



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

N°/SNV/2016

Laboratoire de LMBAFS

Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du diplôme de

Master en Biologie

Spécialité: Nutrition et santé

Présenté par

MOUSSAOUI Salima et BELAKHAL karima

Thème

**Etude du pouvoir antimicrobien des substances
bioactives de la moule (*Mytilus galloprovincialis*)**

Soutenue publiquement le 05/07/2016

Devant le Jury

Président	Pr. Riazi. A	Université de Mostaganem
Examinatrice	Mme Kaddari	Université de Mostaganem
Encadreur	Dr. Mokhtar. M	Université de Mostaganem
Co-encadreur	Melle Otsmane El Haou. S	Université de Mostaganem

Année universitaire 2015-2016

Dédicace

*A l'aide de Dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, J'ai pu réaliser ce travail
que je dédie :*

Aux personnes les plus chères au monde mes chers parents.

A ma très chère Maman;

*La lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie, qui ma apporté son
appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné
confiance, courage et sécurité.*

A mon très cher Papa;

*Qui ma appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice ses
conseils et ses encouragements. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour
mon éducation et mon bien être. Ce travail est fruit de tes sacrifices qui tu as consentis pour
mon éducation et ma formation.*

*C'est grâce à vous que je suis arrivée aujourd'hui à ce niveau d'étude. Je ne trouverai jamais
les mots pour vous remercier autant pour toute la veille morale et physique sur moi.*

A mon grand père : Moussa

*Mes très chères sœurs et mes frères : Yamina, Fatima, Ritadj, Medyan, kheira,
Belkacem, Ahmed, Mohamed.*

Je dédié aussi ce travail à toute ma famille MOUSSAOUI et DAHOU.

A Mes ami(e) s : Hadj, Nesrine, Nour elhoda, Samia, Touatia, Ilhame,

A mon binôme karima qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce travail.

Et à toute La promotion de 2ème année master Nutrition et santé LMD Promotion 2016.

Salima

Dédicaces

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

Je dédie ce modeste travail A :

Ma très chère mère :

Affable, honorable, aimable qui représentes pour moi la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

A mon très cher Père :

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour lui Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit des sacrifices qui ont consentis pour mon éducation et ma formation.

Mon marie et Mes très chères filles : BELARBI Benaissa, Malek et Yasmine .

A mes très chères frères :Miloud,Noureddin,Houssin etMohamed.

Mes très chères sœurs :Kadidja,Otmania,Houria et surtout Yamina .

Toute la famille BELAKHAL et la famille BELARBI .

Tous mes collègues et mes amies : Sihem, Nadjia, Nacera, Nassira, Fatiha, Naima, Khadidja, Zahira et Yacine.

A ma copine salima : Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour elle.

Et à toute mes amies de promo nutrition et santé 2016.

Karima

Dédicace

Avant propos

La présente étude a été réalisée au niveau de Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, sous la direction de Mlle MOKHTAR.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre promotrice Mme Mokhtar M, Maître de conférences à l'Université de Mostaganem, qui nous a encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'ils nous ont accordé nous ont permis de réaliser ce travail.

Nous remercions aussi notre co-encadreur, Melle Ostmane El Haou Siham pour son soutien et sa disponibilité durant la réalisation de toute la partie pratique de cette étude.

Nos sincères remerciements à Mr Riazi A, professeur à l'Université de Mostaganem d'avoir accepté de présider le jury.

Nous adressons également nos respectueux remerciements à Mme Keddari S, Maître de conférences à l'Université de Mostaganem d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous exprimons également notre gratitude à tous les enseignants qui ont collaboré à notre formation depuis notre premier cycle d'étude jusqu'à la fin de notre cursus universitaire, et ceux qui ont contribué de près ou de loin à la concrétisation de ce travail.

Résumé

La diversité des organismes vivants du monde marin offre un potentiel conséquent pour l'exploitation et la découverte de substances naturelles bioactives. Au sein de cette considérable chimiodiversité, les invertébrés marins continuellement exposés aux microorganismes pathogènes environnants et uniquement pourvus d'un système immunitaire primitif, sans mémoire, représentent un réservoir unique de molécules bioactives de défenses. Le présent travail a pour but d'explorer les propriétés antimicrobiennes des substances bioactives, hémolymphe et fraction peptidique de la moule (*Mytilus galloprovincialis*) de la région de Mostaganem. La teneur en protéine a été dosée selon la méthode de **Lowry**. L'activité antimicrobienne a été testée vis-à-vis d'une panoplie de microorganismes de référence en utilisant la méthode de microdilution. Les résultats obtenus ont montré que la teneur en protéines augmente avec leur contamination des moules par *E. Coli*, par ailleurs, l'hémolymphe possède un pouvoir antimicrobien plus important par rapport aux peptides. Il s'est avéré que la souche *S. aureus* est la souche la plus sensible à l'action de l'hémolymphe avec une CMI de 0.7177 µg/ml. En ce qui concerne les résultats de la fraction peptidique, le comportement des souches était différent. La souche *S. typhimurium* était la souche la plus sensible avec une CMI de 0,1495 µg/ml. L'ensemble de ces résultats suggère que les substances associées au système immunitaire pourraient jouer un rôle essentiel dans la défense des bivalves.

Mots Clés : *Mytilus galloprovincialis* – Hémolymphe – Plasma – Protéines – peptide-
Souches pathogènes.

Abstract

The diversity of living marine world offers a substantial potential for the exploitation and the discovery of bioactive natural substances. Within this considerable chemodiversity, continually exposed to the surrounding marine invertebrates pathogenic microorganisms and only provided with a primitive immune system, without memory, represent a single reservoir of bioactive molecules defenses. This work aims to explore the antimicrobial properties of bioactive substances, and hemolymph peptide fraction of the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) of the Mostaganem region. The protein content was assayed by the Lowry method. The antimicrobial activity was tested vis-a-vis a reference range of microorganisms using the microdilution method. The results obtained showed that the protein content increases with mold contamination by *E. Coli*, also hemolymph has a higher antimicrobial potency compared to peptides. It turned out that the *S. aureus* strain is the strain sensitive to the action of the hemolymph with MIC of 0.7177 g / ml. As regards the results of the peptide moiety, the behavior of stem was different. The *S. typhimurium* strain was the most sensitive strain with an MIC of 0.1495 g / ml. All these results suggest that substances associated with the immune system may play a critical role in the defense of bivalves.

Keywords: *Mytilus galloprovincialis* - Haemolymph - Plasma - Protein - peptide pathogenic strains.

Liste des abréviations

- ATCC : American type culture collection.
- BHI : Brain Heart Infusion (Bouillon cœur cerveau).
- BSA : Albumine de sérum bovin.
- CMI : concentration minimal inhibitrice.
- DO : Densité optique.
- IC : Indice de condition.
- IL : Interleukines.
- LMBAFS : Laboratoire des Microorganismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la Santé.
- MGD1 : *Mytilus galloprovincialis* de défensine 1.
- MGD2 : *Mytilus galloprovincialis* de défensine 2.
- MH : Mueller-Hinton.
- *M. galloprovincialis* : *Mytilus galloprovincialis*.
- PAMs : Les Peptides Antimicrobiens.
- TNF : Tumeur Necrosis Factor.
- UFC: Unités Formant Colonies.

Liste des tableaux et des figures

Liste des tableaux

CHAPITRE II : Matériels et méthodes

Tableau 1: Origine, milieu de culture et température de croissance des différentes souches utilisées... pp 14.

CHAPITRE IV : Résultats et Discussion

Tableau 3: Les paramètres biométriques des lots d'individus échantillonnés des moules *Mytilus galloprovincialis*, provenant du port de Mostaganem.....pp 22.

Tableau 4: Indice de Condition des lots d'individus échantillonnés des moules *Mytilus galloprovincialis*.....pp22.

Tableau 4: Spectres d'activité de l'hémolymphe et la fraction peptidique obtenue. L'activité est exprimée en CMI ($\mu\text{g/mL}$).....pp 26.

Liste des figures

CHAPITRE I : Généralités sur la moule *Mytilus galloprovincialis*

Figure 1 : Anatomie interne et externe de la moule *Mytilus galloprovincialis* (Khelil, 2007).....pp 4.

Figure 2 : Système respiratoire chez la moule (Aquascope, 2000) pp 6.

Figure 3 : Les système de défense chez les bivalves (Canesi et al., 2002)..... pp 9.

Figure 4 : L'aire de répartition de *Mytilus galloprovincialis* (Cahen, 2006).....pp10.

Chapitre II : Matériels et méthodes


Figure 5 : position géographique de la côte de Mostaganem représentant le site d'échantillonnage de *Mytilus galloprovincialis*(Google Maps,2016).....pp11.

Figure 6: *Mytilus galloprovincialis* prélevées à partir du port de Mostaganem..... pp 12.

Figure 7 : Elevage des moules dans l'aquarium pour leur phase d'adaptation..... pp 13.

Figure 8 : Les différents paramètres linéaires de la moule (a):Longueur, (b): largeur, (c): épaisseur.....pp 16.

Figure 9 : Extraction des fractions peptidiques à partir de l'hémolymphe de la moule (*Mytilus galloprovincialis*), (a) : prélèvement d'hémolymphe, (b) : séparation des peptides sous agitation, (c):centrifugation, (d): le culot de centrifugation..... pp 17.

Figure 10 : Protocol expérimental.....pp 19.

Figure 11: L'injection d'*E. Coli* dans la cavité palléale pour stimuler la réponse immunitairepp 20.

Figure 12: *Mytilus galloprovincialis* à différente âge prélevées à partir du port de Mostaganem.....pp23

Figure 13: Courbe d'étalonnage de l'albumine sérique bovin (BSA)..... pp 24.

Figure 14: Teneur en protéines dans l'hémolymphe et dans la fraction peptidique dans les moules non infectées (■) et les moules infectées par *E. Coli* ATCC10536 (■).....pp 25.

Table des matières

Dédicace	
Remerciement	
Résumé	
Abstract	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux et des figures	
Table des matières	
Introduction.....	1
CHAPITRE I : Généralités sur la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i>	
I.1. Systématique	2
I.2. Ecologie	2
I.3. Anatomie de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i>	3
I.3.1. Coquille.....	3
I.3.2. Le pied et le byssus.....	3
I.3.3. Les branchies.....	3
I.3.4. Le muscle	3
I.3.5. la gland digestive	3
I.3.6. Le manteau	4
I.3.7. L'hémolymphe.....	4
I.3.8. Les hémocytes.....	5
I.4. Physiologie de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i>	5
I.4.1. Alimentation.....	5
I.4.2. Le système excréteur.....	5
I.4.3. Le système respiratoire.....	5
I.4.4. Le système circulatoire.....	5
I.4.5. Système nerveux.....	6
I.4.6. Reproduction.....	6
I.4.7. Système immunitaire.....	7
I.4.7.1. La réponse immunitaire cellulaire.....	7
I.4.7.2. La réponse immunitaire humorale.....	7
a) Enzymes lysosomales et lysozyme.....	8
b) Lectines.....	8
c) Cytokines.....	8
d) Les Peptides Antimicrobiens (PAMs).....	8
I.5. Répartition géographique de la <i>Mytilus galloprovincialis</i>	10

CHAPITRE II : Matériels et méthodes	11
II.1. Site de prélèvement.....	11
II.2. Prélèvement des moules <i>Mytilus galloprovincialis</i>	13
II.3. Origine des microorganismes.....	13
II.4. Choix des milieux de culture et conditions de croissance	15
II.5. Mesure des paramètres biologiques.....	15
a) Biométrie.....	15
b) Indice de condition.....	16
II.6. La collection de l' hémolymphe	17
II.7. Extraction des fractions peptidiques.....	18
II.8. Détermination de la teneur en protéines.....	18
a) Principe	18
b) Mode opératoire	18
c) Expression des résultats.....	20
II.9. Stimulation de la production des peptides de la moule.....	
II.10. Activité antibactérienne de l'hémolymphe et la fraction peptidique de la moule par méthode de microdilution.....	20
CHAPITRE III : Résultats et Discussion	21
III.1. Analyse des paramètres biométriques.....	21
a) Biométrie.....	21
b) Indice de condition.....	23
III.2. Détermination de la teneur en protéines	23
III.2.1. Courbe d'étalonnage.....	23
III.2.2. Dosage des protéines.....	
III.3. Pouvoir antibactérien d'hémolymphe et des fractions peptidiques de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i>	26
Conclusion générale	30
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction Générale

Introduction

La résistance bactérienne aux agents antimicrobiens apparaît de nos jours comme une des préoccupations majeures de santé publique, l'émergence et la dissémination de souche bactériennes résistantes résulte de l'usage anarchique et abusif des antibiotiques conventionnels combine nombreuse mutation génétique qui suivent dans le mode bactériennes (Perreeten *et al.*, 1999). Afin d'éradiquer cette résistance sans cesse croissante, il devient impératif et urgent de développer de nouvelles classes de composés antimicrobiens.

Les organismes marins présentent un intérêt scientifique énorme. En effet, ils possèdent des structures, des voies métaboliques, des systèmes reproducteurs et des mécanismes de perception et de défense uniques parce qu'ils ont su s'adapter à leur environnement, parfois hostile. L'identification de nouvelles substances naturelles marines bioactives est une voie prometteuse pour identifier des stratégies thérapeutiques innovantes (Defer *et al.*, 2010).

De nombreuses molécules extraites à partir d'invertébrés marins incluant les bivalves, sont connues pour présenter un large spectre d'activités antimicrobiennes. Ainsi, il a été mis en évidence que certaines molécules affectaient la croissance et le développement de bactéries, de virus, de champignons et de levures (Nakamura *et al.*, 1988; Mitta *et al.*, 2000c; Zasloff, 2002). Les activités antibactériennes et antivirales ont été décrites plus spécifiquement chez les bivalves tels que les moules et les huîtres au sein de l'hémolymphe, dans les branchies et le manteau (Seo *et al.*, 2005; Roch *et al.*, 2008).

Dans ce contexte, les mollusques marins représentent d'une part, une source potentiellement importante de nouveaux composés antimicrobiens pouvant servir de support pour la découverte de molécules bioactives antibactériennes et/ou antivirales, et ainsi contribuer au développement de nouvelles stratégies pour des actions préventives chez différentes espèces aquacoles. D'autre part, face à l'augmentation avérée de la résistance bactérienne aux antibiotiques, l'exploration de nouvelles ressources naturelles pourrait servir de support pour l'identification voire la conception de nouvelles molécules thérapeutiques à large spectre d'activité et sans effets secondaires.

L'objet de notre travail est d'étudier les peptides antimicrobiens et l'hémolymphe de la moule (*Mytilus galloprovincialis*), et l'évaluation de leur pouvoir antibactérien vis-à-vis une gamme de bactéries pathogènes.

Etude bibliographique :

CHAPITRE I :

Généralités

sur la moule

Mytilus galloprovincialis

Chapitre I : Généralités sur la moule *Mytilus galloprovincialis*

I.1. Systématique

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

La classification de la moule, *Mytilus galloprovincialis* s'établit comme suit (Turgeon et al., 1998):

- **Règne** : Animal;
- **Sous-règne** : Bilateria;
- **Phylum** : Mollusca;
- **Classe** : Bivalvia;
- **Sous-classe** : Ptériomorpha;
- **Ordre** : Mytiloida;
- **Famille** : Mytilidae;
- **Genre** : *Mytilus*;
- **Espèce** : *galloprovincialis*.

I.2. Ecologie

Les moules sont des espèces sessiles qui vivent fixées sur substrats durs dans la zone médiolittorale (zone intertidale), elles résistent aux courants, aux chocs des vagues et à l'arrachement grâce aux solides filaments du byssus qui sont soudés au rocher (Songy et Avezard, 1963). Les moules recouvrent des rochers battus par les vagues, mais peuvent proliférer dans les estuaires où l'eau est moins salée, moins claire et moins agitée (Songy et Avezard, 1963). On les retrouve aussi dans les ports (Lubet et Aloui, 1987). La nutrition est un paramètre important dans la répartition des moules qui prolifèrent généralement dans les zones riches en phytoplancton, en matières organiques dissoutes ou en suspension et en bactéries (Lubet, 1973).

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

L'anatomie et la fonction physiologique des différents organes de *Mytilus galloprovincialis* sont détaillées ci dessous :

I.3.1. Coquille

Les moules contiennent deux valves lisses ou coquilles extérieures protectrices (Fig.1), ces coquilles sont de couleur noire bleuâtre et sont maintenues ensemble par une petite charnière droite (Barhoumi, 2014), permettant la sauvegarde de la masse viscérale (Kamel, 2014).

I.3.2. Le pied et le byssus

Le pied est inséré en avant de la bosse viscérale, il est comprimé latéralement et prend l'aspect d'un sac « soc de charrue ». Ces mouvements sont assurés par des muscles protracteurs et rétracteurs, pairs, antérieurs et postérieurs, qui s'insèrent symétriquement sur la face interne des valves de la coquille en avant des muscles adducteurs (Beaumont et Cassier, 2004). A sa base se trouve la glande du byssus qui synthétise des filaments (byssus) responsable de la fixation de la moule à son substrat. Une fois qu'ils sont sécrétés, les filaments se solidifient au contact de l'eau de mer (Kamel, 2014).

I.3.3. Les branchies

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

I.3.4. Le muscle

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

I.3.5. La glande digestive

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

I.3.6. Le manteau

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

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

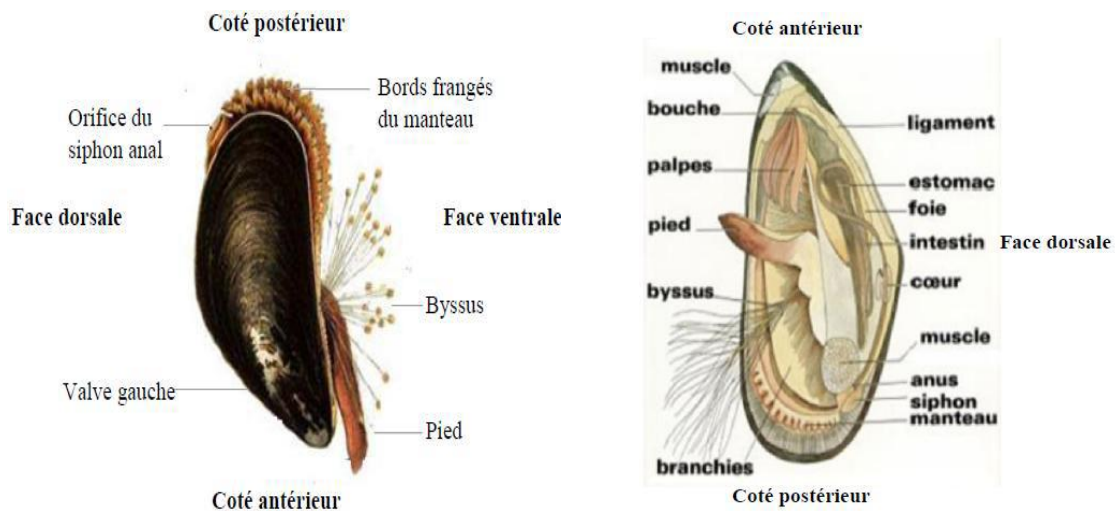


Figure 1: Anatomie interne et externe de la moule *Mytilus galloprovincialis* (Khelil, 2007).

I.3.7. L'hémolymphe

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

I.3.8. Les hémocytes

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

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

I.4.1. Alimentation

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

I.4.2. Le système excréteur

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

I.4.3. Le système respiratoire

Les échanges d'oxygène se font par l'intermédiaire des branchies. L'eau chargée en oxygène dissous pénètre dans la cavité palléale via le siphon inhalant. Elle est filtrée par les filaments des deux paires de branchies lamelleuses avant d'être évacuée par le courant exhalant (Fig. 2). L'oxygène ainsi capté pénètre dans l'hémolymphe pour être distribué dans tout l'organisme. Lorsque la moule se retrouve à l'air libre, elle ferme sa coquille et passe à une respiration anaérobie (Cahen, 2006).

I.4.4. Le système circulatoire

L'appareil circulatoire est relativement simple. On y trouve un cœur dorsal (enveloppé par le péricarde) qui comprend deux oreillettes latérales et un ventricule. L'hémolymphe, chassée dans deux aortes, est distribuée aux différentes parties du corps par

substrat, après 2 à 3 semaines, se métamorphose en jeune moule et devient adulte au bout de 2 ans (Cahen, 2006).

I.4.5. Système immunitaire

Chez la plupart des mollusques, l'hémolymphe baigne directement les organes internes. L'hémolymphe comme le sang des vertébrés joue un rôle spécifique dans le système de défense (Fisher, 1986; Cheng, 1996; Chu, 2000). Les défenses de l'organisme sont essentiellement non spécifiques et basées sur les activités des hémocytes circulant dans les tissus (Cheng, 1996) et dans les fluides extrapalléaux entre le manteau et la face interne de la coquille (Allam et Paillard, 1998). Même si les bivalves sont des organismes relativement simples, ils ont un long cycle de vie pendant lequel ils sont constamment exposés à différents microbes potentiellement pathogènes ou invasifs. Comme c'est le cas de tous les autres invertébrés, cette immunité innée est leur seul système immunitaire et comprend deux actions complémentaires : une action impliquant directement les hémocytes (la défense cellulaire) et une action impliquant des molécules libres (la défense humorale) (Canesi et al., 2002) (Fig.3).

I.4.5.1. La réponse immunitaire cellulaire

Les hémocytes, cellules clés du système de défense, sont les composants primaires de la réponse immunitaire des mollusques bivalves. Ils sont présents à la fois dans l'appareil circulatoire (vaisseaux et sinus hémolympatiques) et dans les tissus et organes (glandes digestives, branchies, manteau, gonades).

Les agents exogènes, dès leur entrée dans l'organisme, peuvent être directement repérés par l'organisme et pris en charge par les cellules hémocytaires. La phagocytose est un processus universel conservé au cours d'évolution et existe à la fois chez les vertébrés et les invertébrés, aussi c'est le principal mécanisme cellulaire de défense chez les mollusques marins qui est mis en place via les cellules hémocytaires (granulocytes et hyalinocytes).

I.4.5.2. La réponse immunitaire humorale

Différents travaux rapportent la présence de molécules intervenant dans les mécanismes de défense telles que le lysozyme, des enzymes lysozomales (Pipe, 1990a; Pipe, 1990b), des cytokines et lectines (Hughes *et al.*, 1990; Beck et Habicht, 1991; Hughes *et al.*, 1991) et des peptides antimicrobiens (Mitta *et al.*, 2000a; Mitta *et al.*, 2000c).

a) Lysozyme et enzymes lysosomales

Le lysozyme est une petite enzyme bactériolytique ubiquitaire présente dans la fraction acellulaire de l'hémolymphe et dans les hémocytes de bivalves (Bachali *et al.*, 2002). Le lysozyme hydrolyse la liaison β -1,4-glycosidique, altérant ainsi les résidus N-acétylglucosamine et Nacétylmuramique engagés dans la couche de peptidoglycane de la paroi bactérienne des bactéries à Gram+. Plusieurs études ont rapporté que les lysozymes sont aussi capables de détruire les bactéries à Gram- chez les bivalves (Xue *et al.*, 2004).

Des enzymes lysosomales (β -glucuronidase, phosphatase, estérase, peroxydase, aminopeptidase) sont également retrouvées dans les hémocytes et l'hémolymphe chez différentes espèces de bivalves (Xue et Renault, 2000).

b) Lectines

Les lectines sont des protéines à forte affinité pour les sucres. La capacité de reconnaissance et l'interaction des lectines avec les carbohydrates de molécules étrangères leur confèrent un rôle de récepteur ligand (Mydlarz *et al.*, 2006). Elles peuvent intervenir dans les phénomènes d'agglutination et d'opsonisation notamment lors de la phagocytose, sont identifiées chez les mollusques bivalves tels que les moules, les palourdes et les huîtres dont la plupart exhibent une activité antibactérienne (Pipe, 1990b).

c) Cytokines

Les cytokines sont des petites protéines solubles constituant des messages échangés entre les différentes catégories de cellules d'un animal sont libérés après contact avec des constituants étrangers, par les cellules du système immunitaire telles que les cellules phagocytaires. Les cytokines comportent notamment les Interleukines (IL) et les molécules de la famille « Tumor Necrosis Factor » (TNF) (Ottaviani *et al.*, 2000; Novas *et al.*, 2004).

d) Les Peptides Antimicrobiens (PAMs)

Conventionnellement, les peptides antimicrobiens sont des molécules de petite taille (6-50 résidus acides aminés) avec une masse moléculaire comprise entre 1 et 5 kDa, sont cationiques (charge nette de +2 à +9), à caractère amphiphile, les structures tridimensionnelles varient dont la plupart présente un domaine hydrophobe et une portion hydrophile à leur surface, leur permettant de fortes interactions avec la membrane bactérienne chargée négativement (Wang & Wang, 2004; Hancock *et al.*, 2006).

Les peptides antimicrobiens peuvent être exprimés de manière constitutive dans des cellules sécrétrices ou inductibles par des infections ou stimuli inflammatoires. La fonction principale des PAMs est son activité antimicrobienne, mais en plus de cette activité ils peuvent agir comme médiateurs d'inflammations ou aussi influençant la libération de cytokines, la prolifération cellulaire, l'angiogénèse, la cicatrisation, le chimiotactisme. Certains peptides possèdent une activité antibactériennes seulement pourtant d'autres possèdent des activités antifongiques, antivirales, antiparasites et même des activités face aux protozoaires voire des cellules cancéreuses (Chinchar *et al.*, 2004; Toke, 2005).

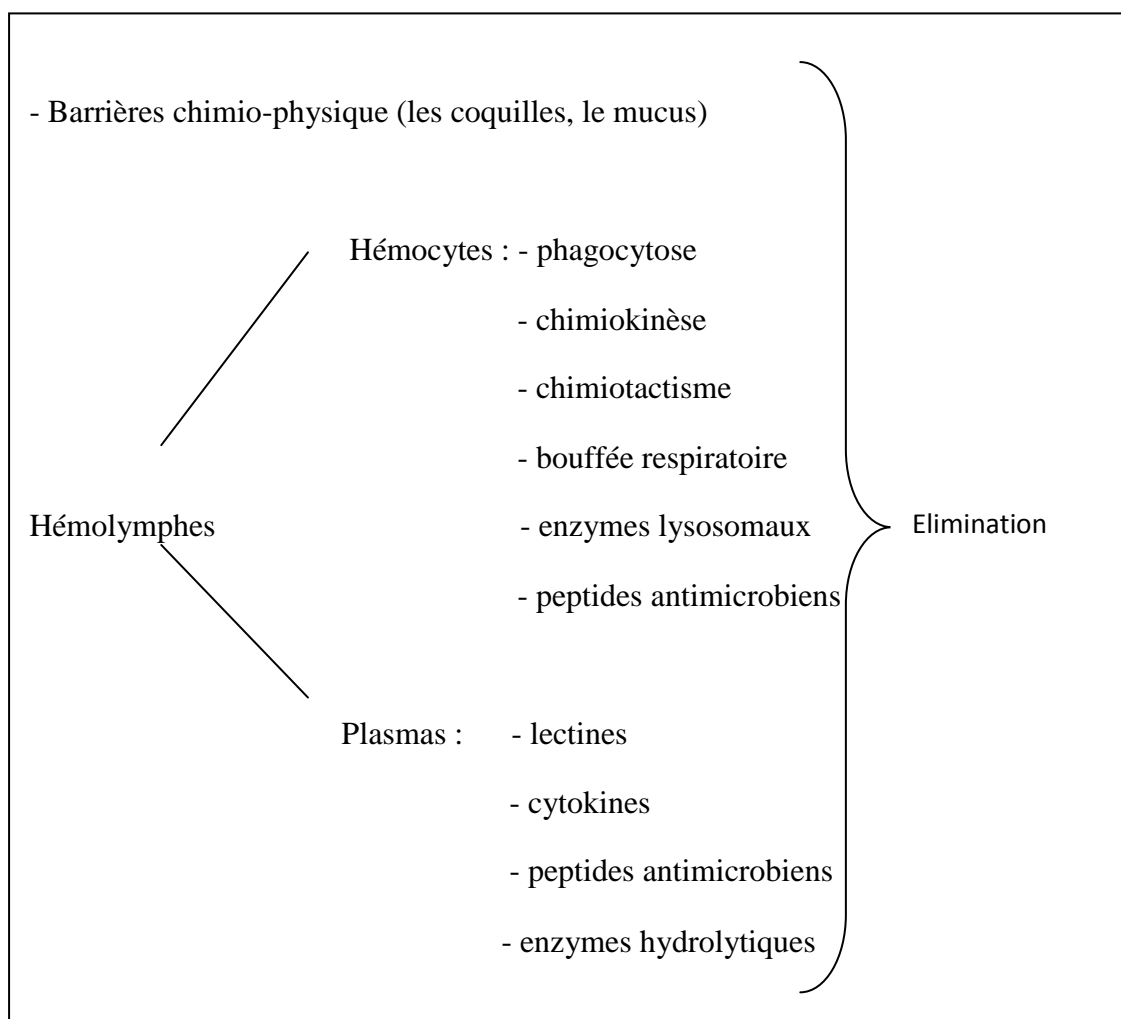


Figure 3 : les système de défense chez les bivalves (Canesi *et al.*, 2002).

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

L'aire de répartition de *Mytilus galloprovincialis* s'étend sur la côte atlantique depuis la baie d'Agadir (Maroc) jusqu'aux îles britanniques et englobe, aussi, l'ensemble du bassin méditerranéen, l'Afrique du Sud, la Nouvelle-Zélande et la Californie (MC Doneld et Koehn, 1991). La moule de Californie est présente de l'Alaska jusqu'au sud de la Californie jusqu'à une profondeur de 24 m (Cahen, 2006) (Fig.4).



Figure 4 : L'aire de répartition de *Mytilus galloprovincialis* (Cahen, 2006).

Etude expérimentale

CHPITRE II :

Matériels

et


Méthodes

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1. Site de prélèvement

Les moules ont été prélevées du port de la wilaya de Mostaganem (latitude 35°55',998 Nord et longitude 0°4',000002 Est). Ce port est situé au centre d'une importante agglomération et se trouve à une quarantaine de kilomètres du port d'Arzew. Il est cadré entre la pointe de Salamandre à l'Ouest et l'embouchure de l'Oued Ain Séfra à l'Est. Le linéaire de quai est long de 2 Km. C'est un milieu semi fermé, en eau peu profonde (2 mètres) (Fig. 5).



Figure 5: position géographique de la côte de Mostaganem représentant le site d'échantillonnage de *Mytilus galloprovincialis* () (Google Maps, 2016).

II.2. Prélèvement des moules *Mytilus galloprovincialis*

Les échantillons de moules sont collectés au mois de Mars 2016 à un profond de 2 mètres. Environ 70 individus de taille moyenne entre 3 et 6 cm (Fig.6) correspondant à des jeunes adultes d'environ 18 à 24 mois (Andral, 2004), période pendant laquelle le

métabolisme est stable (Rno, 2006). En utilisant un couteau stérile pour couper le byssus qui lui sert d'organe d'ancrage sur les rochers.

Les moules prélevées sont lavées à l'eau de mer et débarrassées des byssus et des épizoaires présents sur leurs coquilles, puis transportés dans une glacière étanche et hermétique remplie d'eau de mer. Une fois au laboratoire, elles sont rapidement transférées dans un aquarium (Fig.7). Les moules sont acclimatées au moins une semaine avant de procéder aux expérimentations aux conditions du laboratoire afin de réduire l'effet du stress dû au prélèvement et au transport (1.5 l d'eau de mer/ individu). Le renouvellement tous les quatre jours de l'eau de mer constitue leur unique source de nourriture. Les individus morts sont éliminés chaque jour (Kamel, 2014).



Figure 6: *Mytilus galloprovincialis* prélevées à partir du port de Mostaganem.



Figure 7: Elevage des moules dans l'aquarium pour leur phase d'adaptation.

II.3. Origine des microorganismes

Escherichia coli ATCC 10536, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 utilisées lors de la présente étude proviennent de la collection du laboratoire de microbiologie, département de pharmacie, université de Messine (Italie).

II.4. Choix des milieux de culture et conditions de croissance

La mise en culture des bactéries pathogènes nécessite un milieu liquide « Bouillon cœur cerveau » BHI, utilisé comme milieu d'enrichissement. Pour le dénombrement, il est réalisé sur milieux solides Mueller Hinton (Tableau. 1).

Les souches pathogènes sont des bactéries anaérobies facultatives. Leur incubation se fait à 37°C en aérobose sur milieu solide ou liquide.

Tableau 1 : Origine, milieu de culture et température de croissance des différentes souches utilisées.

Souches	Origine de la souche	Milieu de culture	Température de croissance
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	Laboratoire de microbiologie de l'université de Messine, Italie	BHI (Réf. Cat14000, Laboratoire Conda S.A,Spain)	37°C
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	Laboratoire de microbiologie de l'université de Messine, Italie	BHI (Réf. Cat14000, Laboratoire Conda S.A,Spain)	37°C
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	Laboratoire de microbiologie de l'université de Messine, Italie	BHI (Réf. Cat14000, Laboratoire Conda S.A,Spain)	37°C
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Laboratoire de microbiologie de l'université de Messine, Italie	BHI (Réf. Cat14000, Laboratoire Conda S.A,Spain)	37°C

ATCC: American type culture collection

II.5. Mesure des paramètres biologiques

a) Biométrie

Les bivalves sont triés, nettoyés et débarrassés de leurs épibiontes, avant de prendre les différentes mesures de la coquille réalisée à l'aide d'un pied à coulisse de précision 1/20 mm, cette opération est réalisée rapidement afin d'éviter tout stress, phénomène biologique pouvant être à l'origine d'une baisse de poids de la masse molle totale et par la suite de l'indice de condition comme le montrent [Beninger et al., \(1984\)](#). Ainsi, les paramètres linéaires (en mm) retenus sont ([Fig. 8](#)):

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

b) Indice de condition

Le suivi des variations de l'indice de condition permet d'évaluer l'état de santé des organismes et les fluctuations de leurs réserves énergétiques, qu'il s'agisse d'engraissement ou d'amaigrissement. Il correspond au rapport entre le poids du ceps mou de l'individu et le poids corporel. L'IC des moules a été calculé selon la méthode recommandée par [Afnor. \(1984\)](#):

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

Chaque individu a été pesé à l'aide d'une balance (Réf : D-72336, KERN-KB 6000-1, Allemagne) pour déterminer les paramètres suivants afin de calculer l'IC:

- **Poids total de la coquille sans liquide intra valvaire:** poids de la coquille, masse molle et sans liquide intra valvaire).
- **Poids frais total:** poids de la masse molle humide totale en gramme de l'animal vivant.

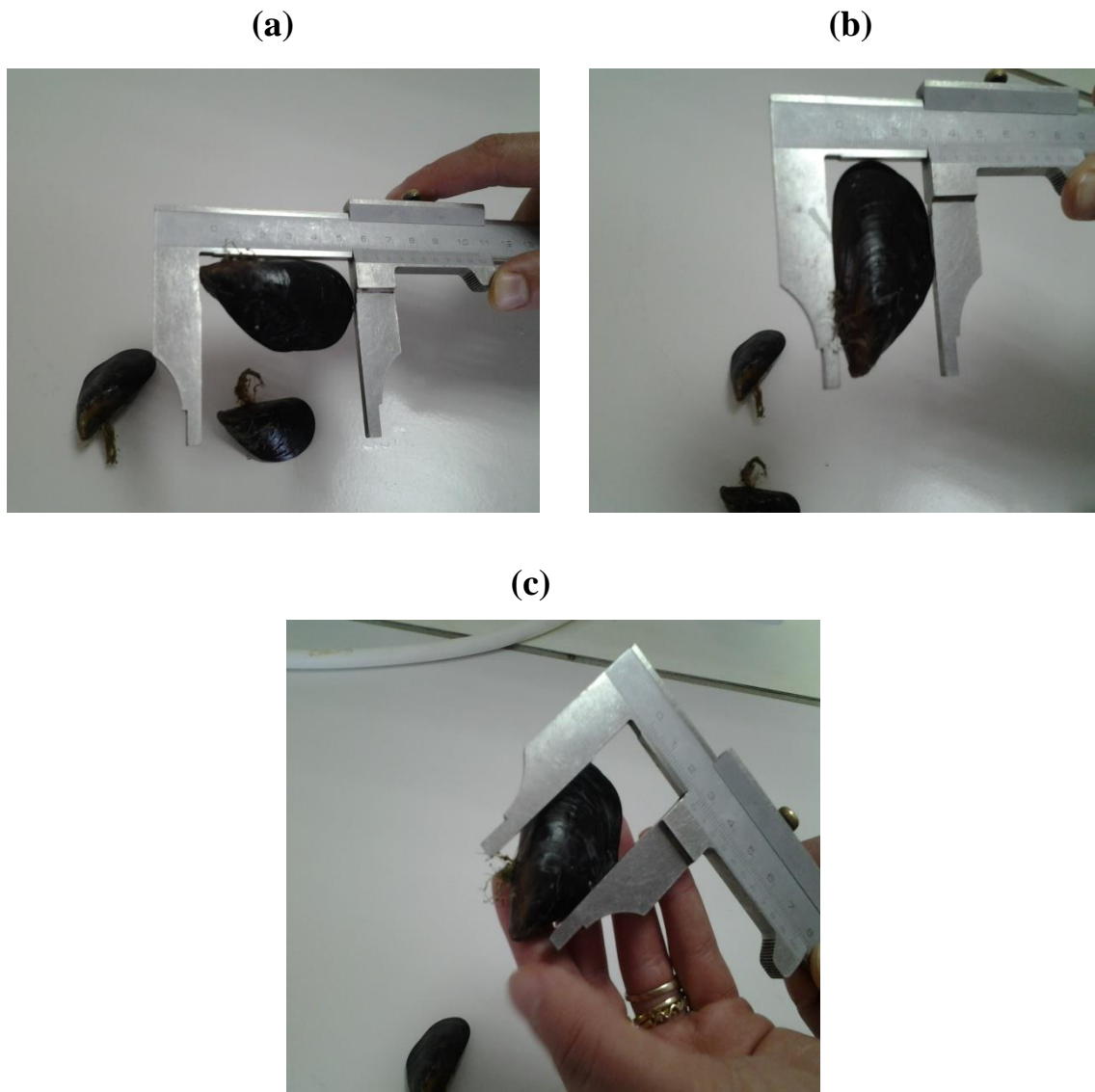


Figure 8: Les différents paramètres linéaires de la moule (a):Longueur, (b): largeur, (c): épaisseur.

II.6. La collection de l' hémolymphe

L' hémolymphe (approximativement 0,5 ml/animal adulte) est prélevé à partir du muscle adducteur postérieur à l'aide d'une seringue en présence de 1 volume de tampon anti-agrégant MAS (Modified Alsevier Solution : 27 mM Na-citrate, 336 mM NaCl, 115 mM glucose, 9 mM EDTA, pH 7.0) (Gonzalez *et al.*, 2007), et centrifugé immédiatement à 800g pendant 15 min à 4°C (Tasiemski *et al.*, 2007). Le surnageant, correspondant à la fraction plasmatique, est additionné d'aprotinine (5µg/ml) et congelé (-80°C) jusqu'à utilisation (Mitta *et al.*, 1999).

II.7. Extraction des fractions peptidiques

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

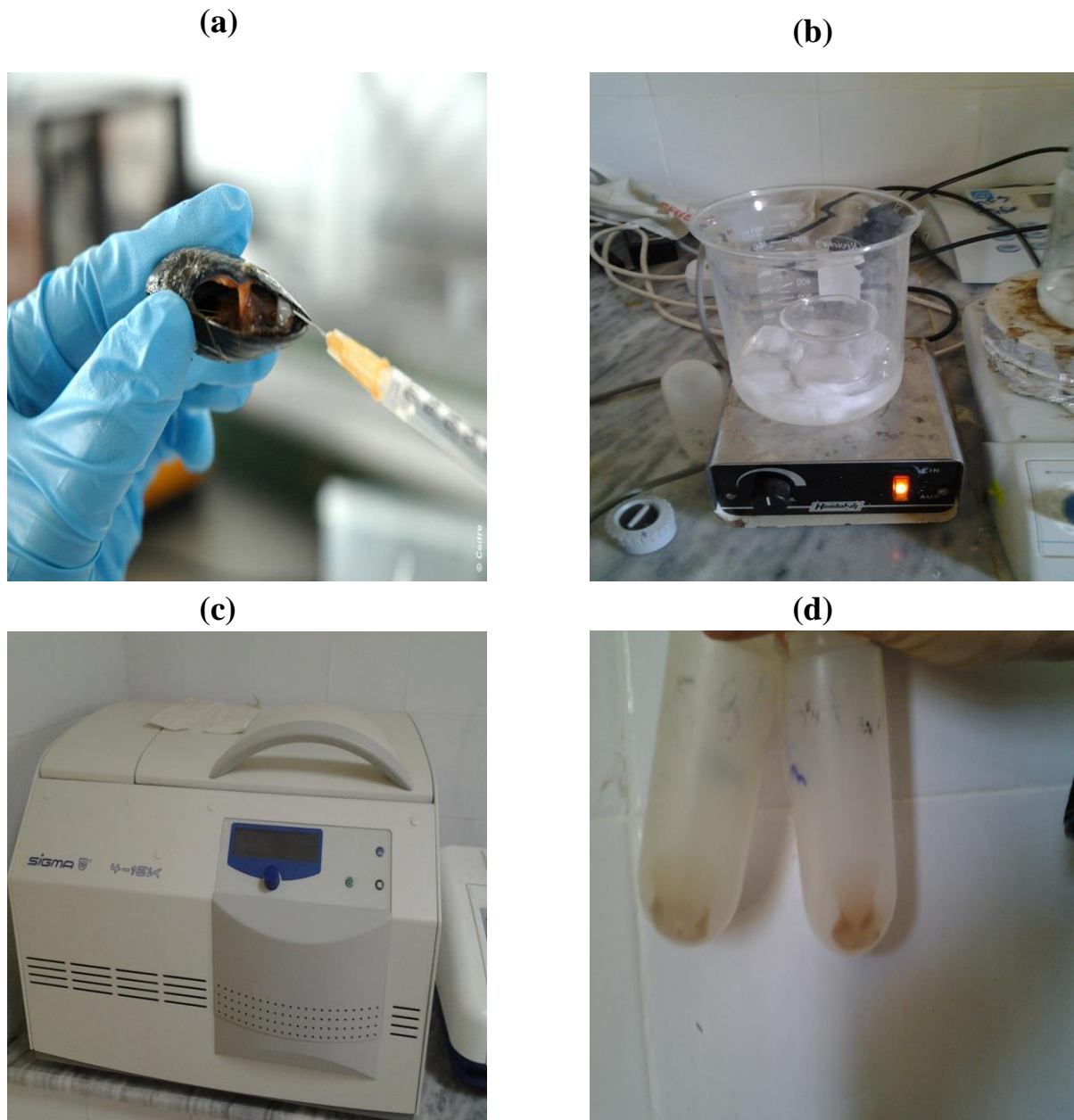


Figure 9: Extraction des fractions peptidiques à partir de l'hémolymphe de la moule (*Mytilus galloprovincialis*), (a) : prélèvement d'hémolymphe, (b) : séparation des peptides sous agitation, (c) : centrifugation, (d) : le culot de centrifugation.

II.8. Détermination de la teneur en protéines (Méthode de Lowry et al., 1951)

a) Principe

La méthode de Lowry permet le dosage des protéines en combinant la réaction au biuret et le réactif Folin-Ciocalteu. Le réactif Folin-Ciocalteu réagit avec les groupements tyrosines et tryptophanes pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à celle de biuret, et qui est proportionnelle à la quantité de protéines de l'échantillon. La grande sensibilité de la méthode de Lowry est sa principale qualité, pouvant atteindre 5 à 10 μg .

b) Mode opératoire

La gamme d'étalonnage s'est effectuée avec une solution d'albumine de sérum bovin (BSA) (Brian-Jaisson, 2014) :

Concentration $\mu\text{g/ml}$	0	20	40	60	80	100
BSA (1mg/ml)	0 μl	10 μl	30 μl	40 μl	50 μl	50 μl
Eau	500 μl	490 μl	480 μl	470 μl	460 μl	450 μl

Dans des tubes, 500 μL d'échantillon ont été mélangés à 700 μL de solution de Lowry et incubés pendant 20 min à l'obscurité à température ambiante. Ensuite, 100 μL de réactif de Folin Ciocalteu ont été ajoutés et après agitation, le mélange est incubé pendant 30 min à l'obscurité à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 750 nm (Brian Jaisson, 2014).

c) Expression des résultats

Un courbe étalon ou standard est tracée en portant sur l'axe des abscisses, les concentrations en BSA des dilutions (gamme étalon) préalablement préparées et sur l'axe des ordonnées, les DO mesurées respectivement pour chaque dilution. La concentration de la protéine inconnue X, est déterminée en portant la valeur de la DO correspondante sur l'axe des ordonnées qui est ensuite projetée sur l'axe des abscisses (Medjour, 2014).

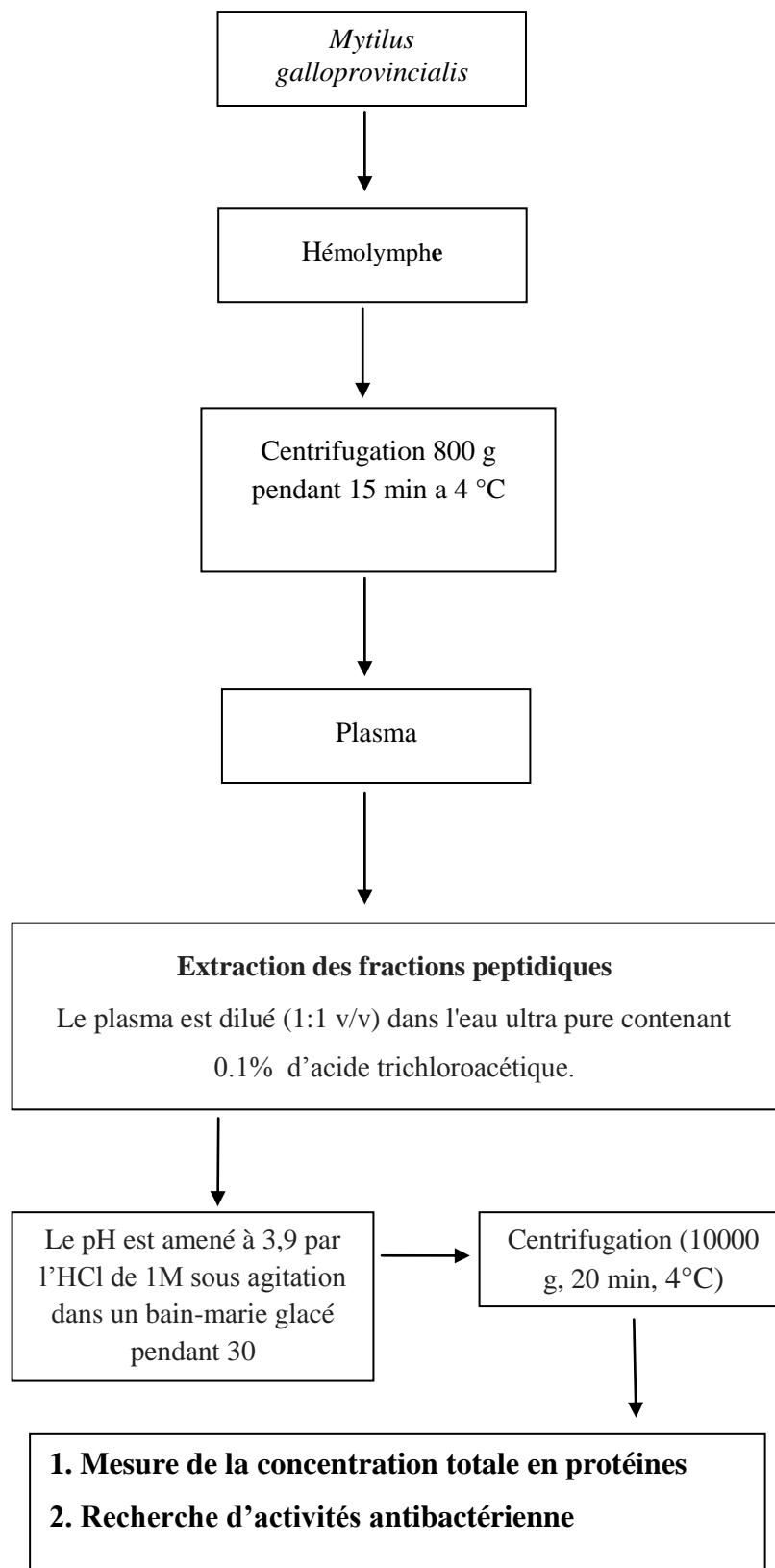


Figure 10 : Protocol expérimental.

II.9. Stimulation de la production des peptides de la moule

Afin d'augmenter la production des peptides de la moule, 100 μ l d'*E. Coli* en suspension de charge de 10^8 UFC/ml préalablement traitée par la chaleur (121 ° C pendant 20 min) sont injectés dans la cavité palléale (Fig.11). Après l'injection, les moules ont été retournés à l'eau de mer, et l'hémolymphe a été prélevé après 2 jours. Les protéines sont ensuite dosées par la méthode de Lowry.



Figure 11: L'injection d'*E. Coli* ATCC 10536 dans la cavité palléale pour stimuler la réponse immunitaire.

II.10. Activité antibactérienne de l'hémolymphe et la fraction peptidique de la moule par méthode de microdilution

Dans cette technique, 100 μ L de chaque suspension bactérienne ont été ajoutés aux puits d'une microplaque de 96 contenant déjà 100 μ L de l'échantillon diluée dans 100 μ L MH liquide d'une façon géométrique de raison de 2. La concentration finale de l'inoculum est 10^6 CFU/mL et la concentration maximale des échantillons testés est de 735 μ g/mL pour l'hémolymphe et 153.125 μ g/mL pour les peptides.

Des puits contenant du milieu de culture seul ou bienensemencé avec la souche testée mais sans l'échantillon ont été utilisés comme témoin. Les microplaques ont été incubées à 37° C. La lecture des résultats est effectuée après 24h d'incubation. La plus faible concentration qui a totalement inhibée le germe étudié est considérée comme la CMI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008).

CHAPITRE III

Résultats

et

Discussion

CHAPITRE III : Résultats et Discussion

III.1. Analyse des paramètres biométriques

a) Biométrie

Les mesures des paramètres biométriques des moules *Mytilus galloprovincialis* provenant de site du port de Mostaganem (Tableau.2) révèle que le facteur age affecte très significativement les trois paramètres biométriques (longueur, hauteur, épaisseur).

Ces résultats ont montré que la longueur (L), la hauteur (H) et l'épaisseur (E) de la coquilles des moules sont significativement élevés chez les moules adulte par rapport à ceux des moules jeune.

Concernant notre travail, la plus grande taille des individus récoltés au niveau du port de Mostaganem est de 6 cm (Fig.12).

Tableau 2: Les paramètres biométriques des lots d'individus échantillonnés des moules *Mytilus galloprovincialis*, provenant du port de Mostaganem.

	variance
L	4.37±0.81
H	2.4±0.5
E	1.63±0.49

L: longueur de la coquille (cm); H: hauteur ou largeur de la coquille (cm) ; E : épaisseur (cm).

b) Indice de condition

L'indice de condition (IC) reflète les conditions physiologiques des organismes vivants. Les résultats de l'indice de condition des moules *Mytilus galloprovincialis*, provenant du port de Mostaganem est de l'ordre de 29.33±0.063 (Tableau.3). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Rouane-Hacene. (2013).

Tableau 3: Indice de Condition des lots d'individus échantillonnés des moules *Mytilus galloprovincialis*

Paramètres biométriques	Avril (port de Mostaganem)
Poids frais	2.2g
Poids total sans l'eau palléale	7.5g
Indice de condition	29.33

Selon Rouane-Hacene. (2013) les valeurs de l'IC des moules *Mytilus galloprovincialis*, se présentent comme suivant :

- Site 1: Le port d'Oran (35°42'31.07''N, 0° 38'26.76''W) qui est un grand port mixte (commerce, pêche et plaisance), est également caractérisé par la présence des deux plus grands émissaires d'eaux usées de la ville, avec IC de l'ordre de 33.88±0.55.
- Site 2: Hadjaj (36°06'09.59''N, 0° 19'11.48''E), qui est considéré comme station de référence, est éloigné de toute activité anthropique (industries, activités urbaines) avec IC de l'ordre de 31.01±0.61.
- Site 3: Ain Defla (S2: 35°49'03.66''N, 0°28'55.89''W), se situe au voisinage d'un petit port de pêche et reçoit les rejets domestiques du village) avec de 'ordre de 28.29±0.48.

La difference entre les conditions du milieu est à l'origine de cette variabilité entre les indices de condition. La temperature, l'oxygène et le statut trophique ont un grand impact sur l'indice de condition.

Les fluctuations du poids sec total chez un individu peuvent être dues à plusieurs facteurs comme la croissance de la chair et de la coquille, la formation et l'émission des gamètes, l'utilisation des réserves pendant certaines périodes du cycle biologique ou la disponibilité de la nourriture dans le milieu (Benzaoui, 2010). Les fluctuations du poids de la chair fraîche dépendent essentiellement du degré de maturité des organes génitaux (Naciri, 1998). Selon Abada-Boudjema et Mouëza (1981), il semble que la variation des indices de condition d'une région à une autre est liée aux conditions nutritionnelles et environnementales.

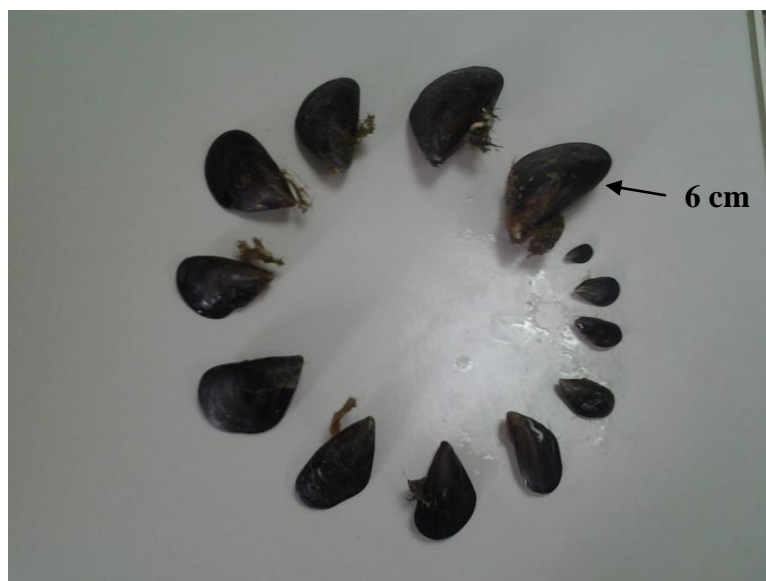


Figure 12: *Mytilus galloprovincialis* à différents âges prélevées à partir du port de Mostaganem.

III.2. Détermination de la teneur en protéines

III.2.1. Courbe d'étalonnage

La courbe est établie en utilisant l'albumine sérique bovine comme référence et les résultats sont exprimés en mg/L. L'équation de la courbe (figure 13) est $y = 0.0092x$ et un coefficient de corrélation de l'ordre de $R^2 = 0.9912$.

III.2.2. Dosage des protéines

La teneur en protéines dans l'hémolymphe et la fraction peptidique des deux types de moules (non infectées et infectées avec *E. coli* traitée avec la chaleur (120°C pendant 20 min)) a été dosée selon la méthode de Lowry *et al.*, (1951). Les protéines réagissent avec le réactif de Folin-Ciocalteu (un mélange de tungstate et de molybdate de sodium en solution dans l'acide phosphorique et l'acide chlorhydrique) pour donner des complexes colorés. La couleur ainsi formée est due à la réaction du phosphomolybdate par la tyrosine et le tryptophane.

L'intensité de la coloration dépend donc de la quantité d'acides aminés aromatiques présents dans l'échantillon. La densité optique a été mesurée à 750 nm. Cette méthode permet de doser des concentrations de protéine qui varient de 5 à 100 $\mu\text{g.ml/1}$ (Pelmont, 1995).

La figure 14 montre une augmentation de la concentration des protéines après injection d'*E. Coli*. La concentration des protéines atteint une valeur maximale de l'ordre de $1304 \pm 21.84 \mu\text{g/ml}$ dans l'hémolymphe des moules témoin. Dans les moules déjà infectées par *E. coli*, on remarque une amélioration dans le taux des protéines équivalente à 12.73%. En ce qui concerne la fraction peptidique, le taux des protéines a augmenté de 33.72% dans les moules infectées par rapport au témoin.

L'hémolymphe en générale contient plusieurs substances protéiques parmi les quelle on trouve les enzymes comme la lectine, les enzymes hydrolytiques, les enzymes lysosomaux. Le poids moléculaire de ces enzymes est élevé, elles sédimentent après centrifugation à $800\times G$ pendant 15 minutes à 4°C , et les protéines de faible poids moléculaire reste dans le surnageant qui est ensuite récupéré tels que les peptides antimicrobiennes.

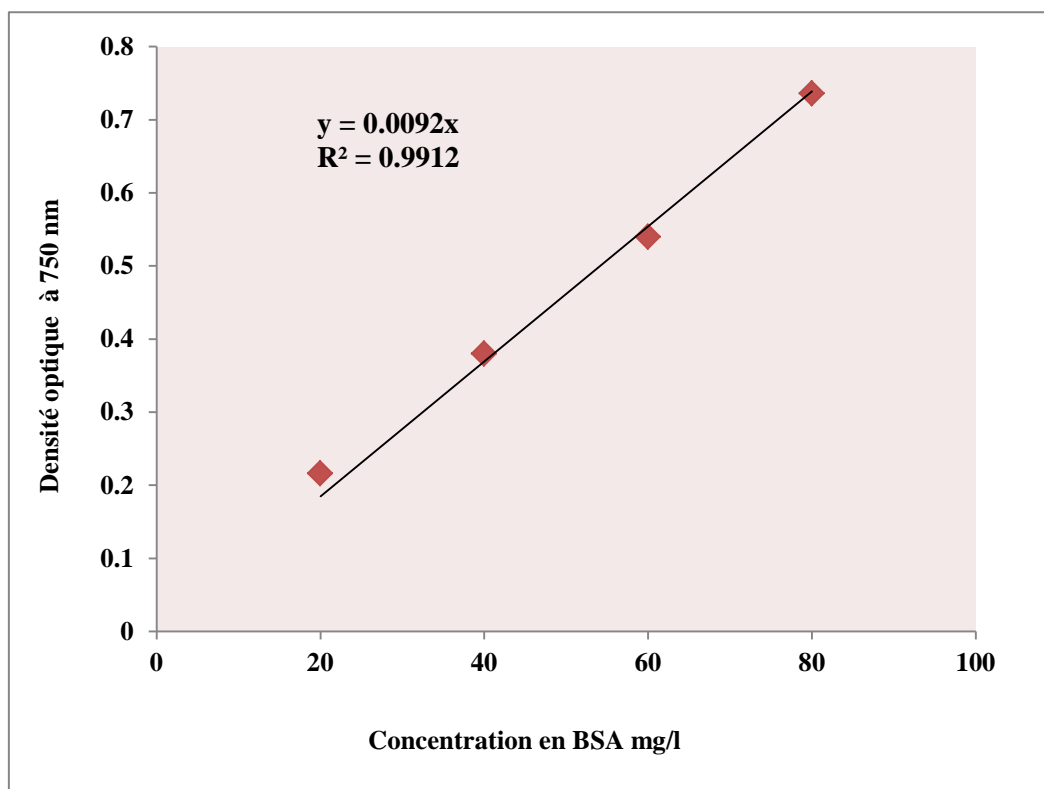


Figure 13: Courbe d'étalonnage de l'albumine sérique bovine (BSA).

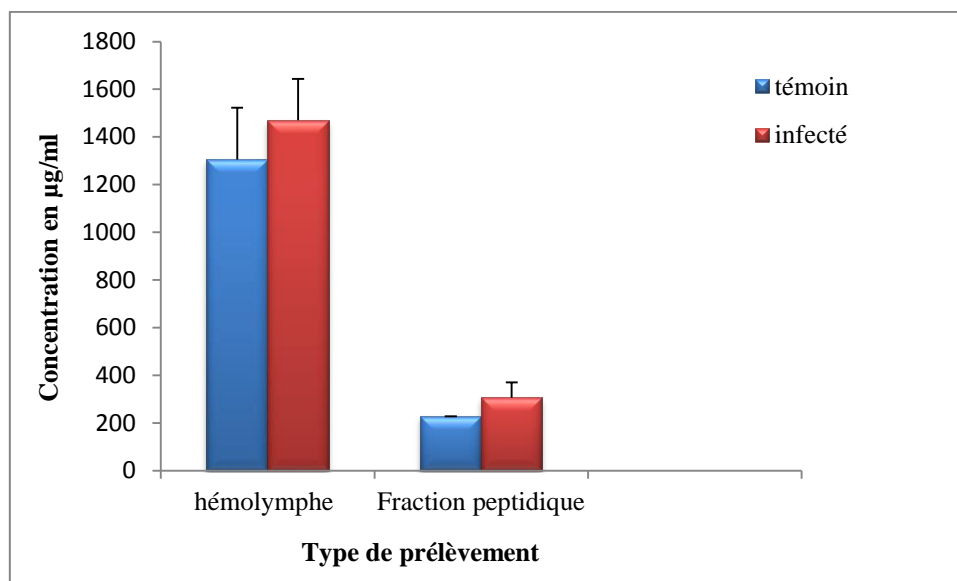


Figure 14: Teneur en protéines dans l'hémolymph et dans la fraction peptidique dans les moules non infectées (■) et les moules infectées par *E. Coli* ATCC10536 (■).

Selon Fournier et al, (2002), La contamination des aquariums ne semble pas avoir d'effet notable sur les niveaux de protéines. En effet, les concentrations moyennes de protéines des bivalves des aquariums contaminés ne différaient pas significativement de celles des bivalves des aquariums témoins (Fournier et al., 2002). Dans notre travail, les moules ont été directement contaminées par la souche *E. coli*, ce qui explique cette différence dans les résultats.

Au cours de l'expérience de Robledo et al., (1995), la concentration de protéine variait de 0,620 à 1,962 mg/ml dans des échantillons de profondeur de 2 m et 0,770 à 2,830 mg/ml à partir des échantillons de profondeur de 5 m. Ces résultats sont inférieurs à ceux enregistrés dans notre travail qui est de l'ordre de 1.3 mg/ml.

Santarem et al., (1992) ont rapporté que les protéines de hémolymph étaient liées à la réponse humorale et cellulaire et variaient selon la saison et l'environnement. Ces résultats suggèrent une forte dépendance des concentrations de composants de l'hémolymph sur la température, la salinité, la disponibilité des aliments et la pollution.

III.3. Pouvoir antibactérien d'hémolymphe et des fractions peptidiques de la moule *Mytilus galloprovincialis*

Durant ces deux dernières décennies, de plus en plus de cas de multirésistances bactériennes aux antibiotiques classiques ont été recensées. Au niveau de tous les microorganismes, ces multirésistances sont liées à plusieurs facteurs tels que l'utilisation abusive des antibiotiques en agriculture et élevage, l'utilisation inappropriée des antibiotiques en clinique et de manière plus spécifique, des modifications du microorganisme lui-même. Devant cette situation alarmante, il est urgent de trouver de nouveaux traitements contre lesquels les bactéries n'ont pas encore développé de résistance (Atindehou, 2012 ; Mokhtar, 2015).

Nous avons étudié in vitro le pouvoir antimicrobien de l'hémolymphe et des peptides de la moule vis-à-vis de 4 germes pathogènes dont 2 bactéries Gram - : *Escherichia coli* ATCC 10536 et *Salmonella* ATCC 13311 et 2 bactéries Gram + : *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 et *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, par la méthode de microdilution. Les résultats sont présentés dans le [tableau 4](#).

Tableau 4: Spectres d'activité de l'hémolymphe et la fraction peptidique obtenue. L'activité est exprimée en CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

Les souches	CMI ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	Hémolymphe	Fraction peptidique
<i>s. aureus</i>	0,7177	2.392
<i>L. monocytogenes</i>	2,871	1.1962
<i>S. typhimurium</i>	11,48	0,1495
<i>E. Coli</i>	-	-

- : Pas d'inhibition

Selon les résultats l'hémolymphe possède un pouvoir antimicrobien plus important par rapport aux peptides. Il s'est avéré que la souche *S. aureus* est la souche la plus sensible à l'action de l'hémolymphe avec une concentration minimal inhibitrice de 0.7177 µg/ml, suivie de *L. monocytogenes* avec une CMI de l'ordre de 2.8708 µg/ml, et *Sal. typhimurium* avec une CMI de 11,48 µg/ml.

En ce qui concerne les résultats de la fraction peptidique, le comportement des souches était différent. La souche *Sal. typhimurium* était la souche la plus sensible avec une CMI de seulement 0,1495 µg/ml, suivie de *L. monocytogenes* (1.1962 µg/ml) et *s. aureus* (2.392µg/ml). La souche *E.coli* était résistante à l'action des deux échantillons testés.

Bien que les mécanismes d'action des peptides antimicrobiens soient controversés, il existe un certain consensus sur le fait que les peptides perturbent de façon sélective les membranes cellulaires et que leur structure amphiphile jouerait un rôle important dans ce mécanisme. En effet, la charge externe des phospholipides de la membrane cellulaire et la distribution de charge des peptides semblent rentrer en jeu dans les interactions entre les peptides et les membranes biologiques (Bowman et al., 1994; Oren et Shai, 1998; Cudic et Otvos, 2002).

La plupart des peptides antimicrobiens, malgré une grande diversité de spectre d'activité, semblent agir sur la membrane cytoplasmique des micro-organismes. Cette action directe sur la membrane entraîne la mort de la cellule par des phénomènes osmotiques rapides. Certains, cependant, agissent par inhibition de mécanismes intracytoplasmiques tels que la synthèse d'ADN, la synthèse de protéines, des activités enzymatiques, ou encore par des perturbations dans la formation des composants de la paroi (Jenssen et al., 2006).

Leur spécificité d'action repose sur la bicouche lipidique des membranes biologiques. Les phospholipides qui la composent présentent un caractère amphiphile, avec des têtes hydrophiles orientées vers l'extérieur et des chaînes alkyles hydrophobes formant l'intérieur de cette bicouche. Les peptides antimicrobiens habituellement cationiques interagissent avec la charge anionique des lipides exposés à la surface des membranes (Tytler et al., 1995; Toke, 2005).

Si les phospholipides, les lipopolysaccharides et les acides lipotéichoïques chargés négativement peuvent être considérés comme des sites d'interactions électrostatiques privilégiés, des interactions autres, de type ligand-récepteur, ont aussi été envisagées pour

expliquer la spécificité de reconnaissance des peptides antimicrobiens comme la nisine (Erand & Vogel, 1999).

Cependant, chaque peptide antimicrobien possède un mode d'action qui lui est propre et dépendant de ses caractéristiques intrinsèques (charge, pI, hydrophobicité,...) mais il existe cependant des points communs permettant de mettre en avant certaines généralités. Le mode d'action des peptides antimicrobiens peut ainsi se diviser selon 3 étapes comprenant la fixation initiale (dépendante de la concentration du peptide et de sa capacité à s'autostructurer), l'intégration dans la membrane (dépendante de la conformation et de la capacité d'autoassemblage des peptides) puis l'aboutissement à la mort cellulaire (par un phénomène de perméabilisation membranaire) (Daffre et al., 2008). Ainsi 4 modes d'actions sont proposés (Jenssen et al., 2006).

- Mode d'action en tapis « Carpet-like model » Ce modèle repose sur une orientation des peptides strictement parallèles vis-à-vis de la membrane;
- Mode d'action des pores en douve de tonneau « Barrel stave model » : Ce modèle d'action « barrel stave » décrit la formation de pores transmembranaires par des peptides organisés en hélices α amphipathiques;
- Mode d'action par formation de pores toroïdaux « Wormhole model » Ce mécanisme est proche du modèle des pores en douve de tonneaux, mais cette fois les lipides font partie intégrante du pore;
- Mode d'action par formation d'agrégats « aggregate channel model » Dans ce mécanisme, les peptides se regroupent sans orientation particulière afin de former des agrégats de types micellaires associés aux phospholipides.

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

Chez la moule méditerranéenne *M. galloprovincialis*, plusieurs isoformes de défensines et de mytilines ont été caractérisées et révèlent des activités antimicrobiennes différentes et parfois complémentaires. Cette diversité des peptides antimicrobiens exprimés chez la moule pourrait contribuer à élargir le spectre d'activité vis-à-vis des microorganismes pathogènes au cours de la réponse immunitaire (Mitta et al., 1999).

La localisation et la régulation de l'expression des peptides antimicrobiens ont été étudiées en détail chez la moule *M. galloprovincialis*. Ces travaux ont permis de mettre en évidence des similitudes entre la réaction anti-infectieuse modulée par les peptides antimicrobiens chez ce mollusque et les mammifères. Les peptides antimicrobiens de moule participent à la réponse immunitaire à deux niveaux : locale et systémique (Mitta et al., 1999a; Mitta et al., 2000).

Une vue d'ensemble sur les peptides antimicrobiens caractérisés chez les invertébrés marins a été proposée en 2004 (Tincu & Taylor, 2004). Ces peptides sont les composants majeurs du système de défense des invertébrés marins et semblent très répandus chez ces animaux notamment au niveau des systèmes digestifs et respiratoires. Compte tenu de l'étendue et de la diversité des espèces marines, peu de peptides antimicrobiens sont connus et la majorité des peptides antimicrobiens d'origine marine ont été identifiés chez des espèces appartenant aux urocordés, aux arthropodes ou aux mollusques.

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

Conclusion

Conclusion

Au cours des dernières décennies, la découverte chez les mollusques des substances endogènes présentant des propriétés antibactériennes donne des perspectives nouvelles. Ces substances synthétisées par l'organisme lui-même, définies dans son code génétique, protègent en permanence cet organisme des multiples agressions bactériennes dont il est la cible, et participent au maintien permanent de son intégrité. Leur large spectre d'activité et leur rapidité d'action présentent un intérêt majeur, pour cela nous nous proposons, Caractérisation, identification de leurs structures et de leur mode d'action afin de production de nouvelles classes d'antibiotiques originaux, utilisables en thérapeutique.

Cette découverte, en orientant de nombreux chercheurs vers l'étude de cette « immunité innée » fondamentale, longtemps méconnue, a permis une meilleure compréhension des mécanismes de défense, mais a aussi ouvert la voie d'un très large domaine de recherche et d'applications

L'ensemble des essais réalisés au cours de ce travail permet de conclure que l'hémolymphe et le plasma de la moule (*Mytilus galloprovincialis*) contient des substances antimicrobiennes présente un grand intérêt dans une vaste gamme d'applications industrielles. Parmi ces substances, les peptides sont prédominants. Les peptides antimicrobiens sont ubiquitaires dans la nature et produits par tous les organismes pluricellulaires. Ils constituent, par ailleurs, des éléments clés du système immunitaire. Notre étude a porté sur l'évaluation de son pouvoir antimicrobien vis-à-vis des bactéries Gram – et Gram+.

Les deux principaux objectifs poursuivis dans ce travail ont été atteints: Le premier objectif était de mettre au point le dosage des protéines d'hémolymphe et de la fraction peptidique de la moule par méthode de Lowry.

Tout d'abord, nous avons démontré que la teneur en protéines augmente avec leur contamination par *E. Coli* ATCC 10536 dans l'hémolymphe ($1470 \pm 173.24 \mu\text{g/ml}$) et dans la fraction peptidique ($306.245 \pm 64.03 \mu\text{g/ml}$).

Le deuxième objectif reposait sur détermination de leur pouvoir antimicrobien contre 4 souches pathogènes (Gram- et Gram+) par méthode de microdilution. Selon les résultats, l'hémolymphe possède une activité antibactérienne plus importante que la fraction peptidique.

Au cours de ce travail, nous avons révélé que les mollusques marins principalement *Mytilus galloprovincialis* représentent d'une part, une source potentiellement importante de nouveaux composés antimicrobiens pouvant servir de support pour la découverte de molécules bioactives antibactériennes et/ou antivirales, et ainsi contribuer au développement de nouvelles stratégies pour des actions préventives chez différentes espèces aquacoles. D'autre part, face à l'augmentation avérée de la résistance bactérienne aux antibiotiques, l'exploration de nouvelles ressources naturelles pourrait servir de support pour l'identification voire la conception de nouvelles molécules thérapeutiques à large spectre d'activité et sans effets secondaires. La nécessité de trouver de nouveaux agents anti-infectieux est un des enjeux majeurs de la recherche et de l'industrie pharmaceutiques.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

-A-

Abada-Boudjema, Y., M. Mouëza. (1981). Structure des populations d'une moulière naturelle en baie d'Alger., *Acta Oecol. Oecol. Gener* (2) :183-194.

Afnor. (1984). Recommandations aux Auteurs des Articles Scientifiques et Techniques pour la Rédaction de Résumés. Norme AFNOR NF Z 44 - 004. Paris, France: Association Française de Normalisation.

Allam, B. & Paillard, C. (1998). Defense factors in clam extrapallialfluids., *Dis. Aqua. Org* (33) :123-129.

Andral, B., Stanisiere, J.Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F. & Boissery, P. (2004). Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of musselcaging., *Marine Pollution Bulletin* 49(9- 10):704-712.

Aquascope. (2000). Tjarno Marine Biological Laboratory, Stromstad, Sweden.

Atindehou, M. (2012).Caractérisation structurale et biologique de nouveaux agents antibactériens naturels actifs dans les infection intestinales : des peptides de la chromogranine A et des principes actifs de chromolaena odorata, Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie, université de Strasbourg: 417.

-B-

Bachelot, M. (2010). Contamination de moules (*Mytilus sp.*) en milieu marin par des substances pharmaceutiques et produits de soin. Thèse d'Université Montpellier 1.

Barefoot, S.F. & Klaenhammer, T.R. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*., *Appl Environ Microbiol* (45):1808–1815.

Brhoumi, B. (2014). Biosurveillance de la pollution de la lagune de Bizerte (Tunisie) par l'analyse compare des niveaux de contamination et de l'écotoxicité des sédiments et du biote. Ecologie, environnement. Université de Bordeaux. Français: 350.

Barros, L., Baptista, P. & Ferreira, I. (2006). Influence of the culture medium and pH on the growth of saprobic and ectomycorrhizal mushroom mycelia., *minerva biotecnologica* 18(4):165-170.

Bayne, B.L., Bayne, C.J., Carefoot, T.C. & Thompson, R.J. (1976). The physiological ecology of *Mytilus californianus* Conrad - 1. Metabolism and energy balance., *Oecologia* (22) : 211–228.

Beaumont, A. & Cassier, P. (2004). *Biologie Animale, Des Protozoaires aux Métazoaires épithélienneurs*, Tome I, Dunod, 1998, Paris : 459.

Beninger, P.G. & lucas, A. (1984). Seasonal variations in condition reproductive activity, and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *tapes decussates* L. Jeffreys, 1863) and *T. philippinarum* (Adams et Reeve. 1850). *J. expl mar. Boil. Ecol* (79): 19-37.

Benzaoui, M. (2010). Mesure du stress sur la moule *mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) de labaied Kristel (est oranais).Biologie et pollution marines, Université d'oran es-sénia. Pp : 101.

Bouchard, P. & Bouchard, N. (2004), La sexualisation précoce des filles peut accroître leur vulnérabilité, *Sisyph* : 6.

Bowman, J.R., Willett, S.D. & Cook, S.J. (1994). Oxygen isotopic transport and exchange during fluid flow: One-dimensional models and applications. *American Journal of Science* (294) : 1–55.

Brian-Jaisson F., Ortalo-Magné, A., Guentas-Dombrowsky, L., Armougom, F., Blache, Y. & Molmeret, M. (2014). Identification of bacterial strains isolated from the mediterranean sea exhibiting different abilities of biofilm formation., *Microb Ecol* (68):94–110.

Broadasky, T. F., Lewis, C. & Eble, T.E. (1976). Bioautographic thin layer chromatographic analysis of antibiotics and their metabolites in the whole animal. I Clindamycin in the rat., *J. Chromatogr* (123): 33-44.

Brodsky, A. E. (1976). Post-laminectomy and post-fusion stenosis of the lumbar spine., *Clin Orthop* (115): 130-9.

Bulet, P., Cociancich, S., Dimarcq, J. L., Lambers, J., Reichhart, J. M., Hoffmann, D., Hetru, C. & Hoffmann, J. A. (1991) Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family., *J. biol. Chem* (266) : 24520-24525.

-C-

Cahen, D. (2006). Dossier didactique, moule natures, Muséum des Sciences naturelles.

Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M. & Pruzzo, C. (2002). Bacteria–hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves., *Microscopy research and technique* (57) : 469-476.

Charlet, M., Chernysh, S., Philippe, H., Hétru, C., Hoffmann, J. & Bulet, P. (1996). Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*., *J. Biol. Chem* (271) : 21808-21813.

Cheng, T.C. (1996). Hemocytes : forms and functions. Maryland sea grant college, pp : 299-329.

Chu, F. L. E. (2000). Defense Mechanisms of Marine Bivalves., *Mar. Biotech*, pp : 1-42.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008).

Cudic, M. & Otvos, Jr. L. (2002). Intracellular targets of antibacterial peptides. *Curr. Drug Targets* (3): 101–106.

-D-

Daffre, S., Bulet, P., Spisni, A., ehret-sabatier, L., Rodrigues, E.G. & Travassos, L.R. (2008). Bioactive natural peptides. In: ATTA-UR-RAHMAN (Ed), *Studies in Natural Product Chemistry*, Chapter 13. Elsevier (35) : 597-691.

-E-

Epand, R.M. & Vogel, H. J. (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action., *Biochim Biophys Acta* (1462): 11–28.

-F-

Fisher, C. D. (1986). Organizational Socialization: An Integrative View., *Research in Personnel and Human Resources Management* (4): 101-145.

Fisher, W. S. (1988). Environmental influence on bivalve hemocyte function. In: Fisher, W.S. (Ed.), *Disease processes in marine bivalve molluscs*. Am. Fish. Soc. Special Publication, pp, 225-237.

Fournier, P. E., Fujita, H., Takada, N. & Raoult, D. (2002). Genetic identification of rickettsiae isolated from ticks in Japan. *J Clin Microbiol* 40, 2176–2181.

-G-

Gagniaire, B. (2005). Etude des effets de polluants sur les paramètres hématologiques de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*-interaction entre environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses. Thèse de doctorat option : Océanologie Biologique et Environnement Marin, pp : 377.

Gosling, E. (1992). Systematics and geographic distribution of *Mytilus*. In: The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* Ed Amsterdam, Elsevier, Amsterdam (25) : 1-20.

Gonzalez, J. J. A., Hernandez, J. R. O., Ibarra, O. O., Gomez, J. J. U. & Fuentes, V.O. (2007). Poultry by-product meal as a feed supplement in mid-lactation dairy cows., *J. Anim. Vet. Adv* (6): 139-141.

Grassé, P. P., & Doumenc, D. (1998). Zoologie Invertébrés. Masson, Paris : 296.

-H-

Hubert, F., Noel, T., & Roch, P. (1996). A member of the arthropod defensin family from edible mediterranean mussels., *Eur. J. Biochem* (240) : 302–306.

Hwanhlem, N., Buradaleng, S., Wattanachant, S., Benjakul, S., Tani, A., Maneerat S. (2011). Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains., *Food Control* (22): 401-407.

-J-

Jensen, M. A., Coetzer, M., van 't Wout, A. B., Morris, L. & Mullins, J. I. (2006). A reliable phenotype predictor for human immunodeficiency virus type 1 subtype C based on envelope V3 sequences. *Journal of virology* (80):4698-704.

Jurd, R. D. (2000). Instant notes in animal biology. *Scientific Publisher*.

-K-

Kamel, B. (2014). Laboratory of Natural Products Chemistry and Biomolecules (LNPCB), Department of Industrial Chemistry, Faculty of Technology University of Saad Dahlab at Blida., *P.O. Box 270, 09000 Blida, Algeria*.

Khelil, F. Z. (2007). Evaluation de la contamination de l'eau de mer et d'un mollusque la moule, *Mytilus galloprovincialis* (Lmck, 1819) Pêché du port d'Oran. Magister en Sciences de l'Environnement, Université d'Oran, Al, pp : 182.

-L-

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent., *Journal of Biological Chemistry* 193(1) : 267-275.

Lubet, P. (1959). Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les mytilidés et les pectinidés. *Rev., Trav. Inst. Pêches Marit* 23(4) : 548.

Lubet, P. (1973). Exposé synoptique des données biologiques sur la moule *Mytilus galloprovincialis* (LmK., 1819)., *Synop.F.A.O. Pêche* 88.

Lubet, P. & Aloui, N. (1987). Limites létales thermiques et action de la température sur la gamétogénèse et l'activité neurosécrétoire chez la moule (*Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis*, Mollusques bivalves., *Haliotis* (16) : 309-316.

Lubet, P. & Delongcamp, D. (1969). Etude des variations annuelles des constituants Lipidiques chez *Mytilus Edulis* L. à Luc sur Mer., *C.r. Soc. Biol* (163) : 1110-1112.

-M-

Martin, M. C., Zwingelstein, G. & Jouanneteau, J. (1970). Composition des lipides de différents tissus de *Mytilus galloprovincialis*., *Ann. Inst. Michel Pacha* (2): 27-35.

McDoneld, J. H., Seed, R. & Koehn, R. K. (1991). Allozymes and morphometric characters of three species of *Mytilus* in the Northern and Southern Hemispheres., *Mar. Biol* (111): 323-333.

Medjour, A. (2014) .Etude comparative des caractéristiques physico-chimiques du lait collecté à partir de chamelles (*Camelus dromedarius*) conduites selon deux systèmes d'élevage (extensif et semi-intensif), thèse Magister en Biologie , université Mohammed Khider , Biskra : 16.

Mitta, G., Hubert, F., Noel, T. & Roch, P. (1999a). Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*., *Eur. J. Biochem* (265) : 71–78.

Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzet, M. & Roch, Ph. (2000). Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defenc., *J. Biol. Chem* (275) :12954-12962.

Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F. & Roch, Ph. (1999b) : Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into plasma after bacterial challenge. *J. Cell Sci* (112) : 4233- 4242.

Mitta G., Vandenbulcke F. & Roch Ph. (2000c) : Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity., *FEBS Letters* (486) : 185-190.

-N-

Naciri, M. (1998). Dynamique d'une population de moules, *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.), vivant sur la côte atlantique marocaine., *Bull. Inst. Sci., Rabat* (21) : 43-50.

Nakamura, T., Furunaka, H., Miyata, T., Tokunaga, F., Muta, T. & Iwanaga, S. (1988). Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). Isolation and chemical structure. *J. Biol. Chem* (263): 16709-16713.

Narbonne, J.F., Aarab, N., Clérandeau, C., Daubéze, M., Narbonne, J., Champeau, O. & Garrigues, P. (2005). Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in Mediterranean coasts and temporal trends., *Biomarkers* (10) : 58-71.

-O-

Oren, Z. & Shai, Y. (1998). Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* (47) : 451–463.

-P-

Pagliassotti, M. J., Davis, S. N. & Cherrington, A. D. (1994). The role of the liver in maintaining glucose homeostasis : Austin R.G. Landes Company.

Pelmont, J. (1995). Enzymes catalyseurs du monde vivant. Press universitaire de Grenoble.

-R-

RNO. (2006). Surveillance du milieu marin. Travaux du réseau national d'observation de la qualité du milieu marin. Rapport DEL/PC, RA708, Ifremer : 76.

Roch, P., Yang, Y., Toubiana, M. & Aumelas, A. (2008). NMR structure of mussel mytilin, and antiviralantibacterial activities of derived synthetic peptides., *Dev. Comp. Immunol* (32): 227-238,

Rouane-Hacene, O., Boutiba, Z. & Risso, C. (2013). Approche multibiomarqueurs appliquée à la biosurveillance marine. Suivi des indices biologiques et de la bioaccumulation métallique chez la moule et l'oursin. Maison d'édition : Presses Académiques Francophones: 364.

-S-

Seo, S., Richardson, G. A., & Kroll, K. L. (2005). The SWI/SNF chromatin remodeling protein Brg1 is required for vertebrate neurogenesis and mediates transactivation of Ngn and NeuroD. *Development* 132: 105–115.

Shai, Y. (2002). Mode of action of membrane active antimicrobial peptides., *Biopolymers* (66): 236–248.

Songy, P. & Avezard, J. (1963). Documents pour l'étude des invertébrés (non Arthropodes). Cours de sciences naturelles. Classique Hachette, p : 84.

-T-

Tasiemski, A., Schikorski, D., Le Marrec-Croq, F., Pontoire-Van Camp, C., Boidin-Wichlacz, C. & Sautière P. E. (2007). Hedistin: A novel antimicrobial peptide containing bromotryptophan constitutively expressed in the NK cells-like of the marine annelid, *Nereis diversicolor*., *Dev. & Comp. Immunol* (31): 749–762.

Toke, O. (2005). Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers* (80):717–735.

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

Tytler, E. M., Anantharamaiah, G .M., Walker, D. E., Mishra, V. K., Palgunachari, M .N. & Segrest, J. P. (1995). *Molecular basis for prokaryotic specificity of magainin-induced lysis. Biochemistry* (34):4393–4401.

Tincu, J. A. & Taylor, S. W. (2004). Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrob Agents Chemother* (48) : 3645–3654.

-Z-

Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415(6870) : 389-395.

ANNEXES

Annexe 1

Les milieux de culture

- **BHIB**

L'élaboration des milieux se fait à partir des poudres déshydratées. Au moment de l'emploi, on pèse avec précision une quantité de poudre équivalente à la quantité de milieu dont on a besoin (la préparation de milieu de culture est motionnée sur l'étiquetage d'emballage de produit : 37g de poudre (BHI) avec 1000 ml d'eau distillée). L'ensemble poudre et eau distillée est chauffé sur plaque chauffante avec une agitation à l'aide d'un barreau magnétique jusqu'à leur ébullition pour assurer une bonne dissolution des cristaux (BHIB, solution ambre claire, limpide, de PH = 7.4 ± 0.2), les milieux sont ensuite répartis dans les flacons avant d'être autoclavés (pendant 20 minutes à 121°C).

- **MH molle (g/l)**

Extrait de viande	03g.
Tryptone	17.5g.
Amidon	1.5g.
Agar.....	8g pour MH semi-solide et 16 g pour MH gélosé.
PH	7.3 ± 0.2 .

La composition de milieu de culture, est calculée pour un litre de milieu de culture.
Le m.

Annexe 2

La préparation des solutions

- **Anti Coagulation :**

Na-Citrat.....	27mM.
Nacl.....	336 mM.
Glucose.....	115mM.
EDTA.....	9mM.
pH.....	7.

- **solution de Lowry (1951) :** Composition dans 500 mL d'eau distillé

Solution A :

NaOH.....	86 g
Na ₂ CO ₃14,31g.

Solution B :

CuSO ₄ .5(H ₂ O) :.....	7,1 g.
---	--------

Solution C :

Tartrate de sodium dihydraté.....	2,85 g.
-----------------------------------	---------

