction du dépassement d'un seuil de déclin de la population (30 % pour VU, 50 % pour EN et 80 % pour CR) sur une période de dix ans ou de

trois générations, selon la plus longue des deux périodes. L'IUCN définit la longueur des générations comme l'âge moyen des adultes reproducteurs de la cohorte actuelle (IUCN, 2013b). Lors de l'évaluation de la Liste rouge de l'IUCN, la durée des générations a été estimée à 11-17 ans selon la méthodologie de l'IUCN. Par ailleurs en Méditerranée, les informations sur l'état du stock des holothuries ne sont pas nombreuses, et très peu d'études se sont intéressées à l'évaluation de l'état du stock et à la dynamique des populations (Mezali *et al.*, 2006 ; Mezali, 2008 ; Ramónd *et al.*, 2010, Aydin *et al.*, 2011, Navarro *et al.*, 2012, González-Wangüemert *et al.*, 2014 ; 2016 ; Mezali et Thandar, 2014). Neghli *et al.*, 2019 ; Mezali et Slimane-Tamacha, 2020).



**Figure 22.** Expansion mondiale du commerce des "concombre de mer" : état des stocks et année d'établissement de la pêche (*in* Bennett et Basurto, 2018). L'état du stock est indiqué par Purcell *et al.* (2013). Les années d'établissement des pêcheries sont indiquées dans Anderson *et al.* (2011).

## **Chapitre II : Matériel et Méthodes**

### **II.1. Echantillonnage**

Les Holothuries étudiées proviennent de la côte Ouest Algérienne. Les individus sont prélevés vivants par plongée sous-marine à une profondeur moyenne d'environ 3 m sur cinq sites choisis: Stidia (35° 50'N, 0°00'E), Hadjaj (36° 06' N, 0° 20' E), Kristel (35°49'.34'N, 0°29'.00" O), port d'Oran(35°42'34.2"N, 0°39'20.8"O), et Cap Falcon (35°46'21.5"N, 0°47'51.0"O) (Figure 23). A chaque plongée environ 10 à 20 individus sont prélevés dans différents biotopes, dissimulés sur les fonds sableux et rocheux riches en matière organique. Leur présence était détectée en observant leurs fèces aisément reconnaissables sous l'eau. Les holothuries récoltées sont rapidement déposées dans des bacs contenant de l'eau de mer, puis transportées au laboratoire (LPVRMLSM) pour leurs traitements (mesures biométriques).

### **II.2. Mesures biométriques**

Au laboratoire chaque individu est lavé à l'eau du robinet pour se débarrasser de toute traces de sable et de salissures. Des mesures biométriques ont été réalisées sur une partie des échantillons (Figure 24). La Longueur contractée a été obtenue selon la méthode décrite par Mezali (1998), en essayant de maintenir chaque individu droit, puis le compresser à la main jusqu'à expulsion du liquide coelomique ( $\pm 0,1$  mm) (Figure 24 B). L'épaisseur de la paroi du corps a été mesurée grâce à un pied à coulisse ( $\pm 0,1$  mm), à partir d'une incision faite grâce à une lame de bistouri au niveau du derme à la limite entre le bivium et le trivium (Figure 24 C). Après cela, chaque individu a été éviscéré, rincé à l'eau du robinet, égoutté et enfin pesé (poids humide de la paroi du corps) avec une balance de précision ( $\pm 0,01$  g) (Kern, Balingen, Allemagne) (Figure 24 A). Enfin chaque individu a été déposé dans un sac en plastique étiqueté, et est conservé dans un congélateur à  $-4^{\circ}\text{C}$  jusqu'à transport au Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio).

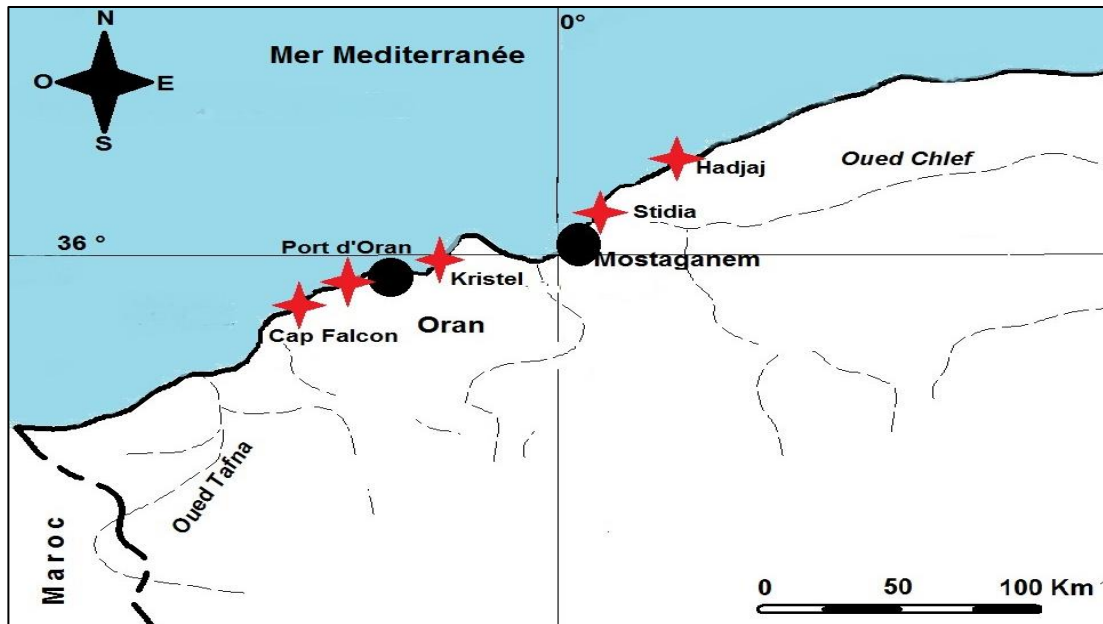


Figure 23. Sites d'échantillonnage (croix rouge) (d-map, 2020, modifiée).

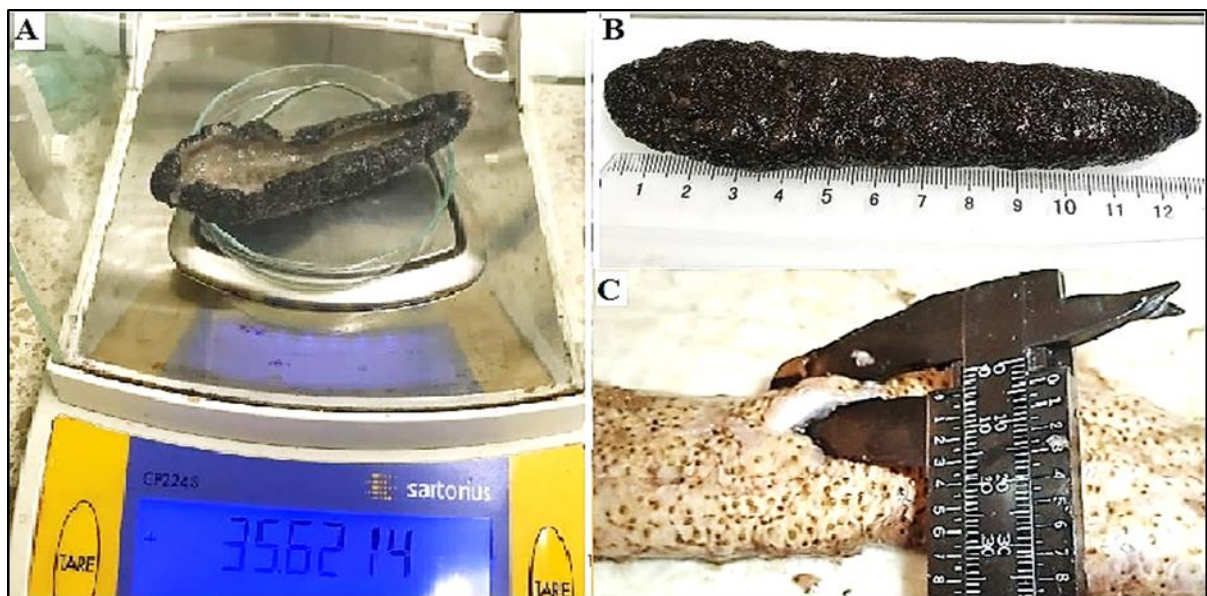
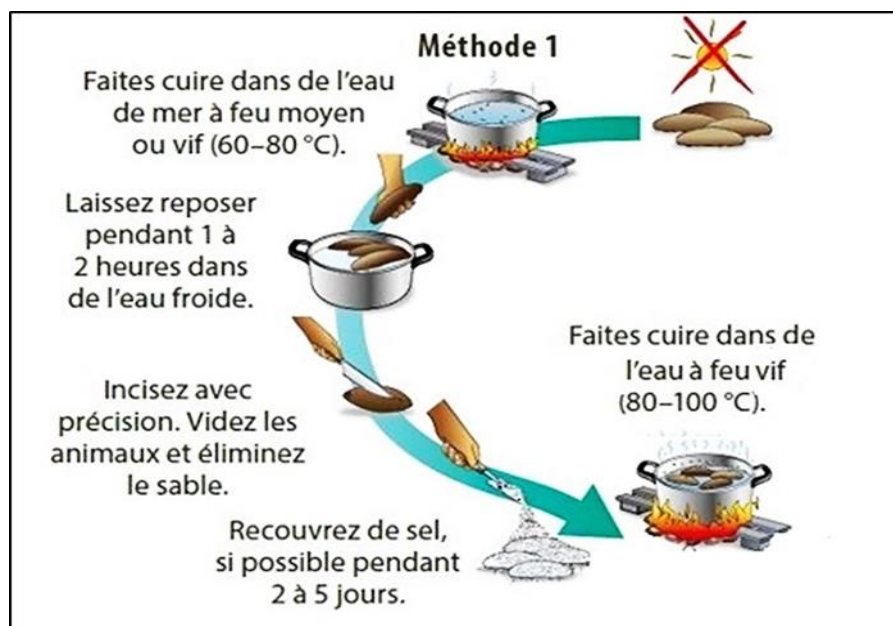


Figure 24. Mesures biométriques : A. prise de poids ; B. mesure de la longueur ; C. mesure de l'épaisseur de la paroi

### II.3. Transformation des holothuries fraîches en produit sec

La transformation des holothuries fraîches en produit sec "bêche-de-mer" est basé sur des méthodes traditionnelles simples décrite par Purcell (2014b) (Figure 25), organisées sur trois étapes principales : la cuisson, le salage, et enfin le séchage à l'air libre. Les holothuries fraîchement collectées, ont été déposées dans un grand récipient, et sont bouillies dans de l'eau de mer à feu moyen (60–80°C) (Figure 25), jusqu'à ce qu'elles gonflent (10-15 min cela dépend de l'épaisseur de tégument). Ensuite, elles ont été déposées dans de l'eau froide (environ 15°C) pendant 1 à 2 h jusqu'à refroidissement totale (Figure 25). Une incision à l'aide d'une lame bistouri a été pratiquée le long de la face ventrale, en commençant à 3 cm de chaque extrémité, puis les échantillons ont été éviscérés, et rincés à l'eau du robinet (Figure 25). Les spécimens sont déposés dans des bacs et ont été recouverts entièrement de sel de mer pendant 2 à 5 jours (Figure 25), ce qui va permettre la déshydratation avant le processus de séchage. Les holothuries ont été bouillies à nouveau (environ 30 min), dans de l'eau propre, jusqu'à consistance dure et caoutchouteuse. Enfin, les holothuries ont été séchées au soleil pendant 4 jours à 2 semaines.



**Figure 25.** Les différentes étapes de préparation des "bèches-de-mer" selon la méthode traditionnelle (Purcell, 2014b).

### II.4. Digestion *in vitro* derme sec de "bêche-de-mer" à la pepsine

Les "bêche-de-mer" des quatre holothuries ont été digérées *in vitro* selon la méthode d'Escudero *et al.* (2010) modifié par Wen *et al.* (2015). Pour cela, environ 0,5 g du tégument

sec a été homogénéisé deux fois dans 2 ml d'eau distillée pendant 30 sec à 950 tr/min, puis à 13500 tr/min avec un temps de refroidissement de 30 sec entre les deux centrifugations. Le pH des homogénats a été ajusté à 2 avec un acide (HCl, 1M). La pepsine a été ajoutée à 3% basé sur la masse de l'échantillon. Le mélange est chauffé à 37°C pendant 2 h dans un bain marie, puis la pepsine a été inactivée en ajustant le pH à 7,5 en utilisant une base (NaOH, 1 M). La paroi digérée a été séchée dans une étuve à 60°C pendant 72 h, puis est pesée.

La digestibilité *in vitro* a été calculée selon la formule suivante :

$$DT(\%) = \frac{1 - W_i}{W_t} \times 100$$

**DT** : Digestibilité (%) ;

**W<sub>i</sub>** : Poids du tégument sec après digestion ;

**W<sub>t</sub>** : Poids total du tégument sec avant digestion ;

Les résultats sont exprimés en % (moyenne de trois répétitions).

## **II.5. Analyse physicochimique du derme des holothuries**

### **II.5.1. Humidité totale (Norme AOAC 950.01, 1990)**

Pour déterminer la teneur d'eau des holothuries, environ 5 g de derme frais de chaque espèce a été séché dans une étuve à 103°C pendant 6 h (Figure 26). Les échantillons ont été laissés à reposer dans un dessiccateur jusqu'à masse constante. Le taux d'humidité a été déterminé selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'humidité (\%)} = \frac{\text{masse du derme frais} - \text{masse du derme sec}}{\text{masse du derme frais}} \times 100$$

Les résultats ont été exprimés en % (moyenne de trois répétitions).



**Figure 26.** Séchage du tégument des espèces d'holothuries étudiées dans l'étuve à 103°C pendant 6 h.

### **II.5.2. Cendres (Norme AOAC 923.03, 1997)**

Les cendres ont été déterminées au four à moufle dans des creusets en porcelaine sur environ 1 g de derme sec a été incinéré totalement à 600°C pendant 12 h (Figure 27). Le taux de cendres a été calculé comme étant le rapport de la masse finale sur la masse initiale après incinération. Le résultat a été exprimé en % (moyenne de trois répétitions).

Le calcul du taux de cendres ce fait alors comme suit :

$$CT(\%) = \frac{P_2 - P_0}{P_1 - P_0} \cdot 100$$

Avec :

$P_0$  ; poids du creuset vide

$P_1$  : poids du creuset + échantillon séché à l'étuve 105°C

$P_2$  : poids du creuset + résidu calciné



**Figure 3.** Incinération du tégument sec dans un four à moufle à 600°C pendant 12 h.

### **II.5.3. Lyophilisation**

Les échantillons d'holothuries fraîches ont été déposés dans un congélateur à -18°C pendant 24 h, puis ils ont été lyophilisés à -60°C pendant 72 h (Figure 28), le vide a été cassé sous azote afin d'éviter oxydation des acides gras. Les échantillons lyophilisés ont été ensuite conservés dans des sacs en plastiques zippés dans un endroit sec, en attendant la suite des analyses



**Figure 28.** Lyophilisation des échantillons d'holothuries frais à -60°C pendant 72 h

### **II.5.4. Matière azotée (Norme AOAC 960.52, 1997)**

La teneur en azote total a été déterminée par la méthode de Kjeldahl (Norme AOAC 960.52, 1997). Environ 0,20 g de derme sec a été pesés sur une balance de précision ( $\pm 0,0001$  g) (Sartorius, Aubagne, France), les échantillons ont été introduits dans des matras et puis minéralisés sur une rampe (Kjeldatherm, Gerhardt, Les Essarts le Roi, France) à 400°C pendant 3 h, après l'ajout de 2 ml d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) et environ 1 g de catalyseur (Figure 29). Le sulfate d'ammonium  $(NH_4)_2SO_4$  a été formé, le produit de la minéralisation. La titration se fait en ajoutant une base forte (NaOH) en volume égal au volume d' $H_2SO_4$  à l'aide d'un système de type microanalyse (Vapodest50, Gerhardt, Les Essarts le Roi, France). La concentration en azote minérale a été obtenue selon la formule suivante :

$$Nt (\%) = \frac{(V - V_0) \times N \times 1400}{E}$$

Avec :

**Nt** : azote total pour 100 g d'échantillon ;

**V** : volume d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nécessaire au titrage de l'échantillon en ml ;

**V<sub>0</sub>** : volume d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nécessaire au titrage du témoin en ml ;

**N** : normalité de la solution d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ;

**E** : prise d'échantillon en g.

La teneur en protéines est ensuite calculée selon la formule suivante :

$$\text{Teneur en protéines (\%)} = \text{Nt} \times 6,25$$

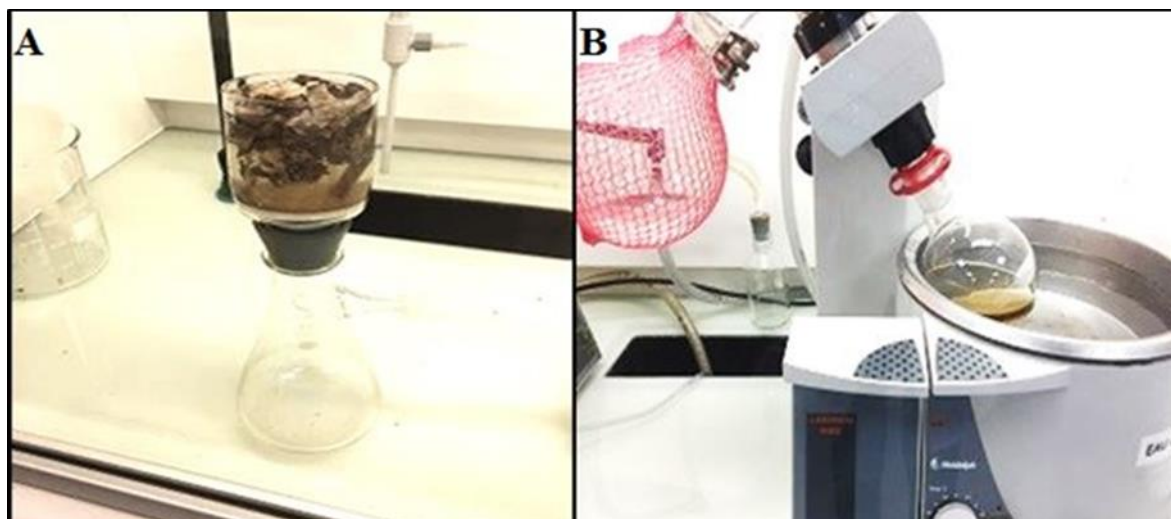
Avec :**6,25** : facteur protéique (Adler- Nissen, 1986).



**Figure 29.** Dosage de la matière azotée selon la méthode de Kjeldahl.

### **II.5.5. Extraction des lipides**

Les lipides totaux ont été extraits à partir du derme lyophilisé, selon la méthode de Folch et *al.* (1957) modifiée par Christie (1982), spécialement pour les produits anhydres. Environ 50 g de derme lyophilisé a été mélangé avec 300 ml d'un mélange de solvant chloroforme et méthanol (2:1 v/v) pendant 30 min sous agitation. Le mélange a été filtré sous vide à travers un verre fritté n°4 dans une fiole à vide. Le derme a été lavé avec 500 ml de solvant pour éviter toute perte de matière grasse (Figure 30A). Le filtrat a été versé dans un ballon, et puis le solvant a été éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide à 40°C. Le vide a été cassé sous azote pour éviter toute oxydation des lipides (Figure 30 B). Le taux de matière grasse a été déterminé en pesant la quantité de lipides récupérée après extraction et évaporation.



**Figure 30.** Extraction des lipides selon la méthode de Folch *et al.* (1957) : **A.** Filtration des lipides ; **B.** Evaporation du solvant.

## II.6. Caractérisation des fractions lipidiques du derme des holothuries

### II.6.1. Détermination des classes de lipides par Iatroscan®

L'analyse des lipides totaux a été réalisée sur un Iatroscan® (Chromarods-SIII, Iatroscan Laboratory Inc, Tokyo, Japon), selon la méthode utilisée par Hasan *et al.* (2016) (Figure 31). La méthode est basée sur le principe d'une détection par ionisation de flamme (DIF) effectuée à la suite d'une chromatographie sur couche mince. Les échantillons (1  $\mu$ l, 2  $\mu$ l, 3  $\mu$ l de lipides à 5 mg/ml) ont été déposés sur les chromarods, une baguette de 1 mm de diamètre et 75  $\mu$ m d'épaisseur recouverte d'une pellicule de SiO<sub>2</sub>. La migration des lipides en fonction de leur affinité a lieu dans des cuves contenant un mélange de solvant. Le premier mélange est composé d'hexane, d'éther diéthylique et d'acide formique (70:30:0,2 v/v/v), avec un temps de migration de 20 min. Cette première migration va permettre aux composés apolaires (triacylglycérols) et composés polaires (phospholipides et glycolipides) de se séparer. Les composés apolaires migrent sur les *chromarods*, alors que les composés polaires restent au niveau de la ligne de dépôt. Après séchage à 100°C pendant 1 min, les chromarods subissent un brûlage complet, afin de définir le ratio lipides polaires/lipides apolaires. Le brûlage et le traitement des données ont été effectués par le logiciel Chromstar qui permet l'obtention de pics représentatifs de la composition des échantillons. Le second mélange de migration est constitué de chloroforme, de méthanol, d'eau et d'ammoniaque (65:35:5:0,28 v/v/v/v), le temps de migration est de 40 min. Cela permettra la séparation des composés polaires (phos-

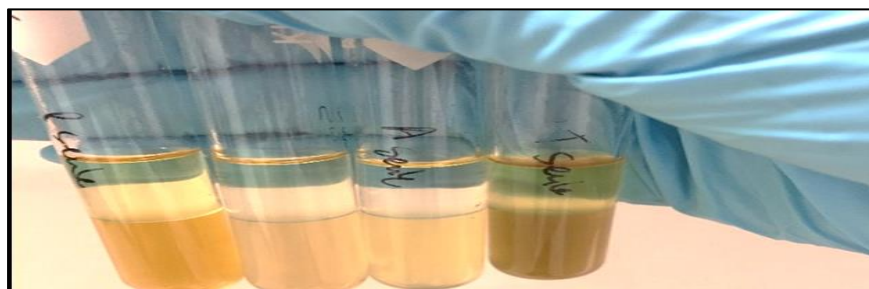
pholipides et glycolipides). Les différents composés polaires présents ont été alors séparés par discrimination de leur temps de rétention. Chaque analyse d'échantillon a été répétée trois fois.



**Figure 31.** Analyse des lipides totaux réalisée sur un Iatroscan®.

### II.6.2. Estérification des acides gras

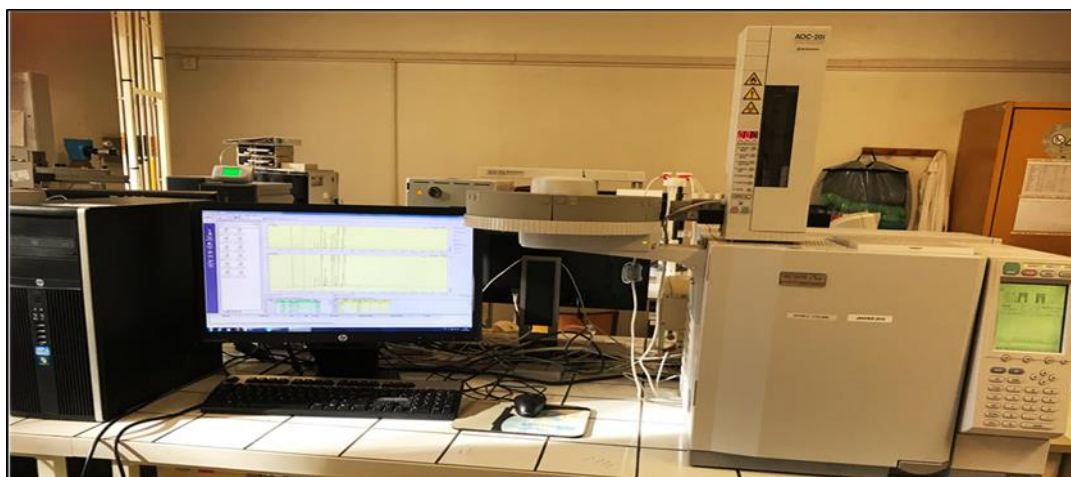
Les esters méthyliques d'acides gras ont été préparés selon la méthode d'Ackman. (1998), par le réactif au trifluorure de bore à la concentration de 14% dans du méthanol ( $\text{BF}_3/\text{MetOH}$ ). Environ 100 mg de lipide est pesés dans un tube à essai, 1,5 ml d'hexane et 15 ml de  $\text{BF}_3/\text{M}$  etOH y ont été ajoutés. Le tube a été fermé hermétiquement sous azote, agité énergétiquement, puis chauffé à  $100^\circ\text{C}$  pendant 1 h. Après refroidissement à température ambiante, 1 ml d'hexane et 2 ml d'eau distillée ont été ajoutés. Le tube a été agité sous azote, et deux phases se séparent après repos (Figure 32). La phase supérieure a été récupérée dans un autre tube. La phase inférieure a été extraite deux fois avec 1 ml d'hexane. Les phases d'acides gras estérifiés ont été lavées avec 2 ml d'eau distillée. Le solvant a été évaporé sous azote, avant de rajouter de 2 ml d'hexane pour ajuster la concentration des esters méthyliques adaptée à la CPG.



**Figure 32.** Estérification des acides gras selon la méthode d'Ackman (1998).

### **II.6.3. Chromatographie phase gazeuse (CPG)**

Les esters méthyliques de lipides totaux ont été analysés par une CPG de type CG-2010 Plus, Shimadzu (Figure 33), équipée avec un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire de 60 m de longueur, 0,25 mm de diamètre interne dont l'épaisseur du film est de 0,20  $\mu\text{m}$ . La température du four a été fixée à 200°C et celle du détecteur et l'injecteur à 250°C. Les échantillons ont été séparés sur la colonne en utilisant l'hélium comme gaz vecteur avec un débit de 0,79 ml/min. L'échantillon a été injecté en mode split. Le programme de température utilisé lors de l'analyse maintenait l'appareil à 120°C pendant 2 min puis montait en 180°C pendant 2 min et gardait l'échantillon à 220°C pendant 25 min. L'intégration des pics a été faite sur le logiciel GC solution (Shimadzu). L'identification des pics d'acides gras sur le chromatogramme a été réalisée à l'aide de standards d'acide (Restek, Food industry FAME Mix-méthylène chloride C23).



**Figure 33.** Analyse des esters méthyliques de lipides totaux par CPG (CG-2010 Plus).

### **II.6.4. Purification des phospholipides marins par acétone**

Les phospholipides ont été en utilisant une méthode de précipitation à l'acétone décrite par Schneider et Lovaas (2009), modifiée par Lu *et al.* (2012) et Hasan *et al.* (2016). Une masse d'environ 1,3 g de lipides a été dissoute dans 2 ml de chloroforme. Cette solution est ensuite vidée dans 100 ml d'acétone refroidi (Figure 34), le mélange a été agité vigoureusement à température ambiante. Le mélange a été maintenu à -18°C pendant une nuit, cela va permettre

la précipitation de phospholipides. L'acétone a été décantée par faible centrifugation à 1000 tr/min, les précipités ont été redissous dans le chloroforme, et la procédure de purification a été répétée une fois encore. Les précipités finaux (phospholipide purifié) sont séchés sous azote pendant 1 h. Les résidus d'acétone et de chloroforme ont été ensuite éliminés sous vide à 40°C par évaporateur rotatif.



**Figure 34.** Purification des phospholipides par acétones froid.

### II.6.5. Séparation et quantification des classes de phospholipides par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

La détermination des différentes classes de lipides par chromatographies en phase liquide à haute performance (Thermo Fisher Scientific Surveyor) (Figure 35) a été réalisée selon la méthode de Stith *et al.* (2000) avec quelques modifications. La séparation des différentes classes lipidiques (standards et échantillons) a été réalisée sur colonne de silice Phenomenex (250mm x 4,0mm, 5µm), en phase normale. Les classes de phospholipides ont été ensuite détectées à l'aide d'un détecteur-évaporateur à diffusion de lumière (DEDL) (ELSD-LT II, SHIMADZU). Le logiciel Chromeleon® permet de contrôler le système de gradients et d'injection. L'évaluation a été faite selon le tableau en utilisant trois solutions différentes :

**Phase A :** Chloroforme-méthanol-25% hydroxyde d'ammonium (80:19:1) ;

**Phase B :** Chloroforme-méthanol-25% hydroxyde d'ammonium (60:39:1) ;

**Phase C :** Chloroforme-méthanol-eau-25% hydroxyde d'ammonium (60:34:5:1).

Le temps d'acquisition pour chaque échantillon était de 65 min. Le débit de la phase mobile était de 1 ml/min. Les échantillons ont été thermostatés à 15°C et la colonne à 50°C. La pression du gaz de nébulisation (air) du détecteur a été fixée à 3 bars, la température du tube de

nébulisation à 35°C et le gain à 5°C. Les différentes classes de phospholipides ont été quantifiées par rapport à un étalonnage externe établissant la courbe de réponse entre la surface des pics et les quantités injectées.

**Tableau 2.** Gradients des différentes solutions utilisées lors de la séparation et quantification des classes de phospholipides par (HPLC).

Temps (min)	Phase mobile A (%)	Phase mobile B (%)	Phase mobile C (%)
0-5	100	0	0
5-23	0	100	0
23-25	0	100	0
25-35	0	0	100
50	0	0	100
55	100	0	0
65	100	0	0

#### **II.6.6. Analyse thermique des huiles par calorimétrie différentielle (DSC)**

L'analyse thermique différentielle (DSC) consiste à mesurer une différence de température entre l'échantillon étudié et un échantillon de référence. Le profil thermique ainsi obtenu reflète les changements d'état du produit analysé et les variations d'énergie associées à ces changements. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un calorimètre différentiel (Modèle Pyris1, Perkin Elmer Corp., Norwalk, USA) (Figure 36), selon la méthode décrite par Hasan *et al.* (2016). L'appareil a été étalonné au préalable en mesurant la température de fusion et l'enthalpie de l'indium ( $T_f$  : 156,6°C,  $H$  : 28,45 J/g). Une microcapsule en aluminium contenant environ 8 à 10 mg de l'échantillon, exactement pesés, a été placée dans le calorimètre. Le programme consistait en un réchauffement progressif des échantillons à -80°C jusqu'à 80°C (5°C/min). Les températures correspondant aux maximums des pics et les enthalpies de fusion (J/g) ont été calculées par un logiciel d'analyse TA Instruments.



**Figure 35.** Calorimètre différentiel (Modèle Pyris1).

### II.6.7. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier des huiles (FTIR)

La spectroscopie infrarouge permet de mesurer les énergies de vibration des liaisons moléculaires. Sous l'effet d'un rayonnement électromagnétique infrarouge, les liaisons moléculaires assimilables à des dipôles peuvent absorber cette énergie. Les spectres représentent l'absorbance de l'échantillon en fonction du nombre d'onde. Le nombre d'onde  $\nu$  (en  $\text{cm}^{-1}$ ) correspond à l'inverse de la longueur d'onde,  $\lambda$  (en cm). Il faut une énergie moindre pour déformer une molécule que pour l'étirer. En conséquence, les nombres d'ondes d'élongation sont toujours plus élevés que ceux de déformation. Il existe trois domaines d'infrarouge : l'infrarouge proche ( $14283\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ) ; l'infrarouge moyen qui a été utilisé dans notre cas ( $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ ) et l'infrarouge lointain ( $400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$ ). La Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier des huiles (FTIR) a été réalisée selon la méthode citée par Hasan *et al.* (2016). Les spectres FTIR ont été enregistrés en utilisant un spectromètre moyen FTIR Tensor 27 (Bruker, Allemagne) (Figure 36) équipé d'un module de diamant ATR (réflectance totale atténuée) et d'un détecteur DTGS (sulfate de deutériase de triglycine). La vitesse de balayage a été fixée à 20 kHz et 128 balayages ont été effectués pour la référence et les échantillons entre  $400\text{ cm}^{-1}$  et  $4000\text{ cm}^{-1}$  à une résolution de  $2\text{ cm}^{-1}$  à température ambiante. Un spectre de référence initial a été enregistré. Ensuite, une petite quantité de chaque échantillon a été placée sur le cristal de diamant de la cellule optique et au moins trois

expériences distinctes ont été effectuées pour chaque échantillon. Tous les traitements des résultats ont été effectués à l'aide du logiciel OPUS (Bruker, Karlsruhe, Allemagne). Les spectres d'absorbance bruts ont été lissés à l'aide d'une fonction de lissage de Savitsky-Golay à neuf points. Ensuite, les spectres ont été centrés et normalisés à l'aide du logiciel OPUS



**Figure 36.** Un spectromètre moyen FTIR Tensor 27.

## II.7. L'hydrolyse enzymatique des protéines

### II.7.1. Enzymes utilisées

#### **Alcalase® 2,4L**

C'est une endoprotéase de type sérine. Elle est obtenue à partir d'une souche sélectionnée de *Bacillus licheniformis*. Elle a une large spécificité de substrat et peut hydrolyser la plupart des liaisons peptidiques au sein d'une molécule de protéine, elle hydrolyse également des liaisons esters et peut catalyser des réactions de transestérification et de transpeptidation. Elle est active entre pH 6,5 et 8,5 et a une température optimale de 60 °C. Son activité est  $\geq 2,4$  U/g.

#### **Neutrase® 0,8L**

C'est une endopeptidase produite par une souche sélectionnée de *Bacillus subtilis*. Elle a une activité  $\geq 0,8$  U/g. Elle hydrolyse les liaisons peptidiques dont le groupement aminé est apporté par un acide aminé hydrophobe comme la leucine, la valine, l'isoleucine et la norleucine,

ainsi que les liaisons dont le groupement carboxylique est porté par la proline. Son activité est maximale à pH 7 et à 50°C.

### **II.7.2. Protocole expérimental**

Avant l'hydrolyse enzymatique, le derme lyophilisé des quatre espèces d'holothuries a été découpé en petits morceaux. L'hydrolyse a été réalisée dans un réacteur agité thermostaté de 250 ml où les échantillons lyophilisés ont été mis en suspension dans 100 ml d'eau distillée (Figure 37). La technique du pH-stat utilisée a été développée par Adler-Nissen (1986) afin de suivre l'hydrolyse (Figure 37). Les conditions de l'hydrolyse suivies ici sont celles optimisées par Gbogouri (2005). Cela consiste à maintenir le pH constant par ajout automatique de soude 1 N lors de la réaction enzymatique. La quantité de base consommée permettait de calculer le degré d'hydrolyse. La réaction a été mise en œuvre pendant 2 h, sous agitation constante à 450 tr/min. Le pH et la température du mélange ont été ajustés aux conditions optimales pour chaque enzyme (Alcalase pH 8, 55°C ; Neutrase pH 7,5, 50°C). La concentration d'enzyme utilisée était de 2% et 5%. Au bout de 2 h d'hydrolyse, le processus a été arrêté en élevant la température du mélange réactionnel à 90°C pendant 10 min pour inactiver l'enzyme. Les hydrolysats ont été ensuite centrifugés à 6000×g pendant 10 min pour séparer les fractions insolubles et solubles. Enfin, les phases solubles récupérées ont été conservées à -20°C jusqu'à utilisations ultérieures.

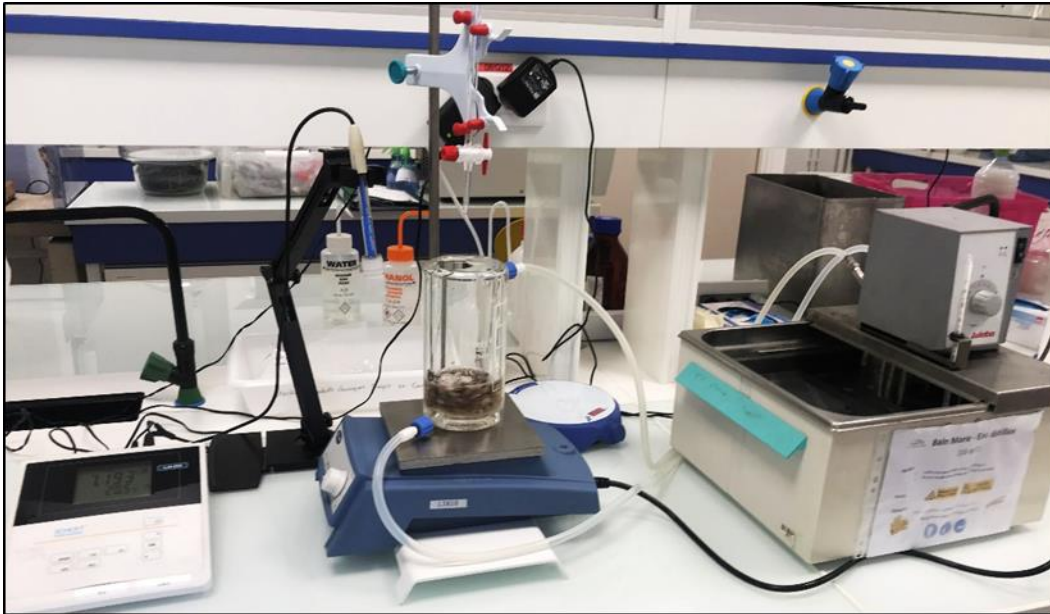


Figure 37. Montage pour l'hydrolyse enzymatique.

### II.7.3. La technique du pH-stat

Adler-Nissen (1986) a montré qu'il existe une proportionnalité entre la libération des protons et le nombre de liaisons peptidiques hydrolysées. Le degré d'hydrolyse est défini comme étant le pourcentage de liaisons peptidiques hydrolysées sur le nombre de liaisons peptidiques totales.

Il a été défini selon la formule suivante :

$$DH (\%) = \left( \frac{N_B \times B}{MP \times \alpha \times h_{tot}} \right) \times 100$$

Avec :

**B** : volume de NaOH ajouté (ml) ;

**N<sub>B</sub>**: normalité de la soude ;

**α** :degré moyen de dissociation des groupes alpha aminés ;

**MP** : masse de protéines (NT x 6,25) présentes dans le milieu réactionnel (g) ;

**h<sub>tot</sub>** : nombre de liaisons peptidiques dans la protéine pour les holothuries (4,33 méq / g).

Le degré de dissociation est défini comme suit :

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}}$$

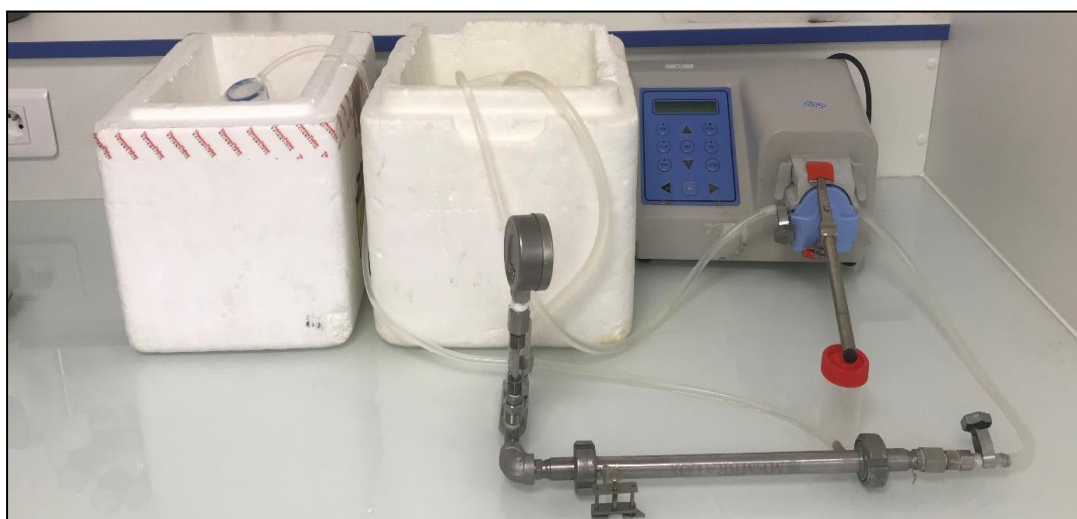
Où le pK représente le pK moyen des fonctions  $\alpha$ -aminés libérées durant l'hydrolyse :

$$P_k = 7.8 + \left( \frac{298 - T}{298 \times T} \right) \times 2400$$

Où T est la température exprimée en Kelvin.

#### II.7.4. Ultrafiltration des hydrolysats

L'ultrafiltration a été réalisée en utilisant une pompe péristaltique (VWR, FastLoad, France) à une vitesse de 80 tr/min, un débit de 551 ml/min, et une pression de 2 bars. Les hydrolysats de chaque espèce ont été dissous dans de l'eau distillée afin d'atteindre un volume de 400 ml, puis ils ont été filtrés deux fois avec une membrane céramique à 10 kDa et à 1 kDa (Figure 38). Les filtrats obtenus ont été congelés à -18°C puis lyophilisés pendant 48 h.



**Figure 38.** Ultrafiltration des hydrolysats à l'aide d'une pompe péristaltique.

#### II.8.1. Activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA)

Pour mesurer l'activité enzymatique de l'ECA, une méthode adaptée par Cushman et Cheung (1971) est utilisée. Elle consiste à quantifier l'acide hippurique libéré après hydrolyse du substrat synthétique HHL par RP-HPLC.

L'activité inhibitrice de l'ECA a été quantifiée pour les hydrolysats les plus prometteurs (degré d'hydrolyse le plus élevé). L'échantillon du mélange d'ECA contenait 50  $\mu$ l d'hydrolysat (4,3

mg dans 2 ml de tampon CHES 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,3), 20 µl d'ECA (0,1U d'ECA de poumon de lapin dans 200 µl de tampon : CHES 50 mM, NaCl 300 mM, glycérol 5%, pH 8,3), et 120 µl HHL (22,23 mg de HHL dans 6 mL de tampon CHES 50 mM et NaCl 300 mM, pH 8,3). Le mélange a été incubé à une température optimale de 37°C pendant 45 min, puis la réaction a été inactivée à l'aide de 75µl de la solution STOP (15 µM de captopril, 3 mM d'EDTA et 0,2 % de TFA). La solution a été mélangée au vortex puis filtrée à travers un filtre seringue 0,22 µm. Une quantité de 50 µl de l'échantillon a été injectée sur une colonne HPLC (Altima® C18 150 × 2,1) (Shimadzu LC-10). Le temps d'acquisition était de 35 minutes par échantillon. Le débit de la phase mobile était de 0,2 ml/min. Les échantillons ont été thermostatés à 15°C et la colonne à 29°C. La pression a été fixée à 50 bars.

L'évaluation a été faite selon le tableau 3 en utilisant deux solutions différentes :

**Phase A :** Eau ultra-pure-0,1% Acide trifluoroacétique (100:0,1) ;

**Phase B :** Acetonitrile-0,1% Acide trifluoroacétique (100:0,1).

**Tableau 3.** Gradients des différentes solutions utilisées lors de l'évaluation de l'activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) par HPLC.

Temps (min)	Phase A (%)	Phase B (%)
0	87	13
7	50	50
8	1	99
17	1	99
18	87	13
35	87	13

### II.8.2. Détermination $CI_{50}$ des hydrolysats

La valeur  $CI_{50}$  est définie comme la concentration d'hydrolysats capables d'inhiber la moitié des activités de l'ECA. Différentes concentrations d'hydrolysats ont été sélectionnées et évaluées pour leurs activités inhibitrices de l'ECA (%). La  $CI_{50}$  des différents hydrolysats a été déterminée en rapportant les activités d'inhibition de l'ECA (%) aux diverses concentrations d'hydrolysats. Les expériences ont été effectuées en triple.

$$CI_{50} = \frac{\%ECA}{C}$$

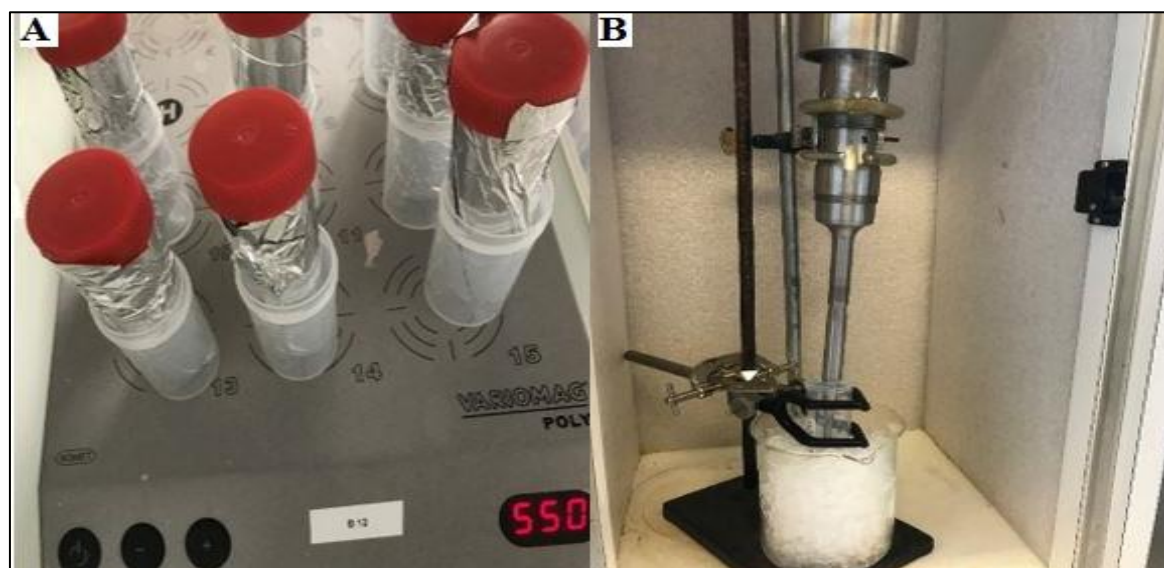
Où :

CI<sub>50</sub> : Concentration inhibitrice médiane ;

C : Concentration des hydrolysats.

### II.9.1 Préparation des liposomes

Les nanoliposomes ont été préparés selon la méthode de Bouarab *et al.* (2014) avec quelques modifications. Environ 60 mg de lécithine de "concombres de mer" a été ajouté à 2,94 ml d'eau distillée, la suspension a été agitée pendant 4 h sous azote afin d'obtenir des nanoliposomes vides à 2% de lécithine (Figure 39A). Pour les nanoliposomes contenant l'hydrolysate de protéine, 30 mg/ml d'hydrolysate à UF 1kDa est utilisé pour obtenir une concentration finale d'hydrolysate à 10 mg/ml. Les échantillons ont été ensuite homogénéisés à l'aide d'une sonde ultrasons à 40 kHz et à 30% de la pleine puissance pendant 4 min (1 sec en marche, 1 sec en arrêt) (Figure 39B). Les échantillons de liposomes ont été conservés dans une bouteille en verre dans l'obscurité à 37°C.



**Figure 39.** Formulation des nanoliposomes : **A.** Nanoliposomes vides ; **B.** Sonication des nanoliposomes contenant l'hydrolysate.

### II.9.2. Mesures de la taille des liposomes et du potentiel zêta

La taille des liposomes a été analysée par diffusion dynamique de la lumière (DLS) à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS de Malvern (Malvern Instruments, UK) (Figure 40). Le protocole utilisé est adapté par Hasan *et al.* (2014). Les échantillons ont été dilués dans de l'eau distillée ultra-filtrée (1:500, v/v), puis placés dans des cellules cylindriques verticales (10 mm de diamètre). L'intensité de la diffusion a été mesurée à un angle de diffusion de 173°C par rapport à la source en utilisant un détecteur de photodiodes à avalanche à 25°C. L'indice de réfraction (IR) et l'absorbance ont été fixés respectivement à 1,471 et 0,010 à 25°C. Les mesures ont été effectuées en cinq répétitions.



**Figure 40.** Zetasizer Nano ZS

### II.10. Essais de biocompatibilité

Pour évaluer l'impact des hydrolysats des espèces de "concombres de mer" (*Holothuria poli*, *Holothuria tubulosa*, *Holothuria arguinensis*, et *Holothuria sanctori*) (respectivement HPF, HTF, HAF et HSF) sur le comportement cellulaire, différents paramètres ont été estimés : cytotoxicité potentielle du système, la prolifération cellulaire et l'activité métabolique des cellules.

#### II.10.1. Essais de cytotoxicité

Le test de cytotoxicité a été effectué après 3, 5 et 7 jours en utilisant le Kit de détection de cytotoxicité PLUS (LDH) (#04744926001, Saint Louis, USA), selon les instructions du fabricant. Ce test est basé sur la mesure de l'activité de la Lactate DesHydrogenase (LDH) libérée par le cytosol des cellules endommagées. Trois contrôles ont été inclus : contrôle de fond (mi-

lieu de l'essai), contrôle faible (cellules non traitées correspondant à la condition de contrôle) et contrôle élevé (un contrôle positif où un maximum de LDH libéré en raison de la lyse des cellules). L'absorbance a été mesurée grâce à un spectrophotomètre à 490 nm (Varioskan® Flash, Thermo Scientific, Waltham, USA). Pour déterminer les valeurs expérimentales de l'absorbance, les valeurs moyennes de l'absorbance des échantillons triples et des contrôles ont été calculées et soustraites des valeurs de l'absorbance du contrôle de fond. Le pourcentage de cytotoxicité a été déterminé par rapport à la valeur du contrôle élevé (fixé à 100 %).

### **II.10.2. Prolifération cellulaire**

La prolifération cellulaire a été évaluée après 3, 5 et 7 jours de culture de cellules souches mésenchymateuses (CSMs), à l'aide du test Hoechst qui permet de quantifier l'ADN cellulaire. En bref, les CSMs ont été récoltées à partir de plaques de culture cellulaire de 12 puits, et mises en suspension dans 100 µl de tampon Hoechst (10 mM de TRIS, 1mM d'EDTA et 0,1M de NaCl, pH 7,4), avant 5 séries de cycles de congélation (l'azote liquide)/décongélation (60°C, 5 min) pour lyser les cellules et libérer leur ADN en solution. Des plaques noires à fond plat et à faible fluorescence ont été utilisées pour réaliser le test, une courbe standard d'ADN de thymus de veau est utilisée pour la quantification. Les échantillons ont été mélangés à 2 µl de solution de Hoechst (0,1 µg/ml en concentration finale), et les mesures des échantillons et des étalons d'ADN ont été effectuées par spectrophotométrie de fluorescence (360 nm d'excitation/460 nm d'émissions, Varioskan® Flash, Thermo, France). La concentration d'ADN (µg/mL) de chaque échantillon a été basée sur la mesure de sa fluorescence par rapport à la courbe standard.

### **II.10.3. Activité métabolique des cellules**

L'activité métabolique cellulaire a été mesurée à l'aide du test MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium]. Un volume de 50 µl de solution de MTT a été ajouté à 200 µl de milieu de culture cellulaire. En bref, les CSMs ont été incubées pendant 4 h (5% de CO<sub>2</sub>, 95% d'humidité à 37°C), pour permettre aux déshydrogénases mitochondriales de transformer la couleur jaune du MTT en cristaux de formazan bleu. Le surnageant a été retiré et le produit insoluble a été protégé de la lumière, et dissous par l'ajout de 200 µl de diméthylsulf oxide (DMSO) et mélangé doucement à 37°C pendant 5 min. Les surnageants ont été retirés, protégés de la lumière, centrifugés, et leur absorbance mesurée pendant les 30

min qui suivaient à l'aide d'un Varioskan® Flash (Thermo Fisher Scientific, France) à 540 nm. La condition de contrôle de l'activité métabolique du CSMs a été utilisée comme valeur de référence.

### **II.10.4 Analyse statistique**

Les résultats ont été exprimés sous la forme d'une moyenne  $\pm$  écart type. Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPad Prism 6 (GraphPad Software) en utilisant des comparaisons multiples d'ANOVA à sens unique suivies d'une correction de Tukey. Les valeurs P ont été indiquées dans les légendes si elles ont été considérées comme significatives (\* $<0,01$ , \*\* $<0,005$ ).

## **Chapitre III : Résultats et Discussions**

### III.1. Etudes biométrique des quatre espèces d'holothuries

Les quatre espèces d'holothuries utilisées dans cette étude sont : *Holothuria poli*, *Holothuria tubulosa*, *Holothuria arguinensis*, et *Holothuria sanctori*, le choix s'est porté sur ces espèces qui sont prédominantes lors de notre échantillonnage.

Les résultats de l'étude biométrique des quatre espèces d'holothuries sont présentés dans le tableau 4. La longueur contractée (LC) des échantillons variait 144,03-261,00 mm, alors que le poids humide (PH) variait entre 90,22-119,78 g, *H. arguinensis* présentait les plus hautes valeurs (Tableau 4). Nos spécimens présentaient des classes de tailles et de poids supérieures à celles enregistrées par Mezali (1998) pour les mêmes espèces méditerranéennes, mais inférieurs à celle enregistrée par Purcell *et al.* (2009) pour les espèces indopacifiques. Ces différences sont liées à plusieurs facteurs, tels qu'une croissance rapide due à une diminution de la prédation des holothuries (Olaya-Restrepo *et al.*, 2018), la biologie de l'espèce, la pression de la pêche (González-Wangüemert *et al.*, 2018b), un régime alimentaire très riche en matière organique cas des herbiers *Posidonia oceanica*, l'habitat de prédilection de *H. poli* et *H. tubulosa* (Mezali, 2004). La taille des particules de sédiment joue aussi un rôle essentiel car plus elles sont petites, plus la quantité de matière organique ingérée par les holothuries est élevée, en raison du rapport volume/surface plus élevé qui a déjà fait ses preuves pour favoriser l'adhérence de la matière organique (Mezali et Soualili, 2013). Plotieau *et al.*, (2013) ont suggéré que la valeur nutritionnelle des sédiments fins serait supérieure à celle des gros sédiments, en raison du nombre plus élevé de microorganismes nutritifs présents. Toutefois, il est important de souligner que l'estimation de la longueur contractée du corps n'est pas une mesure fiable. En effet, l'erreur risque d'être plus importante que celle du poids humide car il est très difficile d'obtenir un relâchement complet du corps des holothuries, la longueur change de manière significative par la contraction et l'allongement de leur corps (Battaglione *et al.*, 1999). Par conséquent, les mesures de poids humide sont plus fiables (Mezali, 1998). La relation entre la longueur et le poids diffère selon les espèces, en fonction de la forme et l'épaisseur du corps (Cone, 1989).

Une différence d'épaisseur du tégument est observée entre les quatre espèces étudiées, l'épaisseur était de 3,44 mm, 5,99 mm, 4,53 mm, et 5,01 mm, respectivement chez *Holothuria poli*, *H. tubulosa*, *H. arguinensis*, et *H. sanctori* (Tableau 4). Selon González-Wangüemert *et al.* (2018b), la nourriture est utilisée différemment par les deux espèces *H. poli* et *H. tubulosa*,

**Tableau 4.** Mesures biométriques obtenues pour les quatre espèces d'holothuries étudiées comparées à d'autres espèces méditerranéennes et Indopacifiques

Espèces	LC (mm)	E (mm)	PH (g)	PS (g)	LS (mm)	PH/PS	Références
<i>H. poli</i>	144,03±23,07	3,44±0,56	90,22±16,07	12,85±0,59	71,60±8,68	7,02	Présente étude
<i>H. tubulosa</i>	187,30±39,79	5,96±1,26	112,64±45,57	12,95±1,32	74,20±9,80	8,69	Présente étude
<i>H. arguinensis</i>	261,00±55,16	4,53±1,03	119,78±31,56	15,51±3,60	67,30±5,22	15,78	Présente étude
<i>H. sanctori</i>	210,69±37,36	5,01±0,36	110,88±11,06	12,45±2,36	65,02±3,68	6,02	Présente étude
<i>H. poli</i>	91,03± 43,10	-	-	-	-	6,44	Mezali (1998)
<i>H. tubulosa</i>	120,15±38,52	-	-	-	-	6,53	Mezali (1998)
<i>H. sanctori</i>	115,60±27,90	-	-	-	-	-	Mezali (1998)
<i>H. forskali</i>	108,04±28,90	-	-	-	-	8,89	Mezali (1998)
<i>H. sanctori</i>	225,00±38,90	2,69±1,95	76,90 ± 18,37	-	-	-	Mezali <i>et al.</i> (2014)
<i>A. aechinites</i>	190,00±3,00	-	231,00±14,00	35,00±2,00	80,00±2,00	-	Purcell <i>et al.</i> (2009)
<i>A. gaspinea</i>	270,00±10,00	-	735,00±39,00	99,00±11,00	130,00±10,00	-	Purcell <i>et al.</i> (2009)
<i>H. lessoni</i>	310,00±10,00	-	1456,00±50,00	221,00±7,00	280,00±10,00	-	Purcell <i>et al.</i> (2009)
<i>H. whitmaei</i>	250,00±8,00	-	1174,00±45,00	213,00±14,00	150,00±4,00	-	Purcell <i>et al.</i> (2009)
<i>A. gapalauensis</i>	270,00±7,00	-	985,00 ± 44,00	165,00±11,00	150,00±5,00	-	Purcell <i>et al.</i> (2009)

Moyenne ± écart type (n = 30).

tandis que *Holothuria poli* l'utilise pour augmenter sa taille, *H. tubulosa* quant à elle l'utilise pour augmenter l'épaisseur de sa paroi et du corps et son poids. Nos résultats ne concordent pas avec cette hypothèse car *H. tubulosa* avait une taille, un poids, et une épaisseur supérieure à ceux enregistrés pour *H. poli*, malgré que sa paroi soit la plus rigide. En ce qui concerne *Holothuria arguinensis* et *H. sanctori*, il n'y a pas d'information sur la relation entre la disponibilité alimentaire et l'épaisseur de la paroi, bien qu'un modèle de croissance spécifique ait déjà été déterminé par Olaya-Restrepo *et al.* (2018) pour *H. arguinensis*.

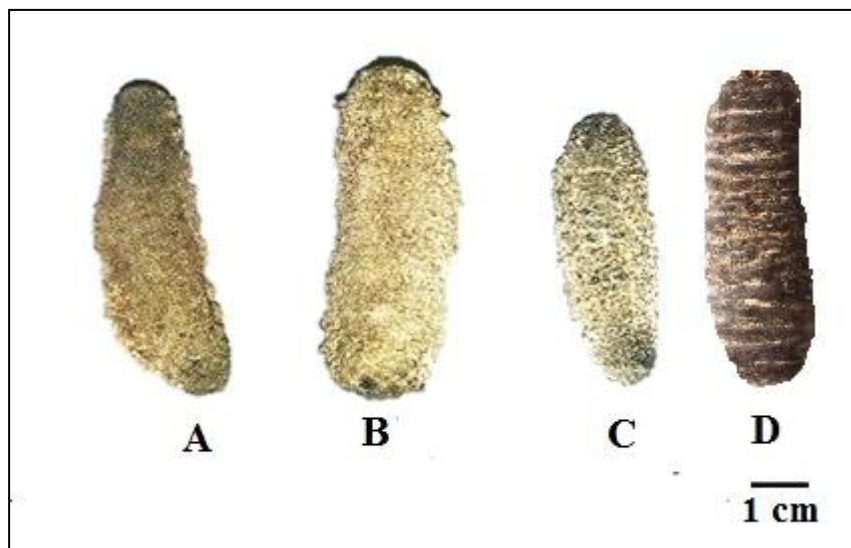
Il n'y a pas de différences significatives entre les résultats de mesures biométriques des quatre espèces d'holothuries ( $p > 0,05$ ), cela est dû au fait que les espèces sont issues de la même région Méditerranéenne.

### III.2. Caractéristiques des "bêches-de-mer"

Après transformation en "bêches-de-mer", les holothuries séchées sont pesées et mesurées pour estimer la perte de poids et de longueur (Tableau 4). Les résultats démontrent une perte significative de poids et de taille chez toutes les espèces étudiées (Tableau 4). Une diminution de 40,10-74,21% de longueurs et 85,72% à 93,65% du poids initial. Selon Conand (1990), après le processus de séchage, le poids diminue entre 90% et 97%, selon les espèces. Le salage permet aussi la déshydratation des "concombres de mer", et permet d'éliminer une partie de l'eau contenue dans le tégument avant le séchage au soleil. Des études similaires menées par Purcell *et al.* (2009) et Lavitra *et al.* (2009) sur les espèces d'holothuries exploitées en Nouvelle-Calédonie et dans le Sud-Ouest de Madagascar, confirment nos résultats, une diminution considérable de longueur et de poids des holothuries ont été également constatée par ces auteurs. Le rapport entre le poids humide et le poids sec est calculé pour toutes les espèces. Des variations considérables ont été observées entre les quatre espèces étudiées (Tableau 4). Le rapport du PH/PS d'*H. poli* et *H. tubulosa* et *H. sanctori* se rapproche de la valeur standard 10:1 établie par Newell et Courtney pour les "concombres de mer" (*in* Astall et Johns, 1991). Mais le rapport obtenu pour *H. arguinensis* est supérieur à la valeur standard 10:1. Selon Ngaluafe et Lee. (2013), plusieurs raisons sont susceptibles d'expliquer un tel écart. Le séchage au soleil entraîne une perte moindre, les résultats sont aussi tributaires des conditions climatiques (taux d'humidité). Malheureusement, la plupart des études antérieures ne précisent pas la méthode de séchage utilisée. Il est dès lors difficile d'élucider les écarts constatés entre les différents taux calculés.

En ce qui concerne la qualité du tégument, on a observé que la paroi d'*H. poli* est extrêmement résistante et rigide par rapport aux autres espèces. Cela signifie qu'elle contient une quantité considérable de sclérites. Le tégument d'*H. arguinensis* et *H. sanctori* étaient très sensible à la lumière du soleil et à la chaleur et se détériore rapidement. Cela est expliqué par le fait que l'exposition prolongée au soleil provoque des réactions biochimiques et une activation des radicaux, entraînant une détérioration rapide du tégument. Ainsi, l'holothurie devrait être manipulée avec précaution afin de conserver sa fraîcheur et d'empêcher lessivage des composants bioactifs (Chong *et al.*, 2015). Quant au tégument d'*Holothuria tubulosa*, il n'était pas rigide et présentait une bonne résistance au soleil et à la chaleur. Pour que les "bêches-de-mer" soient considérées de bonne qualité, leur tégument ne doit pas contenir un nombre important de sclérites et ne doit pas se détériorer rapidement, lors des cueillettes et la

transformation (Motokawa, 1982 ; Conand, 1990). Selon les marchés, les "bêches-de-mer" sont classées en deux à sept catégories, cela dépend de leur taille, poids et espèce. Ils sont fréquemment classés en : très grand (XL, 67 g ; > 120 mm), grand (L, 50 g ; 100-120 mm), moyen (M, 25 g ; 64 mm), petit (S, 17 g ; 51-64 mm) et très petit (XS, 11-15 g ; <51 mm) (Conand, 1990). Selon les résultats obtenus, nos "bêches-de-mer" appartiennent à la catégorie S (petite), car leur poids sec et leur taille variaient entre 12 et 15g et 65 et 74 mm, respectivement (Tableau 4 ; Figure 41).



**Figure 41.** Les "bêches-de-mer" obtenues : **A.** *H. poli* ; **B.** *H. tubulosa* ; **C.** *H. arguinensis* ; **D.** *H. sanctori*

### II.3. Digestibilité des quatre espèces d'holothuries

Le degré de digestibilité des quatre espèces d'holothuries est présenté dans le tableau 5. Les degrés de digestibilité d'*Holothuria sanctori* (53,29%) et *H. arguinensis* (52,06) sont presque identiques, mais nettement supérieure à celui d'*Holothuria poli* (34,68%) et *H. tubulosa* (25,96%). Leurs degrés de digestibilité étaient aussi plus ou moins similaire à celui obtenu par Wen *et al.* (2015) pour les viandes de communément consommées (porc, poisson, poulet et bœuf). Selon Escudero *et al.* (2010), Hur *et al.* (2011) et Pennings *et al.* (2013), les variations des degrés de digestibilité sont attribuées aux différences de biodisponibilité des protéines (du taux d'hydrolyse des protéines), la taille des peptides, et leur teneur en protéines et en collagènes qui constituent les principaux composants de la paroi des holothuries (environ 70% des protéines de la paroi). Ce dernier facteur peut avoir une importance en raison de la présence

de glycosaminoglycanes, largement répartis dans les faisceaux de fibres de collagène (Kariya *et al.*, 1990 ; Liu *et al.*, 2019 ; Tian *et al.*, 2020).

**Tableau 5.** Degré de digestibilité (%) des quatre espèces de "concombres de mer" par l'enzyme digestive pepsine en comparaison au viandes communément consommées

<b>Espèces</b>	<b>Digestibilité (%)</b>	<b>Références</b>
<i>Holothuria poli</i>	34,68±1,02	Présente études
<i>Holothuria tubulosa</i>	25,96±2,04	Présente études
<i>Holothuria arguinensis</i>	52,06±0,91	Présente études
<i>Holothuria sanctori</i>	53,29±3,28	Présente études
<b>Porc</b>	47,22	Wen <i>et al.</i> (2015)
<b>Poisson</b>	46,98	Wen <i>et al.</i> (2015)
<b>Poulet</b>	44,67	Wen <i>et al.</i> (2015)
<b>Bœuf</b>	42,75	Wen <i>et al.</i> (2015)

Moyenne ± écart type (n = 3).

### III.4. Analyses biochimiques approximatives des "concombres de mer"

La composition approximative des téguments des quatre holothuries est présentée dans le tableau 6. L'humidité variait entre 61,85 et 67,76% du poids frais, la valeur la plus élevée étant enregistrée chez *H. poli*. Ces teneurs étaient attendues car la plupart des produits de la mer contiennent un niveau d'eau élevé (Çakli *et al.*, 2004). Les cendres variaient de 31,58 à 47,31% du poids sec, la valeur la plus élevée étant enregistrée chez *H. arguinensis*. La teneur en cendres dépend de la teneur en minéraux comme le calcium, le magnésium, le fer et le zinc (Chen, 2003 ; Ridzwan, 2007). Les teneurs en protéine brute se situaient entre 49,26 et 69,34% du poids sec ; la valeur la plus élevée est obtenue chez *Holothuria sanctori*. La teneur en lipides totaux était la plus faible, qui variait entre 2,57 et 4,30% du poids sec. La teneur en lipides la plus élevée est enregistrée chez *H. poli*. Les "concombres de mer" sont généralement caractérisés par une haute teneur en protéines et une faible teneur en lipides (Wen *et al.*, 2010). Les "concombres de mer" peuvent donc être considérés dans les formulations alimentaires comme des ingrédients "riches en protéines, faibles en gras".

**Tableau 6.** Composition biochimique approximative (%) des "concombres de mer" en comparaison à d'autres espèces indopacifiques.

Espèces	Humidité (%)	Cendre (%)	Protéine (%)	Lipide (%)	Références
<i>H. poli</i>	67,76±0,94	41,78±1,82	69,34±4,13	5,53±0,59	Cette étude
<i>H. tubulosa</i>	61,85±2,62	40,77±0,60	49,26±0,76	3,81±0,25	Cette étude
<i>H. arguinensis</i>	64,55±0,42	47,31±0,88	66,41±0,90	2,57±0,28	Cette étude
<i>H. sanctori</i>	66,21±1,34	31,58±0,10	59,36±2,32	3,07±0,50	Cette étude
<i>H. arenicola</i>	72,12±0,25	45,16±0,22	44,56±0,04	0,88±0,05	Haider <i>et al.</i> , 2015
<i>A. mauritiana</i>	76,54±0,09	31,81±0,34	66,86±0,06	0,76±0,02	Haider <i>et al.</i> , 2015
<i>H. leucospilota</i>	81,41±0,60	4,3 ± 0,20	45,71±0,20	4,60±0,30	Omran, 2013
<i>H. fuscogilva</i>	84,34±0,72	30,45±6,79	63,64±4,56	1,12±0,28	Fawzya <i>et al.</i> , 2015
<i>H. scabra</i>	85,76±0,30	2,26±0,15	43,43±0,20	5,66±0,09	Omran, 2013
<i>T. ananas</i>	90,81±2,08	37,40±4,60	48,26±2,32	2,35	Fawzya <i>et al.</i> , 2015

Moyenne  $\pm$  écart type (n = 3).

Il n'y a pas de différences significatives entre les résultats de compositions approximatives des quatre espèces d'holothuries ( $p > 0,05$ ), cela est dû au fait que les espèces sont issues de la même région Méditerranéenne.

On a remarqué que même si les espèces utilisées dans cette étude étaient différentes, les résultats étaient proches de ceux des autres "concombres de mer" (Tableau 6), l'humidité, les cendres, les protéines et les lipides se situaient respectivement entre 72,12 et 90,81%, 2,26 et 45,16%, 43,43 et 66,86% et 0,76 et 5,66% (Omran, 2013 ; Fawzya *et al.*, 2015 ; Haider *et al.*, 2015 ). La composition approximative varie d'une espèce à l'autre, en fonction de nombreux facteurs tels que les variations saisonnières du comportement alimentaire et la différence des régions (Ginger *et al.*, 2001).

Les quatre espèces d'holothuries présentaient un rapport protéines/lipides suffisant (*H. poli* 12:1 ; *H. tubulosa* 13:1 ; *H. arguinensis* 25:1 ; *H. sanctori* 19:1), ce qui est significatif sur le plan nutritionnel compte tenu du rôle essentiel que jouent les protéines dans le corps humain.

### III.5. Analyses des lipides

#### III.5.1. Classes lipidiques des quatre espèces d'holothurie

La composition lipidique des quatre "concombres de mer" est présentée dans le tableau 7. Chez les quatre espèces, les lipides totaux ont démontré une teneur de 3,55 à 6,43% de lipides neutres et une teneur de 91,16 à 93,85% de lipides polaires, qui se composent de 10,63 à 23,54% de glycolipides et de 69,02 à 80,22% de phospholipides. Les valeurs les plus élevées de glycolipides et de phospholipides sont retrouvées chez *Holothuria poli* et *H. sanctori*, respectivement.

Dans tous les échantillons, la teneur en phospholipides était dominante, et bien plus élevée que celles signalées pour *Holothuria moebii*, *Holothuria impatiens*, *Stichopus chloronotus*, *Euapta godeffroyi*, *Holothuria pardalis* et *Apostichopus japonicus*, qui se situaient entre 12,50% et 22,10% (Svetashev *et al.*, 1991; Lou *et al.*, 2012).

La plupart des lipides neutres sont utilisés comme stock d'énergie (Athenstaedt et Daum, 2006). Chez les holothuries, les lipides neutres obtenus à partir de sources phytoplanctoniques sont stockés pendant la période d'alimentation. Lorsque les larves ne sont pas en mesure d'ob-

tenir des nutriments externes, les lipides neutres sont dégradés et utilisés pour alimenter le reste de leur métamorphose au cours du développement larvaire (Peters-Didier et Sewell, 2019).

Les phospholipides et les glycolipides sont les principaux composants des lipides d'algues et des feuilles de *Posidonia oceanica* (Viso *et al.*, 1993 ; Pérez *et al.*, 2016), une des sources alimentaires des holothuries (Gao *et al.*, 2011 ; Belbachir *et al.*, 2017).

**Tableau 7.** Détermination par TLC-FID des proportions de lipides neutres et polaires (%) des quatre holothuries.

Espèces	Lipides neutres (%)	Phospholipides (%)	Glycolipides (%)
<i>H. poli</i>	4,56 ± 0,25	69,02 ± 0,78	23,54 ± 0,56
<i>H. tubulosa</i>	5,12 ± 0,18	79,23 ± 0,11	12,89 ± 0,69
<i>H. arguinensis</i>	6,43 ± 0,33	71,37 ± 0,58	19,79 ± 0,52
<i>H. sanctori</i>	3,55 ± 0,21	80,22 ± 0,32	13,63 ± 0,01

Moyenne ± écart type (n = 3).

Il n'y a pas de différences significatives entre les résultats de classe lipidiques des quatre espèces d'holothuries ( $p > 0,05$ ), cela est dû au fait que les espèces sont issues de la même région Méditerranéenne.

### III.5.2. Analyse des acides gras des lipides totaux

Les valeurs obtenues varient selon les "concombres de mer" (Tableau 8). Toutes les espèces présentaient de faibles teneurs d'acides gras monoinsaturés (AGMI) par rapport aux acides gras saturés (AGS), et polyinsaturés (AGPI), à l'exception de *H. tubulosa*, qui présentait une quantité plus importante d'AGMI par rapport aux AGS. Le profil lipidique des holothuries est affecté par plusieurs facteurs tels que : le lieu d'échantillonnage, l'approvisionnement alimentaire, le comportement alimentaire et le type de solvants utilisés pour l'extraction des lipides (Fredalina *et al.*, 1999 ; Neto *et al.*, 2006).

Les teneurs d'AGS se situaient entre 12,21% et 32,38 %, le pourcentage le plus élevé est observé chez *H. arguinensis*. Les principaux AGS trouvés dans les quatre espèces sont l'acide palmitique (16:0) et l'acide stéarique (18:0). *H. tubulosa* présentait le plus faible pourcentage d'acide palmitique (2,68%), tandis que *H. arguinensis* avait la teneur la plus élevée (14,60%), suivie d'*Holothuria poli* et *H. sanctori* qui présentaient des valeurs similaires (4,60% et 4,15%, respectivement) (Tableau 8). Pour l'acide stéarique, *H. arguinensis* présentait aussi la teneur la plus élevée (11,90%), suivie de *H. poli* et *H. sanctori* qui avaient les mêmes valeurs

(7,56% et 7,92% respectivement), alors que *H. tubulosa* a démontré la valeur la plus faible (5,87%). Les teneurs d'AGMI détectées chez les quatre espèces variaient entre 14,09 et 16,52%, le pourcentage le plus élevé est retrouvée chez *H. arguinensis*. Le principal AGMI présent était l'acide *Cis*-oléique (18:1*n*-9*c*), ses valeurs étaient similaires chez toutes les holothuries, allant de 5,51 à 6,58% (Tableau 8).

Les AGPI étaient dominants chez toutes les espèces d'holothuries et variaient entre 50,90-71,80%, la quantité la plus élevée est observée chez *H. tubulosa*. Les principaux AGPI étaient l'acide arachidonique (ARA) (20:4*n*-6), l'acide  $\alpha$ -linoléique (ALA) (18:3*n*-3), l'acide hexadécadiénoïque (16:2*n*-4), l'acide eicosapentaénoïque (EPA) (20:5*n*-3), et l'acide docosahexaénoïque (DHA) (22:6*n*-3). La teneur la plus élevée en ARA est détectée chez *H. tubulosa* (18,90 %), suivi d'*Holothuria poli*, *H. sanctori* et *H. arguinensis* (16,50%, 15,30% et 10,50%, respectivement). La plus grande quantité d'ALA est trouvée chez *H. tubulosa* (11,0%), suivie de *Holothuria poli*, *H. sanctori* et *H. arguinensis* (10,0%, 9,33%, et 7,26%, respectivement). *Holothuria tubulosa* présentait le plus haut pourcentage d'acide hexadécadiénoïque (15,0%), suivie d'*Holothuria poli*, *H. sanctori* et *H. arguinensis* (12,6%, 11,2% et 9,62%, respectivement). L'EPA était comparativement plus élevé que le DHA chez toutes les espèces étudiées. La teneur la plus élevée d'EPA est retrouvée chez *H. tubulosa* et *H. sanctori*, qui ont démontré des teneurs similaires (8,76% et 8,62%, respectivement), suivies d'*Holothuria poli* et *H. arguinensis* (7,90% et 5,07%, respectivement) (Tableau 8). En ce qui concerne le DHA, *H. tubulosa* présentait également la plus haute valeur (7,25 %), suivie d'*Holothuria poli* (6,56 %) et d'*Holothuria arguinensis* et *H. sanctori* dont les teneurs étaient similaires (4,97 % et 4,86 %, respectivement) (Tableau 8).

Les "concombres de mer" se nourrissent de sédiments marins composés de débris d'origine végétale et animale, de phytoplancton, de bactéries, de diatomées, et aussi de sédiments mous des fonds marins riches en EPA et DHA (Gao *et al.*, 2011). Ils ont un métabolisme faible et ne peuvent pas synthétiser les acides gras à longue chaîne, mais les accumulent après consommation de leurs sources d'alimentation. Cela pourrait influencer leur composition biochimique et leurs propriétés nutritionnelles (Taboada *et al.*, 2003 ; Purcell *et al.*, 2012 ; Yu *et al.*, 2015). L'acide palmitique, l'acide oléique, l'acide *Cis*-oléique et l'acide arachidonique sont les principaux acides gras présents dans les algues méditerranéennes (*Spyridia filamentosa*, *Acanthophora nayadiformis*, *Halymenia floresii*, *Cystoseira corniculata*, *Padina pavonia* et *Styopodium schimperi*) (Polat et Ozogul, 2008 ; 2009). L'acide palmitique et l'acide stéa-

rique sont également les principaux acides gras retrouvés dans les microalgues méditerranéennes *Chlorella sp.* (Mohammady *et al.*, 2015). L'acide  $\alpha$ -linoléique est un acide gras essentiel présent dans les huiles végétales, un précurseur des acides gras à longue-chaine n-3 (EPA et DHA), et se trouve généralement en grande quantité dans les feuilles des herbiers méditerranéens *Posidonia oceanica* (Michel *et al.*, 2015), dont les holothuries se nourrissent (Belbachir *et al.*, 2017). Les diatomées et les dinoflagellés sont aussi une autre source d'EPA et de DHA (González-Wangüemert *et al.*, 2018a). L'acide hexadécadiénoïque se trouve généralement dans des espèces marines, telles que le champignon marin *Clonostac hysrosea* (Dias *et al.*, 2015), et l'éponge méditerranéenne *Chondrilla Nuclear* (Carballeira et Maldonado., 1986), qui pourraient être une autre source alimentaire pour les "concombres de mer". Même si les sources alimentaires des holothuries sont principalement marines, certains paramètres physiques environnementaux, tels que les intrants terrestres qui peuvent également influencer leurs propriétés nutritionnelles (González-Wangüemert *et al.*, 2018a).

LesAGPI, tels qu'ALA, ARA, EPA et DHA se sont avérés efficaces dans la prévention et le traitement de plusieurs maladies. L'ALA est utilisé sous forme alimentaire et pharmaceutique, comme complément pour minimiser le risque d'accident vasculaire et cérébral, et comme nutraceutique pour améliorer la résistance du cerveau aux dommages causés par les accidents vasculaires cérébraux (Blondeau, 2016). L'ARA joue un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité des cellules et des organites, la perméabilité vasculaire et la signalisation cellulaire (Piomelli, 1993). Ces propriétés pourraient expliquer le rôle essentiel de l'ARA dans le fonctionnement des neurones, la plasticité synaptique du cerveau et la potentialisation à long terme dans l'hippocampe (Miller *et al.*, 2014a ; Balk et Lichtenstein, 2017). Il a été démontré que des apports plus élevés d'EPA et de DHA, diminuent les risques de maladies coronariennes des artères, préviennent les arythmies cardiaques, l'hypertension, ils ont aussi une activité antithrombotique, inhibent les prostaglandines, et sont particulièrement importants pour les fonctions visuelles et neurologiques (Miller *et al.*, 2014a ; Balk et Lichtenstein, 2017 ; Brown *et al.*, 2019).

Le rapport n-6/n-3 est très important, un rapport équilibré doit être appliqué lors de la formulation de régimes alimentaires balancés, en raison des effets antagonistes des oméga-6 et des oméga-3 (Simopoulos, 2011). Un rapport inférieur à 10 est généralement recommandé (Sánchez-Machado *et al.*, 2004). La FAO recommande un rapport entre 5:2 et 8:1 (W.H.O, 2003).

Le rapport  $n-6/n-3$  des quatre "concombres de mer" se situait dans la fourchette de 0,67 à 1,03, ce qui indique qu'ils sont sûrs à la consommation (Tableau 8).

**Tableau 8.** Composition en acides gras (%) des lipides totaux des "concombres de mer".

Acides gras	<i>H. poli</i>	<i>H. tubulosa</i>	<i>H. arguinensis</i>	<i>H. sanctori</i>
<b>C10 :0</b>	1,43±0,03	1,03±0,07	1,32±0,15	0,85±0,00
<b>C12:0</b>	1,31±0,03	0,76±0,05	0,64±0,15	0,93±0,02
<b>C14:0</b>	0,66±0,04	0,45±0,05	1,87±0,01	0,84± 0,03
<b>Iso-C16:0</b>	0,39±0,00	<b>n.d.</b>	0,45±0,00	0,30±0,01
<b>C16:0</b>	4,62±0,19	2,68±0,16	14,6±0,00	4,15±0,07
<b>C17:0</b>	1,24±0,10	0,99±0,07	0,95±0,06	0,99±0,02
<b>C18:0</b>	7,56±0,51	5,87±0,14	11,9±0,07	7,92±0,16
<b>C20:0</b>	0,87±0,05	0,80±0,05	0,81±0,01	1,04±0,02
<b>ΣAGS</b>	18,10±0,80	12,21±0,36	32,38±0,29	16,00±0,17
<b>C14:1</b>	0,60±0,02	0,39±0,03	0,52±0,00	0,40±0,01
<b>C18:1n-9t</b>	3,21±0,76	1,74±0,09	4,82±0,01	3,38±0,67
<b>C18:1n-9c</b>	6,12±0,10	5,81±0,14	6,58±0,06	5,51±0,12
<b>C20:1n-9</b>	3,40±0,10	3,58±0,22	2,38±0,01	4,07±0,09
<b>C20:1n-7</b>	2,26±0,65	2,47±0,06	2,02±0,01	1,87±0,23
<b>ΣAGMI</b>	15,60±0,65	14,39±0,39	16,52±0,99	14,48±0,21
<b>C16:2n-6</b>	0,66±0,03	0,51±0,03	0,59±0,00	0,63±0,00
<b>C16:2n-4</b>	12,60±0,44	15,0±0,01	9,62±0,03	11,2±0,28
<b>C18:2n-6</b>	1,94±0,04	2,11±0,07	3,96±0,02	2,61±0,06
<b>C18:3n-6</b>	2,83±0,07	2,95±0,15	2,79±0,04	4,10±0,15
<b>C18:3n-3</b>	10,00±0,35	11,00±0,27	7,26±0,03	9,33±0,04
<b>C18:4n-3</b>	1,57±0,04	1,55±0,10	0,99±0,01	1,44±0,06
<b>C20:4n-6</b>	16,50±0,58	18,9±0,21	10,5±0,03	15,3±0,63
<b>C20:3n-3</b>	2,34±0,03	2,11±0,10	1,56±0,02	3,24±0,04
<b>C20:4n-3</b>	2,02±0,09	1,87±0,12	1,24±0,01	1,35±0,30
<b>C20:5n-3</b>	7,90±0,28	8,76±0,23	5,07±0,04	8,62±0,03
<b>C21:5n-3</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	1,71±0,02	3,15±0,22
<b>C22:4n-6</b>	<b>n.d.</b>	0,36±0,01	0,21±0,00	<b>n.d.</b>
<b>C22:4n-3</b>	1,01±0,04	1,02±0,10	0,64±0,01	1,60 ± 0,05
<b>C22:6n-3</b>	6,56±0,53	7,25±0,12	4,86±0,12	4,97±0,29
<b>ΣAGPI</b>	60,78±0,02	71,80±0,69	50,90±0,84	67,6±0,23
<b>Σn-6</b>	21,3±0,72	30,00±0,35	17,40±0,31	20,1±0,53
<b>Σn-3</b>	31,5±0,76	24,18±0,30	23,30±0,36	19,4±0,43
<b>Σn-6 / n-3</b>	0,67±0,00	0,80±0,00	0,74±0,00	1,03±0,07

**n.d.** non détecté, Moyenne ± écart type (n = 3).

### III.5.3. Calorimétrie différentielle à balayage des lipides

Les huiles de nos "concombres de mer" sont caractérisées par une quantité importante d'acides gras n-3 polyinsaturés, qui ont une importance croissante en tant que nutraceutiques. Les huiles de nos "concombres de mer" sont caractérisées par une haute teneur d'acides gras n-3 polyinsaturés, qui ont une importance croissante en tant que nutraceutiques. Les points de fusion et les enthalpies des quatre huiles sont indiqués dans le tableau 10. Les huiles fondent sur une plage de températures et n'ont pas de température de fusion spécifique. Les changements dans le processus de fusion ne sont pas visibles, mais sont mesurés par la DSC, et présentent souvent des endothermes multiples (Tan *et al.*, 2002). La DSC est appliquée pour déterminer la stabilité thermique, l'oxydation, la qualité des huiles de "concombres de mer", ainsi que leurs interactions possibles au cours du processus de formulation, si jamais utilisés comme nutraceutiques. Les courbes de fusion pour les quatre huiles ont démontré un pic endothermique à différentes températures de chauffage à -41,71, 2,41, -33,33 et -2,56°C pour *Holothuria poli*, *H. tubulosa*, *H. arguinensis* et *H. sanctori*, respectivement (Tableau 9). Les températures de fusion des huiles de "concombres de mer" diffèrent des autres huiles de poisson, telles que la sardine (-22,60°C), le foie de morue (-16,53°C) et le saumon (-6.80°C) (Schubring, 2009). Les enthalpies de fusion ( $\Delta H$ ) se situaient entre 0,81 et 5,79 J/g (Tableau 9), et diffèrent de celles retrouvées chez les huiles de sardine, de foie de morue et de saumon (1.43–15,34 J/g) (Schubring, 2009).

Les températures de fusion des quatre huiles différaient entre les espèces d'holothuries. Comme toutes les expériences sont réalisées avec le même instrument DSC et dans les mêmes conditions, la discussion portera sur les changements des profils de fusion des huiles en fonction de leur composition en triacylglycérols (TAG) (Tan *et al.*, 2002). En général, les TAG hautement trisaturés (SSS) fondent à des températures plus élevées que les TAG hautement tri-insaturés (UUU), tandis que les TAG monoinsaturés (SSU) et di-insaturés (SUU) fondent entre ces deux groupes (Tan *et al.*, 2002). Pour nos résultats, nous supposons que l'endotherme à basse température d'*Holothuria poli*, *H. arguinensis* et *H. sanctori* pourrait correspondre à la fusion de TAG hautement insaturés (UUU), tandis que l'endotherme à haute température d'*Holothuria tubulosa* est due à la fusion des groupes UUU et SUU (Tan *et al.*, 2002). Les courbes de calorimétrie différentielle à balayage (DSC) sont également fortement influencées par le degré de saturation ou d'insaturation des acides gras (Schubring, 2009). Les points de fusion des acides gras saturés augmentent avec la longueur de leurs chaînes, peut-

être en raison de la force de dispersion intermoléculaire qui augmente avec le nombre de carbones dans les chaînes (Shen *et al.*, 1999). Dans le cas des acides gras insaturés, l'augmentation du nombre de doubles liaisons fait baisser le point de fusion. La faible température de fusion et les enthalpies de fusion indiquent que les lipides contiennent une forte proportion d'acides gras insaturés (Hasan *et al.*, 2016). Comme mentionné précédemment, toutes les courbes de chauffage n'ont démontré qu'un seul pic endothermique. Le nombre de pics lors du chauffage est proportionnel à sa vitesse. Les modifications du profil DSC en fonction de la vitesse de chauffage sont compliquées, et les courbes avec des vitesses plus élevées montrent un seul pic endothermique. La présence d'un seul pic endothermique pendant toute la phase de fusion peut également indiquer que les huiles d'holothuries restent stables tout au long du processus de chauffage.

Compte tenu de la complexité du comportement de fusion des huiles par DSC, les interprétations du comportement thermique basées sur la DSC, l'identification et l'interprétation de leurs événements thermiques doivent être faites avec prudence. À notre connaissance, ces événements thermiques n'ont jamais été signalés auparavant pour les huiles de "concombres de mer" utilisées dans la présente étude.

**Tableau 9.** Les paramètres de fusion des huiles de "concombres de mer", de par calorimétrie à balayage différentiel (DSC).

<b>Espèce</b>	<b>Températures de fusion (°C)</b>	<b>DH (<math>\Delta J/ g</math>)</b>
<i>Holothuria poli</i>	-41,71	3,74
<i>Holothuria tubulosa</i>	2,41	0,87
<i>Holothuria arguinensis</i>	-33,33	5,79
<i>Holothuria sanctori</i>	-2,56	0,81

### III.5.5. Spectroscopie infrarouge

Le tableau 10 présente les spectres FTIR des quatre huiles de "concombres de mer", dans un interval de fréquences de 4000-400  $cm^{-1}$ . Comme il n'existait pas de données antérieures sur les spectres infrarouges (IR) des huiles de "concombres de mer", les bandes ont été identifiées et attribuées à des groupes moléculaires spécifiques.

Nos résultats ont montré que les spectres des "concombres de mer" étaient complexes, avec plusieurs pics résultant de la contribution de différents groupes fonctionnels appartenant aux

lipides (Tableau 10). Bien que les bandes de l'huile étudiée semblent similaires, il existe des différences considérables dans l'intensité des bandes ainsi que dans leur fréquence précise, clairement liées à la composition des huiles. Les bandes apparentes à 2925-2920  $\text{cm}^{-1}$  et à 2854-2850  $\text{cm}^{-1}$ , sont attribuées à la vibration antisymétrique dans les groupes  $\text{CH}_2$ , et à l'élongation symétrique des groupes  $\text{CH}_2$  des chaînes alkyles, les deux bandes ont démontré une variation d'absorbance entre les quatre espèces, *H. poli* a montré la plus élevée. Les deux bandes sont généralement utilisées pour surveiller la transition de phase thermotropique des chaînes d'alkyle chez les phospholipides, les changements de fréquence et de largeur des bandes d'élongation des groupes  $\text{CH}_2$  sont directement liés à la conformation des chaînes d'alkyle des lipides. Les élongations des groupes ester carbonyle  $\text{C}=\text{O}$  dans les triacylglycérols sont détectées à 1739-1614  $\text{cm}^{-1}$  (Tableau 10). La diminution de l'absorbance visible chez *H. tubulosa*, *H. arguinensis* et *H. sanctori* suggérait une diminution de la concentration du groupe ester appartenant au triacylglycérol, et l'apparition d'aldéhydes et de cétones, les produits d'oxydation secondaires de la dégradation des hydroperoxydes (Çakmak *et al.*, 2003 ; Guillén *et al.*, 2004). Les bandes à 1471-1440  $\text{cm}^{-1}$  correspondaient aux cisaillements des groupes  $\text{CH}_2$ , tandis que rotation plane des groupes  $\text{CH}_2$  sont détectées à 756-752  $\text{cm}^{-1}$ , *H. poli* présentait respectivement l'absorbance la plus faible et la plus élevée. Les bandes de vibrations précédentes fournissent des informations sur le compactage des chaînes d'alkyle. En particulier, la configuration des chaînes alkyles des *all-trans*, qui s'emballent en un réseau solide, et augmente le facteur de division des bandes de cisaillement et de rotation plane du  $\text{CH}_2$ . La rotation plane de  $=\text{C}-\text{H}$  (*Cis*) sont apparues à 1411-1400  $\text{cm}^{-1}$ , les déformations hors plan du  $-\text{HC}=\text{CH}-$  (*Cis*) sont apparues à 931-902  $\text{cm}^{-1}$ . (Tableau 10). L'absorbance la plus élevée est retrouvée chez *H. tubulosa*. Les deux bandes sont généralement utilisées pour caractériser les vibrations des structures *cis*-insaturées (Pu *et al.*, 2014). Chez les quatre holothuries, les bandes à 1163  $\text{cm}^{-1}$  sont associées à au mode de déformation hors plan du  $\text{CH}_2$ , les bandes majeures à 1024-1004  $\text{cm}^{-1}$ , représentaient l'élongation symétrique du  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ , avec *H. poli* montrant la plus haute absorbance (Tableau 10). Les deux bandes sont principalement représentent les triacylglycérols, les phospholipides, et les esters de cholestérol (Mihály *et al.*, 2017).

Les spectres FTIR ont fourni une caractérisation moléculaire des huiles d'holothuries. Ils ont permis identifier trois classes de lipides présentes, à savoir les triacylglycérols, les phospholipides, et le cholestérol. Des spectres similaires ont été trouvés chez plusieurs huiles de pois-

son, telles que le thon (*Katsuwona pelamis*), la bonite (*Sarda orientalis*), le grenadier bleu (*Macruronus novaezelandiae*), requin à grands aileron (*Galeorhinus galeus*), l'émissole gommée (*Mustelus antarcticus*) et l'aiguillat commun (*Squalus acanthias*) (Vongsivut *et al.*, 2014).

**Tableau 10.** La position des bandes d'absorption maximale à la vibration appropriée des quatre huiles détectées par FTIR.

Groupe Fonctionnel	Fréquence (cm <sup>-1</sup> )				Mode de vibration
	<i>H. poli</i>	<i>H. tubulosa</i>	<i>H. arguinensis</i>	<i>H. sanctori</i>	
$\nu_{as}(\text{CH}_2)$	2925	2924	2922	2920	Elongation (antisymétrique)
$\nu_{sym}(\text{CH}_2)$	2854	2848	2848	2850	Elongation (symétrique)
$\nu(\text{C}=\text{O})$	1739	1633	1629	1624	Elongation
$\delta_{as}(\text{CH}_2)_{cis}$	1471	1460	1442	1440	Déformation (cisaillement)
$p(=\text{CH})$ ( <i>Cis</i> )	1408	1404	1400	1402	Déformation (rotation plane)
$\gamma(\text{CH}_2)$	1163	1163	1163	1163	Déformation hors plan
$\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$	1004	1022	1020	1024	Elongation (symétrique)
$\gamma(-\text{HC}=\text{CH}-)$ ( <i>cis-</i> )	900	904	906	904	Déformation hors du plan
$p(\text{CH}_2)$	754	754	752	756	Déformation (rotation plane)

### III.5.6. Composition de phospholipides

Les résultats du tableau 11 représentent la composition de la fraction lipidique polaire des "concombres de mer" étudiés. Le pourcentage de phospholipides variait entre 55,20 et 69,85% (des lipides totaux). Des valeurs similaires ont été retrouvées chez d'autres espèces marines connus pour leurs teneurs élevés en phospholipides, telles que les crevettes (56–69%) (Cavalli *et al.*, 2000 ; Wouters *et al.*, 2001 ; Ju *et al.*, 2011), les moules (57–67%) (Lin *et al.*, 2003 ; Murphy *et al.*, 2003 ; Miller *et al.*, 2014b), les huîtres (50%) (Pernet *et al.*, 2007), le calmar (64–67%) (Koning, 1993 ; Saito *et al.*, 2014 ; Lordan *et al.*, 2017). L'apport alimentaire normal des phospholipides est de 2 à 8 g par jour, un apport quotidien en lipides de 1 à 10% (Cohn *et al.*, 2010), ce qui fait de nos espèces une source précieuse de phospholipides marins. Les cinq phospholipides trouvés chez les "concombres de mer" sont la cardioline (CL), le phosphatidylglycérol (PG), la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE) et la phosphatidylsérine (PS).

Les teneurs de phospholipides diffèrent entre les quatre espèces (Tableau 11). Le pourcentage de CL variait entre 5,13 et 11,25% des phospholipides totaux, le taux plus élevé est retrouvé chez *H. sanctori*. La CL joue un rôle important dans les mécanismes cellulaires, essentiels à la fonction cardiaque, notamment la fonction mitochondriale, l'importation de protéines mitochondriales, l'autophagie/mitophagie et la voie de la kinase C (Dudek *et al.*, 2019). La teneur de PG variait entre 9,10 et 14,38%, la quantité la plus élevée est trouvée chez *H. poli* et *H. arguinensis*. Des études ont démontré que la PG peut protéger les cellules épithéliales pigmentaires de la rétine humaine contre l'apoptose, et stimule également les kératinocytes (Xie *et al.*, 2014; Bailey *et al.*, 2017). Le taux de PC se situait entre 51,48 et 58,57%, la valeur la plus élevée est observée chez *H. tubulosa* et *H. arguinensis* (Tableau 11). Le PC est essentiel à la synthèse du neurotransmetteur acétylcholine, peut nourrir le cerveau, et améliore l'intelligence (Zhou *et al.*, 2016). Les valeurs d'EP et de PS étaient de 6,31 à 8,10% et 0,91 à 6,47 %, respectivement (Tableau 11). La PE est connue pour son rôle dans la fusion membranaire (Dowhan, 2013). La PS améliore le fonctionnement des cellules nerveuses, régule la conduction de l'influx nerveux, améliore la mémoire, et est présente lors de l'apoptose (Mariño et Kroemer, 2013; Kim *et al.*, 2014; Segawa et Nagata, 2015) .

Notre étude est la première étude documentant le profil phospholipidique des "concombres de mer" Méditerranéens. La plupart des recherches à cet égard ont été menées pour différentes espèces, telles que *Apostichopus japonicus* (Yu *et al.*, 2015).

**Tableau 11.** Les compositions de phospholipides de "concombres de mer" (%) purifiés par précipitation à l'acétone.

	<i>H. poli</i>	<i>H. tubulosa</i>	<i>H. arguinensis</i>	<i>H. sanctori</i>
<b>PL (%)</b>	55,20±0,22	61,02±0,17	63,09±0,11	69,85±0,02
<b>CL (%)</b>	10,14±0,05	5,13±1,24	6,50±0,41	11,25±0,41
<b>PG (%)</b>	14,38±0,25	10,02±0,53	14,08±0,08	9,10±0,42
<b>PC (%)</b>	55,11±0,41	58,57±1,11	58,56±0,80	51,48±0,19
<b>PE (%)</b>	8,10±0,05	6,72±0,00	6,31±0,45	7,51±0,04
<b>PS (%)</b>	6,47±0,18	0,91±0,10	1,12±0,11	1,31±0,03

Moyenne ± écart type (n = 3). **PL** : Phospholipides ; **CL** : Cardiolipine ; **PG** : Phosphatidylglycérol ; **PC** : Phosphatidylcholine ; **PE** : Phosphatidyléthanolamine ; **PS** : Phosphatidylsérine.

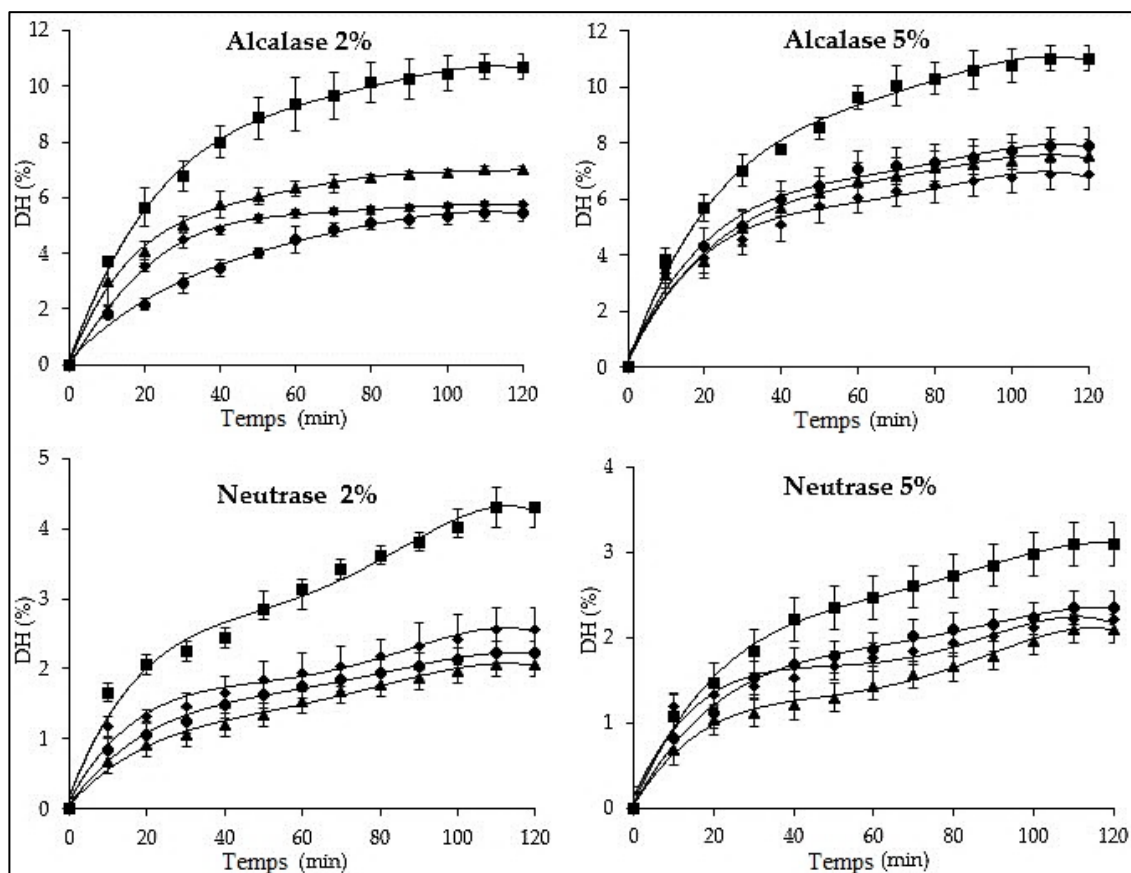
Il n'y a pas de différences significatives entre les résultats de la composition phospholipidique des quatre espèces d'holothuries ( $p > 0,05$ ), cela est dû au fait que les espèces sont issues de la même région Méditerranéenne et ont un profil lipidique similaire.

### III.6. L'hydrolyse enzymatique des "concombres de mer"

Les téguments des "concombres de mer" sont hydrolysés avec succès à l'aide de deux protéases (Alcalase 2,4L et Neutrase 0,8L) à 2 et 5%. L'évolution de l'hydrolyse et les valeurs du degré d'hydrolyse (DH) de chaque espèce sont présentés dans la figure 42. Les hydrolyses enzymatiques sont caractérisées par trois étapes distinctes. Au cours des 60 premières minutes, les valeurs de DH ont augmenté rapidement, ce qui suggère que de multiples liaisons peptidiques sont clivées (Nchienzia *et al.*, 2010 ; Forghani *et al.*, 2012). Ensuite, le taux d'hydrolyse a légèrement diminué jusqu'à atteindre un plateau vers 100 min (Figure 42). Cela pourrait s'expliquer par la diminution des sites d'hydrolyse disponibles, ou par l'absence d'acides aminés spécifiques à l'enzyme (AAs) (Constantinides *et al.*, 1980 ; Souissi *et al.*, 2007). Après cela, les réactions d'hydrolyse ont suivi une tendance linéaire jusqu'à la fin de chaque expérience, cela est due soit à une limitation des sites de clivage disponibles, soit à la dénaturation enzymatique et/ou une inhibition du produit (Souissi *et al.*, 2007). Ces résultats sont similaires

à ceux rapportés pour *Stichopus horrens* (Forghani *et al.*, 2012), *Actinopyga lecanora* (Ghanbari *et al.*, 2015), et *Isostichopus badiotus* (Chim-Chi *et al.*, 2017).

Toutes les courbes de protéolyse ont démontré que tous nos "concombres de mer" sont facilement dégradables par les deux protéases, mais l'Alcalase à 5% a démontré l'hydrolyse enzymatique la plus efficace par rapport aux autres réactions (Figure 42), avec des valeurs de DH les plus élevées de 7,92%, 11,01%, 7,52%, et 6,87%, respectivement pour *H. poli*, *H. tubulosa*, *H. arguinensis*, et *H. sanctori*, indiquant que l'Alcalase clivait plus de liaisons peptidiques que la Neutrase, ce qui implique qu'il y avait plus de sites de clivage disponibles pour l'Alcalase que pour la Neutrase. Ces résultats peuvent également s'expliquer par le fait que l'Alcalase a une grande spécificité au substrat, a une large gamme de pH et de température de fonction, peut hydrolyser à la fois les protéines natives et dénaturées, et qu'elle résiste à l'autoprotéolyse (Bladyga *et al.*, 1999).



**Figure 55.** Degré d'hydrolyse de  $\blacklozenge$  *H. poli* ;  $\blacksquare$  *H. tubulosa* ;  $\bullet$  *H. arguinensis* ; et  $\blacktriangle$  *H. sanctori*, en utilisant l'Alcalase et Neutrase à 2% et 5%. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type.

### III.7. Activité inhibitrice de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine (ECA) et la concentration inhibitrice médiane (CI<sub>50</sub>)

Pour étudier les changements de la CI<sub>50</sub> chez les quatre espèces d'holothuries, l'activités inhibitrices de l'ECA de leur hydrolysats est mesurée. Les "concombres de mer" sont hydrolysés en utilisant deux protéases différentes pendant 120 minutes (Figure 42). Les échantillons hydrolysés sont recueillis à la fin de la protéolyse. Ceux dont le DH était le plus élevée sont choisis pour évaluer leur activité d'inhibitrice de l'ECA, et la détermination de leur CI<sub>50</sub> (Alcalase 5%, <1 kDa). Les hydrolysats de "concombres de mer" produits avec l'Alcalase ont montré une activité d'inhibitrice de l'ECA considérables, et une concentration inhibitrice médiane (CI<sub>50</sub>) de 0,30 à 0,51 mg/ml (Tableau 12). Ces valeurs reflètent l'efficacité de l'hydrolyse améliorant l'inhibition de l'ECA (Forghani *et al.*, 2012). Parmi les hydrolysats de "concombres de mer" testés, celui d'*Holothuria sanctori* présentait la valeur de CI<sub>50</sub> la plus faible, indiquant ainsi une activité inhibitrice plus élevée (Tableau 12). La variation de la CI<sub>50</sub> parmi les quatre espèces de "concombres de mer" peut être attribuée à la spécificité enzymatique, qui est un facteur clé influençant à la fois les caractéristiques des hydrolysats, et donc la nature et la composition des peptides produits (Balti *et al.*, 2010). L'Alcalase est connue pour sa spécificité principalement pour les acides aminés hydrophobes, tandis que la Neutrase a une spécificité principalement pour la leucine et la phénylalanine (Kunst, 2003). L'Alcalase tend à produire des peptides dont les C-terminaux sont des acides aminés à grandes chaînes latérales et sans charge (acides aminés aromatiques et aliphatiques), tels que la tyrosine, la phénylalanine, le tryptophane, la méthionine, la valine, la leucine et l'isoleucine. Elle clive la liaison peptidique des acides aminés aliphatiques ou aromatiques (Rao *et al.*, 1998), ce qui entraîne la formation de nouveaux peptides à forte teneur en acides aminés hydrophobes (Forghani *et al.*, 2012). Il a été démontré que les peptides contenant des résidus d'acides aminés hydrophobes (aromatiques ou à chaînes latérales ramifiées) possèdent un effet inhibiteur élevé (Murray et Fitzgerald, 2007), cas des peptides inhibiteurs d'ECA naturels, très riches en acides aminés hydrophobes (Segura Campos *et al.*, 2013 ; Magaña *et al.*, 2015). Cependant, la comparaison des résultats obtenus d'autres études est difficile en raison de : l'absence de littérature sur les activités inhibitrices de l'ECA d'*Holothuria poli*, *H. tubulosa*, *H. arguinensis* et *H. sanctori* ; les variations de l'espèces ; les conditions de protéolyse (température, temps...etc.) ; le choix de l'enzyme et sa concentration.

Les valeurs de la CI<sub>50</sub> d'*Holothuria tubulosa*, *H. arguinensis* et *H. sanctori* étaient similaires à celles trouvées pour la gélatine d'*Acaudina molpadiodea*, hydrolysée avec de l'Alcalase et de la Broméline (1 kDa, 0,35 mg/ mL) (Zhao *et al.*, 2007). *Holothuria poli* a donné les mêmes résultats que ceux obtenus pour l'hydrolysate de collagène de *Parastichopus californicus*, digéré par la pepsine (0,51 mg/mL après 3 h) (Liu *et al.*, 2011). Nos résultats étaient inférieurs à ceux rapportés pour d'autres "concombres de mer" hydrolysés par l'Alcalase comme *Actinopyga lecanora* (1,50 mg/mL après 8 h) (Ghanbari *et al.*, 2015), et *Stichopus horrens* (0,61 mg/mL après 5 h) (Forghani *et al.*, 2012). D'autre part, les valeurs de la CI<sub>50</sub> pour l'hydrolysate d'Alcalase étaient plus élevées que celles rapportées pour *Isostichopus badiionotus* bouilli, hydrolysé séquentiellement avec la Pepsine et la Corolase PP, dans des conditions simulant la digestion gastro-intestinale. Les trois fractions hydrolysées (3 kDa, >3 kDa, et <3 kDa) ont montré des valeurs de CI<sub>50</sub> de 0,135 mg/mL, 0,120 mg/mL et 0,038 mg/mL, respectivement, ce qui suggère que la double digestion (Pepsine+Corolase PP) a contribué à l'augmentation de l'activité inhibitrice de l'ECA (Pérez-Vega *et al.*, 2013). L'activité inhibitrice de l'ECA et la protéolyse sont influencées par la structure des protéines et la spécificité des enzymes qui conduisent au clivage de différentes liaisons et à la création de peptides ayant des extrémités N et C différentes (Forghani *et al.*, 2012).

**Tableau 12.** Les valeurs CI<sub>50</sub> des hydrolysats de *H. poli*, *H. tubulosa*, *H. arguinensis*, et *H. sanctori* (5%, >1 KDa).

Espèce	CI <sub>50</sub> (mg/ml)
<i>H. poli</i>	0,51±0,02
<i>H. tubulosa</i>	0,31±0,00
<i>H. arguinensis</i>	0,35±0,00
<i>H. sanctori</i>	0,30±0,00

Moyenne ± écart type (n = 3).

### III.8. Taille des liposomes et mesures du potentiel zêta

Les tailles des différents nanoliposomes avec et sans hydrolysate sont mesurées immédiatement après la sonication. Le diamètre hydrodynamique des nanoliposomes et leur potentiel zêta sont présentés dans le tableau 13. Les résultats démontrent que la taille des nanoparticules

augmente après l'encapsulation de l'hydrolysate. Le potentiel zêta est très important lors de la formulation des nanoliposomes, car il permet de prédire le devenir des nanoliposomes *in vitro* et *in vivo*, il permet aussi de mesurer la stabilité et la durée de vie du nanoliposome. Si les nanoliposomes possèdent un grand potentiel zêta que ça soit négatif ou positif, ils auront tendance à se repousser et à résister à la formation d'agrégats, et moins la formulation est susceptible d'être stable. Cependant, s'ils ont de faibles valeurs, c'est-à-dire proches du zéro, les particules de se rapprochent les unes des autres, s'agrègent ou de fusionner (Shi, 2014). Le potentiel zêta est généralement du même signe et la même charge que le potentiel présent à la surface de la vésicule, et est exprimé en millivolts (mV). Généralement, un potentiel zêta supérieur à +30 mV et inférieur à -30 mV est considéré comme valeur appropriée à la stabilité nanoliposomes (Gentine *et al.*, 2012 ; Larsson *et al.*, 2012). Nos résultats ont démontré que, les nanoliposomes vide ou avec hydrolysate (10 mg/ml) sont stables, vue que leur potentiel zêta variait entre 36 mV et -28 mV (Tableau 13).

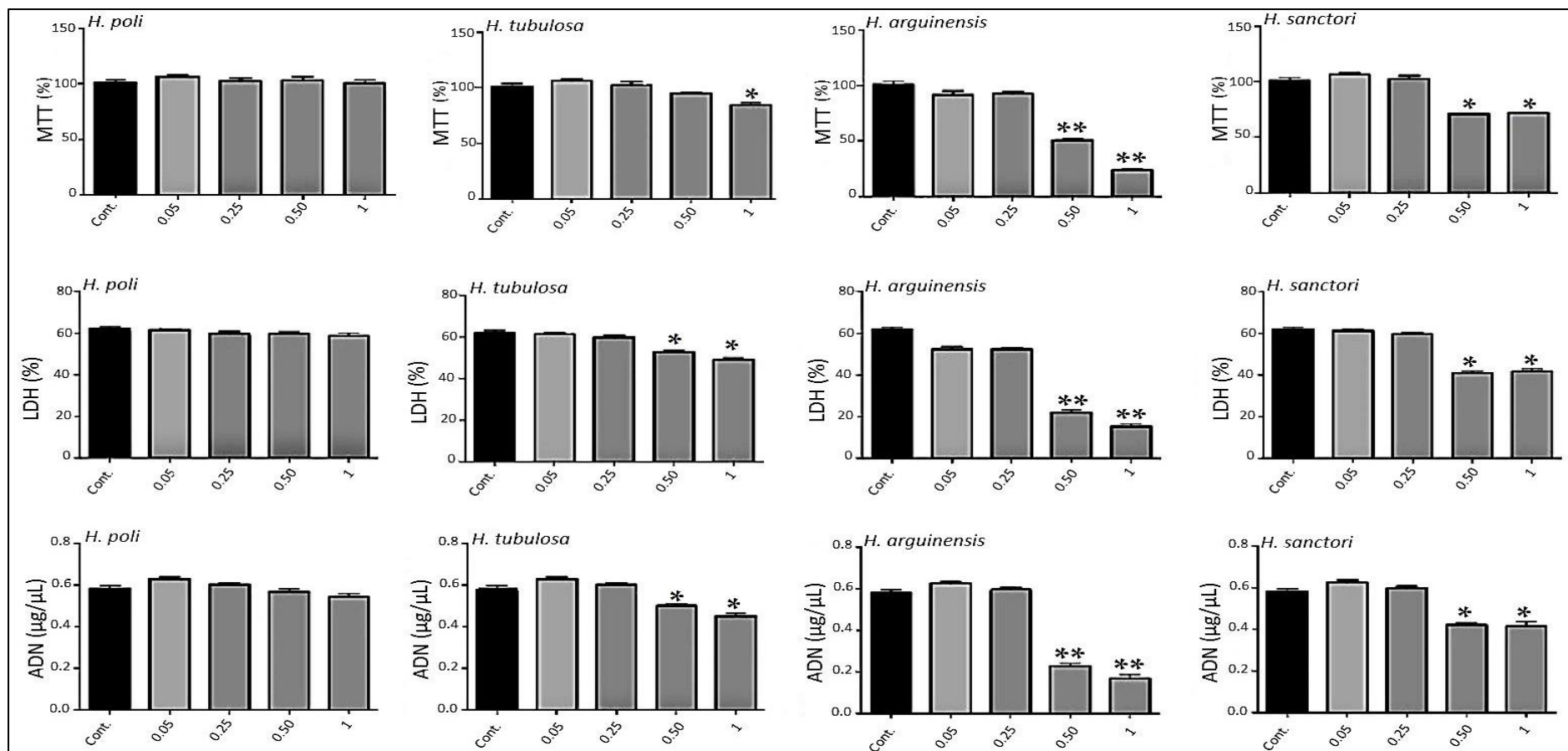
**Tableau 13.** Taille (nm) et potentiel zêta (mV) des nanoliposomes vide ou avec hydrolysate.

Type de nanoliposome	Taille (nm)	Potentiel zêta (mV)
HPF vide	169	36
HPF avec hydrolysate (10 mg/ml)	188	-35
HTF vide	162	-28
HTF avec hydrolysate (10 mg/ml)	163	-30
HAF vide	154	-28
HAF avec hydrolysate (10 mg/ml)	188	-30
HSF vide	117	-30
HSF avec hydrolysate (10 mg/ml)	142	-32

### III.9. Cytocompatibilité des hydrolysats

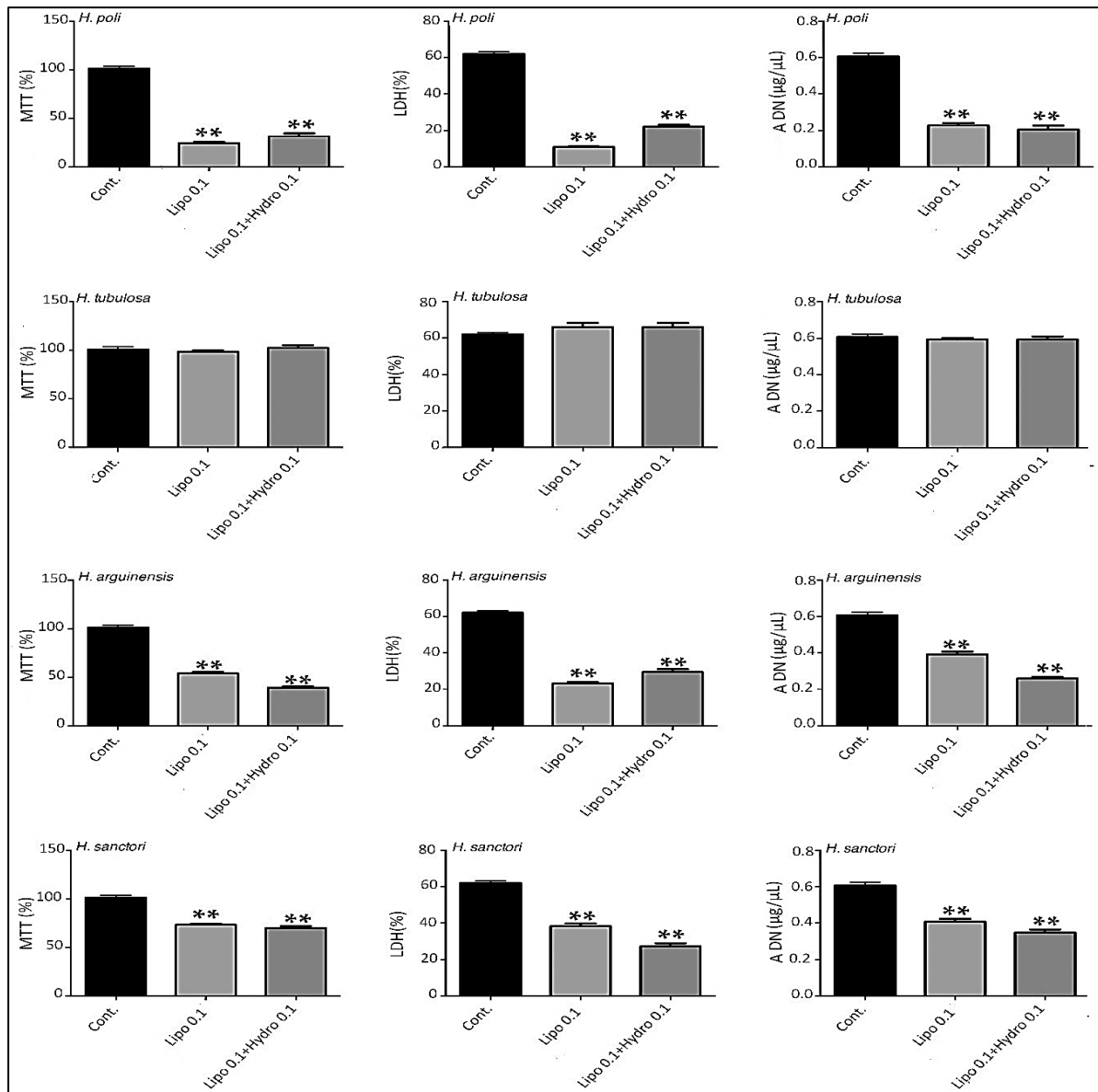
Les tests de Cytocompatibilité sont réalisés pour les hydrolysats d'Alcalase à 5% des quatres espèces d'holothuries. Les données de la figure 43 montrent les résultats obtenus après 7

jours, car aucune modification significative n'a été observée pour les périodes plus courtes (3 jours et 5 jours, non représentés). L'activité métabolique est basée sur la capacité des cellules vivantes à réduire le sel de tétrazolium du MTT en cristaux de formazan. Toutes les analyses ont montré une activité métabolique importante pour toutes les concentrations d'*H. poli* et *H. tubulosa*, respectivement. Pour *H. arguinensis* et *H. sanctori*, les concentrations élevées de 0,5 et 1 mg/ml avaient un fort impact sur l'activité métabolique (Figure 43). La cytotoxicité des hydrolysats est évaluée après 3, 5, et 7 jours d'exposition à diverses concentrations, par le dosage de LDH (Figure 43, jour 7 seulement). Les cellules non exposées aux hydrolysats sont considérées comme témoins. Il n'y avait pas de différence de cytotoxicité significative entre le témoin et toutes les concentrations d'*Holothuria poli* (Figure 43), et aucune différence de prolifération n'est observé (Figure 43). Pour les trois autres "concombres de mer", seules les concentrations les plus élevées (0,5 et 1 mg/ml), semblaient être cytotoxiques pour les cellules mésenchymateuses humaines (CSMs) (Figure 43). Là encore, les deux concentrations extrêmes ont déclenché une diminution de la prolifération, évaluée par la quantification de l'ADN (Figure 43).



**Figure 43.** Impact des hydrolysats sur l'activité métabolique. Les CSMs humaines sont exposées à des concentrations croissantes d'hydrolysats (0,05, 0,25, 0,5 et 1 mg/ml) pendant 7 jours. Pour chaque condition testée, les résultats de l'activité métabolique des cellules sont présentés en % par rapport à la condition témoin (Cont.) (100 %). Les résultats indiqués sont la moyenne  $\pm$  d'aux moins trois expériences individuelles. \* $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,001$  par rapport au contrôle pour chaque point temporel.

Les nanostructures seules (c'est-à-dire les nanoliposomes vides ou les nanoliposomes associés au HTF) (Figure 44), n'ont montré aucune modification de l'activité métabolique ou de la prolifération et aucune cytotoxicité quelles que soient les concentrations (0,01, 0,05, 0,10 et 0,50 mg/ml), pendant les temps d'exposition (1, 3, 5 ou 7 jours, seulement 7 jours sur la figure 44). Cela démontre l'innocuité des conditions testées pour le HTF. Pour les autres hydrolysats, c'est-à-dire le HAF, le HSF, et le HPF (Figure 44), la concentration de 0,10 mg/ml de liposomes était toxique, les données avec 0,05 mg/ml étaient inoffensives (non indiqué).



**Figure 44.** Impact des nanoliposome sans hydrolysats (Lipo 0,1) et avec hydrolysats (Lipo 0,1+ Hydrp 0,1) sur les CSMs humaines après 7 jours d'exposition. Les résultats indiqués sont la moyenne  $\pm$  SD d'au moins trois expériences individuelles. \*\*  $p < 0,001$  par rapport au contrôle.

## **Conclusion et Perspectives**

### Conclusion et perspectives

Au terme de ce travail, nous avons atteint un certain nombre d'objectifs fixés.

Tout d'abord, l'étude biométrique des quatre espèces d'holothuries (*Holothuria poli*, *Holothuria tubulosa*, *Holothuria arguinensis*, et *Holothuria sanctori*), avant et après transformation en bêtes-de-mer a montré que nos spécimens sont plus petits et plus lourds que ceux exploités dans la région indopacifique. Un facteur trophique inférieur combiné à une teneur en matière organique moindre explique en grande partie ces résultats. Malgré ces deux facteurs, les espèces d'holothuries étudiées ont montré une valeur nutritionnelle importante, liée aux faits que leur tégument est facilement dégradé par l'enzyme digestive pepsine. Ainsi, elles pourraient devenir des sources communes de protéines et d'autres nutriments.

Les "concombres de mer" constituent incontestablement une ressource nutritionnelle intéressante. Ils contiennent une quantité élevée de protéines de haute valeur nutritive, une huile riche en acides gras polyinsaturés avec une proportion très importante de phospholipides. Notre étude a révélé que les quatre espèces, ont une valeur nutritionnelle et nutraceutique élevée, et pourraient constituer une nouvelle matière première pour l'EPA, le DHA, les phospholipides, et les peptides inhibiteurs d'ACE. Comme les acides gras oméga-3 et oméga-6 des "concombres de mer" sont obtenus en quantité importante mais sont sensibles à l'oxydation, il convient de manipuler les holothuries avec précaution pour les conserver frais jusqu'à leur consommation.

D'autres formes peuvent être préparées à partir des holothuries, comme des comprimés, des capsules, ou des émulsions contenant de l'extrait de "concombres de mer" riche en AGPI, afin de bénéficier de leurs vertus sur la santé. Ce produit peut être consommé comme complément alimentaire ou nutraceutique, avec ou sans ajout d'herbes pour renforcer l'impact sur la santé humaine. Leurs hydrolysats enzymatiques obtenus par l'Alcalase 2,4L pourraient être exploités comme nouvelle source de peptides inhibiteurs de l'ECA, et être incorporés comme ingrédients fonctionnels dans des nutraceutiques et des produits pharmaceutiques en raison de leur rôle dans la prévention et le traitement de l'hypertension (régulation de la pression artérielle normale chez les humains hypertendus). De plus, ils ont un faible coût de production et une bonne tolérance par le corps humain. Nos résultats sur les tests de Cytocompatibilité ont montré que, sauf à des concentrations extrêmes (0,5 et 1 mg/ml), l'HTF était sans danger pour la viabilité et l'intégrité des CSMs humaines. En effet, dans nos conditions expérimentales, nous avons démontré que les nanoliposomes vides n'induisent pas de cytotoxicité et de mort cellulaire des CSMs humaines, et aucune perturbation de la prolifération n'a

été observé pour tous les temps et les concentrations testés, ainsi que pour les nanoliposomes combinés et aux HTF.

Ces expériences *in vitro* suggèrent que les nanoliposomes de lécithine d'holothurie, avec ou sans HTF, pourraient être utilisés comme support naturel pour délivrer des substances actives dans les cellules de CSMs humaines.

Également, des études ultérieures sont nécessaires pour étudier la composition peptidique des hydrolysats d'holothuries, afin de révéler les peptides bioactifs. Des essais cliniques supplémentaires sont aussi essentiel pour tester l'effet de ces peptides antihypertenseurs d'origine marine

# **Références Bibliographiques**

- Abdel Razek F.A., Abdel Rahman S.H., Mona M.H., El-Gamal M.M., Moussa R.M., (2007).** An observation on the effect of environmental conditions on induced fission of the Mediterranean sand sea cucumber, *Holothuria arenicola* (Semper, 1868) in Egypt. *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin*, **26**:33-34.
- Abdulrazaq M., Innes J. K., Calder P. C., (2017).** Effect of  $\omega$ -3 Polyunsaturated Fatty Acids on Arthritic Pain: A Systematic Review. *Nutrition*, **39–40**:57–66.
- Ackman R.G., (1967).** Characteristics of the fatty acid composition and biochemistry of some fresh-water fish oils and lipids in comparison with marine oils and lipids. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **22**: 907-922.
- Ackman R. G., (1998).** Remarks on Official Methods Employing Boron Trifluoride in the Preparation of Methyl Esters of the Fatty Acids of Fish Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **7(4)**: 541–45.
- Adler-Nissen J., (1986).** Methods in Food Protein Hydrolysis, *In: Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins.*, (ed.). London: Elsevier, 110–30.
- Afkhami M., Ehsanpour M., Khazaali A., Kamrani E., Mokhlesi, A., Darvish Bastami, K., (2012).** Sea cucumber fisheries of Qeshm Island, Persian Gulf. *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin*, **32**: 60-61.
- Ahmed M.I., (2009).** Morphological, Ecological and Molecular examination of the sea cucumber species along the Red Sea Coast of Egypt and Gulf of Aqaba, with the investigation of the possibility of using DNA barcoding technique as a standard method for Sea cucumber ID. *PhDThesis. The University of Hull*, 258 pp.
- Amon R.M.W., Herndl G.J., (1991).** Deposit feeding and sediment: Interrelationship between *Holothuria tubulosa* (Holothurioida, Echinodermata) and the sediment microbial community. *Marine Ecology*, **12**:163–174.
- Anderson S. C., Flemming J. M., Watson R., Lotze H. K., (2011).** Serial exploitation of global sea cucumber fisheries. *Fish and Fisheries*, **12(3)**:317–339.
- Anisuzzaman M., Kamrunnahar K., U-Cheol J., Hyun-Chol J., Byeong-Dae C., Seok-Joong K., (2020).** Lipid Class and Phospholipid Compositions of Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* with Heat Pump-Decompression Hybrid Dryer and Hot Air Dryer. *The Open Food Science Journal*, **11(1)**.
- Antoniadou C., Vafidis D., (2011).** Population structure of the traditionally exploited holothurian *Holothuria tubulosa* in the south Aegean Sea. *Cahiers de Biologie Marine*, **52**:171–175.

- AOAC, Détermination des protéines (brut) en alimentation animale., (1990).** Méthode Kjeldahl 984,13. *In: Méthodes d'analyse officielles de l'AOAC International ; Keneth Heldrich : Arlington, Virginie, États-Unis, Vol. 1.*
- AOAC, Eau (totale) dans les engrais Méthode 950,01., (1990).** *In: Méthodes d'analyse officielles de l'AOAC International ; Keneth Heldrich : Arlington, Virginie, États-Unis, Vol. 1.*
- AOAC, Détermination des cendres Flour Method 923,03., (2006).** *In: les Méthodes d'analyse officielles de l'AOAC International ; Keneth Heldrich : Gaithersburg, MD, Vol. 1.*
- Arnold P.P., Birtles R., (1989).** Soft-sediment marine invertebrates of Southeast Asia and Australia: A Guide to Identification. *Australian Institute of Marine Science (AIMS).*
- Astall C.M., Johns M.B., (1991).** Respiration and biometry in the sea cucumber *Holothuria forskali*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom.* **71**:73–81.
- Athenstaedt K., Daum G., (2006).** The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. *Cellular and Molecular Life Sciences,* **63**:1355–1369.
- Avilov S.A., Antonov A.S., Drozdova O.A., Kalinin V.I., Kalinovsky A.I., Stonik V.A., Jiménez C., (2000).** Triterpene glycosides from the Far-Eastern sea cucumber *Pentamera calcigera*. Mono-sulfated glycosides and cytotoxicity of their unsulfated derivatives. *Journal of natural products,* **63**(1):65-71.
- Aydin M., Sevgili H., Tufan B., Emre Y., Kose S., (2011).** Proximate composition and fatty acid profile of three different fresh and dried commercial sea cucumbers from Turkey. *International Journal of Food Science and Technology,* **46**:500–508.
- Aydin M., (2017).** Present status of the sea cucumber fishery in Turkey. *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin,* **37**:30-34.
- Bailey L. J., Choudhary V., Bollag W. B., (2017).** Possible Role of Phosphatidylglycerol-Activated Protein Kinase C-BII in Keratinocyte Differentiation, *The Open Dermatology Journal,* **11**(1):59.
- Baker A.N., Rowe F.W., Clark H. E., (1986).** A new class of Echinodermata from New Zealand. *Nature,* **321**(6073):862-864.
- Bakus G.J., (1968).** Defensive mechanisms and ecology of some tropical holothurians. *Marine Biology,* **2**(1):23-32.
- Bakus G.J., Green G., (1974).** Toxicity in sponges and holothurians: A Geographical Pattern. *Science.* **185**:951.

- Balk E.M., Lichtenstein A.H., (2017).** Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease: Summary of the 2016 Agency of Healthcare Research and Quality Evidence Review. *Nutrients*, **9(8)**:865.
- Balti R., Bougatef A., Ali N.E.-H., Zekri D., Barkia A., Nasri, M., (2010).** Influence of Degree of Hydrolysis on Functional Properties and Angiotensin I-Converting Enzyme-Inhibitory Activity of Protein Hydrolysates from Cuttlefish (*Sepia Officinalis*) by-Products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **90(12)**:2006–2014.
- Belitz H., Grosch W., Schieberle P., (2009).** Food chemistry. Berlin/ Heidelberg: Springer-Verlag.
- Battaglione S.C., Seymour J.E., Ramofafia C., (1999).** Survival and growth of cultured juvenile sea cucumbers, *Holothuria scabra*. *Aquaculture*, **178**:293–322.
- Becher S., (1909).** Die Stammesgeschichte der Seewalzen. *Ergeb. Fortschr. Zool.* **1**:403-490.
- Belbachir N., (2012).** Contribution à l'étude écologique de l'herbier à *Posidonia oceanica* (L.) De Lile (1813) de la frange côtière de Mostaganem : Etat de santé et relation entre plante et échinoderme. *Mémoire de magister. Université de Mostaganem.* Algérie. 178 p.
- Belbachir N.-E., Mezali K., Soualili D.L., (2014).** Selective Feeding Behaviour in Some Aspidochirotid Holothurians (Echinodermata: Holothuroidea) at Stidia, Mostaganem Province, Algeria. *SPCBêche-de-Mer Information Bulletin*, **34(34)**:34–37.
- Belbachir N. -E., Soualili D.L., Mezali K., (2017).** Communication orale : Place de la Posidonie dans le régime alimentaire des holothuries aspidochirotés (Holothuroidea : Echinodermata) de la frange côtière de Mostaganem (Algérie).
- Belbachir N. -E., Lepoint G., Mezali K., (2019).** Comparison of Isotopic Niches of Four Sea Cucumbers Species (Holothuroidea: Echinodermata) Inhabiting Two Seagrass Meadows in the South-western Mediterranean Sea (Mostaganem, Algeria). *Belgian Journal of Zoology*, **149(1)**:95–100.
- Bennett A., Basurto X., (2018).** Local institutional responses to global market pressures: the sea cucumber trade in Yucatán, Mexico. *World Development*, **102**:57-70.
- Benzait H., Khodja I., Soualili D.L., Mezali K., (2020).** Note on *Parastichopus Regalis* (Cuvier, 1817) from the Sidi-Medjdoub Area of Mostaganem, Algeria. *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin*, **40 (40)**:43–45.
- Berthon J.F., (1987).** Relations trophiques entre quelques espèces d'échinodermes et le phytobenthos dans la baie de Port-Cros (Var, France). *DEA in Océanologie Biologie, Université Pierre et Marie Curie, Paris.*

- Billett D.S.M., (1991).** Deep-sea holothurians. *Oceanography and Marine Biology. Annual Review*, **29**:259-317.
- Bladyga J., Bourne J.R., (1999).** Turbulent Mixing and Chemical Reactions. John Wiley and Sons, Chichester, UK: John Wiley and Sons, 890 pp.
- Blondeau N., (2016).** The Nutraceutical Potential of Omega-3 Alpha-Linolenic Acid in Reducing the Consequences of Stroke. *Biochimie*, **120(1)**:49–55.
- Blunt J., Carroll A., Copp B., Davis R., Keyzers R., Prinsep M., (2018).** Marine Natural Products. *Natural Product Reports*, **35(1)**:8–53.
- Bonham K., Held E.E., (1963).** Ecological observations on the sea cucumbers *Holothuriaatra* and *H. leucospilota* at Rongelap Atoll, Marshall Islands. *Pacific Science*, **17**:305–314.
- Bordbar S., Anwar F., Saari N., (2011).** High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional food - a review. *Marine Drugs*, **9**:1761–1805.
- Borradail, L. A., Potts F. A., Kerkut G. A., Eastham L. E. S., Saunders J.T., (1963).** The invertebrata: a manual for the use of students. CUP Archive.
- Borrero-Pérez G.H., Perez-Ruzafa A., Concepcion M., González-Wangüemert M., (2009).** The taxonomic status of some Atlanto-Mediterranean species in the subgenus *Holothuria* (Echinodermata: Holothuroidea: Holothuriidae) based on molecular evidence. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **157(1)**:51-69.
- Borrero-Pérez G.H., González-Wangüemert M., Marcos C., Pérez-Ruzafa A., (2011).** Phylogeography of the Atlanto-Mediterranean Sea cucumber *Holothuria* (*Holothuria*) *mammata*: the combined effects of historical processes and current oceanographical pattern. *Molecular Ecology*, **20**:1964–1975.
- Bouarab L., Maherani B., Kheiolomoom A., Hasan M., Aliakbarian B., Linder M., Arab-Tehrany E., (2014).** Influence of Lecithin–Lipid Composition on Physico-Chemical Properties of Nanoliposomes Loaded with a Hydrophobic Molecule. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **115**:197–204.
- Bronn H.G., (1860).** Die Klassen und Ordnungen der Strahlenthiere (Actinozoa) wissenschaftlich dargestellt. *In: Die Klassen und Ordnungen des Thier-Reichs, wissenschaftlich dargestellt in Wort und Bild. Zweiter Band. Aktinozoen.* Leipzig & Heidelberg: C.F. Winter, 434 pp.
- Broszeit S., Davenport J., McAllen R., (2010).** First documented record of *Rhabdomolgus ruber* (Echinodermata: Holothuridea) in Irish waters. *Marine Biodiversity Records*, **3**.

- Brown, I., Lee J., Sneddon A.A., Cascio M.G., Pertwee R.G., Wahle K.W.J., Rotondo D., Heys S.D., (2019).** Anticancer Effects of N-3 EPA and DHA and Their Endocannabinoid Derivatives on Breast Cancer Cell Growth and Invasion. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **156**:102024.
- Brown T. J., Brainard J., Song F., Wang X., Abdelhamid A., Hooper L., (2019).** Omega-3, omega-6, and total dietary polyunsaturated fat for prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *bmj*, **366**:l4697.
- Bruce C., (1983).** Sea cucumbers, ‘extraordinary but edible all the same’. *Info fish Marketing Digest*, **6**:19-21.
- Bruckner A.W., (2006).** Proceedings of the CITES workshop on the conservation of sea cucumbers in the families Holothuriidae and Stichopodidae. Technical Memorandum NMFS OPR 34, NOAA.
- Boyd N. T., Kuiper M. J., Brandsma R., Lawerman T. F., Lunsing R. J., Serrano F., Sival, D. A., (2018).** Long-term association between lead poisoning and neurologic function in peruvian children and adolescents. *Clinical assessment of motor behaviour in developing children*, **147**.
- Burmeister H., (1837).** Handbuch der Naturgeschichte. Zum Gebrauch bei Vorlesungen. Zweite Abtheilung: Zoologie. Enslin, Berlin, 858 pp.
- Çakli Ş., Cadun A., Kişla D., Dinçer T., (2004).** Determination of Quality Characteristics of *Holothuria Tubulosa*, (Gmelin, 1788) in Turkish Sea (Aegean Region) Depending on Sun Drying Process Step Used in Turkey. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **13(3)**:69–78.
- Çakmak G., Togan I., Uğuz C., Severcan, F., (2003).** FT-IR Spectroscopic Analysis of Rainbow Trout Liver Exposed to Nonylphenol, *Applied Spectroscopy*, **57(7)**:835–41.
- Calva L. B., (2002).** Hábitos alimenticios de algunos equinodermos. *Parte 2. Erizos de Mar y Pepinos de Mar. ContactoS*, **47**:54-63.
- Cameron J.L., Fankboner P.V., (1986).** Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Parastichopus californicus* (Stimpson) (Echinodermata: Holothuroidea). I. Reproductive periodicity and spawning behavior. *Canadian Journal of Zoology*, **64(1)**:168-175.
- Cameron J.L., Frankboner P.V., (1989).** Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Parastichopus californicus* (Stimpson) (Echinodermata: Holothuroidea). II. Observations on the ecology of development, recruitment, and the juvenile life stage. *Journal of Experimental Marine Biology Ecology*, **127**:43–67.
- Cannon L.R.G., Silver H., (1986).** Sea Cucumbers of Northern Australia. *Queensland Museum, Queensland*, 60 pp.

- Capone D.G., Dunham S.E., Horrigan S.G., Duguay L.E., (1992).** Microbial nitrogen transformations in unconsolidated coral reef sediments. *Marine Ecology Progress Series*, **80**:75–88.
- Carballeira, N.M.; Maldonado, L. (1986).** Identification of 5,9-hexadecadienoic acid in the marine sponge *Chondrilla nucula*. *Lipids*, **21**:470–471.
- Cary G. A., Hinman V.F., (2017).** Echinoderm development and evolution in the post-genomic era. *Developmental Biology*, **427(2)**:203–211.
- Caulier G., Van Dyck S., Gerbaux P., Eeckhaut I., Flammang P., (2011).** Review of saponin diversity in sea cucumbers belonging to the family Holothuriidae. *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin*, **31(1)**:48-54.
- Caulier G., Mezali K., Soualili D.L., Decroo C., Demeyer M., Eeckhaut I., Gerbaux P., Flammang P., (2016).** Chemical Characterization of Saponins Contained in the Body Wall and the Cuvierian Tubules of the Sea Cucumber *Holothuria (Platyperona) Sanctori* (Delle Chiaje, 1823), *Biochemical Systematics and Ecology*, **68**:119–27.
- Cavalli R.O., Menschaert G., Lavens P., Sorgeloos P., (2000).** Maturation performance, offspring quality and lipid composition of *Macrobrachium rosenbergii* females fed increasing levels of dietary phospholipids. *Aquaculture International*, **8**:41–58.
- Chekaba., (2002).** Analyses granulométrique et chimiques du contenu digestif de cinq espèces d'Holothuries spidochiotes (Holothuroidea : Echinodarmata) de trois sites littoraux : sidi-Fredj, Tamentfoust et figuier plage-Algérie. *Mémoire DEA, Alger Algérie*, 55 pp.
- Chen J., (2003).** Overview of Sea Cucumber Farming and Sea Ranching Practices in China. *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin*, **18**:18–23.
- Chen J., (2004).** Present status and prospects of sea cucumber industry in China. *FAO Fisheries & Aquaculture Technical papers*, **463**:25–38.
- Chen S., Xue C., Yin L., Tang Q., Yu G., Chai W., (2011).** Comparison of structures and anticoagulant activities of fucosylated chondroitin sulfates from different sea cucumbers. *Carbohydrate Polymers*, **83**:688–695.
- Cherbonnier G., (1988).** Echinodermes : Holothurides. *Faune de Madagascar*, **70**:1–192.
- Cherbonnier G., Feral J.-P., (1984).** Les Holothuries de Nouvelle-Calédonie : Deuxième contribution. *Bulletin du Muséum national d'histoire naturelle*, **3**:659–700.
- Chim-Chim Y., Olivera-Castillo L., Betancur-Ancona, D., Chel-Guerrero L., (2017).** Protein Hydrolysate Fractions from Sea Cucumber (*Isostichopus Badionotus*) Inhibit Angiotensin-Converting Enzyme. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **26(10)**:1199–1209.

- Christie W.W., (1982).** Analyse Lipid. Pergamon Press, Oxford, 207 pp.
- Clark H.L., (1922).** Holothurians of the genus Stichopus. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College*, **65**:39–74.
- Clark A. M., Rowe F.W.E., (1971).** Monograph of Shallow-Water Indo-West Pacific Echinoderms. British Museum Press, Britain, 237 pp.
- Clemente D. B., Casas M., Janssen B. G., Lertxundi A., Santa-Marina L., Iñiguez, C., Vrijheid, M., (2017).** Prenatal ambient air pollution exposure, infant growth and placental mitochondrial DNA content in the INMA birth cohort. *Environmental research*, **157**:96-102.
- Clouse R.M., (1997).** Burying behaviour in an Indo-Pacific sea cucumber, *Bohadschiamarmorata* Jaeger (Holothuroidea): a circadian, not circatidal, rhythm. *Micronesica*, **30**:245–257.
- Clouse R., Janies D., Kerr A.M., (2005).** Resurrection of *Bohadschia bivittata* from *B. marmorata* (Holothuroidea: Holothuriidae) based on behavioral, morphological, and mitochondrial DNA evidence. *Zoology*, **108**:27-39.
- Codex Alimentarius et Codex Alimentarius Commission., (2006).** FAO. WHO Rome.
- Codex Alimentarius., (2015).** General standard for contaminants and toxins in food and feed (Codex STAN 193-1995).
- Cohn J.S., Kamili A., Wat E., Chung R.W.S., Tandy S., (2010).** Dietary Phospholipids and Intestinal Cholesterol Absorption. *Nutrients*, **2**:116–127.
- Conand C., (1990).** Part 2: Holothurians: The fishery resources of Pacific island countries. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, **272(2)**:1-143.
- Conand C., (1994).** Les holothuries : ressource halieutique des lagons. *Rapports Scientifiques*
- Conand C., (2004).** Present status of world sea cucumber resources and utilization: An international overview. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, **463**:13-23.
- Conand C., (2018).** Tropical sea cucumber fisheries: Changes during the last decade. *Marine Pollution Bulletin*, **133**:590–594.
- Cone R.S., (1989).** The need to reconsider the use of condition indices in fishery science. *Transactions Journal of the American Fisheries Society*, **118**:510–514.
- Constantinides A., Adu-Amankwa B., (1980).** Enzymatic Modification of Vegetable Protein: Mechanism, Kinetics, and Production of Soluble and Partially Soluble Protein in a Batch Reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, **22(8)**:1543–65.
- Costello J., (1985).** The annual reproductive cycle of the holothurian *Aslia lefevrei* (Dendrochirota: Echinodermata). *Marine Biology*, **88(2)**:155-165.

- Coulon P., Jangoux M., Bulteel P., (1991).** Respiratory rate and assessment of secondary production in the holothuroid *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) from Mediterranean seagrass beds. *Marineecology*, **13(1)**:63-68.
- Coulon P., Jangoux M., (1993).** Feeding Rate and Sediment Reworking by the Holothuroid *Holothuria Tubulosa* (Echinodermata) in a Mediterranean Seagrass Bed off Ischia Island, Italy, *Marine Ecology Progress Series*, 201–204.
- Croneis C., Cormack J.M., (1932).** Fossil holothuroidea. *Journal of Paleontology*, **6**:11–148.
- Cuénot L., (1948).** Anatomie, éthologie et systématique des échinodermes. *Traité de zoologie*, **11**: 3-275.
- Cuong N.C., Vien L.T., Hoang L., Hanh T.T.H., Thao D.T., Thanh N.V., Nam N.H., Thung D.C., Kiem P.V., Minh C.V., (2017).** Cytotoxic triterpene diglycosides from the sea cucumber *Stichopushorrens*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **27**:2939–2942.
- Cushman D.W., Cheung H.S., (1971).** Spectrophotometric Assay and Properties of the Angiotensin-Converting Enzyme of Rabbit Lung. *Biochemical Pharmacology*, **20(7)**:1637–48.
- Cutress B.M., (1996).** Changes in dermal ossicles during somatic growth in Caribbean littoral sea cucumbers (Echinoidea: Holothuroidea: Aspidochirotida). *Bulletin of Marine Science*, **58(1)**:44-116.
- Cuvier G.L.C.F.D., (1817).** Les annélides. *Le règne animal distribué d'après son organisation, pour servir de base à l'histoire naturelle des animaux et d'introduction à l'anatomie comparée. Contenant les Reptiles, les Poissons, les Mollusques et les Annélides*, **2**:515-532.
- Dance S.K., Lane I., Bell J.D., (2003).** Variation in short-term survival of cultured sandfish (*Holothuria scabra*) released in mangrove-seagrass and coral reef flat habitats in Solomon Islands. *Aquaculture*, **220**:495–505.
- De Vore D.E., Brodie A.D., (1982).** Palatability of the tissues of the holothurian *Thyonebriareus* (Lesueur) to fish. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **61**:279-285.
- Deichmann E., (1958).** The holothurioidea collected by the Velero III and IV during the years 1932 to 1954, Part II: Aspidochirota. *Allan Hancock Pacific Expeditions*, **11**:249–349.
- Delle Chiaje S., (1823).** Descrizione zoologica ed anatomica di alcune specie di Oloturie. In: Memorie su la storia e notomia degli animali senza vertebre del Regno di Napoli. Fratelli Fernandes, Napoli. Vol.1, 77-116 p.
- Delle Chiaje S., (1824).** Descrizione zoologica ed anatomica di alcune specie di Oloturie. *Memorie su la storia e notomia degli animali senza vertebre del Regno di Napoli*, **1**:77-116.

- Dewi A.S., Patantis G., Fawzya Y.N., Irianto H.E., Sa'diah S., (2020).** Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activities of Protein Hydrolysates from Indonesian Sea Cucumbers, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 1–9.
- Dias A.C.D.S., Ruiz N., Couzinet-Mossion A., Bertrand S., Duflos M., Pouchus Y.-F., Barnathan, G., Nazih H., Wielgosz-Collin G., (2015).** The Marine-Derived Fungus *Clonostachys rosea*, Source of a Rare Conjugated 4-Me-6E,8E-hexadecadienoic Acid Reducing Viability of MCF-7 Breast Cancer Cells and Gene Expression of Lipogenic Enzymes. *Marine Drugs*, **13**:4934–4948.
- Dissanayake D.C.T., Stefansson G., (2012).** Habitat preference of sea cucumbers: *Holothuria atra* and *Holothuria edulis* in the coastal waters of Sri Lanka. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **92**:581-590.
- Dowhan W., (2013).** A Retrospective: Use of Escherichia Coli as a Vehicle to Study Phospholipid Synthesis and Function. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1831(3)**:471–94.
- Dudek J., Hartmann M., Rehling P., (2019).** The Role of Mitochondrial Cardiolipine in Heart Function and Its Implication in Cardiac Disease. *Biochimica et Biophysica Acta- Molecular Basis of Disease*, **1865(4)**:810–21.
- Eeckhaut I., Parmentier E., Becker P., Gomez da Silva S., Jangoux M., (2004).** Parasites and biotic diseases in field and cultivated sea cucumbers. *Advances in sea cucumber aquaculture and management*, 311-325.
- Eeckhaut I., Lavitra T., Rasoforinina R., Rabenevanana M.W., Gildas P., Jangoux M., (2008).** Madagascar Holothurie SA: The first trade company based on sea cucumber aquaculture in Madagascar. *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin*, **28**:22–23.
- Entsch B., Boto K.G., Sim R.G., Wellington J.T., (1983).** Phosphorus and nitrogen in coral reef sediments. *Limnology and Oceanography*, **28**:465–476.
- El Shehawy S. M., Gab-Alla A. A., Mutwally H. M., (2016).** Proximate and Elemental composition of important fish species in makkah central fish market, saudi arabia. *Food and Nutrition Sciences*, **7(06)**:429.
- Escudero E., Sentandreu M.A., Toldrá F., (2010).** Characterization of peptides released by in vitro digestion of pork meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**:5160-5165.
- Fabinyi M., Barclay K., Eriksson H., (2017).** Chinese trader perceptions on sourcing and consumption of endangered seafood. *Frontiers in Marine Science*, **4**:181.
- Fankboner P.V., (1978).** Suspension-feeding mechanisms of the armoured sea cucumber *Pso-luschitinoïdes* Clark. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **31**:11-25.

- Fawzya Y.N., Januar H.I., Susilowati R., Chasanah E., (2015).** Chemical Composition and Fatty Acid Profile of Some Indonesian Sea Cucumbers. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Post-harvest and Biotechnology*, **10(1):**27–34.
- Fell B., (1965).** The early evolution of the Echinozoa. *Breviora*, **219:**1–17.
- Feral J.F., Massin C., (1982).** Digestive systems: Holothuroidea. *In:* Jangoux, M., Lawrence, J.M. (Eds.), *Echinoderm Nutrition*. AA Balkema, Rotterdam, 191–212 pp.
- Ferdouse F., (1999).** Bêche-de-mer Markets and Utilisation. *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin*, **11:**3–8.
- Fischer W., Schneider M., Bauchot M.L., (1987).** Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. *Méditerranée et Mer noire. Zone de pêche*, **37:**1186-1189.
- Flammang P., Conand C., (2004).** Functional morphology of the tentacles in the apodid holothuroid *Synapta maculata*. *In* *Echinoderms: München (Proceedings of the 11th International Echinoderm Conference, Munich, Germany)*, 327-333 pp.
- Florkin M., Schoffenibls E., (1969).** *Molecular Approaches to Ecology*. New York: Academic Press.
- Foglietta L.M., Camej M.I., Gallardo L., Herrera F.C., (2004).** A maturity index for holothurians exhibiting asynchronous development of gonad tubules. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **303(1):**19-30.
- Folch J., Lees M.R., Stanley G.H., (1957).** A simpler method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, **226:**97-509.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), (2008).** Sea cucumbers: A global review of fisheries and trade. *FAO Fisheries and aquaculture technical paper*, **516:**1-331.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), (2012).** *Cooperatives in small-scale fisheries: Enabling successes through community empowerment*. Rome: FAO.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), (2013).** *Statistical yearbook. World Food and Agriculture*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 289 pp.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), (2020).** *La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture la durabilité en action*. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome, 227 pp.

- Forghani B., Ebrahimpour A., Bakar J., Abdul Hamid A., Hassan Z., Saari N., (2012).** Enzyme Hydrolysates from *Stichopus horrens* as a New Source for Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Peptides. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. **2012**:1-9.
- Francour P., (1990).** Dynamique de l'écosystème à *Posidonia oceanica* dans le Parc national de Port-Cros. Analyse des compartiments "matte", litière, faune vagile, échinodermes et poissons. *Thèse Doct. Océanol. Univ. Pierre et Marie Curie, Paris VI, Fr.:* 1-373.
- Francour P., (1997).** Predation on holothurians: a literature review. *Invertebrate Biology*, **116(1)**:52-60.
- Franklin S.E., (1980).** The reproductive biology and some aspects of the population ecology of the Holothurians *Holothuria leucospilota* (Brandt) and *Stichopus chloronotus* (Brandt). *Ph.D. Thesis, Univ. Sydney*. 1-250.
- Fredalina B.D., Ridzwan B.H., Abidin A.A.Z., Kaswandi M.A., Zaiton H., Zali I., Kittakoop P., Jais A.M.M., (1999).** Fatty acid compositions in local sea cucumber. *General Pharmacology: The Vascular System*, **33**:337–340.
- Friedman K., Eriksson H., Tardy E., Pakoa K., (2011).** Management of sea cucumber stocks: Patterns of vulnerability and recovery of sea cucumber stocks impacted by fishing. *Fish and Fisheries*, **12(1)**:75–93.
- Frizzell D.L., Exline H., (1955).** Micropaleontology of holothurian sclerites. *Micropaleontology*, **1(4)**:335–342.
- Furnas M.J., Mitchell A.W., Skuza M., (1995).** Nitrogen and phosphorus budgets for the Central Great Barrier Reef shelf. Great Barrier Reef Marine Park Authority. *Research Publication*, **36**:194.
- Gallo N.D., Cameron J., Hardy K., Fryer P., Bartlett D.H., Levin L.A., (2015).** Submersible and lander-observed community patterns in the Mariana and New Britain trenches: Influence of productivity and depth on epibenthic and scavenging communities. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, **99**:119-133.
- Gao Q.-F., Wang Y., Dong S., Sun Z., Wang F., (2011).** Absorption of different food sources by sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) (Echinodermata: Holothuroidea): Evidence from carbon stable isotope. *Aquaculture*, **319**:272–276.
- García-Arrarás J.E., Greenberg M.J., (2001).** Visceral regeneration in holothurians. *Microscopy Research and Technique*, **55**:438–51.

- Gbogouri G.A., Linder M., Fanni J., Parmentier M., (2006).** Analysis of Lipids Extracted from Salmon (*Salmo Salar*) Heads by Commercial Proteolytic Enzymes. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **108(9):766–75.**
- Gentine P., Bubel A., Crucifix C., Bourel-Bonnet L., Frisch B., (2012).** Manufacture of liposomes by isopropanol injection: characterization of the method. *Journal of liposome research*, **22(1):18-30.**
- Ghanbari R., Zarei M., Ebrahimpour A., Abdul-Hami, A., Ismail A., Saari N., (2015).** Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) Inhibitory and Anti-Oxidant Activities of Sea Cucumber (*Actinopyga Lecanora*) Hydrolysates. *International Journal of Molecular Sciences*, **16(12):28870–85.**
- Gianasi B.L., (2018).** Exploring the potential of the sea cucumber *Cucumaria frondosa* as an aquaculture species, (*Doctoral dissertation, Memorial University of Newfoundland* ).
- Giese A.C., Pearse J.S., Pearse V.B., (1991).** Reproduction of marine invertebrates. Echinoderms and lophophorates. Pacific Grove, California: Boxwood Press, Vol. 6.
- Gilliland P.M., (1993).** The skeletal morphology, systematics and evolutionary history of holothurians. *Special Papers on Palaeontology*, **47:1-147.**
- Ginger M.L., Billett D.S.M., Mackenzie K.L., Konstandinos K., Neto R.R., Boardman K., Santos D., Horsfall I.M., Wolff G., (2001).** Organic Matter Assimilation and Selective Feeding by Holothurians in the Deep Sea: Some Observations and Comments. *Progress in Oceanography*, **50(1):407–21.**
- Giraspy D.A.B., Ivy W.G., (2005).** Australia’s first commercial sea cucumber culture and sea ranching project in Hervey Bay, Australia. *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin*, **21:29–31.**
- Giraspy D.A.B., Walsalam I.G., (2010).** Aquaculture potential of the tropical sea cucumbers *Holothuria scabra* and *H. lessoni* in the Indo-Pacific region. *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin*, **30:29-32.**
- Gmelin J.F., (1791).** Systema Naturae Linnaei. GE Beer, *Germania*, **3371.**
- González-Wangüemert M., Borrero-Perez G., (2012).** A new record of *Holothuria arguinensis* colonizing the Mediterranean Sea. *Marine Biodiversity Records*, **5:1–4.**
- González-Wangüemert M., Aydin M., Conand C., (2014).** Assessment of sea cucumber populations from the Aegean Sea (Turkey): First insights to sustainable management of new fisheries. *Ocean and Coastal Management*, **92:87- 94.**

- González-Wangüemert M., Valente S., Aydın, M., (2015).** Effects of Fishery Protection on Biometry and Genetic Structure of Two Target Sea Cucumber Species from the Mediterranean Sea, *Hydrobiologia*, **743(1)**:65–74.
- González-Wangüemert M., Domínguez-Godino J., (2016).** Sea cucumbers as new marine resource in Europe. *Frontiers in Marine Science*, **3**.
- González-Wangüemert M., Valente S., Henriques F., Domínguez-Godino J.A., Serrão E. A., (2016).** Setting Preliminary Biometric Baselines for New Target Sea Cucumbers Species of the NE Atlantic and Mediterranean Fisheries, *Fisheries Research*, **179**:57–66.
- González-Wangüemert M., Roggatz C.C., Rodrigues M.J., Barreira L., da Silva M.M., Custódio L., (2018a).** A new insight into the influence of habitat on the biochemical properties of three commercial sea cucumber species. *International Aquatic Research*, **10**:361–373.
- González-Wangüemert M., Domínguez-Godino J.A., Canovas F., (2018b).** The fast development of sea cucumber fisheries in the Mediterranean and NE Atlantic waters: From a new marine resource to its over-exploitation. *Ocean & Coastal Management*, **151**:165-177.
- Grube, A.E. (1840).** Actinien, Echinodermen und Würmer des Adriatischen- und Mittelmeers nach eigenen Sammlungen beschrieben. Königsberg : J.H. Bon. 92 pp.
- Guille A., Laboute P., Menou J.L., (1986).** Handbook of the Sea-Stars, Sea-Urchins and Related Echinoderms of New- Caledonia Lagoon. Orstom, Paris. 238 pp.
- Guillén M.D., Ruiz A., Cabo N., (2004).** Study of the oxidative degradation of farmed salmon lipids by means of Fourier transform infrared spectroscopy. Influence of salting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **84**:1528–1534.
- Guo Y., Ding Y., Xu F., Liu B., Kou Z., Xiao W., Zhu J., (2015).** Systems pharmacology-based drug discovery for marine resources: an example using sea cucumber (Holothurians). *Journal Ethnopharmacology*, **165**:61–72.
- Haider M.S., Sultana R., Jamil K., Tarar O.M., Afzal W., (2015).** A Study on Proximate Composition, Amino Acid Profile, Fatty Acid Profile and Some Mineral Contents in Two Species of Sea Cucumber. *JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences*, **25**:1.
- Hamel J.F., Mercier A., (1996).** Early development, settlement, growth, and spatial distribution of the sea cucumber *Cucumaria frondosa* (Echinodermata: Holothuroidea). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **53(2)**:253-271.

- Hammond L.S., (1982).** Patterns of feeding and activity in deposit-feeding holothurians and echi-noids (Echinodermata) from a shallow back-reef lagoon, Discovery Bay, Jamaica. *Bulletin of Marine Science*, **32**:549–571.
- Hampton J.S., (1958).** *Frizzellus irregularis* a new holothurian sclerite from the Upper Bathonian of the Dorset coast, England). *Micropaleontology*, **4**:309-316.
- Hansen L.A., Alongi D.M., Moriarty D.J.W., Pollard P.C., (1987).** The dynamics of benthic microbial communities at Davies Reef, central Great Barrier Reef. *Coral Reefs*, **6**:63–70.
- Harmelin J.G., Bouchon C., Duval C., Hong J.S., (1980).** Les échinodermes des substrats durs de l'île de Port-Cros, Parc national. Elément pour un inventaire qualitatif. *Parc nation. Port-Cros*, Fr., **6**:25-38.
- Harris W.S., Zotor F.B., (2019).** N-3 Fatty Acids and Risk for Fatal Coronary Disease, *Proceedings of the Nutrition Society*, **78**(4):526–31.
- Hasan M., Belhaj N., Benachour H., Barberi-Heyob M., Kahn C.J.F., Jabbari E., Linder M., Arab-Tehrany E., (2014).** Liposome Encapsulation of Curcumin: Physico-Chemical Characterizations and Effects on MCF7 Cancer Cell Proliferation. *International Journal of Pharmaceutics*, **461**(1):519–28.
- Hasan M., Messaoud G.B., Michaux F., Tamayol A., Kahn C.J.F., Belhaj N., Linder M., Arab-Tehrany E., (2016).** Chitosan-Coated Liposomes Encapsulating Curcumin: Study of Lipid–Polysaccharide Interactions and Nanovesicle Behavior, *RSC Advances*, **6**(51):45290–304.
- Hawaida R.G., Ahmed I.A., Hanafy H.M., Lawrence J.A., Ahmed I.M., Salah G., EL-Etreby. (2004).** Sea cucumbers of the Red Sea: The Egyptian experience. *In: Advances in sea cucumber aquaculture and management*, Lovatelli A., Conand C. Purcell S. Uthicke, S. Hamel J.-F. and Mercier A. (eds). FAO, Rome, 373–384 p.
- Hendler G., Miller J.E., Pawson D.L., Kier P.M., (1995).** Sea Stars, sea urchins and Allies: Echinoderms of Florida and the Caribbean. Smith. Inst. Press. Jaeger, G.F. – 1833. De Holothuriis. Turici: 1-40 p.
- Hernández-Sámano A. C., Guzmán-García X., García-Barrientos R., Ascencio-Valle F., Sierra-Beltrán A., Vallejo-Córdoba B., Guerrero-Legarreta I. (2015).** Extracción y caracterización de proteasas de pepino de mar *Isostichopus fuscus* recolectado en el Golfo de California, México. *Revista mexicana de ingeniería química*, **14**(1):35-47.

- Herrero-Pérezrul M.D., (1994).** Comparative study of reproduction of *Isostichopus fuscus* Ludwig, 1875 and *Neothyone gibbosa* Deichman, 1941 (Echinodermata; Holothuroidea) at La Paz Bay. *MSc. thesis. Centre of Research and Advanced Studies (CICIMAR). National Polytechnic Institute, Mexico* (In Spanish), 88 pp.
- Herrero-Pérezrul M.D., Bonilla H.R., García-Domínguez F., Cintra-Buenrostro C., (1999).** Reproduction and growth of *Isostichopus fuscus* (Echinodermata: Holothuroidea) in the southern Gulf of California, Mexico. *Marine Biology*, **135(3):**521-532.
- Higgins M., (2000).** Sea cucumbers in a deep pickle. *Environmental News Network*, **30**.
- Hu L., Ying J., Zhang M., Qiu X., Lu Y., (2018).** Antitumor Potential of Marine Natural Products: A Mechanistic Investigation. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **18(5):**702–18.
- Hudson I.R., Wigham B.D., Solan M., Rosenberg R., (2005).** Feeding behaviour of deep-sea dwelling holothurians: inferences from a laboratory investigation of shallow fjordic species. *Journal of Marine Systems*, **57:**201–218.
- Hur S.J, Lim B.O, Decker E.A., Mc Clements D.J., (2011).** *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, **125:**1–12.
- Hyman L. H., (1955).** The invertebrates: Echinodermata. McGraw-Hill, New York, Vol. 4.
- IUCN., (2012).** IUCN Red List categories and criteria, version 3.1, 2nd edn. Gland, Switzerland.
- IUCN., (2013a).** IUCN Red List of threatened species, v. 2013.2. Gland, Switzerland.
- IUCN., (2013b).** Guidelines for using the IUCN Red List categories and criteria, v. 10. Prepared by the Standards and Petitions Subcommittee.
- Jaeckle, W., Strathmann, R., (2013).** The anus as a second mouth: anal suspension feeding by an oral deposit-feeding sea cucumber. *Invertebrate Biology*, **132:**62-68.
- Jaeger G.F., (1833).** De Holothuriis. Gessnerianis, Turici, 40 pp.
- Jangoux M., (2014).** Une expérience de zoologie appliquée : l'holothuriculture à Madagascar. *Bulletin des séances de l'Académie royale des sciences d'Outre-mer*, **57(2):**307-321.
- Jaquemet S., Rousset V., Conand C., (1999).** Asexual reproduction parameters and the influence of fission on a *Holothuria atra* sea cucumber population from a fringing reef on Reunion Island (Indian Ocean). *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin*, **11:**12-18.
- Jenkins C.N., Van houtan K.S., (2016).** Global and regional priorities for marine biodiversity protection. *Biological conservation*, **204:**333-339.

- Jimenez P.C., Wilke D.V., Branco P.C., Bauermeister A., Rezende-Teixeira P., Gaudêncio S.P., Costa-Lotufó L.V., (2020).** Enriching Cancer Pharmacology with Drugs of Marine Origin. *British Journal of Pharmacology*, **177(1)**:3–27.
- Ju Z.Y., Forster I., Dominy W., Lawrence A., (2011).** Classification and Quantification of Phospholipids and Dietary Effects on Lipid Composition in Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *North American Journal of Aquaculture*, **73**:221–229.
- Kalinin V.I., Prokofieva N.G., Likhatskaya G.N., Schentsova E.B., Agafonova I.G., Avilov S.A., Drozdova O.A., (1996).** Hemolytic activities of triterpene glycosides from the holothurian order Dendrochirotida: some trends in the evolution of this group of toxins. *Toxicon*, **34(4)**:475-483.
- Kalinin V.I., Silchenko A.S., Avilov S. A., Stonik V.A., Smirnov A.V., (2005).** Sea cucumbers triterpene glycosides, the recent progress in structural elucidation and chemotaxonomy. *Phytochemistry Reviews*, **4(2-3)**:221-236.
- Kalinin V.I., Avilov S.A., Silchenko A.S., Stonik V.A., (2015).** Triterpene glycosides of sea cucumbers (Holothuroidea, Echinodermata) as taxonomic markers. *Natural product communications*, **10(1)**:1934578X1501000108.
- Kariya Y., Watabe S., Ochiai Y., Murata K., Hashimoto K., (1990).** Glycosaminoglycan involved in the cation-induced change of body wall structure of sea cucumber *Stichopus japonicus*. *ConnectiveTissue Research*, **25**:149–159.
- Ke P.J., Smith-Lall B., Hirtle R.W., Kramer D.E., (1987).** Technical studies on resource utilization of Atlantic sea cucumber (*Cucumaria frondosa*). *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, **20(1)**:4-8.
- Kerr A.M., (2000).** Holothuroidea. Sea cucumbers. *The Tree of Life Web Project*.
- Kerr A.M., Kim J., (2001).** Phylogeny of Holothuroidea (Echinodermata) inferred from morphology. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **133**:63-81.
- Kerr A.M., Janies D.A., Clouse R.M., Samyn Y., Kuszak J., Kim J., (2005).** Molecular phylogeny of coral reef sea cucumbers (Holothuriidae: Aspidochirotida) based on 16S mitochondrial ribosomal DNA sequence. *Marine Biotechnology*, **7(1)**:53–60.
- Khanna D.R., Yadav P.R. (2005).** Biology of echinoderms. Discovery Publishing House, New Delhi (India).
- Khotimchenko Y.S., (2015).** The nutritional value of holothurians. *Russian Journal of Marine Biology*, **41**:409–423.

- Khotimchenko, Y. (2018).** Pharmacological potential of sea cucumbers. *International Journal of Molecular Sciences*, **19(5)**:1342.
- Khripounoff A., Sibuet M., (1980).** The nutrition of abyssal echinoderms: 1. Feeding holothuroids. *Marine Biology*, **60(1)**:17–26.
- Kiew P.L., Don M.M., (2012).** Jewel of the seabed: sea cucumbers as nutritional and drug candidates. *International journal of food sciences and nutrition*, **63(5)**:616-636.
- Kim H.Y., Huang B.X., Spector A.A., (2014).** Phosphatidylserine in the Brain: Metabolism and Function. *Progress in Lipid Research*, **56**:1–18.
- Kinch J., Purcell S., Uthicke, S., Friedman K., (2008).** Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in the Western Central Pacific. Sea cucumbers. A global review of fisheries and trade. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, **516**:7-55.
- Koehler R., Vaney C., (1906).** Mission des Pêcheries de la Côte occidentale d’Afrique. II. Echinodermes. *Actes de la Société Linnéenne de Bordeaux*, **60**:58-66.
- Koehler R., (1921).** Echinodermes. *Faune de France*, **1**:1–210.
- Koning A.J.D., (1993).** Phospholipids of marine origin—the squid (*Loligo vulgaris*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **61**:129– 132.
- Kropp R.K., (1982).** Responses of five holothurian species to attacks by a predatory gastropod, *Tonna pernix*. *Pacific Science*, **32**:445-452.
- Kunst T., (2003).** Protein Modification to Optimize Functionality Protein Hydrolysates Galactosidase, in *Handbook of Food Enzymology*, New York: M. Dekker, 221–36 pp.
- Lacey K., McCormack G., Keegan B., Powell R., (2005).** Phylogenetic relationships within the class Holothuroidea, inferred from 18S rRNA gene data. *Marine Biology*, **147**:1149-1154.
- Lambert P., (1997).** Sea cucumbers of British Columbia. Southeast Alaska and Puget Sound. UBC Press.
- Larsson M., Hill A., Duffy J., (2012).** Suspension stability; why particle size, zeta potential and rheology are important. *Annual transactions of the nordic rheology society*, **20**:209–214.
- Lavitra T., Rachele D., Rasolofonirina R., Jangoux M., Eeckhaut I., (2009).** Processing and marketing of holothurians in the Toliara region, southwestern Madagascar. *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin*, **28**:24-33.
- Lee D. I., Kang S. A., Md A., Jeong U. C., Jin F., Kang S. J., Lee J.Y., Yu H. S., (2018).** Sea cucumber lipid-soluble extra fraction prevents ovalbumin-induced allergic airway inflammation. *Journal of Medicinal Food*, **21(1)**:21-29.

- Leuckart R., (1854).** Bericht über die Leistungen in der Naturgeschichte der niederen Thiere während der Jahre 1848–1853. *Archiv für Naturgeschichte*, **20(2)**:289-473.
- Levin V.S., Kalinin V.I., Stonik V.A., (1984).** Chemical characters and taxonomic revision of holothurian *Bohadschia graeffei* (Semper) as refer to erection of a new genus. *Biologia Moria, Vladivostok*, **3**:33–38.
- Levin V.S., (1999).** Feeding by shallow water holothuroids (Echinodermata) and its effect on the environment. ELIMOR Press, St. Petersburg, Russia.
- Li J.-H., Li S., Zhi Z.-J., Yan L.-F., Ye X.-Q., Ding T., Yan, L., Linhardt R.J., Chen S.-G., (2016).** Depolymerization of Fucosylated Chondroitin Sulfate with a Modified Fenton-System and Anticoagulant Activity of the Resulting Fragments. *Marine Drugs*, **14**:170
- Li M., Qi Y., Mu L., Li Z., Zhao Q., Sun J., Jiang Q., (2019).** Effects of Processing Method on Chemical Compositions and Nutritional Quality of Ready-to-Eat Sea Cucumber (*Apostichopus Japonicus*). *Food Science & Nutrition*, **7(2)**:755–63.
- Li L., Guo H., Yang L., Li X., Wang H., He C. (2020).** Encapsulation of Flavin Cofactor within a Manganese Porphyrin-Based Metal–Organic Polyhedron for Reductive Dioxygen Activation. *Inorganic Chemistry*, **59(5)**:2636-2640.
- Liao Y.L., (2001).** Chinese sea cucumbers. *Bulletin of Biology*, **35(9)**:1–4.
- Lin H., Jiang J., Xue C., Zhang B., Xu J., (2003).** Seasonal changes in phospholipids of mussel (*Mytilus edulis* Linne). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **83**:133–135.
- Linnaeus C., (1767).** Systema naturae per regna tria naturae: secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Ed. 12. 1., Regnum Animale. 1 & 2. Holmiae, Laurentii Salvii. Holmiae Stockholm, Laurentii Salvii, 532 pp.
- Liu Z.-Y., Chen D., Su Y.-C., Zeng M.-Y., (2011).** Optimization of Hydrolysis Conditions for the Production of the Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Sea Cucumber Collagen Hydrolysates. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **20(2)**:222–32.
- Liu X.F., Xu J., Xue Y., Gao Z., Li Z.J., Leng K.L., Wang J.F., Xue C.H., Wang Y.M., (2015).** Sea cucumber cerebroside and long-chain bases from *Acaudina molpadioides* protect against high fat diet-induced metabolic disorders in mice. *Food & Function*, **6**:3428–3436.
- Liu Y.X., Liu Z.Q., Song L., Ma, Q.R., Zhou D.Y., Zhu B.W., Shahidi F., (2019).** Effects of collagenase type I on the structural features of collagen fibres from sea cucumber (*Stichopusjaponicus*) body wall. *Food chemistry*, **301**:125302.

- Liu X., Chenggang L., Sun L., Liu S., Sun J., Yang H., (2020).** Behavioural response of different epithelial tissues of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) to light and differential expression of the light-related gene Pax6. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, **53(2)**:73–85.
- Lordan R., Tsoupras A., Zabetakis I., (2017).** Phospholipids of Animal and Marine Origin: Structure, Function, and Anti-Inflammatory Properties. *Molecules*, **22**:1964.
- Lou Q.M., Wang Y.M., Liu X.-F., Xue C.H., (2012).** Lipid Profile and Fatty Acid Compositions in Body Wall of *Apostichopus Japonicus* (selenka). *Journal of Food Biochemistry*, **36**:317–321.
- Lu F.S.H., Nielsen N.S., Baron C.P., Diehl B.W.K., Jacobsen C., (2012).** Oxidative Stability of Dispersions Prepared from Purified Marine Phospholipid and the Role of  $\alpha$ -Tocopherol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60(50)**:12388–12396.
- Ludwig H., (1891).** Ankyroderma musculus (Risso), eine Molpadiide des Mittelmeeres, nebst Bemerkungen zur Phylogenie und Systematik der Holothurien. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*. **51(4)**: 569–61.
- Macknight C.C., (1976).** The voyage to Marege: Macassan trepangers in northern Australia. Melbourne University Press, 175 pp.
- MacTavish T., Stenton-Dozey J., Vopel K., Savage C., (2012).** Deposit-feeding sea cucumbers enhance mineralization and nutrient cycling in organically-enriched coastal sediments. *PloS one*, **7(11)**:50031
- Magaña M.D., Segura-Campo, M., Dávila-Ortiz G., Betancur-Ancona D., Chel-Guerrero L., (2015).** ACE-I Inhibitory Properties of Hydrolysates from Germinated and Ungerminated *Phaseolus Lunatus* Proteins. *Food Science and Technology*, **35(1)**:167–74.
- Mah C., Linse K., Copley J., Marsh L., Rogers A., Clague D., Foltz D., (2015).** Description of a new family, new genus, and two new species of deep-sea Forcipulatacea (Asteroidea), including the first known sea star from hydrothermal vent habitats. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **174(1)**:93-113.
- Mangion P., Taddei D., Frouin P., Conand C., (2004).** Feeding rate and impact of sediment reworking by two deposit feeders *Holothuria leucospilota* and *Holothuria atra* on a fringing reef (Reunion Island, Indian Ocean). In: Echinoderms, Munchen, T. Heinzeler & J. Nebelsick (eds). Leiden, the Nethe lands: Balkema, 311–317 p.
- Mariño G., Kroemer G., (2013).** Mechanisms of Apoptotic Phosphatidylserine Exposure. *Cell Research*, **23(11)**:1247–48.

- Marques J., Vilanova E., Paulo A.S., Mourão P.E.S., Fernández-Busquets X., (2016).** Marine organism sulfated polysaccharides exhibiting significant antimalarial activity and inhibition of red blood cell invasion by Plasmodium. *Scientific Reports*, **6**:24368.
- Martins, A., Vieira, H., Gaspar, H. and Santos, S., (2014).** Marketed Marine Natural Products in the Pharmaceutical and Cosmeceutical Industries: Tips for Success. *Marine Drugs*, **12(2)**:1066–1101.
- Mashanov V.S., García-Arrarás J.E., (2011).** Gut regeneration in holothurians: a snapshot of recent developments. *Biological Bulletin*, **221**:93–109.
- Massin C., Jangoux M., (1976).** Observations écologiques sur *Holothuria tubulosa*, *H. polii* et *H. forskali* et comportement alimentaire de *Holothuria tubulosa*. *Cahier de Biologie Marine France*, **17**:45–59.
- Massin C., (1982).** Feed and feeding mechanisms. Holothuroidea. In: Jangoux, M., Lawrence, J.M. (Eds.), *Echinoderm Nutrition*. AA Balkema, Rotterdam, 43–55 p.
- Massin, C., Doumen C., (1986).** Distribution and feeding of epibenthic holothuroids on the reef flat of Laing Island (Papua New Guinea). *Marine Ecology Progress Series*, 185-195.
- Massin C., Rasolofonirina R., Conand C., Samyn Y., (1999).** A new species of *Bohadschia* (Echinodermata, Holothuroidea) from the Western Indian Ocean with a redescription of *Bohadschia subrubra*. *Bulletin de l'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique*, **69**:151–160.
- Matsuno T., Ishida T., (1969).** Distribution and seasonal variation of toxic principles of sea cucumber (*Holothuria leucospilota* Brandt). *Experientia*, **25(12)**:1261-1261.
- Mauzey K.P., Birkeland C., Dayton P.K., (1968).** Feeding behavior of asteroids and escape responses of their prey in the Puget Sound region. *Ecology*, **49**:603-619.
- Maurya P.K., Malik D.S., Yadav K.K., Kumar A., Kumar S., Kamyab H., (2019).** Bioaccumulation and potential sources of heavy metal contamination in fish species in River Ganga basin: Possible human health risks evaluation. *Toxicology reports*, **6**:472-481.
- Mazliadiyana M., Nazrun A. S., Isa N.M. (2017).** Optimum dose of sea cucumber (*Stichopus chloronotus*) extract for wound healing. *Medical Health*, **12**:83-89.
- McKenzie J.D., (1991).** The taxonomy and natural history of north European dendrochirote holothurians (Echinodermata). *Journal of Natural History*, **25**:123-171.
- Mecheta A., Mezali K., (2019).** A Biometric Study to Determine the Economic and Nutritional Value of Sea Cucumbers (Holothuroidea: Echinodermata) Collected from Algeria's Shallow Water Areas, *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin*, **39(39)**:65–70.

- Mercier A., Battaglione S.C., Hamel J.F., (1999).** Daily burrowing cycle and feeding activity of juvenile sea cucumbers *Holothuria scabra* in response to environmental factors. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **239**:125–156.
- Mercier A., Battaglione S. C., Hamel J.F., (2000a).** Periodic movement, recruitment and size-related distribution of the sea cucumber *Holothuria scabra* in Solomon Islands. *Hydrobiologia*, **440**:81-100.
- Mercier A., Battaglione S. C., Hamel J.F., (2000b).** Settlement preferences and early migration of the tropical sea cucumber *Holothuriascabra*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **249**:89-110.
- Mezali K (1998).** Contribution à la systématique, la biologie, l'écologie et à la dynamique des populations de cinq espèces d'holothuries aspidochirotés (*Holoturiatubulosa*, *Holothuria poli*, *Holothuria stellati*, *Holothuria forskali* et *Holothuria sanctori*) de l'herbier à *Posidonia oceanica* (L.) Delile de la presqu'île de Sidi-Fredj- Algérie (*Thèse de Doctorat d'état. Alger, Algérie : USTHB*), 208 pp.
- Mezali K., (2001).** Biométrie des holothuries aspidochirotés (Holothuroidea : Echinodermata) de la presqu'île de Sidi-Fredj (Algérie). *Rapports et procès-verbaux des réunions-Commission internationale pour l'exploration scientifique de la mer Méditerranée, Monaco*, **36**:403.
- Mezali K., Chekaba B., Zupo V., Asslah B., (2003).** Comportement alimentaire de cinq espèces d'Holothuries aspidochirotés (Holothuroidea : Echinodermata) de la presqu'île de Sidi Fredj- Algérie. *Bulletin Societe Zoologique France*, **128**: 49-62.
- Mezali K., (2004a).** Micro-répartition des holothuries aspidochirotés au sein de l'herbier de *Posidonies* de la presqu'île de Sidi-Fredj (Algérie). p. 534. CIESM (ed.). *Rapport du Congrès de la Commission internationale pour l'exploration scientifique de la Mer Méditerranée. Monaco*, **37**:574.
- Mezali K., (2004b).** Feeding behaviour of *Holothuria tubulosa* and *Holothuria poli* of Tamentefoust area - Algeria. *Rapports P.V. Rapport du Congrès de la Commission internationale pour l'exploration scientifique de la Mer Méditerranée. Barcelone*, **37**:535.
- Mezali K., Zupo V., Francour P., (2006).** Population dynamics of *Holothuria (Holothuria) tubulosa* and *Holothuria (Lessonothuria) poli* of an Algerian *Posidonia oceanica* meadow. *Biologia marina mediterranea*, **13(4)**:158-161.
- Mezali K., (2008).** Phylogénie, systématique, dynamique des populations et nutrition de quelques espèces d'holothuries aspidochirotés (Holothuroidea : Echinodermata) inféodées aux herbiers de posidonies de la côte Algéroise. *PhD Thesis*.

- Mezali K., (2011).** Some insights on the phylogeny of Algerian shallow-water sea cucumber species (Holothuroidea: Aspidochirotida). *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin*, **31**:45-47.
- Mezali K., Francour P., (2012).** Les holothuries aspidochirotes de quelques sites des côtes algériennes : révision systématique et relations phylogénétiques. *Bulletin de la Société zoologique de France*, **137(1-4)**:177-192.
- Mezali K., Soualili D.L., (2013).** The ability of holothurians to select sediment particles and organic matter. *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin*, **33**:38–43.
- Mezali K., Thandar A., (2014).** First record of *Holothuria (Roweothuria) arguinensis* (Echinodermata: Holothuroidea: Aspidochirotida: Holothuriidae) from the Algerian coastal waters. *Marine Biodiversity Records*, **7**.
- Mezali K., Soualili D.L., Neghli L., Conand C., (2014).** Reproductive cycle of the sea cucumber *Holothuria (Platyperona) sanctori* (Holothuroidea: Echinodermata) in the southwestern Mediterranean Sea: interpopulation variability. *Invertebrate Reproduction & Development*, **58**:179–189.
- Mezali K., Slimane-Tamacha F., (2020).** Current status of the sea cucumber fishery and its illegal trade in Algeria, *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin*, **40(40)**:23–26.
- Michel L.N., Dauby P., Gobert S., Graeve M., Nyssen F., Thelen N., Lepoint G., (2015).** Dominant amphipods of *Posidonia oceanica* seagrass meadows display considerable trophic diversity. *Marine Ecology*, **36**:969–981.
- Michio K., Kengo K., Yasunori K., Hitoshi M., Takayuki Y., Hideaki Y., Hiroshi S., (2003).** Effects of deposit feeder *Stichopus japonicus* on algal bloom and organic matter contents of bottom sediments of the enclosed sea. *Marine Pollution Bulletin*, **47**:118–125.
- Mihály J., Deák R., Szigyártó I.C., Bóta A., Beke-Somfai T., Varga Z., (2017).** Characterization of Extracellular Vesicles by IR Spectroscopy: Fast and Simple Classification Based on Amide and CH Stretching Vibrations. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, **1859(3)**:459–66.
- Miller J.E., Pawson D.L., (1984).** Holothurians (Echinodermata: Holothuroidea). *Memoirs of the Hourglass Cruises*, **7(1)**:1–79.
- Miller P.E., Van Elswyk M., Alexander D.D., (2014a).** Long-Chain Omega-3 Fatty Acids Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid and Blood Pressure: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials, *American Journal of Hypertension*, **27(7)**:885–96.
- Miller M.R., Pearce L., Bettjeman B.I., (2014b).** Detailed Distribution of Lipids in Greenshell TM Mussel (*Perna canaliculus*). *Nutrients*, **6**:1454–1474.

- Miller A. K., Kerr A. M., Paulay G., Reich M., Wilson N. G., Carvajal, J. I., Rouse G. W., (2017).** Molecular phylogeny of extant Holothuroidea (Echinodermata). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **111**:110-131.
- Mitu S.A., Bose U., Suwansa-Ard S., Turner L. H., Zhao M., Elizur A., Cummins S.F., (2017).** Evidence for a saponin biosynthesis pathway in the body wall of the commercially significant sea cucumber *Holothuria scabra*. *Marine drugs*, **15(11)**:349.
- Mladenov P. V., Campbell A., (1996).** Resource evaluation of the sea cucumber, *Stichopus mollis*, in the environmentally sensitive Fiordland region of New Zealand. *In: Proceedings of the ninth international echinoderm conference, AA Balkena Rotterdam, Brookfield San Francisco, CA.* **9**:481-487 p.
- Mohammady N.G.-E., El-Sayed H.S., Taha H.M., Fakhry E.M., Mahmoud N.H., Mohamed J.H., Mekawy L.M., (2015).** *Chlorella sp.* as a Source of Biodiesel and By-Products: An Integral Study of Med-Algae Project. *International Journal of Technoogical Chemistry Research Part A*, 144–151.
- Mohammadizadeh M., Bastami K. D., Ehsanpour M., Afkhami M., Mohammadizadeh F., Esmailzadeh M., (2016).** Heavy metal accumulation in tissues of two sea cucumbers, *Holothuria leucospilota* and *Holothuria scabra* in the northern part of Qeshm Island, Persian Gulf. *Marine Pollution Bulletin*, **103(1-2)**:354-359.
- Mohsen M., Wang Q., Zhang L., Sun L., Lin C., Yang H., (2019).** Heavy metals in sediment, microplastic and sea cucumber *Apostichopus japonicus* from farms in China. *Marine Pollution Bulletin*, **143**:42–49.
- Moraes G., Norhcote P.C., Kalinin V.I., Avilov S.A., Silchenko A.S., Dmitrenok P.S., Levin V.S. (2004).** Structure of the major triterpene glycoside from the sea cucumber *Stichopus mollis* and evidence to reclassify this species into the new genus *Australostichopus*. *Biochemical systematics and ecology*, **32(7)**:637-650.
- Morgan A., Archer J., (1999).** Overview: Aspects of sea cucumber industry research and development in the South Pacific. *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin*, **12**:15-17.
- Moriarty D.J.W., (1982).** Feeding of *Holothuria atra* and *Stichopus chloronotus* on bacteria, organic carbon and organic nitrogen in sediments of the GBR. *Journal of Marine and Freshwater Research*, **33**:255-263.
- Mosher C., (1956).** Observation on evisceration and visceral regeneration in the sea cucumber, *Actinopyga agassizi*. *Zoology*, **41**:16–27.

- Motokawa T., (1982).** Rapid change in mechanical properties of Echinoderm connective tissues caused by coelomic fluid. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*, **73(1)**:223-229.
- Mottett M.G., (1976).** The Fishery biology and market preparation of sea cucumbers. *State of Washington, Department of Fish, Technical Report*, **22(2)**.
- Mou J., Li Q., Qi X., Yang J., (2018).** Structural Comparison, Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Fucosylated Chondroitin Sulfate of Three Edible Sea Cucumbers. *Carbohydrate Polymers*, **185**:41–47.
- Mukai H., Koike I., Nishihira M., Nojima S., (1989).** Oxygen consumption and ammonium excretion of mega-sized benthic invertebrates in a tropical seagrass bed. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **134**:101-115.
- Murphy K.J., Mann N.J., Sinclair A.J., (2003).** Fatty acid and sterol composition of frozen and freeze-dried New Zealand Green Lipped Mussel (*Perna canaliculus*) from three sites in New Zealand. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, **12**:50–60.
- Murray B.A., FitzGerald R. J., (2007).** Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Food Proteins: Biochemistry, Bioactivity and Production. *Current Pharmaceutical Design*, **13(8)**:773–91.
- Navarro P.G., Garcia-Sanz S., Tuya F., (2012).** Reproductive biology of the sea cucumber *Holothuria sanctori* (Echinodermata: Holothuroidea). *Scientia Marina*, **76**:741-752.
- Navarro P.G., García-Sanz S., Barrio J. M., Tuya F., (2013).** Feeding and movement patterns of the sea cucumber *Holothuria sanctori*. *Marine Biology*, **160**:2957-2966.
- Navarro P., G., García-Sanz S., Tuya F., (2014).** Contrasting displacement of the sea cucumber *Holothuria arguinensis* between adjacent nearshore habitats. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **453**:123-130.
- Nchienzia H.A., Morawicki R.O., Gadang V.P., (2010).** Enzymatic Hydrolysis of Poultry Meal with Endo- and Exopeptidases. *Poultry Science*, **89(10)**:2273–80.
- Neghli L., Mezali K., (2019).** Algeria's Sea Cucumber Fishery: Challenges for a New Fishery. *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin*, **39(39)**:71–75.
- Neto R.R., Wolff G.A., Billett D.S.M., Mackenzie K.L., Thompson A., (2006).** The influence of changing food supply on the lipid biochemistry of deep-sea holothurians. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, **53**:516–527.

- Newell R.C., Courtney W.A.M., (1965).** Respiratory movements in *Holothuria forskali* Delle Chiaje. *Journal of Experimental Biology*, **42**:45–47.
- Ngaluafe P., Lee J., (2013).** Variations du poids des holothuries au cours de la transformation : étude sur dix espèces communes exploitées à des fins commerciales aux Tonga. *CPSLa Bêche-de-mer Bulletin*, **33**:3-8.
- Nichols D., (1969).** Echinoderms. Hutchinson Radius, Vol. 23.
- O’Loughlin P.M., Paulay G., Davey N., Michonneau F., (2010).** The Antarctic region as a marine biodiversity hotspot for echinoderms: Diversity and diversification of sea cucumbers. *Deep-Sea Research II*, **58**:264–275.
- Okada A., Kondo M., (2019).** Regeneration of the digestive tract of an anterior-eviscerating sea cucumber, *Eupentacta quinquesemita*, and the involvement of mesenchymal–epithelial transition in digestive tube formation. *Zoological letters*, **5**(1):21.
- Olaya-Restrepo J., Erzini K., González-Wangüemert M., (2018).** Estimation of growth parameters for the exploited sea cucumber *Holothuria arguinensis* from South Portugal. *Fishery Bulletin*, **116**:1-8.
- Omran, N. E.-S., (2013).** Nutritional Value of Some Egyptian Sea Cucumbers. *African Journal of Biotechnology*, **12**:35.
- Paltzat D.L., Pearce C.M., Barnes P.A., McKinley R.S., (2008).** Growth and production of California sea cucumbers (*Parastichopus californicus* Stimpson) co-cultured with suspended Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture*, **275**:124–137.
- Pangestuti R., Arifin Z., (2018).** Medicinal and Health Benefit Effects of Functional Sea Cucumbers, *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, **8**(3):341–51.
- Pawson, D. L. (1977).** Marine Flora and Fauna of the Northeastern United States: Echinodermata: Holothuroidea Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service. Vol. 405.
- Pawson D.L., (1982).** Holothuroidea. In: Synopsis and Classification of Living Organisms, Volume 2. SP Parker (Ed), McGraw-Hill, New York, N.Y., 813–818 p.
- Pawson D.L., (2007).** Phylum Echinodermata. *Zootaxa*, **1668**:749–764.
- Pawson D.L., Pawson D. J., King R. A. (2010).** A taxonomic guide to the Echinodermata of the South Atlantic Bight, USA: 1. Sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea). *Zootaxa*, **2449**(1):1-48.

- Pennings B., Groen B.B., van Dijk J.W., de Lange A., (2013).** Minced beef is more Rapidly digested and absorbed than beef steak, resulting and in Greater postprandial protein retention in older men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **98**:121-128.
- Pérez-Vega, J. A., Olivera-Castillo, L., Gómez-Ruiz, J. Á. and Hernández-Ledesma, B., (2013).** Release of Multifunctional Peptides by Gastrointestinal Digestion of Sea Cucumber (*Isostichopus Badionotus*). *Journal of Functional Foods*, **5(2)**:869–77.
- Pérez M.J., Falqué E., Domínguez H., (2016).** Antimicrobial Action of Compounds from Marine Seaweed. *Marine Drugs*, **14**:52.
- Pernet, F., Gauthier-Clerc S., Mayrand É., (2007).** Change in lipid composition in eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin) exposed to constant or fluctuating temperature regimes. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, **147**:557–565.
- Peters-Didier J., Sewell M.A., (2019).** The role of the hyaline spheres in sea cucumber metamorphosis: lipid storage via transport cells in the blastocoel. *Evolutionary Developmental Biology*, **10**:8.
- Piomelli D., (1993).** Arachidonic Acid in Cell Signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, **(5)**:274-280.
- Pitt R., Duy N.D.Q., (2004).** Breeding and rearing of the sea cucumber *Holothuria scabra* in Viet Nam. *Advances in sea cucumber aquaculture and management*, **463**:333-346.
- Plotieau T., Baele J.M., Vaucher R., Hasler C.A., Koudad D., Eeckhaut I., (2013).** Analysis of the impact of *Holothuria scabra* intensive farming on sediment. *Cahiers de Biologie Marine*, **54**:703–711.
- Polat, S.; Ozogul, Y. (2008).** Biochemical composition of some red and brown macro algae from the Northeastern Mediterranean Sea. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **59**:566
- Polat S., Ozogul Y., (2009).** Fatty acid, mineral and proximate composition of some seaweeds from the northeastern Mediterranean coast. *Italian Journal of Food Science*, **21(3)**.
- Pomeroy L.R., Deibel D., (1980).** Aggregation of organic matter by pelagic tunicates. *Limnology and Oceanography*, **25**:643-652.
- Popov A.M., (2002).** Comparative study of cytotoxic and hemolytic effect of triterpenoids isolated from Ginseng and Sea cucumber. *Izvestiia Akademii nauk. Serii biologicheskaja*, **2**:155-164.
- Preston, G (1993).** Bêches-de-mer. In: Nearshore Marine Resources of the South Pacific: Information for Fisheries Development and Management. A. Wright and L. Hill, (eds), Honiara, Forum Fisheries Agency, 371–407 p.

- Pu, Q., Han, L. and Liu, X., (2014).** Discrimination of Different Processed Animal Proteins (PAPs) by FT-IR Spectroscopy Based on Their Fat Characteristics. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, **18(3)**:321-328.
- Purcell S.W., (2004a).** Rapid growth and bioturbation activity of the sea cucumber *Holothuria scabra* in earthen ponds. *Proceedings of Australasian Aquaculture*, **1**:244.
- Purcell S.W., (2004b).** Criteria for release strategies and evaluating the restocking of sea cucumber. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical*, **463**:181–192.
- Purcell S.W., (2005).** Rapid growth and bioturbation activity of the sea cucumber *Holothuria scabra* in earthen ponds. *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin*, **22**:58–59.
- Purcell S.W., Gossuin H., Agudo N.S., (2009).** Changes in weight and length of sea cucumbers during conversion to processed bêche-de-mer: Filling gaps for some exploited tropical species. *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin*, **29**:3–6.
- Purcell S.W., (2010).** Managing sea cucumber fisheries with an ecosystem approach. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical*, **520**:1–171.
- Purcell S., Samyn Y., Conand C., (2012).** Commercially important sea cucumbers of the world. FAO, Rome (Italy).
- Purcell S.W., Mercier A., Conand C., Hamel J. F., Toral-Granda M.V., Lovatelli A., Uthicke S., (2013).** Sea cucumber fisheries: global analysis of stocks, management measures and drivers of overfishing. *Fish and Fisheries*, **14(1)**:34–59.
- Purcell S.W., (2014a).** Value, Market Preferences and Trade of Bêche-De-Mer from Pacific Island Sea Cucumbers. *PLoS ONE*, **9(4)**: 95075.
- Purcell S.W., (2014b).** Processing sea cucumbers into Bêche-de-mer: A manual for Pacific Island fishers. Southern Cross University, Lismore, and the Secretariat of the Pacific Community, Noumea. 44 pp.
- Purcell S. W., Conand C., Uthicke, S., Byrne M., (2016).** Ecological roles of exploited sea cucumbers. *In Oceanography and marine biology CRC Press*, 375-394.
- Purcell S.W., Lalavanua W., (2017).** Postharvest processing of sea cucumbers in Fiji. *Fiji's Sea Cucumber Fishery: Advances in Science for Improved Management*, Wildlife Conservation Society, Suva, Fiji, 30-37.

- Pratama W.W., Nursyam H., Hariati A.M., Islamy R. A., HASAN V., (2020).** Proximate analysis, amino acid profile and albumin concentration of various weights of Giant Snakehead (*Channa micropeltes*) from Kapuas Hulu, West Kalimantan, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, **21(3)**.
- Qin Z., Jing-feng W., Yong X., Yi W., Sen G., Min L., Chang-hu X., (2008).** Comparative study on the bioactive components and immune function of three species of sea cucumber. *Journal of Fishery Sciences of China*, **15(1)**:154-159.
- Rafiuddin S., (2004).** Impact of Developing Concrete Materials on Alkali Silica Reaction (*Doctoral dissertation, University of Dundee*).
- Ramofafia C., Foyle T.P., Bell J.D., (1997).** Growth of juvenile *Actinopyga mauritiana* (Holothuroidea) in captivity. *Aquaculture*, **152**:119–128.
- Ramón M., Leonart J., Massutí E., (2010).** Royal cucumber (*Stichopus regalis*) in the northwestern Mediterranean: Distribution pattern and fishery. *Fisheries Research*, **(105)**:21–27.
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V., (1998).** Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62(3)**:597–635.
- Rao G. H., (2018).** Arachidonic Acid Metabolism, Thrombosis, and Stroke. *Journal of Cardiology & Cardiovascular Therapy*, **11(1)**:1–3.
- Raup D.M., (1966).** The endoskeleton. In: Booloottian R.A. Physiology of Echinodermata. Interscience Publishers (ed), New York, 379–395 p.
- Razafimandimby Y., (2008).** Bio-écologie et exploitation de deux espèces d'holothuries aspidochirotes, *Holothuria notabilis* et *Stichopus horrens* dans la baie de Toliara (Sud-ouest de Madagascar). *Mémoire de DEA Océanologie, Université de Tuléar, IH-SM*.
- Reich M., (1999).** Ordovizische und silurische Holothurien (Echinodermata). *Greifswader Geowissenschaftliche Beitrage*, **6**:479-488.
- Reich M., (2001).** Ordovician holothurians from the Baltic Sea area. In: Echinoderms, M. Barker (eds), **2000**:93-96.
- Reich M., (2010 a).** The early evolution and diversification of holothurians (Echinozoa). In: Harris, L.G., Böttger, S.A., Walker, C.W., Lesser, M.P. (Eds.), Echinoderms: Durham. Taylor & Francis, London, 55-59 p.
- Reich M., (2010 b).** The oldest synallactid sea cucumber (Echinodermata: Holothuroidea: Aspidochirotida). *Paläontologische Zeitschrift*, **84**:541–546.

- Ridzwan H., (2007).** Sea Cucumbers: A Malaysian Heritage. Research Centre of International Islamic University Malaysia (IIUM), Kuala Lumpur Wilayah Persekutuan: Kuala Lumpur.
- Roberts D., (1979).** Deposit-feeding mechanisms and resource partitioning in tropical holothurians. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **37**:43-56.
- Roberts D., Bryce C., (1982).** Further observations on tentacular feeding mechanisms in holothurians. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **59(2-3)**:151-163.
- Roberts, D., Gebruk, A., Levin, V., Manship, B.A.D., (2000).** Feeding and digestive strategies in deposit-feeding holothurians. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, **38**:257–310.
- Robinson G., Lovatelli A., (2015).** Global sea cucumber fisheries and aquaculture FAO's inputs over the past few years. *FAO Aquaculture Newsletter*, **53**:55–57.
- Rowe F.W.E., (1969).** A review of the family Holothuriidae (Holothurioidea: Aspidochirotida). *Bulletin of the British Museum*, **18(4)**:117–170.
- Ruppert E.E., Barnes R.D., (1994).** Invertebrate Zoology. Sixth Edition. Saunders College Publishing. Harcourt Brace College Publishers. Orlando, Florida. 1056 p.
- Sadegh Vishkaei M., Ebrahimpour A., Abdul-Hamid A., Ismail A., Saari N., (2016).** Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) Inhibitory and Anti-Hypertensive Effect of Protein Hydrolysate from *Actinopyga Lecanora* (Sea Cucumber) in Rats. *Marine Drugs*, **14(10)**:176.
- Saito M., Kunisaki, N., Urano N., Kimura S. (2002).** Collagen as the major component of edible sea cucumber (*Stichopus japonicus*). *Journal of Food Science*, **67**:1319-1322.
- Saito H., Sakai M., Wakabayashi T., (2014).** Characteristics of the lipid and fatty acid compositions of the Humboldt squid, *Dosidicus gigas*: The trophic relationship between the squid and its prey. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **116**:360–366.
- Samyn Y., Van den Spiegel D., Massin C., (2006).** Taxonomie des holothuries des Comores. *AbcTaxa*, **1(3)**:130.
- Sánchez-Machado D.I., López-Cervantes J., López-Hernández J., Paseiro-Losada P., (2004).** Fatty Acids, Total Lipid, Protein and Ash Contents of Processed Edible Seaweeds. *Food Chemistry*, **85(3)**:439–44.
- Schneider M., Lovaas E., (2009).** Process for the Production of Phospholipides. Brevet N° US20090028989A1.
- Schneider K., Silverman J., Woolsey E., Eriksson H., Byrne M., Caldeira K., (2011).** Potential influence of sea cucumbers on coral reef CaCO<sub>3</sub> budget: a case study at One Tree Reef. *Journal of Geophysical Research G: Biogeosciences*, **116**:04032.

- Schneider K., Silverman J., Kravitz B., Rivlin T., Schneider-Mor A., Barbosa S., Byrne M., Caldeira K., (2013).** Inorganic carbon turnover caused by digestion of carbonate sands and metabolic activity of holothurians. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **133**:217–223.385
- Schubring R., (2009).** Crystallisation and melting behavior of fish oil measured by DSC. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **95**:823–830.
- Segawa K., Nagata S., (2015).** An Apoptotic ‘Eat Me’ Signal: Phosphatidylsérine Exposure. *Trends in Cell Biology*, **25**(11):639–50.
- Segura Campos M.R., Peralta González F., Chel Guerrero L., Betancur Ancona D., (2013).** Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides of Chia (*Salvia hispanica*) Produced by Enzymatic Hydrolysis. *International Journal of Food Science*, **2013**.
- Selenka E., (1867).** Beiträge zur Anatomie und Systematik der Holothurien. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, **17**(2): 291-374.
- Sewell M.A., Tyler P.A., Young C.M., Conand C., (1997).** Ovarian Development in the Class Holothuroidea: a Reassessment of the "Tubule Recruitment Model". *The Biological Bulletin*, **192**(1):17-26.
- Shen L., Alexander K.S., (1999).** A Thermal Analysis Study of Long Chain Fatty Acids. *Thermochimica Acta*, **340–341**:271–78.
- Shi Y., (2014).** Self-Assembled Gold Nanoplexes for Cancer-Targeted siRNA Delivery. *University of Southern Mississippi, (MSc dissertation)*.
- Shi S., Feng W., Hu S., Liang S., An N., Mao Y., (2016).** Bioactive Compounds of Sea Cucumbers and Their Therapeutic Effects. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, **34**(3):549–58.
- Shiell G.R., Uthicke S., (2006).** Reproduction of the commercial sea cucumber *Holothuria whitmaei* [Holothuroidea: Aspidochirotida] in the Indian and Pacific Ocean regions of Australia. *Marine Biology*, **148**(5):973-986.
- Sibuet M., Lawrence J.M., (1981).** Organic content and biomass of abyssal holothuroids (Echinodermata) from the Bay of Biscay. *Marine Biology*, **65**(2):143-147.
- Sibuet M., (1987).** Structure des peuplements benthiques en relation avec les conditions trophiques en Milieu Abyssal dans l’Océan Atlantique. Cas particulier des Echinodermes. *Thèse de Doctorat d’étatés Science Naturelles, Université Pierre et Marie Curie, Paris*.
- Sicuro B., Levine J., (2011).** Sea cucumber in the Mediterranean: a potential species for aquaculture in the Mediterranean. *Review of Fishery Science*, **19**:299-304.

- Sicuro B., Piccinno M., Gai F., Abete M.C., Danieli A., Daprà F., Mioletti S., (2012).** Food quality and Safety of Mediterranean Sea Cucumbers *Holothuria tubulosa* and *Holothuria polii* in Southern Adriatic Sea. **7:851–859.**
- Sila A., Bougatef A., (2016).** Antioxidant Peptides from Marine By-Products: Isolation, Identification and Application in Food Systems. *A Review, Journal of Functional Foods*, **21:10–26.**
- Simopoulos A.P., (2011).** Evolutionary Aspects of Diet: The Omega-6/Omega-3 Ratio and the Brain. *Molecular Neurobiology*, **44(2):203–15.**
- Slater M.J., Jeffs A. G., Carton A.G., (2009).** The use of the waste from green-lipped mussels as a food source for juvenile sea cucumber, *Australostichopus mollis*. *Aquaculture*, **292(3-4):219-224.**
- Slater M.J., Jeffs A.G., (2010).** Do benthic sediment characteristics explain the distribution of juveniles of the deposit-feeding sea cucumber *Australostichopus mollis*? *Journal of Sea Research*, **64:241-249.**
- Slater M.J., Jeffs A.G., Sewell M.A., (2011).** Organically selective movement and deposit-feeding in juvenile sea cucumber, *Australostichopus mollis* determined *in situ* and in the laboratory. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **409(1-2):315-323.**
- Slater M., Chen J., (2015).** Sea cucumber biology and ecology. *Echinoderm Aquaculture*. New Jersey: 47-56. First Edition. Edited by Nicholas P. Brown and Stephen D. Eddy. John Wiley & Sons.
- Sluiter, C.P. (1901).** Die Holothurien der Siboga-Expedition. *In: Weber, M. (Ed.), Siboga Expeditie Vol. 44.* E. J. Brill, Leiden, 1-141 pp.
- Smiley S., (1988).** The phylogenetic relationships of holothurians: a cladistics analysis of the extant echinoderm classes. *In: Echinoderm phylogeny and evolutionary biology*, Paul, C.R.C. & Smith, A.B. (Eds), Clarendon-Press, Oxford: 69-84 p.
- Smiley, S. (1994)** Holothuroidea. *In: Microscopic anatomy of invertebrates (Echinodermata)*, Harrison, F.W. and Chia, F.-S. (eds), Wiley-Liss New York, **14:401–471.**
- Smirnov A.V., (2012).** System of the class Holothuroidea. *Journal of Paleontology*, **46:793-832.**
- Smith A.B., (1997).** Echinoderm larvae and phylogeny. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics***28:219-241.**
- Solan M., Cardinale B.J., Downing A.L., Engelhardt K.A.M., Ruesink J.L. Srivastava D.S., (2004).** Extinction and ecosystem function in the marine benthos. *Science*, **306:1177–1180.**
- Solís-Marín F.A., (2003).** Systematics and Phylogeny of the Holothurian Family Synallactidae. University of Southampton, Southampton.

- Souissi N., Bougatef A., Triki-Ellouz Y., Nasri M., (2007).** Biochemical and Functional Properties of Sardinella (*Sardinella Aurita*) By-Product Hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology*, **45(2)**:187–94.
- Stith B.J., Hall J., Ayres P., Waggoner L., Moore J. D., Shaw W. A., (2000).** Quantification of Major Classes of Xenopus Phospholipides by High Performance Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection. *Journal of Lipid Research*, **41(9)**:1448–54.
- Stonik V.A., Kalinin V.I., Avilov S.A., (1999).** Toxins from sea cucumbers (Holothuroids): chemical structures, properties, taxonomic distribution, biosynthesis and evolution. *Journal of natural toxins*, **8**:235–248.
- Svetashev V.I., Levin V.S., Lam C.N., Nga D.T., (1991).** Lipid and fatty acid composition of holothurians from tropical and temperate waters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, **98(4)**:489-494.
- Taboada M.C., Gonzalez M., Rodriguez E., (2003).** Value and effects on digestive enzymes and serum lipids of the marine invertebrate *Holothuria forskali*. *Nutrition Research*, **23**:1661–1670.
- Taiyeb-Ali T.B., Zainuddin S.L.A., Swaminathan D., Yaacob H., (2003).** Efficacy of “Gamadent” Toothpaste on the Healing of Gingival Tissues: A Preliminary Report. *Journal of Oral Science*, **45(3)**:153–59.
- Tan C.P., Che Man Y.B., Selamat J., Yusoff M.S.A., (2002).** Comparative Studies of Oxidative Stability of Edible Oils by Differential Scanning Calorimetry and Oxidative Stability Index Methods, *Food Chemistry*, **76(3)**:385–89.
- Tanikawa E., (1955a).** Studies on the protein of the meat of sea cucumber (*Stichopus Japonicus* [Selenka]). *Mem. Fac. FishHokkaido University*.
- Tanikawa E., (1955b).** Studies on the nutritive value of the meat of sea cucumber (*Stichopus Selenka*). *Research Report of the Department of Fisheries, Hokkaido University*, **5**:338.
- Techniques Biologie Marine*, **65**:1-86.
- Telahigue K., Chetoui I., Rabeh I., Romdhan MS., Cafsi ME., (2010).** Comparative fatty acid profiles in edible parts of wild scallops from the Tunisian coast. *Food Chemistry*, **122**:744–746.
- Tawali A.B., Asfar M., Mahendradatta M., Tawali S., (2018).** comparison of proximate composition, amino acid, vitamin, and mineral contents of whole fish powder and fish protein concentrate from local indonesian snakehead fish (*Channa striatus*). *Carpathian Journal of Food Science & Technology*, **7(3)**.

- Tian M., Xue C., Chang Y., Shen J., Zhang Y., Li Z., Wang Y., (2020).** Collagen fibrils of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) are heterotypic. *Food Chemistry*, **316**:126272.
- To A.W., Shea S.K., (2012).** Patterns and dynamics of bêche-de-mer trade in Hong Kong and mainland China: implications for monitoring and management. *Traffic Bulletin*, **24**:65–76.
- Toral-Granda M.V., (2006a).** Fact sheets and identification guide for commercial sea cucumber species. *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin*, **24**:49–52.
- Toral-Granda V., (2006b).** Situation biologique et commerciale des concombres de mer des familles Holothroidae et Stichopodidae. CITES Workshop on the conservation of sea cucumbers, Lima (Perou) (Doc 16), 32 p.
- Tortonese E., Vadon C., (1987).** Oursin et Holothuries (Echinodermes) in fiche FAO nidification des espèces pour les besoins de pêche Révision I. *Méditerranée, Mer noire zone de pêche*, **37**: 715-739.
- Tripoteau L., (2015).** Valorisation des coproduits de l'holothurie *Cucumaria frondosa* par l'étude d'extraits bioactifs et approche écotoxicologique des métabolites secondaires relargués en situation de stress (*Doctoral dissertation*).
- Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Dmitrenok A.S., Borodina E.Y., Nifantiev N.E., Usov A.I., (2018).** A Highly Regular Fucan Sulfate from the Sea Cucumber *Stichopus Horrens*, *Carbohydrate Research*, **456**:5–9.
- Uthicke S., Klumpp D.W., (1998).** Microphytobenthos community production at a nearshore coral reef: Seasonal variation and response to ammonium recycled by holothurians. *Marine Ecology Progress Series*, **169**:1-11.
- Uthicke, S., (1999).** Sediment bioturbation and impact of feeding activity of *Holothuria* (*Halodeima*) *Atra* and *Stichopus Chloronotus*, two sediment feeding Holothurians, at Lizard Island, Great Barrier. *Reef. Bulletin of Marine Science*, **64**:129–141.
- Uthicke S., (2001a).** Nutrient regeneration by abundant coral reef holothurians. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **265**: 153-170.
- Uthicke S., (2001b).** Interactions between sediment-feeders and microalgae on coral reefs: Grazing losses versus production enhancement. *Marine Ecology Progress Series*, **210**:125-138.
- Valente S., Serrão E.A., González-Wangüemert M., (2015).** West versus East Mediterranean Sea: origin and genetic differentiation of the sea cucumber *Holothuria polii*. *Marine Ecology*. **36**:485–495.

- van Dam-Bates P., Curtis D.L., Cowen L.L.E., Cross S.F., Pearce C.M., (2016).** Assessing movement of the California sea cucumber *Parastichopus californicus* in response to organically enriched areas typical of aquaculture sites. *Aquaculture Environment Interactions*, **8**:67-76.
- VandenSpiegel D., Jangoux M., (1987).** Cuvierian tubules of the holothuroid *Holothuria forskali* (Echinodermata): a morphofunctional study. *Marine Biology*, **9(2)**:263-275.
- Vandenspiegel D., Jangoux M., Flammang P., (2000).** Maintaining the line of defense: regeneration of Cuvierian tubules in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata, Holothuroidea). *The Biological Bulletin*, **198(1)**:34-49.
- Venugopal V., (2008).** Marine Habitat and Resources. In *Marine Products for Healthcare: Functional and Bioactive Nutraceutical Compounds from the Ocean*. 1 Ed. CRC Press Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA, 528 pp.
- Viso A.-C., Pesando D., Bernard P., Marty J.-C., (1993).** Lipid components of the Mediterranean seagrass *Posidonia Oceanica*. *Phytochemistry*, **34**:381–387.
- Vincent J. B., (2019).** Effects of chromium supplementation on body composition, human and animal health, and insulin and glucose metabolism. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, **22(6)**:483-489.
- Vongsvivut J., Miller M.R., McNaughton D., Heraud P., Barrow C.J., (2014).** Rapid discrimination and determination of polyunsaturated fatty acid composition in marine oils by FTIR Spectroscopy and Multivariate Data Analysis. *Food Bioprocess Technology*, **7**:2410–2422.
- Wang H., Xue Z., Liu Z., Wang W., Wang F., Wang Y., Song L., (2018).** A novel C-type lectin from the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (AjCTL-2) with preferential binding of D-galactose. *Fish & shellfish immunology*, **79**:218-227.
- Webb K.L., D'Elia C.F., Dupaul W.D., (1977).** Biomass and nutrition flux measurements on *Holothuria atra* populations on windward reef flats at Enewetak, Marshall Islands. Proceedings of the 3rd International Coral Reef Symposium, Miami, Florida, D.L. Taylor (edt), Miami: University of Florida, 410-415 p.
- Wen J., Hua C., Fan S., (2010).** Chemical composition and nutritional quality of sea cucumbers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **90(14)**:2469-2474.
- Wen J., Hu C., Zhang L., Fan S., (2011).** Genetic identification of global commercial sea cucumber species on the basis of mitochondrial DNA sequences. *Food Control*, **22(1)**:72-77.

- Wen S., Zhou G., Song S., Xu X., Voglmeir J., Liu L., Zhao F., Li M., Li L., Yu X., Bai Y., Li C., (2015).** Discrimination of in vitro and in vivo digestion products of meat proteins from pork, beef, chicken, and fish. *Proteosis*, **15**:3688-3698.
- Wilfred Chong N.V., Pindi W., Chye F.Y., Shaarani S., Lee J.S., (2015).** Effects of Drying Methods on the Quality of Dried Sea Cucumbers from Sabah. *International journal of novel research in life science*, **4**:49.
- Wilkinson C.R., Williams D.M., Sammarco P.W., Hogg R.W., Trott L.A., (1984).** Rates of nitrogen fixation on coral reefs across the continental shelf of the central Great Barrier Reef. *Marine Biology*, **80**:255–262.
- Wolkenhauer S.M., Uthicke S., Burridge C., Skewes T., Pitcher R., (2010).** The ecological role of *Holothuria scabra* (Echinodermata: Holothuroidea) within subtropical seagrass beds. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **90**:215-223.
- Woodby D., Smiley S., Larson R., (2000).** Depth and habitat distribution of *Parastichopus californicus* near Sitka, Alaska. *Alaska Fishery Research Bulletin*, **7**:22-32.
- World Health Organization (W.H.O.), (2003).** Diet, Nutrition, and the Prevention of Chronic Diseases. *Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation*, **916**:4-10.
- Wouters R., Molina C., Lavens P., Calderón J., (2001).** Lipid composition and vitamin content of wild female *Litopenaeus vannamei* in different stages of sexual maturation. *Aquaculture*, **198**:307–323.
- Xie D., Seremwe M., Edwards J.G., Podolsky R., Bollag W.B., (2014).** Distinct Effects of Different Phosphatidylglycerol Species on Mouse Keratinocyte Proliferation. *PloS One*, **9(9)**:107-119.
- Xu J., Duan J., Xue C., Feng T., Dong P., Sugawara T., Hirata T., (2011).** Analysis and comparison of glucocerebroside species from three edible sea cucumbers using liquid chromatography-ion trap-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**:12246–12253.
- Xu D., Su L. and Zhao P., (2015).** In Chapter 21-*Apostichopus Japonicus* in the Worldwide Production and Trade of Sea Cucumbers, in *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, H. Yang J.-F. Hamel and A. Mercier, Eds., Elsevier, 383–98 p.
- Yin J., Yang X., Xia B., Yang Z., Wang Z., Wang J., Guo, S. (2019).** The fucoidan from sea cucumber *Apostichopus japonicus* attenuates lipopolysaccharide-challenged liver injury in C57BL/6J mice. *Journal of Functional Foods*, **61**:103493.

- Youssef N.M., (2017).** Effect of sea cucumbers *Holothuria atra* extract on liver and kidney functions in rats. *Journal of Egyptian Academic Society for Environmental Development. D, Environmental Studies*, **18(1):1-9.**
- Yu H.-B., Gao Q.-F., Dong S.-L., Wen B., (2015).** Changes in Fatty Acid Profiles of Sea Cucumber *Apostichopus Japonicus* (Selenka) Induced by Terrestrial Plants in Diets. *Aquaculture*, **442:119–24.**
- Yuan W.P., Liu C.H., Wang X.J., Meng X.M., Xia X.K., Zhang M.S., Hu W., (2010).** Evaluation and analysis of nutritional composition of different parts of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Science and Technology of Food Industry*, **2010.**
- Yuan X., Zhou Y., Mao Y., (2015).** *Apostichopus japonicus*: A key species in integrated polyculture systems. In: *The Sea Cucumber Apostichopus japonicus: History, Biology and Aquaculture*, H. Yang *et al.* (eds). London: Academic Press, 323–332 p.
- Zhang H., Wang J., Liu Y., Gong L., Sun B., (2016).** Rice bran proteins and their hydrolysates modulate cholesterol metabolism in mice on hypercholesterolemic diets. *Food & function*, **7(6):2747-2753.**
- Zamora L.N., Jeffs A.G., (2011).** Feeding, selection, digestion and absorption of the organic matter from mussel waste by juveniles of the deposit-feeding sea cucumber, *Australostichopus mollis*. *Aquaculture*, **317(1-4):223-228.**
- Zetina Moguel C., Ríos Lara G., Hernández Herrera I., Guevara Ortiz M., Ortiz Avilés E., Pool Gómez J., (2002).** Catálogo de especies de pepino de mar comercializables del Estado de Yucatán. *Editorial Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán.*
- Zhao Y., Li B., Liu Z., Dong S., Zhao X., Zeng M., (2007).** Antihypertensive Effect and Purification of an ACE Inhibitory Peptide from Sea Cucumber Gelatin Hydrolysate. *Process Biochemistry*, **42 (12):1586–91.**
- Zhao H., (2015).** Taxonomy and identification. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, **39:37-52.**
- Zhao Y.C., Xue C.H., Zhang T.T., Wang Y.M. (2018).** Saponins from sea cucumber and their biological activities. *Journal of agricultural and food chemistry*, **66(28):7222-7237.**
- Zhong Q., Wei B., Wang S., Ke S., Chen J., Zhang H., Wang H., (2019).** The Antioxidant Activity of Polysaccharides Derived from Marine Organisms: An Overview. *Marine Drugs*, **17(12):674.**

**Zhou M., Xue Y., Sun S., Wen M., Li Z., Xu J., Wang J., Yanagita T., Wang Y., Xue C., (2016).** Effects of Different Fatty Acids Composition of Phosphatidylcholine on Brain Function of Dementia Mice Induced by Scopolamine. *Lipids in Health and Disease*, **15(1):135**.

**Zupo V., Fresi E., (1984).** A study of the food web of the *Posidonia oceanica* ecosystem: analysis of the gut contents of Echinoderms. *International Workshop on Posidonia oceanica beds*, Boudour- esque C.F., Jeudy de Grissac A., Olivier J. edit., *GIS Posidonie publ.*, France., 373-379.



# **Annexe**

### **1. Préparation de l'ECA de poumon de lapin**

Environ 0,1U d'ECA de poumon de lapin lyophilisée est solubilisée dans environ 200 µl de tampon CHES (N-cyclohexyl-2-aminoéthanesulfonique) froid (50 mM, NaCl 300 mM, glycérol 5%, pH 8,3). Après homogénéisation douce pendant 10 min à 4°C, l'enzyme d'une concentration de 0,5 U/ml est répartie dans des micro-tubes à raison de 20 µl/tube puis conservés à -20 °C. Dans chaque micro-tube un volume de 180 µl de tampon CHES est rajouté afin de diluer l'enzyme à 1/10, et obtenir une concentration de 0,05 U/ml.

### **2. Préparation de la solution substrat HHL**

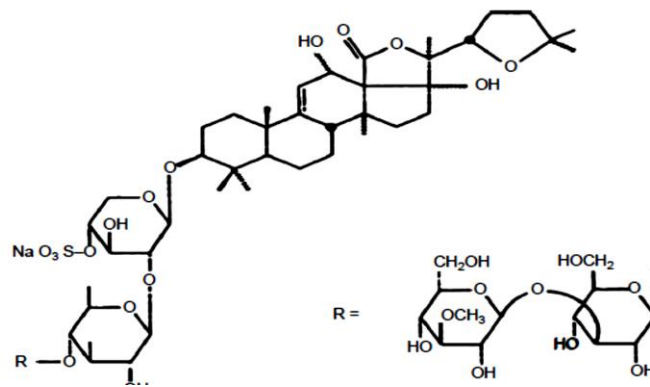
Environ 223,23 mg de HHL (Hippuryl-L-histidyl-L-leucine) est pesé et dissout dans 6 ml de tampon (CHES 50 mM et NaCl 300 mM, pH 8,3). Après 12h d'agitation à 4°C, le volume final est ajusté à 10 ml en ajoutant le tampon CHES. La solution est filtrée (0,22 µm), distribué dans des Eppendorfs (120 µl/Eppendorfs), et puis conservée à -20 °C jusqu'à son utilisation.

### **3. Préparation de la solution STOP**

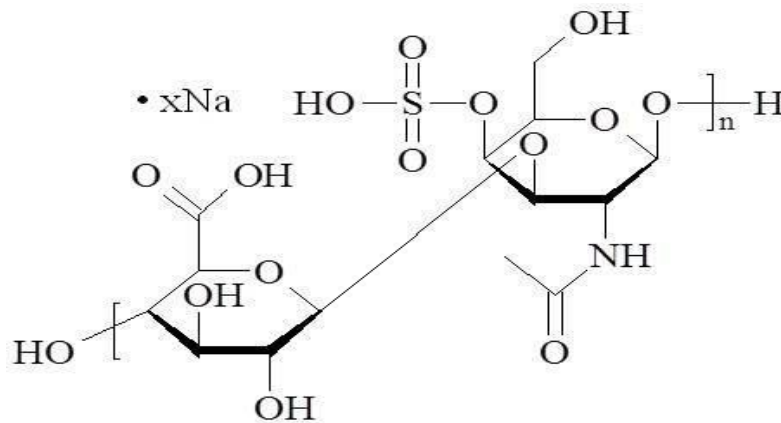
Environ 1,63 mg de captopril est ajouté à 43,84 mg d'EDTA, ils sont dilués dans 20 ml d'eau ultrapure. Un volume de 100 µl d'acide trifluoroacétique (TFA) est dilué dans de l'eau ultrapure puis rajouté à la solution précédente. Le volume final de 50 ml est complété avec de l'eau ultrapure. La solution est bien agitée pendant 10 min et conservée dans des Eppendorfs à -20°C.

#### 4. Formule chimique de quelques biomolécules extraites des holothuries

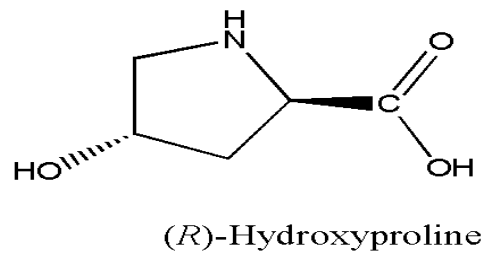
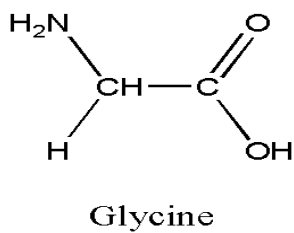
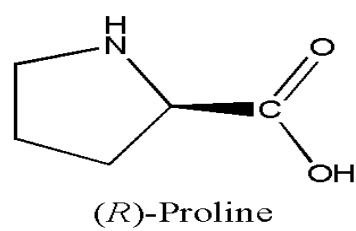
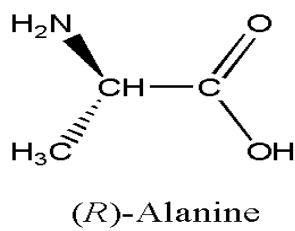
##### Saponines



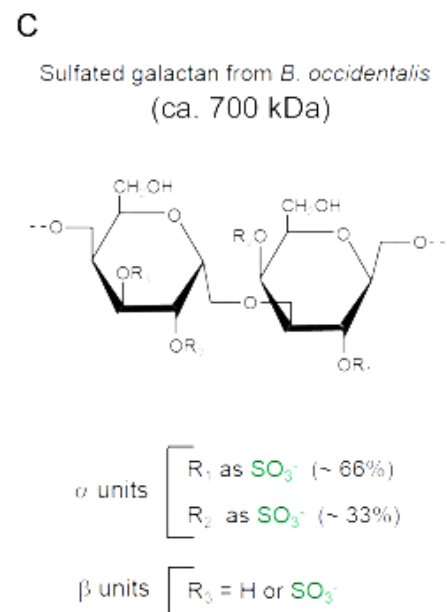
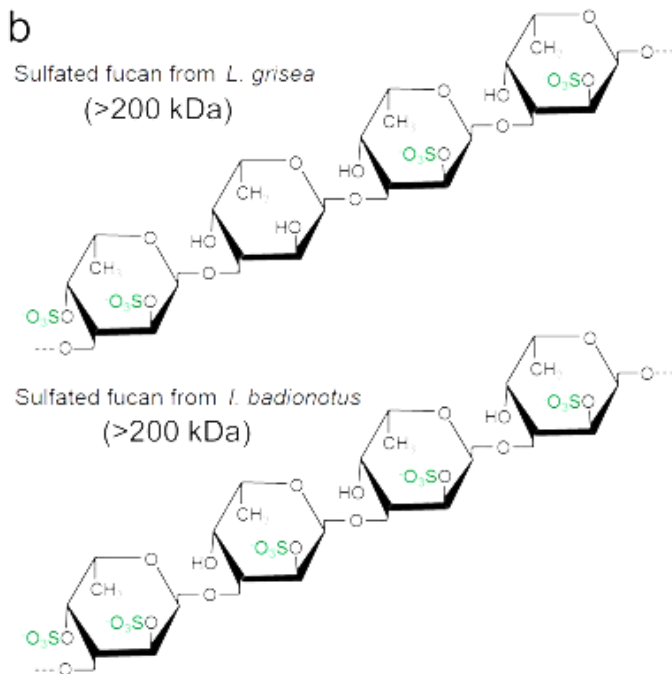
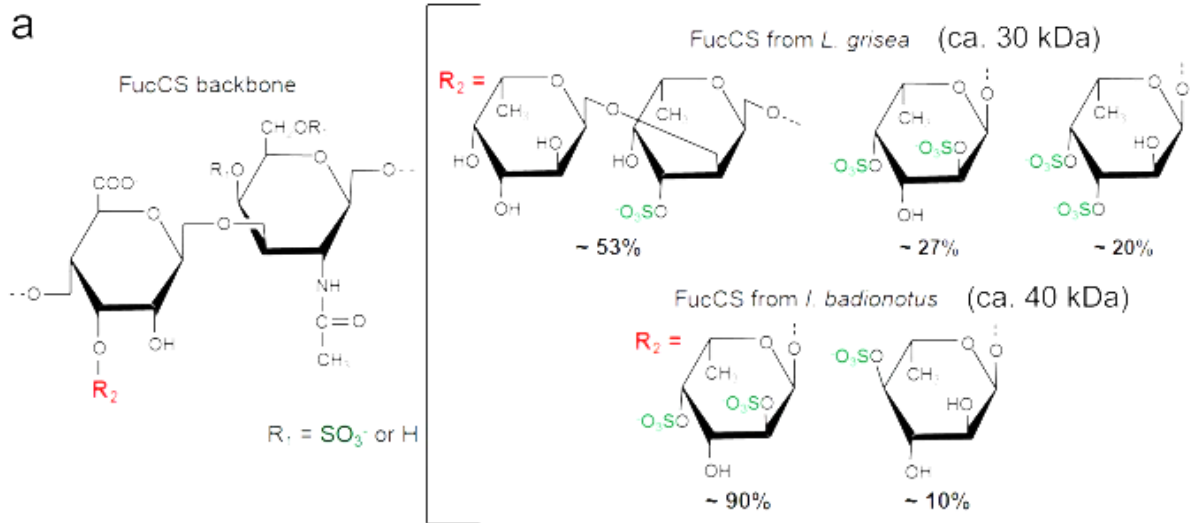
##### Chondroïtine sulfatée



##### Acides aminés



## Polysaccharides sulfatés



# **Travaux scientifiques réalisés**





*molecules*

an Open Access Journal by MDPI



# CERTIFICATE OF PUBLICATION

Certificate of publication for the article titled:

Physicochemical Properties and Liposomal Formulations of Hydrolysed Fractions of Four Sea Cucumbers (Holothuroidea: Echinodermata) from the Northwestern Algerian Coast

Authored by:

Asmaa Mecheta; Amine Hanachi; Carole Jeandel; Elmira Arab-Tehrany; Arnaud Bianchi;  
Emilie Velot; Karim Mezali; Michel Linder

Published in:

*Molecules* 2020, Volume 25, Issue 13, 2972



Academic Open Access Publishing  
since 1996

Basel, July 2020

**Communication en relation avec le sujet  
de thèse (Participation aux séminaires  
nationales)**

## **Essais d'exploitation des holothuries aspidochirotés ("concombres de mer") de deux sites de la région de Mostaganem à travers l'analyse de leur tégument**

**Asmaa Mecheta** et Karim Mezali

Laboratoire de Protection, Valorisation des Ressources Marines et Littorales, et Systématique Moléculaire, Département des Sciences de la Mer et de l'Aquaculture, Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, B.P. 300, Algérie.

Email : asmaamecheta@gmail.com/ Tel : 0792287905

### **Résumé**

Souvent, considérées comme une délicatesse alimentaire, les holothuries ou "concombre de mer" constituent un marché florissant dans les pays Asiatique. La partie la plus appréciée, étant la paroi du corps qui est consommée sous différentes formes et commercialisée sous le nom de "bêche-de-mer". La qualité biochimique du tégument est un outil clé pour estimer la valeur marchande d'une espèce d'holothurie.

Une estimation de la composition physicochimique du tégument de quatre espèces d'holothuries aspidochirotés [*Holothuria poli* (Delle Chiaje, 1824), *H. tubulosa* (Gmelin, 1791), *H. sanctori* (Delle Chiaje, 1823) et *H. arguinensis* (Koehler & Vaney, 1906)] collectées dans deux stations de la côte ouest algérienne (Stidia et Hadjadj, Mostaganem) a été réalisée en vue de leur éventuelle exploitation en "bêche-de-mer". Quatre lots constitués de 30 individus de chaque espèce, ont été collectés durant la période allant de novembre 2014 à janvier 2018. Des analyses biochimiques ont été réalisées sur le tégument sec de chaque holothuride [taux d'humidité, matière organique, lipides totaux et protéines].

Les résultats obtenus ont montré des teneurs très élevées en eau pour l'ensemble des holothuries. Cependant, on a noté que les teneurs en cendre sont plus ou moins importantes mais similaires pour les deux holothurides [*H. tubulosa* (2.24±0.46%) et *H. poli* (2.22±0.25%)]. Par ailleurs, *H. tubulosa* présente des valeurs plus élevées en protéines et en lipides (9,5±0.24g/100g et 11.7±0.36g/100g respectivement).

Les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus pour d'autres espèces d'holothuries couramment exploités dans les régions de l'indopacifique.

**Mots clés :** Holothuries aspidochirotés ; "bêche-de-mer" ; tégument ; biochimie ; protéines ; lipides ; côte ouest algérienne.

# Caractérisation de la fraction lipidique de quatre espèces de "concombres de mer" de la côte Ouest Algérienne

Asmaa Mecheta et Karim Mezali

Laboratoire de Protection, Valorisation des Ressources Marines et Littorales, et Systématique Moléculaire, Département des Sciences de la Mer et de l'Aquaculture, Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, B.P. 300, Algérie.

Email : asmaamecheta@gmail.com/ Tel : 0792287905

## Résumé

Au cours des dernières décennies, le concept d'aliments fonctionnels a offert une nouvelle approche pour promouvoir l'utilisation de produits naturels. La plupart des aliments fonctionnels et des agents thérapeutiques actuellement disponibles sont dérivés directement ou indirectement de sources naturelles, en particulier les ressources marines. Les holothuries aspidochirotés appelées communément "concombres de mer" ont été largement utilisées dans la médecine traditionnelle asiatique. Ils contiennent beaucoup d'acides gras fonctionnels tels que les acides gras oméga-3, en particulier les acides eicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA), dont les bienfaits ont été largement reconnus contre les maladies cardiovasculaires et cérébrales.

Afin de caractériser les fractions lipidique de quatre espèces d'holothuries aspidochirote [*Holothuria poli* (Delle Chiaje, 1824), *H. tubulosa* (Gmelin, 1791), *H. sanctori* (Delle Chiaje, 1823) et *H. arguinensis* (Koehler & Vaney, 1906)], collectées dans deux stations de la côte ouest algérienne (Stidia et Hadjadj, Mostaganem) durant la période allant de novembre 2014 à janvier 2018, plusieurs analyses ont été réalisées sur leur téguments lyophilisés (extraction par méthode de Folch, chromatographie couche mince par Iatroscan, Chromatographie phase gazeuse)

Les résultats obtenus ont démontré que les quatre espèces ont un profil lipidique impressionnant, composés quasi-majoritairement d'acide gras polaire (à 90%). Ils contiennent une quantité considérable d'acides gras nutritifs précieux tel que : l'acide méristique (C14: 0), l'acide palmitique (C16: 0), l'acide stéarique (C18: 0), l'acide linoléique (C18: 2), l'acide arachidique (C20: 0), l'acide eicosapentaénoïque (C20: 5, EPA) et l'acide docosahexaénoïque (C22: 6, DHA), avec des niveaux relativement plus élevés d'EPA (4.65-7.80%) comparés au DHA (4.02-5.75%). Par ailleurs, les acides gras prédominants sont les polyinsaturés (PUFA) dont les valeurs les plus élevés ont été enregistrés chez *H. poli* (63.0±0.11%) en comparaison à *H. tubulosa* (60.4±0.57%), *H. sanctori* (58.9±0.14%) et *H. arguinensis* (45.50±0.08%).

Les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus pour d'autres espèces d'holothuries couramment exploités dans les régions de l'indopacifique.

**Mots clés :** Holothuries aspidochirotés ; tégument ; biochimie ; lipides ; exploitation, côte ouest algérienne.

Ministry of Higher Education And Scientific Research  
University Abdelhamid Ibn Badis - Mostaganem  
Faculty of Nature and Life Sciences



## ATTESTATION DE PARTICIPATION

Le comité d'organisation des IX<sup>èmes</sup> Journées Nationales des Sciences de la Nature et de la Vie qui se sont déroulées les 6 et 7 Novembre 2019 à Mostaganem, Atteste que :

Mme, Mlle, M. **Asmaa Mecheta** a participé aux **JNSNV 2019** avec une communication orale intitulée :

*"Caractérisation de la fraction lipidique de quatre espèces de "concombres de mer" de la côte Ouest Algérienne".*  
avec comme co-auteur : Karim Mezali

Pr. Dina Lila SOUAMMI  
DOYENNE DE LA FACULTE

الجامعة الجزائرية  
العلوم الطبيعية  
و الحياة  
البيئية  
البيئية:صو الشيشة ليل (أ) مرزالي



Pr. Mohamed CHAFFOUR  
PRESIDENT DU COMITE

D'ORGANISATION

السجل عليه  
نائب عميد مكتب الأبحاث  
البيئية:صو الشيشة ليل (أ) مرزالي



Ministry of Higher Education And Scientific Research  
University Abdelhamid Ibn Badis - Mostaganem  
Faculty of Nature and Life Sciences



## ATTESTATION DE PARTICIPATION

Le comité d'organisation des IX<sup>èmes</sup> Journées Nationales des Sciences de la Nature et de la Vie qui se sont déroulées les 6 et 7 Novembre 2019 à Mostaganem, Atteste que :

Mme, Mlle, M. **Asmaa Mecheta** a participé aux **JNSNV 2019** avec une communication orale intitulée :

*"Caractérisation de la fraction lipidique de quatre espèces de "concombres de mer" de la côte Ouest Algérienne".*  
avec comme co-auteur : Karim Mezali

Pr. Dina Lila SOUAMMI  
DOYENNE DE LA FACULTE

السيدة دينا ليل سوامي  
مديرة الكلية  
العلوم الطبيعية  
والحياة



Pr. Mohamed CHAFFOUR  
PRESIDENT DU COMITE

D'ORGANISATION

السيد محمد شافور  
رئيس اللجنة  
تنظيم مؤتمرات العلوم  
الطبيعية والحياة





## Résumé

Les holothuries ou "concombres de mer" sont des invertébrés marins d'une grande importance écologique, économique et nutritionnelle. Ils sont très appréciés par les peuples d'Asie et de l'Extrême-Orient dû à leurs nombreux effets bénéfiques sur la santé humaine. Dans certains pays d'Asie, les holothuries constituent la ressource halieutique la plus importante et leurs transformations en "bêches-de-mer" (produit sec) est florissante. Récemment, la pêche aux "concombres de mer" est en train d'émerger en Méditerranée en raison de l'effondrement des stocks de l'Indo-Pacifique. Afin promouvoir le potentiel économique, nutritionnelle et nutraceutique de quatre espèces de "concombres de mer" [*Holothuria poli* (Delle Chiaje, 1824), *H. tubulosa* (Gmelin, 1791), *H. arguinensis* (Koehler et Vaney, 1906), et *H. sanctori* (Delle Chiaje, 1823)], récoltées sur cinq stations de la côte ouest Algérienne [Stidia et Hadjadj (Mostaganem) ; Port de Kristel, Port d'Oran, et Cap Falcon (Oran)], nous avons réalisé : 1) une étude biométrique sur des échantillons frais afin d'estimer la taille, le poids et l'épaisseur du tégument ; 2) une transformation en "bêche-de-mer" et une digestion à la trypsine afin d'estimer leurs valeurs nutritionnelles ; 3) Une estimation de la composition approximative de la paroi du corps, du profil lipidique et de l'activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) ; 4) une élaboration de nanoliposomes et encapsulation des peptides en utilisant des phospholipides obtenus à partir de la même source ; 5) une caractérisation physico-chimique des nanoliposomes et des peptides ; 6) des analyses *in vitro* afin d'estimer la cytotoxicité des nanoliposomes sur des cellules mésenchymateuses humaines (CMSs).

Les résultats obtenus ont montré que malgré que la taille et le poids des quatre "concombres de mer" soient inférieurs à ceux des espèces Indo-Pacifique, leur valeur nutritionnelle reste néanmoins importante, car leur tégument est facilement digéré par la trypsine. Ces résultats ont démontré une teneur élevée en protéines (49,26-69,34 %), et un profil lipidique impressionnant constitué de 27 acides gras, principalement composés d'acides gras polaires (91,16-93,85 %), avec une teneur élevée en acides gras polyinsaturés (AGPI) (50,90-71,80 %), en particulier l'acide eicosapentaénoïque (EPA) (5,07-8,76 %) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) (4,86-7,25 %). Une quantité élevée de phospholipides a également été retrouvée (55,20-69,85%), principalement composée de phosphatidylcholine (PC) (51,48-58,56%). Leurs fractions peptidiques présentent une forte activité inhibitrice de l'ECA (CI<sub>50</sub> 0,30-0,51 mg/mL). Nos résultats ont également montré que les nanoliposomes n'induisent pas de cytotoxicité et de mort cellulaire dans les CMSs humaines et aucune perturbation de la prolifération n'est observée pour toutes les concentrations testées, ainsi que les nanoliposomes et hydrolysats (HTS) combinés à une concentration de 0,1 mg/mL. Les quatre espèces de "concombres de mer" ont un réel potentiel comme nutraceutique, car ils représentent une nouvelle source de protéines, d'oméga-3, d'oméga-6, et de peptides bioactifs.

**Mots clés :** "concombres de mer" ; "bêche-de-mer" ; valorisation ; AGPI ; peptides ; ACE ; nanoliposome ; phospholipides ; côte ouest algérienne.