



République
Tunisienne



Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université de Monastir

Institut Supérieure de Biotechnologie de Monastir

Rapport de projet de fin d'étude

Filière : Licence appliqué en biotechnologie

Parcours : Licence Co-construite Biotechnologie marine et aquaculture

Réalisé par :

Malek CHARANNA

Contribution à l'étude chimique et à la valorisation biologique de la méduse « *Rhizostoma pulmo* »

Soutenu le 02 Juillet 2021, devant le jury composé de :

Examineur	Elhem HSSAN (ISBM)
Président	Haïfa ZGHIDA (ISBM)
Encadrant	Hichem BEN JANNET (FSM)
Co - encadrant	Manel BEN ISMAIL (NGB)

Laboratoire d'accueil : Laboratoire de Chimie Hétérocyclique, Produits Naturels et réactivité (LR11ES39), Faculté des Sciences de Monastir

Année Universitaire : 2020/2021

Remerciement

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu, le tout puissant, qui m'a inspiré et m'a guidé dans le bon chemin.

Au terme de mon travail réalisé au Laboratoire de Chimie Hétérocyclique, Produits Naturels et Réactivité, équipe Chimie médicinale et Produits Naturels de la Faculté des Sciences de Monastir, je tiens à exprimer mes remerciements à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la finalisation de ce travail.

Je tiens à remercier Professeur Hichem BEN JANNET, directeur du Laboratoire de Chimie Hétérocyclique, Produits Naturels et Réactivité à la Faculté des sciences de Monastir, qui a accepté l'encadrement de mon projet et m'a réservé un accueil chaleureux dans son laboratoire, ainsi que pour le temps qu'il m'a consacré. Ce travail n'aurait jamais vu le jour sans ses qualités scientifiques et humaines et à l'assistance continue qu'il m'a prodiguée tout au long de mon travail. Je lui témoigne ma profonde gratitude et mon plus grand respect.

J'exprime également ma profonde reconnaissance et mes plus vifs remerciements à Dr. Manel BEN ISMAIL, directrice de l'association Notre Grand Bleu à Monastir pour m'avoir encadrée tout au long de mon stage du projet de fin d'étude. Je n'aurais pu réaliser ce mémoire sans son aide précieux et ses conseils utiles.

Je remercie aussi Mr. Ahmed SOUKI, président de l'association Notre Grand Bleu de m'avoir accueillie, soutenue et solidifié mes connaissances pratiques vis-à-vis l'étude de l'écosystème marin pendant ces trois années.

Mes vifs remerciements vont également aux membres du jury madame Elhem HASSEN, présidente du jury ainsi que madame Haïfa ZGHIDA, examinatrice pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon sujet en acceptant d'examiner mon travail et de l'enrichir par leurs propositions. Votre présence pour moi est un réel plaisir et une profonde fierté.

Je tiens aussi à remercier aussi les membres du laboratoire chimie hétérocyclique, produits naturels et réactivité (Equipe Chimie Médicinale et Produits Naturels) Bessma, Amel, Ghofrane, et Amine pour leur soutien et leur amitié, ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, chacun à sa façon. Un merci spécial à la doctorante Salma JLIZI pour ses sacrifices et sa patience durant mon période du stage. Je les remercie pour l'ambiance et l'amitié que j'ai trouvée auprès d'eux.

Mes vifs remerciements vont aussi à madame Zeineb MZOUGHJI, professeur à la faculté des sciences et madame Houda LAZREG, enseignante chercheuse à l'institut supérieur de biotechnologie à Monastir et monsieur Imed CHERAIEF, technicien supérieur à la faculté de médecine de Monastir.

Je tiens à remercier toute l'équipe de Notre Grand Bleu ; Amjed KHIAREDDINE, Ala Eddine SAID, Sahbi DORAI, Arij SADRAOUI, Kamel NOUIRA, Mohammed DAMAK, Sana MBAREK..... ; merci pour être toujours là quand j'ai besoin de vous.

Dédicaces

Je dédie ce travail

A la lumière de mes yeux et le bonheur de ma vie, à celle qui a donné un sens à mon existence, à celle qui a sacrifié sa vie pour m'offrir un climat idéal de travail, ma mère « Souhir AZAEIZ » qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'études, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné l'amour, la confiance, le courage et la sécurité.

ନିରଂତରାକାଶ

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, à toi mon père « Kamel CHARANNA », aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Mes chers parents, je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance.

ନିରଂତରାକାଶ

A mes très chères sœurs « Nourhen » et « Ons » et mes chères frères « Mohamed » et « Josef », mes grands-mères « Rafika » et « Khadouja » qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail. Ils m'ont chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours.

ନିରଂତରାକାଶ

A la mémoire de mon grand-père « Hakim AZAIEZ », que son âme repose en paix. J'imagine quelle serait sa joie en assistant à l'aboutissement de ce travail. J'aurais tant aimé qu'il soit présent mais, malheureusement, Dieu en a décidé autrement. . J'espère que, du monde qui est sien maintenant, il apprécie ce modeste travail comme preuve de reconnaissance de la part de sa petite fille qui a toujours prié pour le salut de son âme.

ନିରଂତରାକାଶ

Sans oublier mon binôme et mon âme sœur « Riheb CHATTI » pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.

ନିରଂତରାକାଶ

A tous les professeurs et enseignants qui m'ont poussée à aller plus loin. Je vous remercie infiniment.

ନିରଂତରାକାଶ

A mes toutes amies Ons, Dhekra, Amal, Nour ... il me serait difficile de vous citer tous. Vous avez toujours été présents pour les bons conseils. Merci pour les très bons moments qu'on avait partagés ensemble. Vous êtes dans mon cœur, affectueusement.

Liste des abréviations

CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
D.O	Densité Optique
EMAGs	Esters Méthyliques d'Acides Gras
IC₅₀	Concentration inhibitrice médiane
K_M	Constante de Michaelis-Menten
LA	Extrait d'acétate d'éthyle de la méduse lyophilisée
LH	Extrait d'hexane de la méduse lyophilisée
LM	Extrait méthanolique de la méduse lyophilisée
MA	Extrait d'Acétate d'Ethyle de la méduse (avant lyophilisation)
MB	Extrait Butanolique de la méduse (avant lyophilisation)
MeOH	Méthanol
MH	Extrait d'Hexane de la méduse (avant lyophilisation)
ML	Extrait d'acétate d'éthyle de la solution de méduse (avant lyophilisation)
Rdt	Rendement
RMN¹H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
R. pulmo	<i>Rhizostoma pulmo</i>
UE	Unité enzymatique
V_{max}	Vitesse maximale de l'activité enzymatique
VA	Extrait d'acétate d'éthyle de venin de la méduse
VB	Extrait butanolique de venin de la méduse
VH	Extrait d'hexane de venin de la méduse

Liste des figures

Figure 1. Anatomie de la forme méduse et polype des cnidaires	5
Figure 2. Les facteurs influant sur la méduse dans son écosystème	8
Figure 3. Les proliférations de <i>Rhizostoma pulmo</i> en méditerranée de 2013 jusqu'à 2020	9
Figure 4. Les proliférations de <i>Rhizostoma pulmo</i> en Tunisie de 2014 jusqu'à 2020.....	10
Figure 5. <i>Rhizostoma pulmo</i>	11
Figure 6. Schéma de cycle de vie de <i>Rhizostoma pulmo</i>	12
Figure 7. Schéma de cnidoblaste avant et après dévagination	13
Figure 8. Collecte de la méduse <i>Rhizostoma pulmo</i>	15
Figure 9. Congélation de la méduse <i>R. pulmo</i>	16
Figure 10. Décongélation de la méduse <i>R. pulmo</i>	16
Figure 11. Mesure du pH de la méduse par un pH-mètre	16
Figure 12. Lyophilisateur	17
Figure 13. Echantillon de la méduse avant lyophilisation	18
Figure 14. Extraction liquide-liquide par une ampoule à décanter	19
Figure 15. Desséchage de la phase organique par le sulfate de sodium.....	19
Figure 16. Filtration de l'extrait par un papier filtre	20
Figure 17. Séchage de l'extrait à l'aide d'un évaporateur rotatif.....	20
Figure 18. Evaporateur rotatif	20
Figure 19. Bain à ultrasons	21
Figure 20. Capsulation de la méduse lyophilisée dans un papier filtre	22
Figure 21. Extraction solide-liquide de la méduse lyophilisée	22
Figure 22. Chromatographie sur Couche Mince.....	23
Figure 23. Révélation de plaque CCM par Kamarowsky.....	23
Figure 24. Contrôle de la variation du pH à l'aide d'un papier- pH.....	24
Figure 25. Chauffage du mélange de la biotransformation dans un bain marie.....	26
Figure 26. Mettre le mélange de biotransformation sous agitateur magnétique	26
Figure 27. Extraction liquide-liquide du mélange de biotransformation.....	26
Figure 28. Spectromètre RMN "AC-300"	31
Figure 29. Tubes RMN.....	31
Figure 30. Extrait sec de la méduse <i>Rhizostoma pulmo</i>	33
Figure 31. Echantillon de la méduse après lyophilisation	33

Figure 32. Courbe d'étalonnage de dosage des protéines (BSA : albumine de sérum bovin) par la méthode de Lowry	36
Figure 33. Courbe d'étalonnage du DUBOIS (DO : la densité optique=f (concentrations $\mu\text{g/mL}$)	37
Figure 34. Chromatogramme de l'extrait hexane de la méduse <i>Rhizostoma pulmo</i> lyophilisée	38
Figure 35. Spectre RMN ^1H de l'extrait de l'hexane de la méduse (MH) (CDCl_3 , 300 MHz)	40
Figure 36. Spectre RMN ^{13}C de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la méduse (MA) (CDCl_3 , 300 MHz).....	41
Figure 37. Spectre RMN ^{13}C de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la méduse après biotransformation (MAB) (CDCl_3 , 300 MHz)	42
Figure 38. Spectre infrarouge de l'extrait méthanolique de la méduse lyophilisée (LM).....	44
Figure 39. Spectre infrarouge de l'extrait butanolique de la méduse (MB)	45
Figure 40. Spectre infrarouge de l'extrait d'acétate d'éthyle de la méduse bio transformé (MAB)	45
Figure 41. Diagramme de Lineweaver-Burk de l'effet de ML sur l'activité catalytique de l'alpha-amylase en présence de l'amidon	46
Figure 42. Diagramme de Lineweaver-Burk de l'effet de LA sur l'activité catalytique de l'alpha-amylase en présence de l'amidon.....	47
Figure 43. Diagramme de Lineweaver-Burk de l'effet de LM sur l'activité catalytique de l'alpha-amylase en présence de l'amidon	48

Liste des tableaux

Tableau 1. <i>Classification de la méduse Rhizostoma pulmo (FAO, 1987)</i>	11
Tableau 2. <i>Composition des acides gras de Rhizostoma pulmo</i>	13
Tableau 3. Rendement des extraits de l'extraction liquide-liquide et de macération	34
Tableau 4. Mesure de pH de différents échantillons de la méduse	35
Tableau 5. <i>Résultat de dosage des sucres neutres</i>	37
Tableau 6. Liste des aides gras et leurs proportions dans l'extrait à l'hexane de la méduse lyophilisé (LH)	38
Tableau 7. <i>Les déplacements chimiques par ppm des signales du spectre MH et leurs attributions</i>	40
Tableau 8. Mesure de TCA (sec) pour différentes concentrations des polysaccharides.....	49

Liste des annexes

Annexe 1 : Spectre RMN1H de l'extrait d'acétate d'éthyle de contrôle négatif de la biotransformation (NA) (CDCL3 ,300MHz)

Annexe 2 : Spectre RMN1H de l'extrait butanolique de contrôle négatif de la biotransformation (NB) (CDCL3 ,300MHz)

Annexe 3 : Spectre RMN1H de l'extrait butanolique de la méduse après biotransformation (MBB) (CDCL3 ,300MHz)

Annexe 4 : Spectre RMN1H de l'extrait méthanolique de la méduse lyophilisée (LM) (CDCL3 ,300MHz)

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. GENERALITES SUR LES CNIDAIRES	4
1. Classification.....	4
1.1. LES ANTHOZOAIREs.....	4
1.2. LES MEDUZOAIRES.....	4
1.3. LES CUBOZOAIRES	5
2. Anatomie et morphologie	5
3. Locomotion.....	6
4. Alimentation	6
5. Reproduction	6
6. Ecologie.....	7
II. LA MEDUSE « RHIZOSTOMA PULMO »	9
1. Distribution en méditerranée	9
2. Distribution en Tunisie.....	9
3. Description.....	10
4. Classification.....	11
5. Cycle de vie	12
6. Physiologie.....	12
III. TRAVAUX ANTERIEURS SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE DES MEDUSES ET LEUR VALORISATION.....	13
CHAPITRE 2 : MATERIEL & METHODES	
I. MATERIEL BIOLOGIQUE : RHIZOSTOMA PULMO	15
II. MATERIEL ET METHODES.....	16
1. Mesure du pH de R. pulmo.....	16
2. Séchage de R. pulmo	17
2.1. DANS L'ETUVE.....	17
2.2. PAR LYOPHILISATION	17
3. Extraction liquide-liquide de R. pulmo liquide par des solvants organiques	18
4. Extraction solide-liquide de R. pulmo lyophilisée par des solvants organiques « Macération »	20
4.1. Définition	20
4.2. Principe.....	21
4.3. Mode opératoire	21
5. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	22
5.1. DEFINITION.....	22
5.2. PRINCIPE	22
6. Traitement acido-basique de R. pulmo	23
6.1. Principe.....	23
6.2. Mode opératoire	24
6.3. Extraction.....	24
7. La biotransformation de R. pulmo	25
7.1. Définition	25
7.2. Principe.....	25

7.3.	Mode opératoire	25
7.4.	Contrôle négatif.....	27
8.	Teneur en protéines de <i>R. pulmo</i>	27
8.1.	Principe	27
8.2.	Mode opératoire	27
9.	Dosage des sucres totaux	28
10.	Analyse des esters méthyliques d'acides gras (EMAGs) par Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	28
11.	Etude de l'activité anti- α -amylase de <i>R. pulmo</i>	29
12.	Etude de l'activité anticoagulante de <i>R. pulmo</i>	30
13.	La résonance magnétique nucléaire (RMN)	30

CHAPITRE 3 : RESULTATS & DISCUSSION

I.	EVALUATION ET COMPARAISON DES RENDEMENTS.....	33
1.	Rendement des extraits sec et de lyophilisation	33
2.	Rendement des extraits de l'extraction liquide-liquide et l'extraction solide-liquide 34	
II.	ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES	35
1.	Mesure de pH	35
2.	Teneur en protéines.....	36
3.	Dosage des sucres neutres	36
4.	Analyse de la composition chimique en acides gras	37
5.	Analyse des spectres RMN 1H des extraits préparés	39
6.	Analyse des spectres infrarouge.....	44
III.	ACTIVITE ANTI-A-AMYLASE.....	46
IV.	ACTIVITE ANTICOAGULANTE.....	49
	CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES.....	51
	REFERENCES.....	52
	ANNEXES.....	55

Introduction générale

Au cours des dernières décennies, l'association positive entre les aliments nutraceutiques ou fonctionnels et la santé humaine a suscité la recherche de composés bioactifs issus d'organismes vivants. Les plantes terrestres et les taxons marins représentent les principales sources de ces produits naturels bioactifs.

Les océans représentent le plus grand biome de la planète, couvrant 71% de la surface de la planète, avec une diversité de plans corporels beaucoup plus grande que sur terre. Par conséquent, les organismes marins représentent encore un réservoir de produits naturels largement inexploré, une vaste source potentielle d'aliments diversifiés et sains, une source d'énergie renouvelable, de nouveaux médicaments et de composés bioactifs, en raison de la présence de métabolites secondaires couvrant un large éventail de classes structurales et de diverses origines biosynthétiques. D'ailleurs, de nombreuses molécules bioactives provenant d'organismes marins et présentant des propriétés antimicrobiennes, anti-inflammatoires et anticancéreuses potentielles, ont fait l'objet de recherches récentes.

Parmi ces organismes marins, on peut citer les cnidaires qui sont devenus une source importante de composés physiologiquement actifs, en particulier, les méduses. Ces dernières représentent un composant visible des écosystèmes marins et leurs populations sont connues pour connaître d'importantes fluctuations saisonnières et interannuelles, caractérisées par de soudaines épidémies également appelées "blooms" suivies de périodes de rareté.

Les méduses représentent une biomasse gélatineuse abondante et largement distribuée dans les océans du monde. Leurs efflorescences sont principalement soutenues par de grandes méduses Rhizostomoidea et Semaestomeae à toutes les latitudes de l'hémisphère Sud et de l'hémisphère Nord directement influencées par le réchauffement climatique. Cependant, en raison de leur grande abondance et de leur potentiel élevé de régénération et de reproduction, les méduses peuvent être considérées comme une nouvelle source de composés pharmacologiques, nutraceutiques et alimentaires. Leur utilisation potentielle dans l'ingénierie tissulaire, l'industrie alimentaire et la médecine peut fournir l'opportunité de présenter les méduses sous un jour plus positif (Leone et al., 2015).

Dans ce travail, on s'intéresse à la méduse de *Rhizostoma pulmo* vu son abondance au niveau des côtes tunisiennes, particulièrement la baie de Monastir.

Les objectifs de cette étude consistent à réaliser la caractérisation physicochimique de cette espèce (pH, teneur en eau, matière sèche), et la détermination de sa composition chimique. La deuxième partie traitera la biotransformation de la méduse de *Rhizostoma pulmo* avant de

déterminer sa teneur en protéines, sucres, et en acides gras des extraits de la méduse. La dernière partie sera consacrée à l'identification d'activités enzymatiques d'intérêt, à savoir les activités anti- α -amylase et anticoagulantes.

Chapitre1 : Synthèse bibliographique

I. Généralités sur les cnidaires

1. Classification

Les cnidaires présentent l'embranchement le plus primitif puisqu'ils se placent au début de la classification systématique. Il s'agit d'organismes aquatiques métazoaires diploblastiques, à symétrie radiale. Il existe trois classes principales de Cnidaires (Anthozoaires, Méduzoaires et Cubozoaires) :

1.1. Les Anthozoaires

Ils ont uniquement le stade polype (c'est une forme fixe dans la plupart des cas ; son mode de vie est benthique) et sont le plus souvent hermaphrodites. On divise cette classe en deux groupes selon la forme de l'estomac.

- **Les Hexacoralliaires** : leur estomac possède 6 cloisons gastriques. On peut citer les anémones de mer, les madréporaires comme membres de ce groupe.
- **Les octocoralliaires** : possèdent 8 cloisons gastriques, le corail bijoutier et les gorgones font partie de ce groupe.

1.2. Les Méduzoaires

Ils ont à la fois un stade polype et un stade méduse ; ce dernier présente une forme libre et mène en pleine eau une vie pélagique ou planctonique ; c'est le stade où apparaissent les organes de la reproduction. A l'exception, on trouve certaines méduses qui possèdent un seul des deux stades (Exemple : *Pelagia noctiluca*, qui ne possède pas de stade polype fixe).

Les Méduzoaires sont divisés en trois sous classes, qui dépendent du mode de formation de la méduse à partir du polype.

* **Scyphozoaires** : composés des **scyphoméduses**, c'est la sous classe des méduses vraies. La formation de nouvelles méduses se fait par bourgeonnement latéral. Leurs formes et leurs tailles sont très variées, de quelques millimètres à plusieurs mètres de diamètre, rondes, carrés, ou plates. Elles ont généralement un stade de vie fixée et un stade de vie libre. Actuellement, on ne dénombre pas loin de 190 espèces de scyphoméduses dont *Pelagia noctiluca*, *Aurelia aurita* et *Rhizostoma pulmo* font parties.

* **Hydrozoaires** : cette sous classe est composée des hydroméduses et siphonophores. La formation de méduses se fait par bourgeonnement latéral. Elles sont de petites tailles, de 1 à 10 cm. De même que les scyphoméduses, ils possèdent également un stade fixé et un stade libre.

Le polype va bourgeonner avec d'autres polypes. Ces derniers peuvent être seuls, ou former des colonies nommées hydraires. On distingue actuellement 840 espèces d'hydroméduses. Cinq ordres composent cette sous classe : les Anthomédues, les Leptomédues, les Limnomédues, les Narcomédues et les Trachymédues.

1.3. Les cubozoaires

Ils sont composés des **cuboméduses**. La formation de méduses se fait par métamorphose du polype. Ce dernier résulte de la rencontre des spermatozoïdes du mâle, présents dans le spermatophore, et déposé depuis la bouche du mâle sur un tentacule de la femelle. La fécondation se déroule dans les poches gastriques de la femelle. Le polype va ensuite se fixer sur le fond et se métamorphoser pour donner une méduse unique. Il a des tentacules que l'on qualifie de capités. On a répertorié actuellement environ 40 espèces de cubozoaires. Elles sont en forme de cube, leurs rhopalies sont situées dans des niches au-dessus des bords de l'ombrelle. On ne connaît le cycle de vie que de 10% de ce groupe (Lecointre et Le Guyader, 2001).

2. Anatomie et morphologie

Il existe généralement deux formes de cnidaires ; la forme polype (fixe) et la forme méduse (libre) (Figure 1).

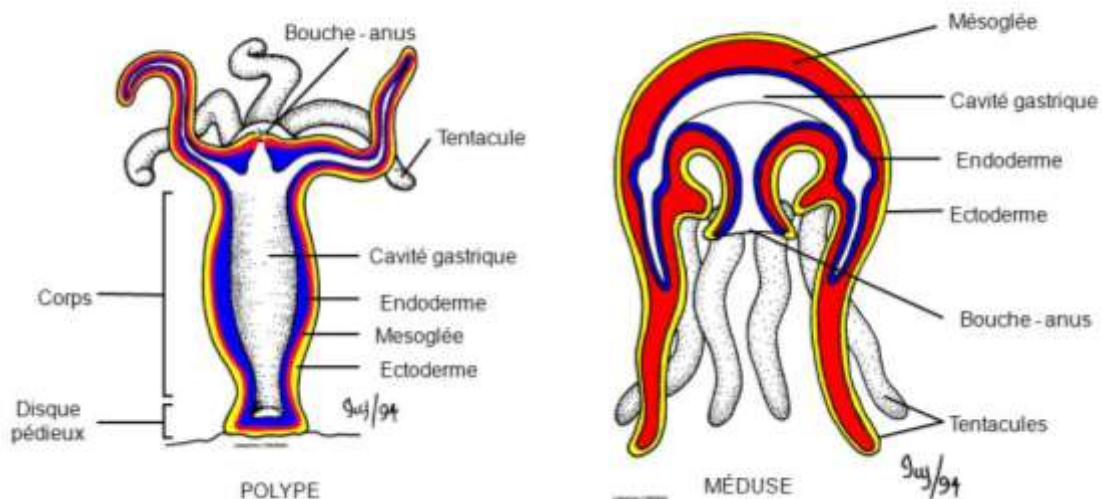


Figure 1. Anatomie de la forme méduse et polype des cnidaires

Les Cnidaires possèdent une organisation interne très simple. Ils sont des organismes diploblastiques, c'est-à-dire que leur paroi est composée de deux feuillet embryonnaires ; l'ectoderme (couche cellulaire externe) et l'endoderme (couche cellulaire interne). Entre ces

deux couches cellulaires se trouve une substance gélatineuse, plus ou moins abondante et pauvre en cellules : la mésoglyée. Ils ont acquis une architecture basée sur une symétrie radiale (FAO, 1987).

Comme indique la figure 1, les cnidaires sont des animaux marins dont la forme en sac possède une cavité gastrique et un orifice unique (qui joue le rôle d'une bouche et d'un anus au même temps) autour duquel sont présentes des tentacules, soit tournées vers le haut pour les formes sessiles, fixées aux fonds marins (c'est la forme « polype » : coraux, gorgones, anémones...), soit tournées vers le bas pour les formes pélagiques libres (c'est la forme « méduse » : méduses, siphonophores...). Les tentacules servent à la fois de moyen de défense contre les prédateurs, mais également de piège qu'elles utilisent pour capturer et harponner leurs proies, grâce à la présence de cellules spécifiques : les cnidoblastes ou cnidocytes. Ces cellules situées tout le long des tentacules, sont les responsables du phénomène d'envenimation (Rondon J, 2018). Leurs systèmes digestif, musculaire, nerveux et sensoriel sont plus ou moins développés. Il peut y avoir un squelette calcaire ou corné, toujours externe malgré les apparences. Ils ne possèdent pas les systèmes respiratoire, excréteur et circulatoire. Le système reproducteur est, de façon générale, constitué de cellules sexuelles rassemblées en gonades (FAO, 1987).

3. Locomotion

Le mouvement chez les cnidaires se réduit à de simples contractions musculaires. Alors que la locomotion chez les méduses s'effectue au moyen des tentacules, mais également de l'anneau musculaire situé dans la sous-ombrelle dont les contractions sont contrebalancées par la seule élasticité de l'animal. Toutes ces impulsions motrices sont contrôlées par les 8 rhopalies (système nerveux primitif) [1].

4. Alimentation

La plupart des cnidaires sont des carnivores prédateurs, et parmi les espèces sédentaires et nageuses, il en est qui s'attaquent à de très grosses proies. Les autres, se contentent du plancton microscopique qu'ils capturent au moyen de minuscules organites (les nématoblastes produits par des cellules spécialisées : les cnidoblastes) incrustés à la surface des tentacules [1].

5. Reproduction

Ils existent deux types de reproduction chez les Méduzoaires ; la reproduction sexuée et la reproduction asexuée. Cette dernière s'effectue par une division du polype, ou par bourgeonnement, ce qui favorise la formation de colonies. C'est le cas des colonies d'hydres

et de siphonophores. Le gonozoïde, polype spécial, en bourgeonnant va donner par multiplication asexuée des hydroméduses qui vont être lâchées dans l'environnement pour se développer, et assure la formation des gonades. Par la suite, on obtient des colonies de sexes différents qui vont se reproduisent entre eux ; c'est la reproduction sexuée. Elle fait intervenir des cellules reproductrices inhérentes à de nombreuses espèces : spermatozoïdes et ovules, qui lors de leur rencontre vont former un œuf donnant par la suite une larve ciliée, la planula. Cette rencontre peut avoir lieu en pleine mer, mais aussi à l'intérieur de la femelle chez certaines espèces comme *Pelagia noctiluca*. Les cellules sexuelles sont formées dans les gonades, dont la localisation dépend de la méduse. Ainsi, chez les Anthoméduses, elles vont se situer autour du manubrium, le long des canaux radiaires pour les Leptoméduses ou Trachyméduses, ou dans des poches génitales reliées à l'estomac pour les Scyphoméduses.

Il existe des différences au stade de formation de polype entre les hydrozoaires et les scyphoméduses ; on constate pour la première que la planula tombe au fond pour former un polype, ce dernier va bourgeonner par multiplication asexuée. Les différents bourgeons sont reliés par un réseau de filament canal ou stolon. Les colonies ainsi formées se nomment hydraires. Certains bourgeons se détachent et forment de nouvelles colonies (Gershwin, 2016).

Alors que chez les scyphoméduses la planula peut tomber au fond et s'y fixer, elle va alors former un polype appelé scyphistome. Ce polype peut, comme pour les hydroméduses, bourgeonner et former des colonies. Mais généralement ils sont solitaires. Le scyphistome va strobuler par segmentation. Il va former des sortes de lamelles. Ces lamelles vont se libérer par des contractions violentes donnant des éphyrules chacune à l'origine d'une méduse adulte (Holst et al., 2007).

6. Ecologie

Les cnidaires, et surtout les méduses, ont historiquement un rôle considéré négligeable dans les écosystèmes. Cette vision est à présent dépassée. La recherche des dernières dizaines d'années portant sur ces organismes a en effet démontré leur importance et leurs rôles dans les écosystèmes marins (Djeghri, 2019). Ils sont essentiels en tant que source de nourriture pour différents taxons, ainsi qu'un prédateur d'œufs, de larves de poissons, de petites proies planctoniques et nectoniques. Entre les Cnidaires, les récifs coralliens fournissent un habitat à une riche diversité d'animaux, dont certains sont des espèces pêchées commercialement, notamment des crustacés, des poissons et des algues. Malheureusement, certaines activités ayant un impact économique énorme comme le tourisme de plongée et un important commerce

mondial de corail pour les aquariums et les bijoux ont entraîné la destruction de bon nombre de ces ressources (Marta Solé et al., 2016).

Plusieurs études scientifiques relient les proliférations des méduses à l'effet et l'influence de l'homme sur le milieu aquatique comme le réchauffement climatique, l'eutrophisation, la modification de l'habitat, la surpêche, l'aquaculture, et l'acidification des océans (Mills, 1995, 2001 ; Purcell, 2012).

En effet, il a été démontré que le réchauffement de la colonne d'eau permet d'élargir la période de reproduction de ces espèces. De même, l'eutrophisation du milieu est un facteur stimulateur du phénomène de prolifération des méduses grâce à la disponibilité des nutriments et des microalgues qui présentent une nourriture abondante de ces gélatineux. Dans les dernières années, on a vécu une diminution accentuée du nombre des tortues (à cause de la pollution et du réchauffement climatique), qui sont les principaux prédateurs des méduses, donc la disparition des tortues et aussi des poissons lune augmentent la prolifération des méduses, de même pour les aménagements littoraux, l'aquaculture et les transformations des écosystèmes aquatiques en général (Öztürk, 2020) (Figure 2).

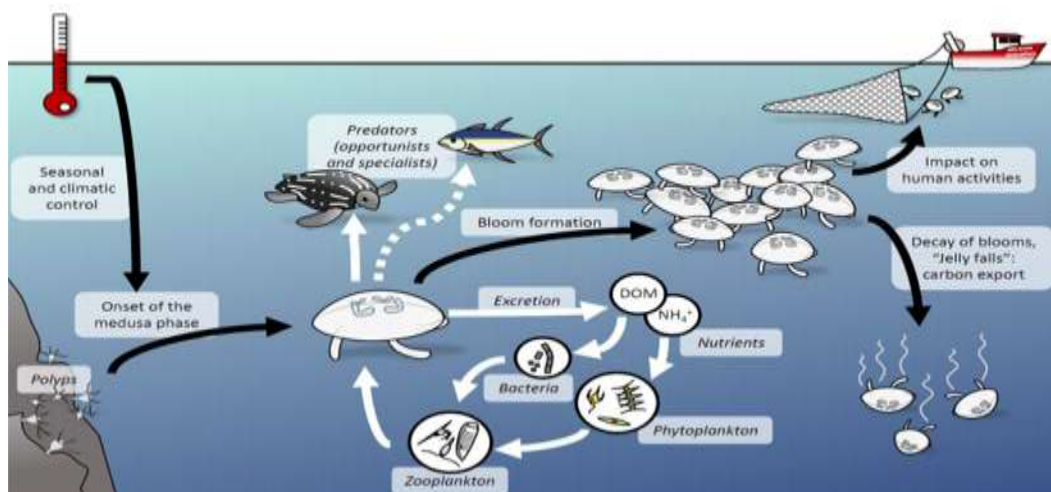


Figure 2. Les facteurs influant sur la méduse dans son écosystème

II. La méduse « *Rhizostoma pulmo* »

1. Distribution en méditerranée

La mer Méditerranée abrite de nombreuses espèces de méduses, à la fois indigènes et invasives. En effet, *Rhizostoma pulmo* est une des plus abondantes scyphoméduses le long des côtes méditerranéennes. Ainsi, c'est la seule des trois espèces de *Rhizostoma* (*Rhizostoma octopus*, *Rhizostoma pulmo*, *Rhizostoma luteum*), actuellement reconnues comme valides (Holst et al. 2007), trouvée dans la mer Méditerranée et les zones adjacentes. En effet pendant les années de floraison en Méditerranée, *Rhizostoma pulmo* est présent en grand nombre dans plusieurs endroits comme par exemple la mer Adriatique Nord et Sud, la mer Ionienne, la Méditerranée orientale et occidentale, ainsi que dans la mer Noire (revue dans Mariottini et Pane 2010) (Öztürk et al, 2020). D'après la carte de JELLYWATCH (Figure 3), *Rhizostoma pulmo* est présente dans la plupart des côtes méditerranéennes mais elle est plus abondante en Tunisie et Italie [2].

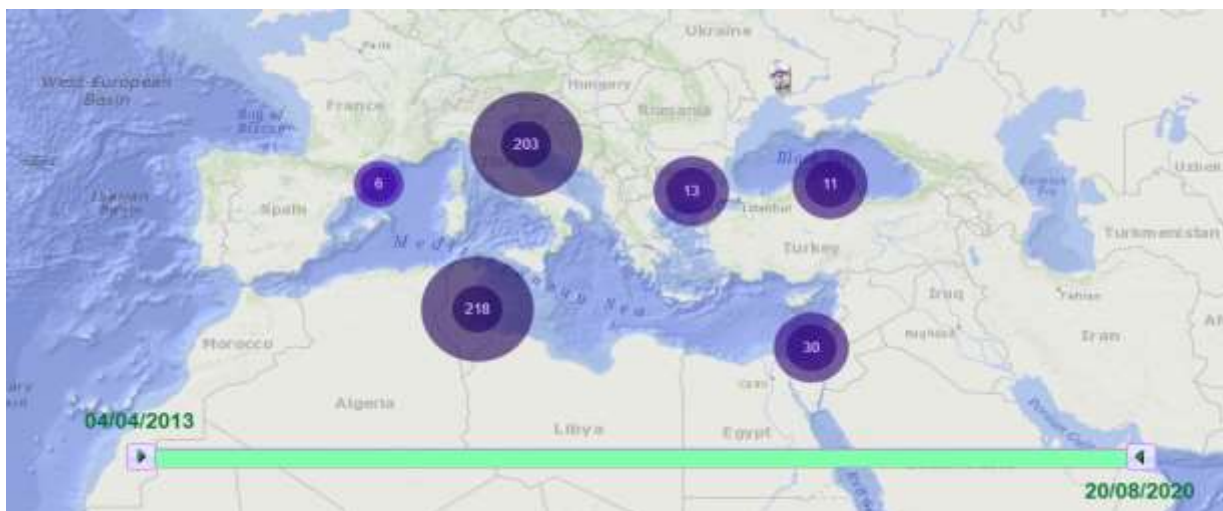


Figure 3. Les proliférations de *Rhizostoma pulmo* en méditerranée de 2013 jusqu'à 2020

2. Distribution en Tunisie

Les premières proliférations des *Rhizostoma pulmo* était au début de 2014 sur les côtes de sud tunisien avec un nombre supérieur à 100 individus. Ce nombre a atteint 218 en 2020, non seulement au sud tunisien, mais aussi sur les autres cotes tels que le nord et le sahel de la Tunisie. Par conséquent, le bloom de méduses augmente de plus que 100 individus en 2014 jusqu'à plus que 1000 individus en 2016 [2] (Figure 4).

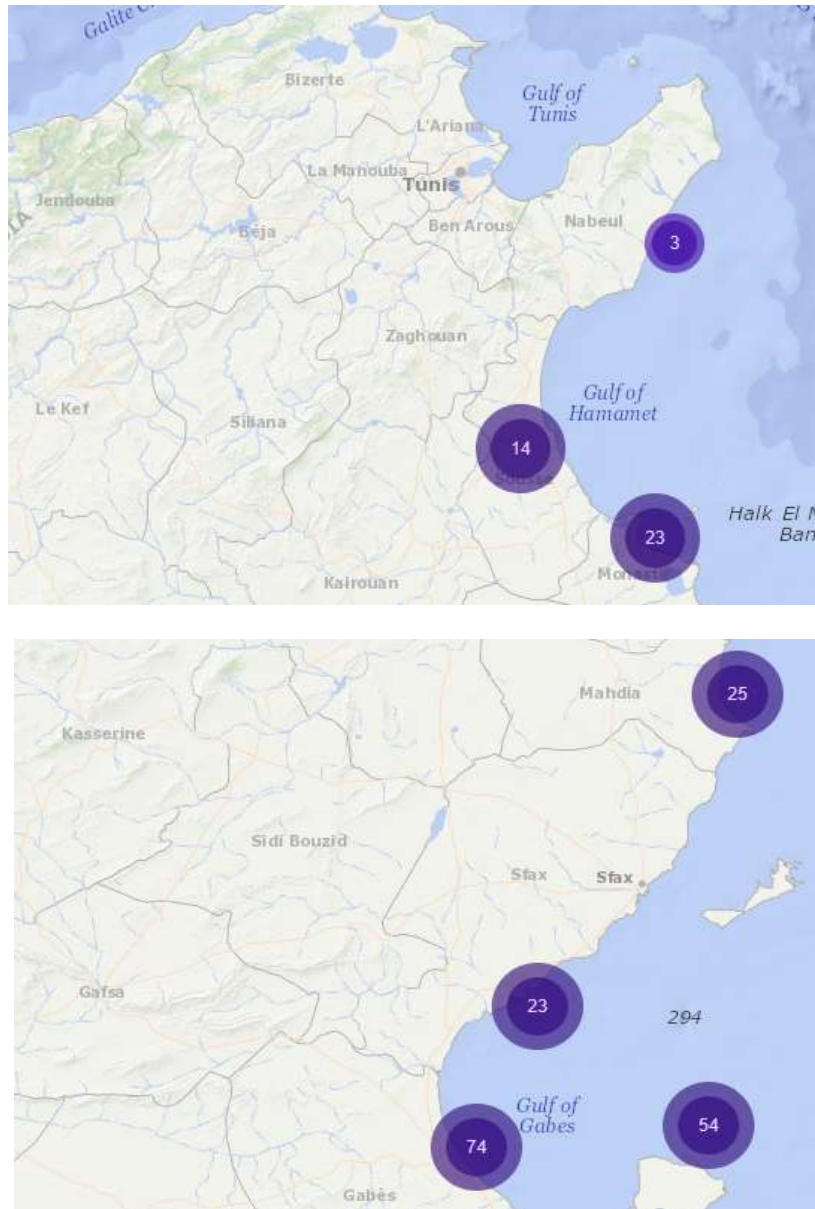


Figure 4. Les proliférations de *Rhizostoma pulmo* en Tunisie de 2014 jusqu'à 2020

3. Description

Rhizostoma pulmo (Macri, 1778 ; Kramp, 1961 ; Morand et Dallot, 1985 ; Buecher, 1996) est également une espèce endémique de la Méditerranée, connue sous le nom de méduse baril ou poumon de la mer. C'est une méduse massive et de très grande taille, la couleur de son ombrelle en forme de cloche est généralement gris pâle et incolore, tandis que ses lappets marginaux sont étroitement bordés d'une ligne bleu outremer, violette ou brune de couleur dense (Öztürk et al., 2004; Çinar et al., 2014). Elle ne possède pas de tentacules marginaux, mais présente 8 tentacules oraux fins soudés entre eux. Le diamètre de l'ombrelle peut atteindre 40cm (Figure 5). Cette espèce est classée des méduses urticantes en Tunisie. C'est une espèce « régulière »

dans la faune pélagique qui présente une forte dépression estivale dans ses effectifs (Morand et Dallot, 1985). Dans la baie de Tunis, sa taille varie entre 20 et 40 cm. Sa période de présence semble être les mois de mai, de septembre et d'octobre.



Figure 5. Rhizostoma pulmo

4. Classification

La classification de la méduse *Rhizostoma pulmo* est résumée dans le tableau suivant (Tableau 1).

Tableau 1. Classification de la méduse Rhizostoma pulmo (FAO, 1987)

Règne	Animale	Eucaryote
Embranchement	Cnidaire	Métazoaire, diploblastique
Sous- embranchement	Méduzoaires	Ce sont des vraies méduses
Classe	Scyphozoaire	Méduses de grande taille, possédant un manubrium, mais pas de voile
Famille	Rhizostomatidae	Espèces de grande taille. Ombrelle en dôme élevé, 80 lobes. Nombreux tentacules labiaux (tentacules situés en marge du disque oral)
Genre	<i>Rhizostoma</i>	Un diamètre plus faible et un nombre réduit de lobes ombrellaires que <i>Rhizostoma octopus</i>
Espèce	<i>R. pulmo</i>	

5. Cycle de vie

Rhizostoma pulmo appartient à la classe des scyphoméduses, ayant un cycle de vie typique qui alterne entre les phases pélagiques et benthiques. Ce cycle, partiellement décrit par Paspaleff (1938), commence par des planulas pélagiques, produites sexuellement par des méduses matures (Krumbach, 1930), qui se fixent sur des substrats durs. Les planulas se métamorphosent en scyphistomes primaires benthiques qui se développent en scyphistomes matures (taille de corps égale à 12 mm et possède 8 tentacules) qui se reproduisent asexuellement par strobilation (Paspaleff, 1938). Les sites éphyra détachées, pélagiques, à 8 rayons (Claus 1883, 1884) se développent en méduses matures, qui se reproduisent sexuellement (Figure 6).

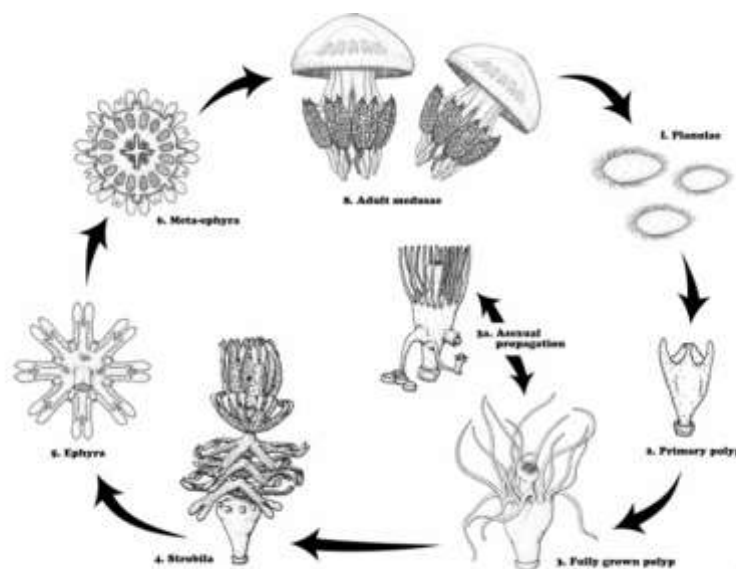


Figure 6. Schéma de cycle de vie de *Rhizostoma pulmo*

6. Physiologie

Les cnidoblastes, situées tout le long des tentacules, sont les cellules responsables du phénomène d'envenimation. Elles sont composées de deux parties (Figure 7). :

* Le **cnidocyte** qui est constitué de deux éléments, la capsule et le filament urticant. La capsule est une vésicule centrale remplie de venin, dont l'ouverture vers l'extérieur est fermée par un opercule qui contient le filament urticant, tube armé de crochets.

* Le **cnidocil**, expansion sensorielle excitable située à la surface de la cellule, déclenchera la dévagination du filament. En cas d'effleurement du cnidocil, les crochets du filament urticant expulsé déchirent les tissus de la victime permettant la décharge venimeuse et son maintien dans la plaie (Rondon, 2018).



Figure 7. Schéma de cnidoblaste avant et après dévagination

III. Travaux antérieurs sur la composition chimique des méduses et leur valorisation

Les travaux antérieurs sur la composition chimique des méduses (spécifiquement de *R. pulmo*) ne sont pas nombreux (Angilè 1 et al. 2020; Leone et al., 2015), mais ayant montré une richesse en composés chez *R. pulmo*, essentiellement la présence d'acides gras saturés et polyinsaturés (Tableau 2) tel que l'AGPI ω -3 (EPA et DHA), d'acides aminés libres (essentiels et non essentiels) et d'osmolytes (homarine et bétaine) (Angilè 1 et al. 2020; Leone et al., 2015).

Tableau 2. Composition des acides gras de *Rhizostoma pulmo*

Acide gras	Nomenclature	Pourcentage (%)
Acide laurique	C12 :0	1,3 \pm 0,5
Acide myristique	C14 :0	3,1 \pm 0,4
Acide palmitique	C16 :0	33,2 \pm 0,5
Acide stéarique	C18 :0	30,6 \pm 1,8
Acide oléique	C18 :1	5 ,1 \pm 1,8
Acide vaccinal	C18 :1	1,9 \pm 0,5
Acide linoléique	C18 :2	2,5 \pm 0,7
Acide arachidonique	C20 :4	8,8 \pm 0,5
Acide eicosapentaénoïque	C20 :5	8,6 \pm 1,7
Acide docosahexaénoïque	C22 :6	4,9 \pm 1,1

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

I. Matériel biologique : *Rhizostoma pulmo*

En coordination avec l'équipe de l'association Notre Grand Bleu, la collecte de deux grandes méduses a été assurée pendant le mois de Décembre 2020, et des mesures ont été faites (longueur, diamètre, poids, etc).

La première collectée le 16/12/2020, avait un poids de l'ordre de 2,402 Kg, avec une longueur de 28 cm et l'ombrelle était de 29 cm de diamètre. Une deuxième a été capturée le 17/12/2020, ayant un poids de 6 Kg, avec une longueur de 52 cm et l'ombrelle était de 55 cm de diamètre (Figure 8).



Figure 8. Collecte de la méduse *Rhizostoma pulmo*

Nous avons récupéré des volumes importants de leurs venins collectés dans des flacons, puis les échantillons ont été rincés avec de l'eau distillée, avant de les conserver au congélateur à -20°C jusqu'au début des manipulations en mois de Février 2021 (Figure 9). Lorsque les deux échantillons ont été décongelés pour réaliser les expériences, nous avons obtenu un mélange de venin et de la méduse, où seule, une petite partie de son corps reste intacte et solide (Figure 10).



Figure 9. Congélation de la méduse *R. pulmo*



Figure 10. Décongélation de la méduse *R. pulmo*

II. Matériel et méthodes

1. Mesure du pH de *R. pulmo*

La mesure de pH est effectuée par un pH-mètre. Dans un premier temps, on mesure le pH de la méduse décongelée (liquide), après on essaye de le mesurer pour chaque organe à part (le pH de l'ombrelle de la méduse et du venin). En ce qui concerne le venin, qui sous forme liquide, on plonge tout simplement la sonde dans le venin. Alors que pour l'ombrelle, avant de faire la mesure, on ajoute de l'eau distillée et on met le mélange sous agitation pendant quelques minutes (Figure 11).



Figure 11. Mesure du pH de la méduse par un pH-mètre

2. Séchage de *R. pulmo*

2.1. Dans l'étuve

Dans un tube à hémolyse, on prépare une masse de 4,3839 g de la méduse, qu'on place dans l'étuve pendant 48 heures à 90 °C.

2.2. Par lyophilisation

- a. Définition :** La lyophilisation (sublimation de l'eau à froid ou cryodessiccation) est un procédé très utilisé qui conserve les propriétés d'un produit ; elle dure entre 60 et 72 heures. Cette technique est effectuée grâce à un lyophilisateur ; un appareil qui permet de lyophiliser, par dessiccation sous vide à basse température des produits (Figure 12).



Figure 12. Lyophilisateur

- b. Principe :** La lyophilisation consiste à enlever l'eau d'un produit liquide, pâteux ou solide, à l'aide de la surgélation puis une évaporation sous vide de la glace sans la faire fondre. Le réchauffement de l'eau à l'état solide à très basse pression conduit à sa sublimation (passage directement de l'état solide à l'état gazeux). La vapeur d'eau (ou de tout autre solvant) quitte le produit et sera capturée par congélation à l'aide d'un condenseur. Elle se divise en trois grandes étapes :

☪ **La congélation :** Diminuer la température lentement jusqu'à une valeur comprise entre -20°C et -80°C.

☪ **La dessiccation primaire (= Sublimation) :** Elle est effectuée sous vide et avec une température supérieure à -20°C.

☪ **La dessiccation secondaire (Séchage final) :** C'est une étape qui s'effectue toujours sous vide à une température n'excédant pas 50°C (Ben Abdallah, 2016).

- c. Mode opératoire :** Dans un contenant, on remplit le 1/3 avec la méduse sous forme liquide (Figure 13), de masse égale à 234,2317 g, puis on le met au congélateur pendant 1 semaine. Une fois sortie, on commence la lyophilisation qui dure 5 jours



Figure 13. Echantillon de la méduse avant lyophilisation

3. Extraction liquide-liquide de *R. pulmo* liquide par des solvants organiques

a. Choix du solvant

Dans cette étude, on a choisi trois solvants de polarités croissantes, tels que l'hexane avec une température d'ébullition de 38°C, puis l'acétate d'éthyle qui possède une température d'ébullition plus élevée que celle de l'hexane ; entre 50 et 60°C. A la fin, on utilise le butanol qui est le plus polaire, dont la température d'ébullition est plus élevée que les précédentes elle est d'environ 110°C.

b. Principe

C'est une opération fondamentale de transfert de matières entre deux phases liquides non miscibles, sans transfert de chaleur. Cette technique permet d'extraire une substance dissoute dans un solvant, à l'aide d'un autre solvant, appelé solvant d'extraction, dans lequel elle est plus soluble. Le solvant initial et le solvant d'extraction ne doivent pas être miscibles (Ben Abdallah, 2016).

c. Mode opératoire

Tout d'abord, on doit préparer deux solutions de 100 ml l'une de la méduse (liquide), qui possède une masse de 105,0458 g et l'autre de venin de la méduse de masse égale à 101,2011 g, on met les 2 échantillons «M»: Solution de méduse et «V»: venin de la méduse dans des ballons, on ajoute pour chacun 50 ml d'hexane sous agitation pendant 15 minutes dans un

réfrigérant, puis on laisse les ballons refroidir, ensuite on les remplace chacun dans une ampoule pour effectuer l'extraction liquide-liquide; cette dernière est réalisée grâce à une forte agitation qui favorise la séparation de deux phases et tant que l'hexane est moins lourd que l'eau on le trouve dans la phase supérieure qui s'appelle la phase organique on récupère la phase aqueuse (qui contient l'eau) pour une deuxième extraction à l'hexane (Figure 14), on récupère les 2 phases organiques de deux extractions de l'hexane dans un erlenmeyer et on l'ajoute 4 spatules de desséchant «Sulfate de sodium» (Figure 15); c'est un composé capable d'absorber les dernières traces d'eau présentes dans un solide ou un liquide, puis on filtre l'extrait de desséchant par un papier filtre (Figure 16). Dernièrement, pour concentrer cet extrait (Figure 17), on utilise l'appareil évaporateur rotatif (Figure 18).

Pour les autres extraits ; ils sont réalisés à partir de la phase aqueuse, du même principe que l'hexane on réalise deux extractions pour chaque solvant ; l'acétate d'éthyle et le butanol.



Figure 14. *Extraction liquide-liquide par une ampoule à décanter*



Figure 15. Desséchant de la phase organique par le sulfate de sodium



Figure 16. Filtration de l'extrait par un papier filtre



Figure 17. Séchage de l'extrait à l'aide d'un évaporateur rotatif



Figure 18. Evaporateur rotatif

4. Extraction solide-liquide de *R. pulmo* lyophilisée par des solvants organiques « Macération »

4.1. Définition

L'extraction solide-liquide est un phénomène lent qui permet d'extraire une substance présente dans un solide pour la faire passer dans un solvant liquide (Ben Abdallah, 2016).

4.2. Principe

Cette technique permet d'endommager ou de fragiliser les membranes et/ou parois cellulaires facilitant ainsi la libération du contenu cellulaire vers le milieu extérieur (El Darra, 2013). L'extraction par macération est réalisée à température ambiante (20°C), pour préserver la structure des extraits phénoliques obtenus à partir des écorces de la méduse lyophilisée.

On utilise pour cette macération 3 solvants de polarité croissante : l'hexane, l'acétate d'éthyle et le méthanol ; ce dernier permet l'extraction d'une teneur importante, vu qu'il permet l'extraction de plusieurs composés comme : les acides phénoliques, les anthocyanidines, les flavanones, les flavanols, les flavones, les procyanidines et la catéchine (Rhazi, 2015). Cette extraction est assistée par ultrasons qui sont un nouveau procédé d'extraction permettant d'extraire des molécules de faibles poids moléculaires (Hromadkova et al. 2002) (Figure 19). Dans les secteurs agroalimentaire et pharmaceutique, les ultrasons permettent l'extraction de composés bioactifs tels que les flavonoïdes, les huiles essentielles, les polysaccharides et les esters (El Darra, 2013).



Figure 19. Bain à ultrasons

4.3. Mode opératoire

Une quantité de 0,5 g de la méduse lyophilisée a été capsulée dans un papier filtre (Figure 20) et placée dans une boîte fermée, avant de remplir cette dernière par de l'hexane afin de commencer l'extraction durant 3 heures. Par la suite, on sèche l'extrait, et on répète cette opération 3 fois pour les trois solvants (hexane, acétate d'éthyle et méthanol) (Figure 21). Plus que la macération se fait à froid, on utilise aussi pour cette extraction le bain à ultrasons.

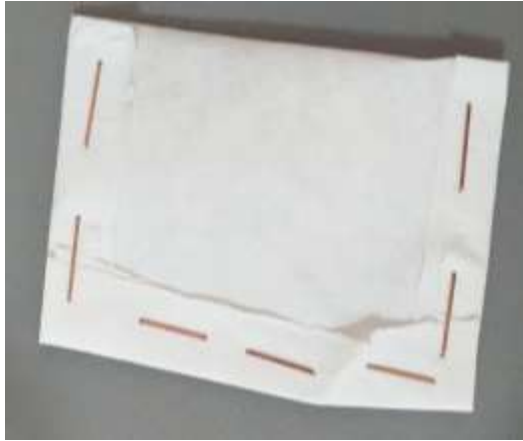


Figure 20. Capsulation de la méduse lyophilisée dans un papier filtre



Figure 21. Extraction solide-liquide de la méduse lyophilisée

5. Chromatographie sur couche mince (CCM)

5.1. Définition

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges variés. Elle sert en analyse pour purifier, identifier et quantifier des composés au sein d'échantillons divers.

5.2. Principe

Le principe de cette technique est basé sur la migration différentielle des divers solutés contenus dans un échantillon analysé. Comme présente la figure 22 l'échantillon est entraîné par la **phase mobile** (c'est un solvant ou un mélange de solvants ; on l'appelle éluant) au travers de la **phase stationnaire** (c'est un support, en aluminium ou en verre, sur lequel a été étendue une fine couche d'un milieu de sorption ; silice) qui a tendance à retenir plus ou moins les composés de l'échantillon à l'aide d'interactions comme les forces de Van der Waals ou les liaisons hydrogène. Une fois la phase stationnaire traversée, les composés sont élués (Ferrari, 2002).

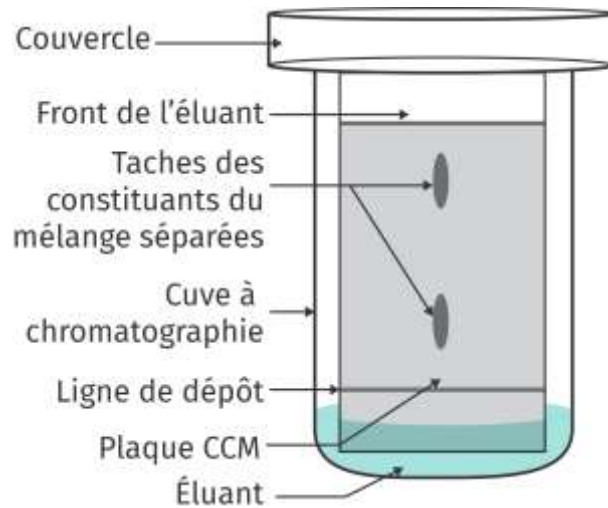


Figure 22. Chromatographie sur Couche Mince

Dans cette étude, pour chaque extraction on a effectué plusieurs plaques CCM pour vérifier la présence des composés intéressants dans l'extrait tels que ; les composants phénoliques, les acides gras, les acides aminés, etc. Afin d'atteindre ceci, on doit révéler la plaque CCM, soit en plaçant la plaque sous une lampe UV, soit par un révélateur chimique courant Kamarowsky (Figure 23).



Figure 23. Révélation de plaque CCM par Kamarowsky

6. Traitement acido-basique de *R. pulmo*

6.1. Principe

On varie le pH de la méduse soit à un pH acide (pH=2) avec l'acide sulfurique H_2SO_4 , soit à un pH basique (pH=9) avec la solution carbonate de sodium Na_2CO_3 (Figure 24).

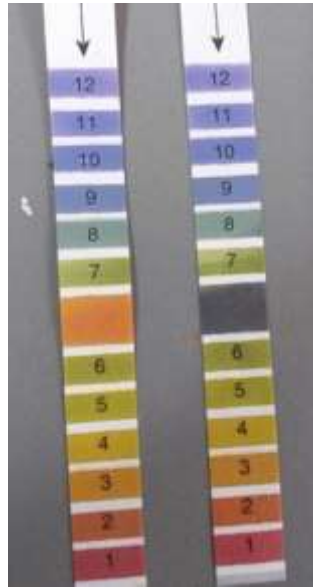


Figure 24. Contrôle de la variation du pH à l'aide d'un papier- pH

6.2. Mode opératoire

Traitement acide : On prépare 100 ml de la solution de méduse et on ajoute lentement de la solution d'acide sulfurique (H_2SO_4) pour baisser le pH. Le suivi du pH est réalisé avec un papier pH jusqu'il serait est égal à 2 (couleur orangée).

Traitement basique : On prépare 100 ml de la solution de méduse et on ajoute lentement de la solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) pour augmenter le pH. Le suivi du pH est réalisé avec un papier pH jusqu'il serait égal à 9 (couleur bleu foncé).

6.3. Extraction

L'extraction est du type liquide-liquide avec 3 solvants de polarité croissante : Hexane, Acétate d'éthyle et le Butanol. Tout d'abord, 50 ml d'hexane sont ajoutés aux solutions des méduses traitées avec H_2SO_4 et Na_2CO_3 , mise sous agitation pendant 15 minutes dans un réfrigérant, puis on laisse les ballons refroidir. Ensuite, les solutions sont remplacées dans deux ampoules ; Une forte agitation de l'ampoule est nécessaire pour réaliser l'extraction liquide-liquide, ce qui favorise la séparation de deux phases. Sauf que dans notre cas, il n'y a pas eu de séparation, même après 1 heure, ce qui a nécessité l'ajout du sel NaCl pour qu'on obtienne un relargage des molécules d'eau avec le sel, et ainsi, la séparation de deux phases, vu que l'hexane est moins lourd que l'eau. Par conséquent, on le trouve dans la phase supérieure qui s'appelle la phase organique, et on récupère la phase aqueuse (qui contient l'eau) pour une deuxième extraction à l'hexane. On récupère les deux phases organiques de deux extractions de l'hexane dans un erlenmeyer, et on ajoute du desséchant « Sulfate de sodium » qui est un composé capable

d'absorber les dernières traces d'eau présentes dans un solide ou un liquide. A la fin, on filtre l'extrait par un papier filtre, et on utilise l'appareil rote à vapeur pour le concentrer.

Pour les autres extraits ; ils ont été obtenus à partir de la phase aqueuse, suivant le même principe que l'hexane, où on réalise deux extractions pour chaque solvant, à savoir l'acétate d'éthyle et le butanol.

7. La biotransformation de *R. pulmo*

7.1. Définition

La « biotransformation ruminale » est un concept qui regroupe l'ensemble des réactions se produisant dans le rumen (dégradation, synthèse et conversion). Ces réactions sont pilotées par trois forces motrices majeures : les lois de la cinétique chimique, de la thermodynamique et de la dynamique des populations microbiennes (Serment, 2012). En fait, la biotransformation est essentielle pour convertir les produits chimiques lipophiles en métabolites hydrosolubles et facilement excrétables (Wolfgang, 2009).

7.2. Principe

La biotransformation, et la « *Saccharomyces cerevisiae* » spécifiquement, permet la réalisation des plusieurs réactions chimiques telles que :

- La réduction de la 4-sulfenylacétoacétate (Hayakawa et al. 1996)- La réduction énantioselective du 3-Oxopalmitate d'éthyle, étape clé dans la synthèse d'un 1,3-diglycéride bioactif (Ben Jannet et al., 1999)
- La biotransformation du méthanol et du butanol en leurs aldéhydes correspondants avec des rendements de 32,4 et 45%, respectivement (Norouzian et al. 2003).
- La réduction des liaisons C=C, C=O ou les deux en même temps des méthylènegécétoesters avec des bonnes conversions (Giuliano et al., 2007 ; Chouaib, 2016).

7.3. Mode opératoire

Dans un ballon de 500 ml on met 10 g de levure de boulangerie, 13 g de sucre (saccharose) et 120 ml d'eau distillée, avant de le passer sous agitation pendant quelques minutes, suivie d'un bain-marie à une température égale à 30°C pendant 1 heure (Figure 25). Le ballon est agité chaque 15 minutes (Figure 26), et à la fin, on ajoute 20 g de la solution de méduse et 20 ml d'éthanol au mélange. Ce dernier est mis sous agitation pendant 8 jours.



Figure 25. Chauffage du mélange de la biotransformation dans un bain marie



Figure 26. Mettre le mélange de biotransformation sous agitateur magnétique

Une fois la biotransformation terminée, on effectue deux extractions liquide-liquide successives, la première par l'acétate d'éthyle et l'autre avec le butanol. Le mélange de biotransformations est remplacé dans une ampoule à décanter, auquel est rajouté l'acétate d'éthyle. Après agitation, on remarque une séparation de deux phases ; Une phase organique (Figure 27) qui va être par la suite desséchée avec le sulfate de sodium $MgSO_4$ pour éliminer une quantité maximale d'eau et une phase aqueuse qui va subir une deuxième extraction par l'acétate d'éthyle. Par la suite, le butanol est ajouté à la phase aqueuse de la deuxième extraction à l'acétate d'éthyle ; et on suit la même procédure que l'acétate d'éthyle pour obtenir l'extrait butanolique desséché. Au final, tous les extraits sont remis dans la rote à vape pour éliminer le maximum d'eau.



Figure 27. Extraction liquide-liquide du mélange de biotransformation

7.4. Contrôle négatif

Dans un ballon de 500 ml, on met 10 g de levure de boulangerie, 13 g de sucre (saccharose) et 120 ml d'eau distillée, puis mis sous agitation pendant quelques minutes, suivi d'un bain marie à une température égale à 30°C pendant 1 heure. Le ballon doit être agité chaque 15 minutes. A la fin, on ajoute 20 ml d'éthanol au mélange, et 20 g de l'eau distillée pour remplacer l'échantillon de solution de méduse. Une agitation est effectuée pendant 8 jours suivie de l'extraction selon le protocole précédemment décrit.

8. Teneur en protéines de *R. pulmo*

8.1. Principe

Le teneur en protéines est déterminé par la méthode de *Lowry* qui consiste en un dosage colorimétrique particulièrement sensible, en se basant sur la réaction colorimétrique de Folin-Ciocalteu.

La coloration bleue/violette obtenue lorsqu'on met le réactif de Folin-Ciocalteu en présence de protéines est due à deux réactions. La première réaction se produit entre les liaisons peptidiques et les ions cuivre. La deuxième réaction se fait entre les sels de phosphomolybdate et de phosphotungstate et les résidus tryptophane, tyrosine, cystéine et histidine de la protéine. La densité optique des échantillons est mesurée à 750 nm.

8.2. Mode opératoire

Dans un premier temps, une courbe d'étalonnage est effectuée à partir d'une gamme de concentrations connues de BSA (albumine de sérum bovin). Dans un second temps, la concentration en protéines totales de l'extrait est déterminée par la mesure de l'absorbance des solutions à 750 nm.

Par la suite, une solution de la méduse lyophilisée dissoute dans l'eau distillée (1mg/ml) est mélangée avec 4 ml de réactif de *Lowry*. Puis les tubes sont incubés pendant 10 à 15 min à l'obscurité. Par la suite 4 ml de réactif de Folin-Ciocalteu sont ajoutés et de nouveau les tubes sont incubés pendant 30 min à l'obscurité, avant de mesurer l'absorbance à 750 nm.

9. Dosage des sucres totaux

9.1. Principe

Les sucres totaux sont déterminés selon la méthode de Dubois et al, (1956) dont le principe repose sur la réaction suivante : l'acide sulfurique concentré provoque, à chaud, le départ de plusieurs molécules d'eau à partir des oses. Cette déshydratation s'accompagne par la formation d'un hydroxy-méthylfurfural (HMF) dans le cas d'hexose et d'un furfural dans le cas d'un pentose. Ces composés se condensent avec le phénol pour donner des complexes colorés (jaune-orangé) mesurable à 488 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des oses (Benaouida, 2008).

9.2. Mode opératoire

200 µL de la solution à doser (Méduse lyophilisée + Eau distillée) sont mis dans un tube à essai avec 200 µL de phénol (à 5%). 1 ml de H₂SO₄ est ajouté rapidement sans les faire couler le long des parois et le mélange est agité immédiatement. Une coloration jaune se développe dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des oses. Les tubes sont placés au bain-marie à 100°C pendant 10 minutes, puis refroidis sous l'eau à 20°C. Il faut laisser la coloration se développer pendant 30 minutes avant de mesurer l'absorbance à 490 nm. La teneur en sucres neutres est déterminée en référence à une gamme étalon de galactose.

10. Analyse des esters méthyliques d'acides gras (EMAGs) par Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Une partie préliminaire doit être effectuée avant l'analyse des EMAGs par CPG, c'est l'estérification des acides gras essentiels de l'extrait hexane de la méduse lyophilisée en vue de leur transformation en esters volatils analysables par chromatographie en phase gazeuse. Cette estérification se fait en milieu méthanolique à l'aide du tri fluorure de bore (BF₃) et trois essais sont pratiqués pour chaque prélèvement.

Dans un tube de type Wheaton (8 ml), on introduit 1 ml de l'extrait que l'on l'évapore à sec sous un flux d'azote (LH), 1 ml de BF₃-Méthanol (14%) est ajouté puis on chauffe le mélange au bain-marie 10 min à 95-100°C. Après refroidissement, on ajoute 1 ml d'hexane et 1ml d'eau milli-Q. On agite vigoureusement au moins 2 min à l'aide d'un agitateur, puis on laisse décanter. La phase inférieure (MeOH + Eau) doit être éliminée (on laisse un peu pour éviter d'embarquer l'hexane) et par la suite on ajoute 1 ml d'eau milliQ, on agite vigoureusement au moins 2 min

et on stocke à -20°C pendant la nuit ou au moins 4-5 heures. Le lendemain, le reste d'eau doit être congelé et on récupère rapidement (avant la fonte de la glace) la phase organique supérieure (hexane) et la transférer dans un tube chromacol. L'extrait estérifié est prêt à être analysé en chromatographie en phase gazeuse.

Chaque échantillon d'EMAGs est injecté trois fois afin de vérifier la reproductibilité des résultats « chromatographie ». L'analyse des EMAGs est réalisée par chromatographie sur un CPG hp5890 séries II, le tout piloté par ordinateur DELL et logiciel de chromatographie HPCHEM. Après montage d'une colonne capillaire de polyéthylène glycol carbowax (30 m x 0.25 mm de diamètre x 0.25 cm d'épaisseur de film), les injections se font en mode split (avec un rapport de split de 1/100^{ème}).

Les conditions de gradient et de débit de gaz ont été définies et optimisées au LSN : gaz vecteur N₂, débit constant de 1 ml/mn ; Injecteur 1079 split/splitless 250°C pendant 45.0 mn; détecteur à ionisation de flamme FID 260°C; four colonne température initiale 50°C pendant 2 mn, puis gradient de température 4°C /mn jusqu'à 220°C et plateau de température à 220°C pendant 5 mn, soit un cycle total d'élution d'une durée 45.0 mn.

11. Etude de l'activité anti- α -amylase de *R. pulmo*

11.1. Définition de l' α -amylase

L' α -amylase est une enzyme ubiquitaire, synthétisée par tous les genres de la vie (Janecek, 1994). Elle appartient à la classe des protéines globulaires, dont le rôle biologique est de catalyser l'hydrolyse de l'amidon et du glycogène (Wang et al. 1989 ; Scriban, 1999).

11.2. Principe

Plusieurs techniques ont été développées pour déterminer l'activité de l' α -amylase. La méthode de DNS (Dinitrosalicylique) est la plus utilisée pour doser les oses réducteurs présents dans le milieu. En milieu alcalin et à chaud, l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5- DNS) jaune est réduit par les oses réducteurs en acide 3-amino-5-nitrosalicylique rouge orangé. L'hydrolyse est réalisée à l'aide d'amylases dans le cas de l'amidon (Lahmadi, 2019).

11.3. Mode opératoire

Le mélange réactionnel est composé de 100 μ L d'une solution 1% (w/v) d'amidon de pomme de terre (Sigma) dans 10 Mm tampon de phosphate (pH 6) et 20 μ L de la solution enzymatique (α amylase) préalablement diluée dans 480 μ l de tampon phosphate (10Mm), le tout a été incubé 10 min à 25°C.

Une unité enzymatique est définie par la quantité d'enzyme qui libère 1 μmol de sucres réducteurs par minute. D-glucose est utilisé pour le traçage de la courbe standard. Toutes les expériences ont été réalisées indépendamment en triplicatas. L'activité inhibitrice des extraits est déterminée dans les mêmes conditions opératoires en ajoutant aux 480 μL de tampon 20 μL d'extrait 0,0005 $\mu\text{g/ml}$ (LM), 0,00025 $\mu\text{g/ml}$ (LA) et 0,001 $\mu\text{g/ml}$ (ML).

12. Etude de l'activité anticoagulante de *R. pulmo*

12.1. Collecte du sang et préparation du plasma pauvre en plaquettes (PPP)

Le sang total humain a été prélevé chez des volontaires en bonne santé, dispensés de prendre des médicaments pendant au moins 10 jours, après avoir leur consentement conformément à la déclaration d'Helsinki. Le sang a été recueilli dans des tubes Vacutainer TM siliconés (Becton Dickinson, Le pont de Claix, France), contenant du citrate de sodium tamponné (0,129M). Le sang total a été centrifugé à 2000g pendant 15 min, suivi d'une centrifugation de 13,000 g pendant 2 min pour préparer du plasma pauvre en plaquettes (PPP). Les plasmas collectés sont conservés à -80°C .

12.2. Temps de la céphaline activée (TCA)

Le temps de la céphaline activée explore la voie de la phase contact classiquement appelée «voie endogène» de la cascade de la coagulation. Celle-ci est déclenchée dans le test par adjonction d'un mélange d'acides éllagiques, de phospholipides et d'une solution calcium.

A 50 μL de PPP contenant une seule concentration élevée des extraits (1 mg/ml), pré incubé une minute à 37°C . 50 μL sont ajoutées du réactifs aPTT (Purpa Thrombotique Thrombocytopenique). Après 3 min d'incubation à 37°C , 50 μL de chlorure de calcium CaCl_2 (0,025 M) sont ajoutés pour amorcer le phénomène de coagulation sanguine et le temps de formation de caillot est mesuré par le coagulomètre. Dans les mêmes conditions expérimentales, des témoins en absence des polysaccharides sont préparés servant de référence (Chahed et al, 2020).

13. La résonance magnétique nucléaire (RMN)

13.1. Principe

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est fondée sur la mesure de l'absorption de la radiation de radiofréquence (RF) par un noyau atomique dans un champ magnétique fort. Dans

la présente étude, les spectres de RMN ^1H ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker "AC-300" (300 MHz) (Figure 28).



Figure 28. Spectromètre RMN "AC-300"

Le chloroforme deutéré (CDCl_3), l'eau deutérée et le méthanol deutéré sont employés comme solvants. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm et les constantes de couplage sont indiquées en Hz (Frad, 2019).

13.2. Mode opératoire

Dans le tube de RMN, 12 à 15 mg de l'extrait hexane, d'acétate d'éthyle ou butanolique dissous dans un solvant deutéré approprié (le méthanol, le chloroforme et l'eau deutérés sont utilisés) sont introduits (Figure 30).



Figure 29. Tubes RMN

Chapitre III. Résultats et Discussion

I. Evaluation et comparaison des rendements

1. Rendement des extraits sec et de lyophilisation

Pour étudier la quantité du poids sec de la méduse, un extrait a été préparé ; on met 4,3839 g de la solution de méduse dans un tube à essai. Après séchage à l'étude pendant 48 heures, la masse obtenue était égale à 210,8 mg (Fig30).

Pour calculer le rendement (**R**), la formule suivante a été utilisée ; $R = \frac{\text{Masse finale}}{\text{Masse initiale}} \times 100$.

Après tout calcul fait, le rendement de l'extrait sec est égal à **4,81%**.



Figure 30. Extrait sec de la méduse Rhizostoma pulmo

L'estimation du rendement de la lyophilisation de la méduse à partir de 234,2317 g de la solution de méduse donne une quantité de l'ordre de 8,9945 g (Fig31), correspondant à un rendement de l'ordre de **3,84%**.



Figure 31. Echantillon de la méduse après lyophilisation

Ce taux est similaire à celui noté par Leone et al (2015), qui ont montré que les poids secs après lyophilisation doivent être entre 4,1 et 6,8 %. La légère différence en rendement pourrait être due à l'effet de congélation décongélation, qui pourrait augmenter la teneur d'eau dans les échantillons, affectant ainsi le rendement du poids sec.

2. Rendement des extraits de l'extraction liquide-liquide et l'extraction solide-liquide

La préparation des extraits de la solution de méduse et de la méduse lyophilisée a été effectuée par deux types d'extraction : extraction liquide-liquide et macération. Ces méthodes nous ont permis d'obtenir plusieurs extraits, dont le rendement calculé selon la relation suivante pour les extraits de l'extraction liquide-liquide :

$$R = \frac{\text{masse de la solution de méduse}}{\text{masse finale d'extrait}} \times 100$$

Concernant les extraits de la macération, c'était un peu compliqué car on devrait tout d'abord calculer la masse initiale de la solution de méduse, qui est égal à x :

$$x = \frac{\text{masse de la méduse lyophilisée}}{\text{masse de la solution de méduse}} \times 100$$

Par la suite, on calcule le rendement par selon la formule suivante :

$$R = \frac{\text{masse d'extrait}}{x} \times 100$$

Les résultats des rendements des différents extraits sont groupés dans le tableau 3.

Tableau 3. Rendement des extraits de l'extraction liquide-liquide et de macération

Extrait	Masse (mg)	Rendement (%)
MH	19,5	0,02
VH	7,5	0,007
MA	16,2	0,015
VA	1,8	0,002
MB	94,3	0,09
VB	27,7	0,027
LH	8,9	0,068
LA	22,6	0,173
LM	53,74	0,413

Les rendements de l'extrait sec et de la lyophilisation sont approximativement similaires, ainsi, le choix entre ces deux techniques n'est pas un facteur qui pourrait influencer notre travail.

En partant d'une extraction liquide-liquide, nous n'avons pu obtenir que de très faibles rendements, de même pour la macération, qui donne quand même un rendement plus au moins élevé par rapport à la première méthode. Ceci pourrait être dû à l'abondance en eau dans nos échantillons de l'extraction liquide-liquide, où l'eau présente un pourcentage de l'ordre de 96,16%. Même pour la macération ces faibles rendements reviennent à la grande quantité de solution de méduse utilisée au départ pour la lyophilisation.

II. Analyses physico-chimiques

1. Mesure de pH

Les mesures de pH des différents échantillons des méduses récoltées montrent un pH autour de 7 pour la solution de méduse et de l'ombrelle, et légèrement acide pour son venin (pH 6.5).

Tableau 4. Mesure de pH de différents échantillons de la méduse

Echantillon	pH
Solution de méduse	7,02
L'ombrelle de la méduse	6,97
Venin	6,5

Ceci nous permet de conclure que les composants de la méduse ainsi que et son venin sont plutôt de pH neutre. Cette valeur pourrait être corrélée au pH neutre de l'eau. En effet, le corps de la méduse est composé de mésoglycane, une matrice extracellulaire très bien hydratée enveloppée de 2 fines couches de tissu : ectodermique et endodermique, et donc contient beaucoup d'eau. Déjà, environ 96 % de leur volume corporel est composé d'eau, dont environ 40 % sous forme de liquide extracellulaire (Wright et Purcell, 1997).

2. Teneur en protéines

La teneur en protéines des extraits de la méduse lyophilisée, est déterminée par la méthode de Lowry, en référence d'une gamme étalon d'albumine de sérum bovin (Figure 32)

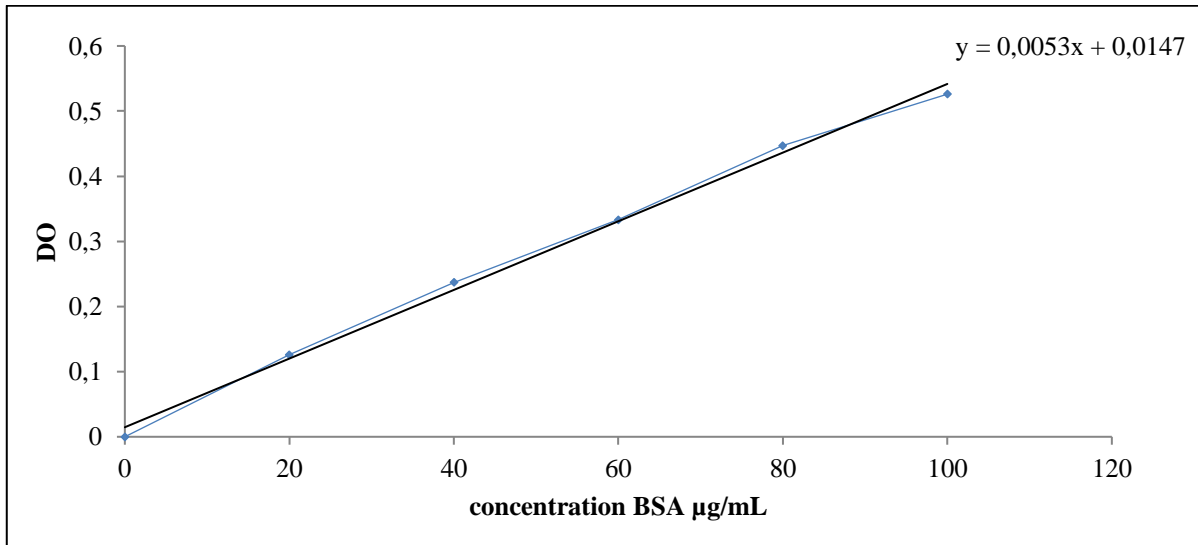


Figure 32. Courbe d'étalonnage de dosage des protéines (BSA : albumine de sérum bovin) par la méthode de Lowry

D'après la courbe d'étalonnage et après mesure de D.O des solutions (Figure 32), la quantité des protéines chez *Rhizostoma pulmo* présente 53µg/mL, soit 53% du poids sec de l'individu.

La teneur obtenue dans nos échantillons de méduses *Rhizostoma pulmo* est légèrement plus importante, comparée à celle trouvée par Leone et al (2015), montrant que celle-ci peut atteindre 40 % du poids secs selon la méthode de dosage des protéines. Ceci donc pourrait confirmer notre hypothèse sur la richesse de notre espèce en protéines, pouvant être principalement du collagène (Leone et al, 2015).

3. Dosage des sucres neutres

La teneur en sucres neutres est déterminée par la méthode de DUBOIS en référence à une gamme étalon de galactose (0 à 500 µg/mL) (Figure 33).

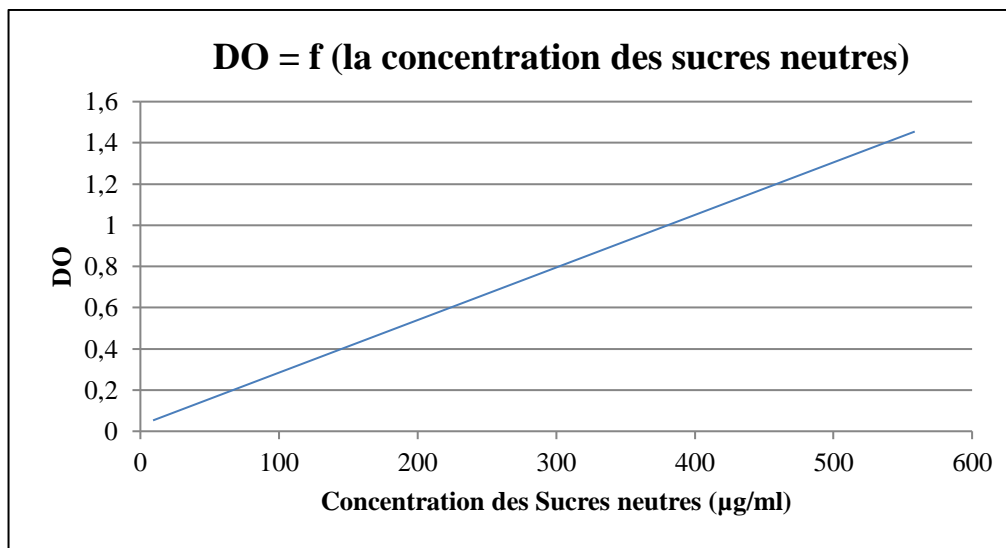


Figure 33. Courbe d'étalonnage du DUBOIS (DO : la densité optique= f (concentrations $\mu\text{g/mL}$)

Pour déterminer les taux des sucres neutres de la méduse lyophilisée, 3 essais de dosage ont été réalisés avant de mesurer leurs D.O. La projection des valeurs obtenues sur la courbe d'étalonnage de DUBOIS nous a permis de déduire la concentration en sucres neutres et par conséquent estimer le pourcentage de chaque valeur, les résultats sont regroupés dans le Tableau.

Tableau 5. Résultat de dosage des sucres neutres

	D.O $_{490\text{nm}}$	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	% des sucres neutres
Essai 1	0,67	260	33,5
Essai 2	0,57	180	28,5
Essai 3	0,60	240	30,3
Moyenne (%)		30,7% \pm 2,53	

Le dosage du Dubois permet la quantification des sucres neutres présents, dont les résultats révèlent un taux de l'ordre de $30,7 \pm 2,53\%$.

4. Analyse de la composition chimique en acides gras

Les analyses réalisées par chromatographie en phase gazeuse (Figure 34) permettent d'identifier les AG présentes dans l'extrait Hexane de la méduse lyophilisée (LH).

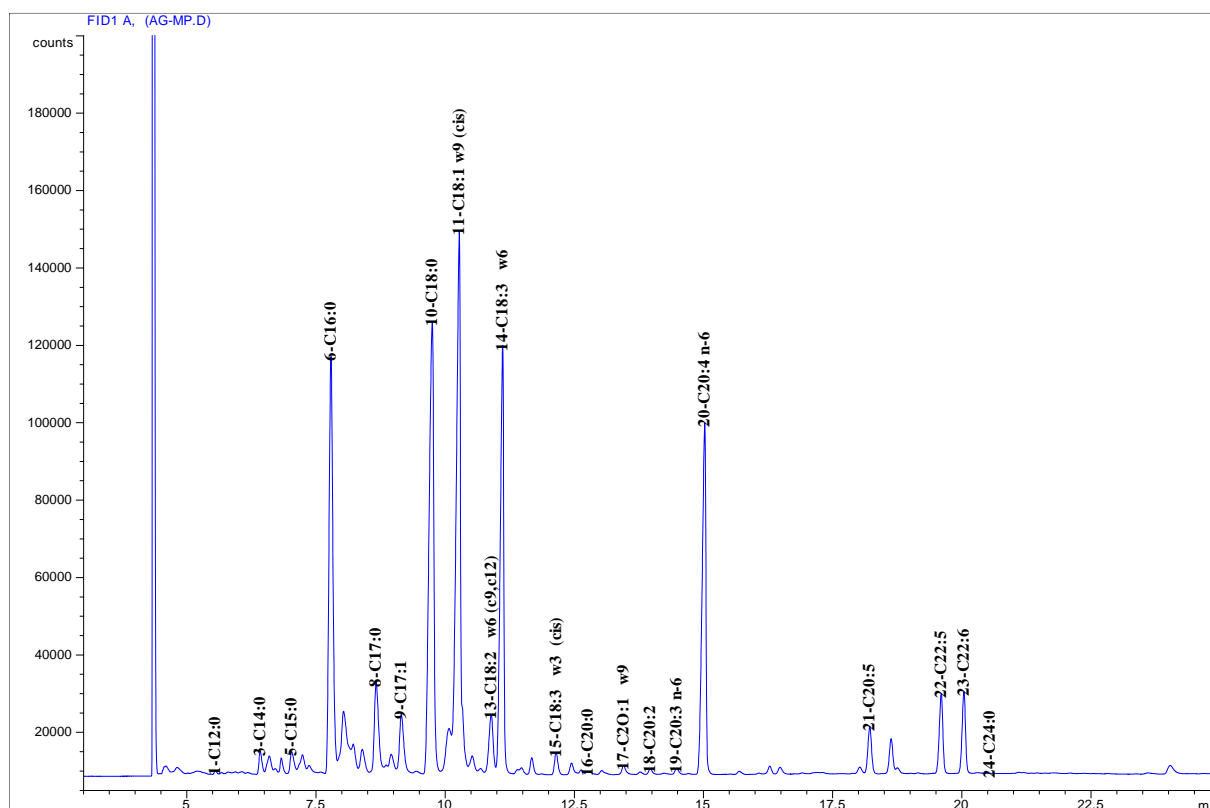


Figure 34. Chromatogramme de l'extrait hexane de la méduse *Rhizostoma pulmo* lyophilisée

Le chromatogramme ci-dessus (Fig. 34) montre que l'extrait à l'hexane de la méduse est riche en acides gras ; il possède un profil très diversifié et à des pourcentages différents qui sont détaillés dans le tableau suivant :

Tableau 6. Liste des acides gras et leurs proportions dans l'extrait à l'hexane de la méduse lyophilisée (LH)

<i>Nomenclature</i>	<i>Acide Gras</i>	<i>Pourcentage (%)</i>
1-C12:0	Acide laurique	0,50
2-C13:0	Acide tridécanoïque	0,59
3-C14:0	Acide myristique	0,37
4-C14:1 w9	Acide myristoléique	0,10
5-C15:0	Acide pentadécanoïque	0,48
6-C16:0	Acide palmitique	32,16
7-C16:1 w7 (cis)	Acide palmitoléique	0,62
8-C17:0	Acide heptadécanoïque	0,94
9-C17:1	Acide cis-10-heptadécénoïque	0,63
10-C18:0	Acide stéarique	32,69
11-C18:1 w9 (trans)	Acide élaïdique	6,18
12-C18:1 w9 (cis)	Acide oléique	2,72
13-C18:2 w6 (c9, c12)	Acide linoléique	1,35

14-C18:3 w6	Acide γ -linoléique	0,25
15-C18:3 w3 (cis)	Acide alpha-linolénique	0,21
16-C20:0	Acide arachidique	0,10
17-C20:1 w9	Acide gadoléique	0,26
18-C20:2	Acide dihomo-gamma-linolénique	0,16
19-C20:3 n-6	Acide cis-8,11,14-éicosatriénoïque	0,18
20-C20:4 n-6	Acide arachidonique	8,75
21-C20:5	Acide eicosapentaénoïque	4,00
22-C22:5	acide docosapentaénoïque	1,55
23-C22:6	Acide docosahexaénoïque	5,08
24-C24:0	Acide lignocérique	0,11

Le tableau 6 confirme la panoplie diversifiée en acides gras révélée sur le chromatogramme. On peut noter une abondance particulière des acides gras saturés ; l'acide palmitique et l'acide stéarique, conformément à la littérature. Il est à mentionner que l'acide palmitique a un rôle important dans l'induction d'une réaction inflammatoire au sein des astrocytes et des neurones (Beaulieu, 2018). En effet, il active le TLR4 et induit la sécrétion de cytokines pro inflammatoires dans des astrocytes cultivés, puis qu'il module le traitement amyloïde dans les neurones et les astrocytes responsables de la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer (Patil et Chan 2005 ; Gupta et al., 2012 ; Kim et al., 2017). Ainsi, l'extrait de l'espèce *R. pulmo* semblerait être un bon produit à valoriser contre la maladie d'Alzheimer.

5. Analyse des spectres RMN 1H des extraits préparés

5.1. Etude RMN 1H des produits d'extraction liquide-liquide

L'utilisation de la spectrométrie RMN ^1H à champ moyen (300 MHz) permet une bonne résolution des protons correspondant aux groupes méthyle, méthylène et méthines (0,8 à 5,5 ppm), ce qui nous permet d'avoir plus d'informations sur la présence d'acides gras dans un échantillon (Figure 35).

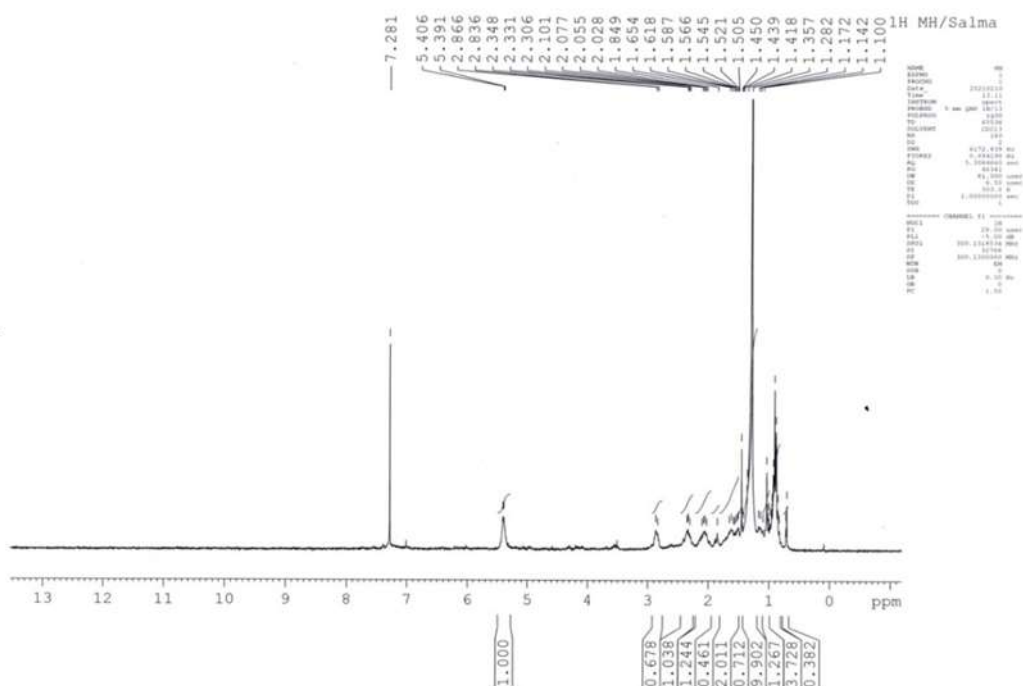


Figure 35. Spectre RMN ^1H de l'extrait de l'hexane de la méduse (MH) (CDCl_3 , 300 MHz)

L'allure du spectre RMN ^1H des acides gras est très remarquable chez les spécialistes. L'observation de signaux caractéristiques à des déplacements chimiques bien précis suffit pour confirmer la présence de tels composés. Chaque signal du spectre correspond à un déplacement chimique, chacun dépend de l'environnement chimique de la molécule pour cela on trouve les signaux dispersées de 0,5 à 18 ppm.

Le spectre (Fig. 35) présente un signal important dans la fraction des hydrocarbures, ainsi qu'un autre signal de moindre importance, mais remarquable au niveau de la fraction des éthyléniques.

Le tableau suivant (Tableau 7) regroupe tous les signaux observés sur le spectre RMN ^1H de MH avec l'attribution de chacun.

Tableau 7. Les déplacements chimiques par ppm des signales du spectre MH et leurs attributions

RMN ^1H de MH		
Signal	δ (ppm)	Attribution (proton)
1	7,28	CHCl_3 (chloroforme, solvant)
2	5,40	$\text{CH}=\text{CH}$ (hydrogène éthylénique d'une chaîne d'acide gras)
3	2,86	$\text{CH}=\text{CH}\underline{\text{CH}_2}\text{CH}=\text{CH}$ (hydrogène bis-allylique du groupe linoléyle et linolényle)

4	2,33	CH ₂ COO (méthylène en α du carbonyle)
5	2,10	CH ₂ CH=CH (méthylène allylique)
6	1,54	CH ₃ C=C (méthyle allylique)
7	1,28	(CH ₂) _n (chaîne aliphatique saturée)
8	1,10	CH ₃ (méthyle terminale)

Dans le spectre de l'extrait MH, on trouve 8 signaux hydrogènes, dont chacun correspond à une fonction chimique. On remarque que la plupart des signaux sont groupés de 1,10 à 2,86 ppm. Le dernier signal correspondant à plusieurs CH₃ superposés, montre la présence d'un mélange d'acides gras insaturés (Figure 36).

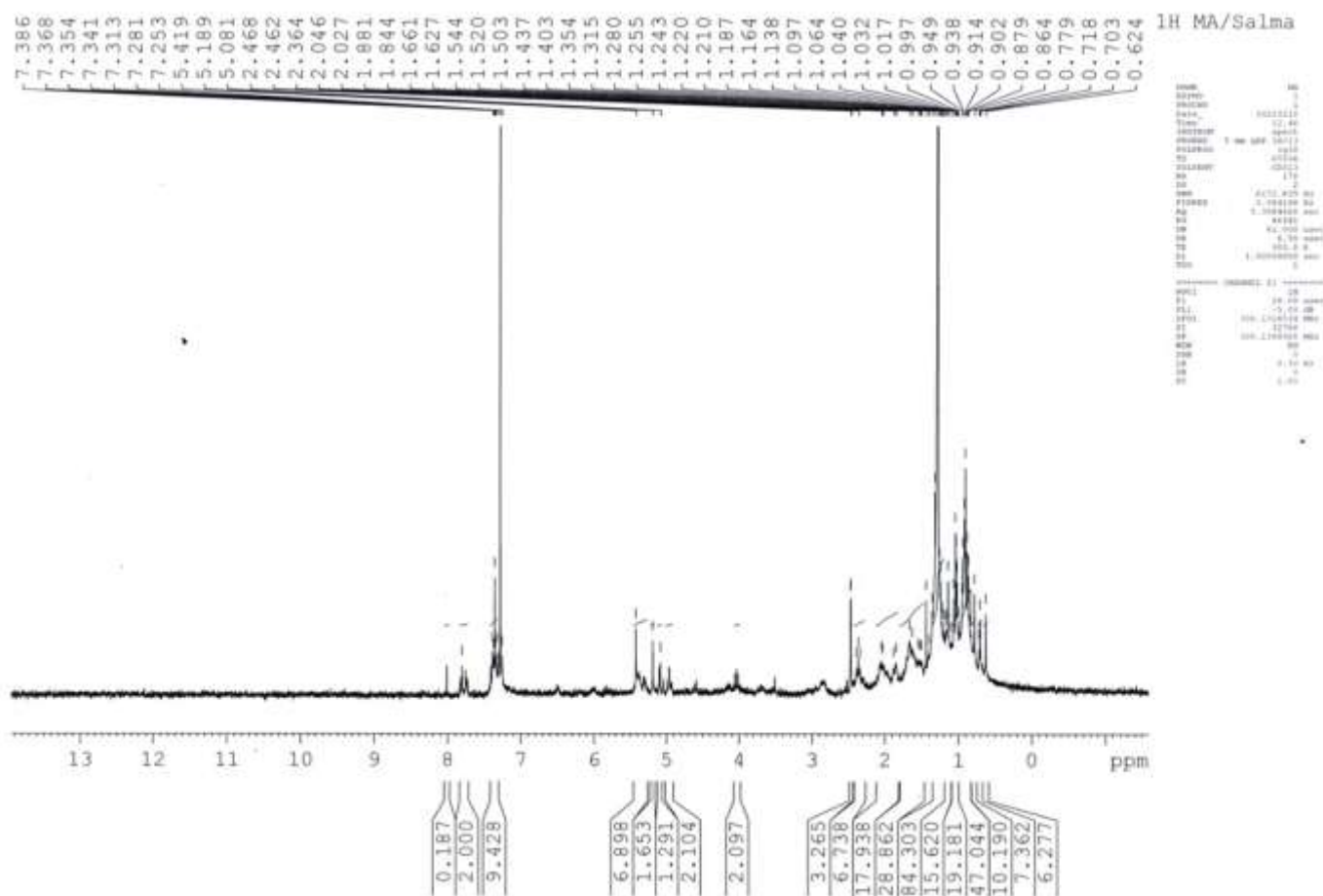


Figure 36. Spectre RMN¹H de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la méduse (MA) (CDCl₃, 300 MHz)

L'analyse de ce spectre MA est réalisée sur 3 parties selon le déplacement chimique. Une première partie allant de 0,5 à 3 ppm correspondant à des chaînes hydrocarbonées constituent la plupart des molécules extraite par l'acétate d'éthyle. Les spectres de la deuxième partie entre

5 et 5,5 ppm est un signe de la présence de proton éthylénique (CH=CH). Enfin, en troisième partie allant de 7,4 à 8 ppm correspond à des protons des composés aromatiques (Benzéniques) (Figure 36).

5.2. Etude RMN 1H des produits de biotransformation

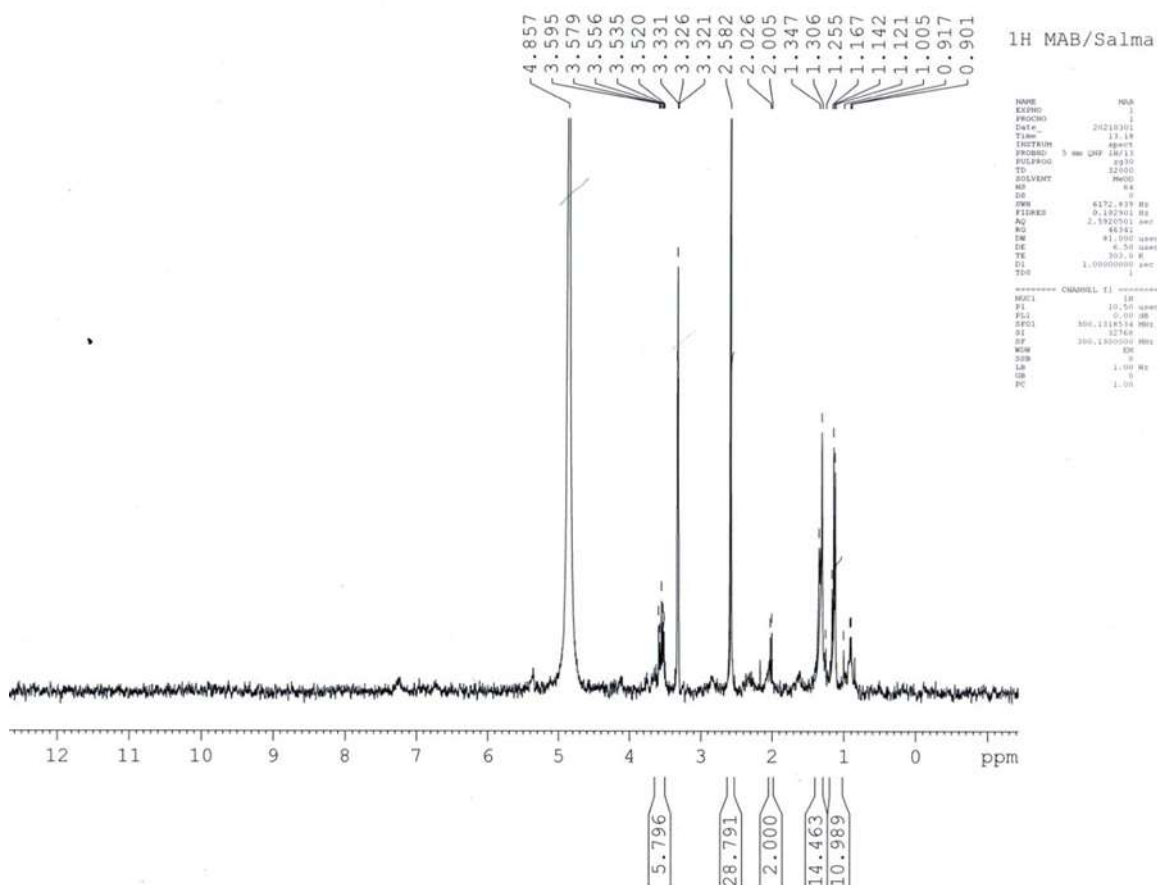


Figure 37. Spectre RMN1H de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la méduse après biotransformation (MAB) (CDCl3, 300 MHz)

5.3. La comparaison entre les études RMN 1H des produits d'extraction liquide-liquide et de biotransformation

a. Comparaison entre les spectres MH et MA

Les signaux à 5ppm et au niveau de la partie aromatique, sont des signaux des acides gras, similaires à ceux du spectre MH. Ceci montre que l'extraction par hexane n'était pas totale pour un problème de différence de polarité entre ce solvant et l'eau qui constitue la majorité de la méduse.

L'acétate d'éthyle a continué l'extraction du reste des acides gras à côté d'autres produits aromatiques, éthyléniques et hydroxylés (signal à 4 ppm) généralement porté par un alcool hydroxylé relativement plus polaire que les acides gras (Fig. 35 et 36).

b. Comparaison MAB et MA

La comparaison du spectre de l'extrait à l'acétate d'éthyle bio transformé (MAB) avec celui du même extrait avant biotransformation nous a permis de constater la disparition des protons aromatiques dans la zone 7,4 - 8 ppm, des signaux des protons éthyléniques entre 5 et 5.5 ppm et la plupart des signaux entre 0.5 et 3 ppm qui correspondent aux acides gras extraits à l'acétate d'éthyle.

En contrepartie, nous observons sur les spectres RMN 1 H de l'extrait d'acétate d'éthyle biotransformé de nouveaux signaux à 3,5 ; 2,5 et entre 1 et 1,2 ppm, qui pourrait être signe de la biotransformation de la plupart des constituants de cet extrait par la levure de boulangerie.

L'insolubilité de cet extrait biotransformé dans le chloroforme deutéré $CDCl_3$ utilisé pour l'enregistrement du spectre RMN¹H de l'extrait avant biotransformation constitue une autre preuve de la bioconversion des composés initiaux en d'autres plus polaires solubilisées dans le méthanol deutéré (Fig. 36 et 37).

Concernant les spectres de biotransformation et du contrôle négatif on remarque qu'ils dépendent presque de la même allure qui correspondent à la levure de boulangerie, donc on ne peut pas visualiser l'effet de la biotransformation sur la méduse à cause de l'abondance de la levure (Voir annexe 1 et 2).

Pour les spectres MB, MBB et LM il y a un problème de solubilité des extraits dans les solvants deutéré disponibles au laboratoire, il nous a été donc difficile de détecter des signaux clairs qui correspondent aux protons des molécules extraites (voir annexe 3 et 4).

L'étude réalisée par Angilè et al (2020) autour des spectres RMN de chaque organe à part de méduse *R. pulmo* (gonade des femelles, tentacules et l'ombrelle), a montré que les ovaires sont plus riches en raison de la présence d'acides gras polyinsaturés, d'acides aminés libres (essentiels et non essentiels) et d'osmolytes (homarine et bétaïne). Alors que dans notre cas, nous avons obtenu ces résultats à partir d'un mélange de méduse et non pas d'organes particuliers.

6. Analyse des spectres infrarouge

Cette technique permet de caractériser les changements globaux de nature des fonctions chimiques présentes à la surface ou dans le matériau comme l'illustrent de manière non exhaustive. On utilise la spectromètre FTIR (Fourier Transform InfraRed spectroscopy) pour réaliser les spectres infrarouges des extraits de la méduse.

Dans cette étude on a effectué 3 spectres des 3 extraits chacun de masse égale à 10 mg, à savoir :

* LM Extrait méthanolique de la méduse lyophilisée

* MB : Extrait butanolique de la solution de méduse

* MAB : Extrait d'acétate d'éthyle de la méduse après biotransformation

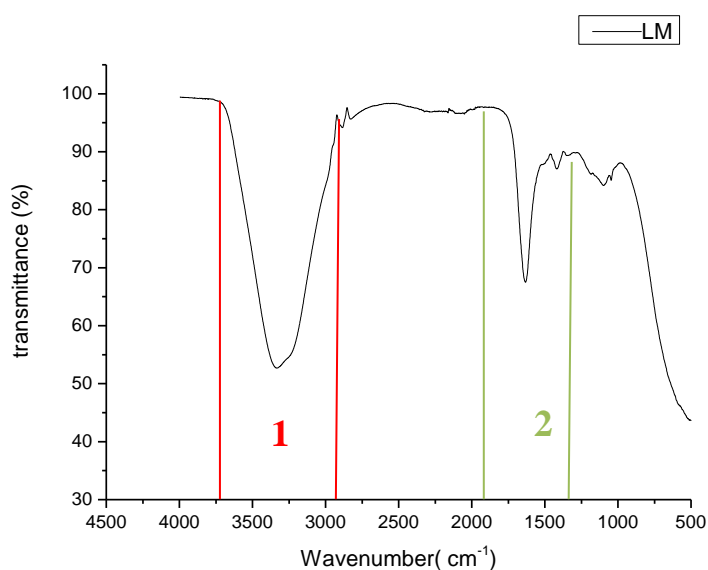


Figure 38. Spectre infrarouge de l'extrait méthanolique de la méduse lyophilisée (LM)

On remarque la première et la plus grande bande est entre 3000 et 3600 cm^{-1} , elle présente le groupement -OH qui correspond à un alcool ou phénol. Par ailleurs, les bandes entre 1500 et 1700 cm^{-1} sont attribuées à la bande d'élongation de $\text{C}=\text{O}$; correspondant à une cétone (Figure 38).

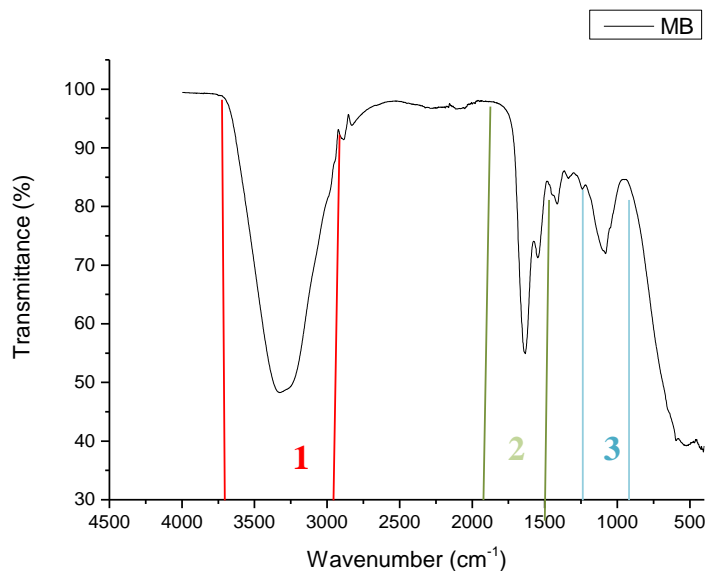


Figure 39. Spectre infrarouge de l'extrait butanolique de la méduse (MB)

Le spectre infrarouge de l'extrait butanolique de la méduse (MB) (Figure 39) montre 3 bandes claires:

- * De 1020 à 1230 cm^{-1} : une bande moyenne correspond à une liaison C-N.
- * De 1500 à 1700 cm^{-1} : cette bande présente un groupement C=O, qui correspond à un cétone.
- * De 3000 à 3600 cm^{-1} : une grande bande présente le groupement -OH, qui correspond à un alcool ou phénol.

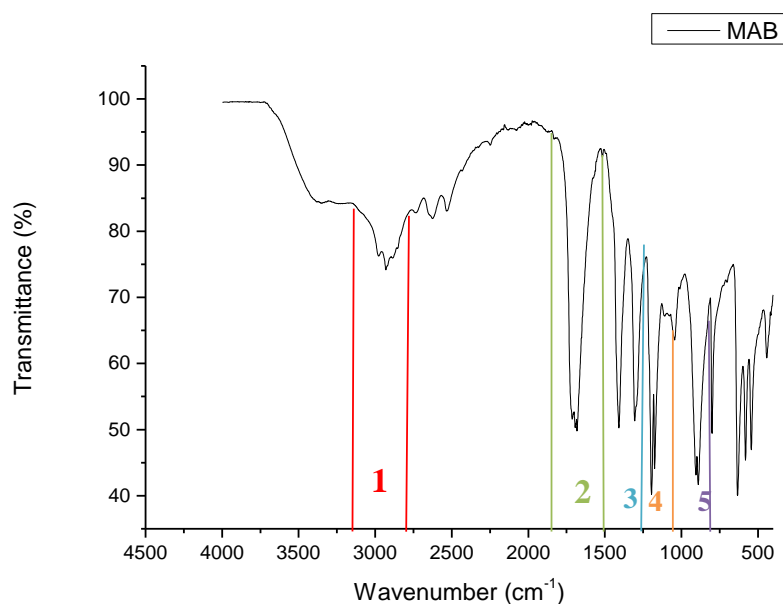


Figure 40. Spectre infrarouge de l'extrait d'acétate d'éthyle de la méduse bio transformé (MAB)

Le dernier spectre de l'extrait MAB est le plus compliqué puisqu'il présente plusieurs bandes très rapprochées. La première bande se situe entre 2750 et 3200 cm^{-1} , correspondant au groupement H-C=O. Pour la deuxième bande, elle correspond à un groupement C=O, ayant une forte bande située entre 1500 et 1700 cm^{-1} .

La troisième partie du spectre est composée en réalité de 2 bandes de même taille et forme. Les deux correspondent au même groupement chimique C-N. Quant à les 4èmes et 5èmes bandes sont de taille plus grande que les 3èmes et correspondent au groupement C=O (Figure 40), ce qui reflète la présence de composés aromatiques.

III. Activité anti- α -amylase

La teneur en protéines élevée trouvée dans cette étude nous a guidé vers la recherche de l'effet de ces protéines sur l'activité anti-alpha-amylase.

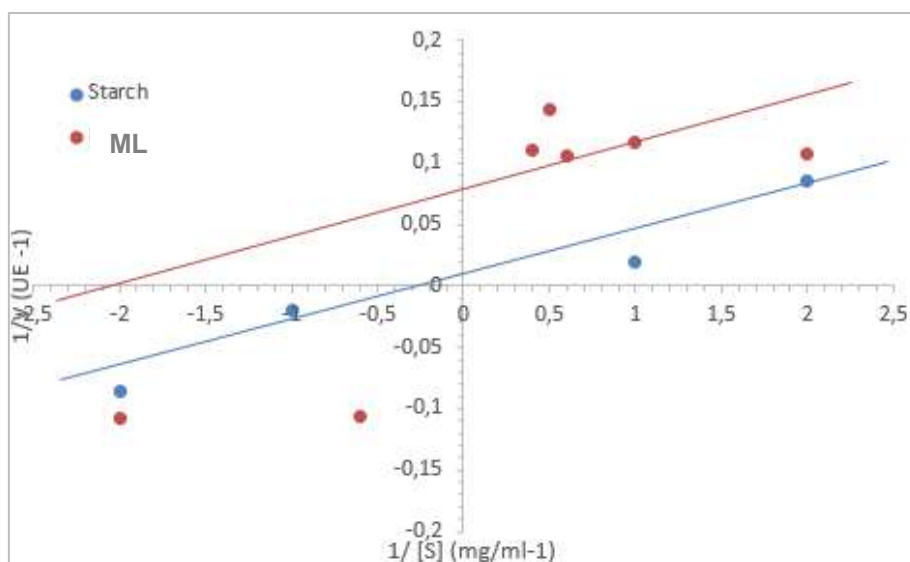


Figure 41. Diagramme de Lineweaver-Burk de l'effet de ML sur l'activité catalytique de l'alpha-amylase en présence de l'amidon

La figure 41 présente la variation de la concentration de substrat, ce qui est dans notre cas l'amidon (en bleu) en présence de ML (en rouge). La valeur des IC_{50} correspond aux concentrations inhibitrices de chaque extrait. Les résultats représentent les moyennes de trois expériences indépendantes en trois exemplaires ; dans notre cas IC_{50} est égale à 0,001 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A partir de cette courbe, on peut déterminer les deux paramètres cinétiques de l'activité enzymatique aussi bien pour l'amidon que notre extrait.

La courbe de l'amidon passe par l'axe des abscisses en $-1/K_M = -0,3$, donc K_M est égale à 0,003 $\mu\text{g}/\text{ml}$, et passe par l'axe des ordonnées en $1/V_{\text{max}} = 0,01$, équivalent à $V_{\text{max}} = 100$ UE.

En d'autres parties, pour l'extrait, la courbe passe par l'axe des abscisses en $-1/K_M = -2$ ce qui donne une valeur K_M de l'ordre de $0,005 \mu\text{g/mL}$; et passe par l'axe des ordonnées en $1/V_{\text{max}} = 0,08$ donnant un $V_{\text{max}} = 12,5 \text{ UE}$. Ces résultats affirment que les deux paramètres cinétiques de l'activité de l'alpha amylase ont diminué en présence de cet extrait ML, contenant des inhibiteurs incompétitifs (Figure 41).

En effet, un inhibiteur incompétitif ne se fixe jamais à l'enzyme libre mais seulement à l'enzyme complexée avec le substrat ES et empêche la formation des produits. Généralement, la liaison du substrat sur l'enzyme entraîne une modification de la conformation de l'enzyme par ajustement induit, révélant ainsi un site de fixation pour l'inhibiteur. L'inhibiteur, en retour, modifie la conformation du site actif de l'enzyme, et empêche la réaction (Strelow et al., 2012).

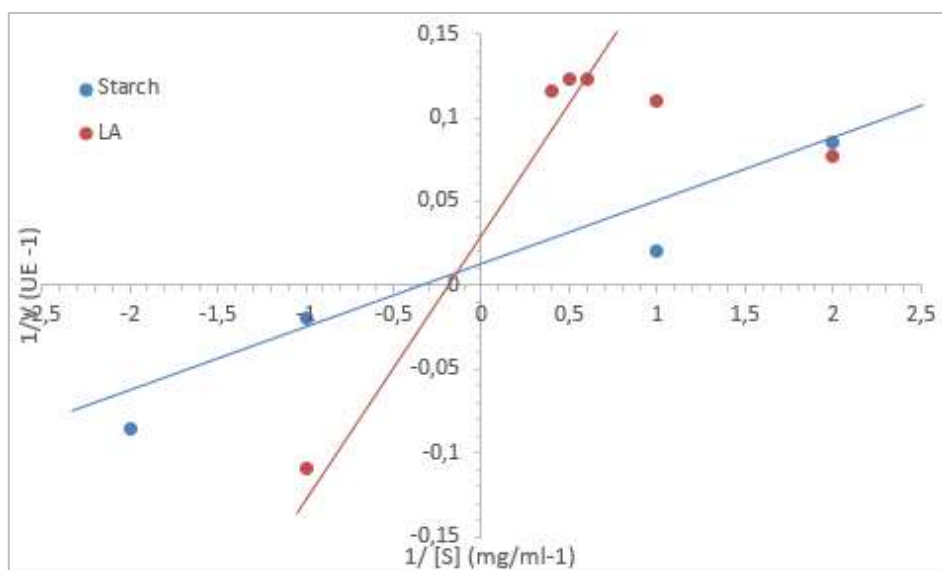


Figure 42. Diagramme de Lineweaver-Burk de l'effet de LA sur l'activité catalytique de l'alpha-amylase en présence de l'amidon

Dans ce cas, IC_{50} est égale à $0,00025 \mu\text{g/mL}$. La valeur de K_M varie avec des affinités différentes puisque les deux courbes de l'extrait LA et du substrat Amidon coupent l'axe des abscisses dans le même point, mais ils possèdent la même valeur, $-1/K_M = -0,2$ donc K_M est égale à $0,005 \mu\text{g/ml}$ pour l'amidon. Celle-ci diminue à $0,0025 \mu\text{g/ml}$, alors que ce n'est pas le cas pour V_{max} , puisqu'il diminue de 100 UE à 33 UE en présence de LA (Figure 42).

Ceci signifie que LA comporte un inhibiteur mixte. En fait, l'inhibition mixte est une généralisation des inhibitions précédentes dans laquelle l'inhibiteur se lie à la fois avec l'enzyme libre et avec l'enzyme liée au substrat, mais avec des affinités différentes : $K_i \neq K_I$ (Strelow et

al., 2012). On distingue deux types d'inhibitions mixtes : l'inhibition compétitive - non compétitive ($K_I > K_i$) et l'inhibition non compétitive - incompétitive ($K_I < K_i$), notre cas c'est la première.

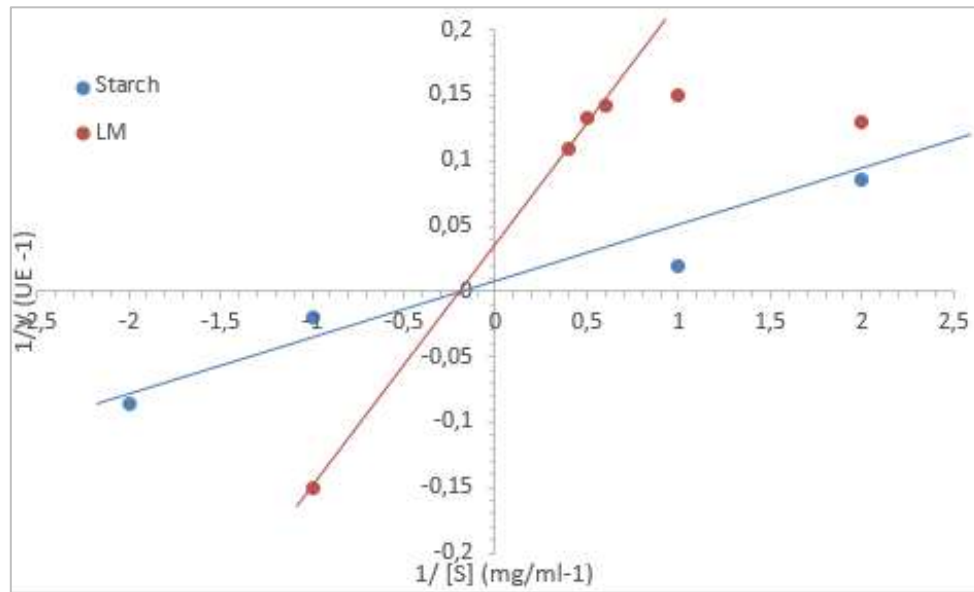


Figure 43. Diagramme de Lineweaver-Burk de l'effet de LM sur l'activité catalytique de l'alpha-amylase en présence de l'amidon

Ce diagramme présente l'intersection des courbes de l'amidon et de l'extrait LM en un seul point qui correspond à $-1/K_M = -0,2$, donnant ainsi une valeur de K_M égale à $0,005 \mu\text{g/ml}$, qui est constante pour LM et l'amidon. Alors que V_{max} varie pour une valeur de 100 UE en présence de l'amidon, qui diminue à 24 UE suite une fois LM est utilisé, contenant un inhibiteur non compétitif (Figure 43).

Un inhibiteur non compétitif peut se lier à la fois, et avec une même affinité, sur l'enzyme libre et sur l'enzyme liée au substrat. Cependant, l'inhibiteur et le substrat n'entrent pas en compétition pour se fixer sur un même site. Le substrat se lie au site actif, et l'inhibiteur à un autre site de fixation. L'inhibiteur entraîne une modification de la conformation du site actif, ce qui empêche la transformation du substrat en produit mais n'influe pas sur la reconnaissance entre l'enzyme et le substrat (Laidler, 1978 ; Strelow et al., 2012).

IV. Activité anticoagulante

Cette activité a été réalisée pour identifier un éventuel effet de nos extraits pouvant influencer la voie endogène du phénomène de coagulation à une forte concentration (1 mg/ml), et ce en mesurant le TCA (Temps de la céphaline activée) de ces extraits, utilisant le plasma pauvre en plaquettes préparé. Le tableau 8 présente le temps de coagulation de chaque extrait. Nos références sont les valeurs normales de TCA sont entre 37 et 40 s.

Tableau 8. Mesure de TCA (sec) pour différentes concentrations des polysaccharides

Concentration des polysaccharides	1 mg/ml		
	ML	LA	LM
Extrait			
Temps de coagulation (s)	37,2	21,1	13

D'après nos résultats, on note que l'allongement de TCA est absent pour tous les extraits secs de la méduse, et nos valeurs sont inférieures ou égales aux normes de TCA (Temps de la céphaline activée). Pour dire qu'une substance possède une activité anticoagulante, il faudrait avoir un allongement de TCA supérieure à 60 s (Chahed et al., 2019), or ce n'est pas notre cas. Ceci pourrait donc confirmer que les extraits LM, LA et ML ne possèdent pas d'activités anticoagulantes. En revanche, une étude menée par Rastogi et al (2017) a abouti à l'identification d'une métalloprotéine à activité anticoagulante « La Rhizoprotéase » présente en *Rhizostoma pulmo*. D'où la question qui se pose sur le fait que nos extraits n'exhibent aucune activité. Ceci pourraient être expliqués par le fait que l'expérience n'a pu être réalisée qu'une seule fois, faute de temps et non disponibilité au laboratoire, de plus, on ne peut pas négliger la probabilité d'erreurs au sein de laboratoire, et ça reste donc à revérifier.

Conclusion générale et perspectives

La taille de la population des méduses est en cours d'augmentation et augmentera encore à l'avenir si des facteurs de stress anthropiques et le changement climatique modifient davantage les écosystèmes pélagiques dans le monde. Par conséquent, il est devenu fondamental de mener des études sur ces espèces afin de déterminer la biomasse et les caractéristiques de ces organismes gélatineux pour estimer le potentiel de valorisation.

Cette étude résume un profil complet de la composition chimique de la méduse *Rhizostoma pulmo* et aussi la valorisation biologique de cette espèce telle que l'activité anti- α -amylase qui a montré la richesse de la méduse lyophilisée et ses extraits par différents types d'inhibiteurs.

Les résultats obtenus dans ce travail prouvent la richesse de la méduse *R. pulmo* en composés organiques (Protéines, sucres totaux, acides gras, composés volatiles, etc) malgré l'abondance de l'eau dans cette espèce.

Il est clair que la durée de stage est insuffisante pour refaire les mêmes expérience plusieurs fois et c'est le cas pour la biotransformation. Il faut donc la refaire dans de meilleures conditions pour mieux comprendre son effet sur la méduse. Il est à noter aussi que le protocole devra être optimisé en diminuant la quantité de la levure de boulangerie pour obtenir de meilleurs spectres RMN¹H des extraits bio transformés (MAB et MBB), qui avaient presque le même profil que celui du contrôle négatif (NA et NB), reflétant ainsi l'abondance de la levure.

La présente étude a révélé l'absence de l'activité anticoagulante des extraits de la méduse *Rhizostoma pulmo* (LA, LM et LM) sur la voie endogène du phénomène de coagulation, mais qui reste à vérifier.

Enfin, nos résultats ouvrent de nombreuses perspectives sur d'autres domaines de valorisation qui devraient s'intéresser à cette espèce une fois des données seront comparés ou combinés.

Références

- Angilè. F., Coco. L.D., Girelli. C.R., Basso.L., Rizzo.L., Piraino .S., Stabili .L. and .Fanizzi .F.P, (2020). *Molecules*, 806.
- Beaulieu.J, (2018). Régulation de la neuro-inflammation dans les cellules microgiales par l'acide palmitique, l'acide oléique et l'oleuropène,canada , 86-105,.
- Ben Abdallah. H. (2016), Techniques d'extraction, de purification et de conservation, Algérie.
- Ben jannet, H., Mourabit, A., Gateau, A., Marazano, C., Mighri, Z. 1999. *Tetrahedron Asym.* 10, 2381– 2386.
- Benaouida. K., (2008). Etude de l'alpha amylase de levures isolées d'un écosystème extrême (sol environnement des sources thermales) et cultivées sur un milieu de base lactosérum, Algérie,.
- Carpine, C. (1987). *Cnidaire* FAO, France.
- Chouaib. K, (2016), Synthèse d'analogues structuraux, bioconversion et valorisation biologique de tri terpènes acides extraits du grignon d'olives ,Tunisie,.
- Deleforterie. Y. (2018) Pullulation des méduses : cas d'intoxication des carnivores domestiques, cause et localisations spatio-temporelles, discussion des modèles de prévision, France..
- Djaghri. N, (2019). Variabilité et plasticité de la nutrition des méduses zooxanthellées : aperçu de l'expérience et des terrains, Bretagne, 229.
- El Darra. N, (2013). Les composés phénoliques des raisins : étude du potentiel qualitatif et des procédés émergents d'extraction, France, 351.
- Ferrari J., (2002). Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles : *Gnidia involucrata* Steud. Ex A. Rich, Suisse,.
- Frad, R., (2019), Extraction des acides gras polyinsaturés à partir des déchets de poissons, Tunisie, 59.
- Fuentes.V., Straehler.I., Atienza,Pohl,D. Franco. I., Tilves .U., Gentile. M., Acevedo .M., Olariaga .A. and Gili .G-M., (2011),,Mar Biol, 158 ,2247– 2266.Chahed.L,Balti.R,Elhiss.S,Bouchemal.N,Ajzenberg.N,Ollivier.V,Chaubet.F,Maar

- oufi. R.M, BenMansour.M, 2019, Activité anticoagulante du sulfate de chondroïtine fucosylée isolé de *Cucumaria syracusana*, *Process Biochemistry*, 1359-5113
- Giuliano, C., Clososki, C'ntia D. F., Milagre, Paulo J., Moran, J. J. Mol, (2007), *Catal. B: Enzym*, 47, 70– 76.
- Hamza, A, Ahmed, F (2019). Mise à jour des informations sur les proliférations des méduses sur les cotes tunisiennes, Tunisie.
- Hayakawa, R., Shimizu, M., Fujisawa. T. *Tetrahedron Lett.* (1996). 37, 7533– 7536.
- Jérémy, R. (2018). Jérémy, Prévention, prise en charge et traitement des blessures, piqures et envenimations de la faune marine de Guadeloupe, France.
- Laidler, (1978). *Physical Chemistry with Biological Applications*, Anglettere,
- Lahmadi.G. (2019), Etude photochimique et évaluation biologique des espèces du genre *Eucalyptus*, Tunisie.
- Leone.A. A., Lecci.R.M. i, Durante .R.M.M., Melli.MF. and Piraino.S. (2015). *Mar.Drogues*, , 13,4654-4681. Daly.Yhia.M.N. And Goy.J. Yahia-Kéfi.O.D., 2003, Distribution et écologie des Méduses (Cnidaria) du golfe de Tunis (Méditerranée sud occidentale) *,Oceanologica Acta, , 26,645–655.*
- Norouzian, D., Akbarzadeh, A., Inanlou, D., Farahmand, (2003), *B. Enzyme Microb. Technol.*. 33, 150– 153
- Öztürk.I.D. and Sümen. S.G. (2020). *J. Black Sea/Mediterranean Environment*, 3,231-237.
- Rastogi,.A., Sarkar.A., Chakrabarty.D. (2017). Purification partielle et identification d'une métalloprotéinase ayant une activité anticoagulante de *Rhizostoma pulmo* (Méduse baril), *Toxicon* .
- Rhazi, N, (2015). Mise au point de mélanges collants écologiques d'Acacia mollissima du Maroc, Maroc, 201.
- Serment, A. (2012). Dynamique et intensité de biotransformation dans le rumen, France.
- Solé.M, Lenoir.M, Fontuño .J. Durfort .M. Schaar .M. v. d. and André.M. (2016). *Scientific reports*, 6: 37979.
- Strelow J, Dewe W, Iversen PW, et al. (2012). Mechanism of Action Assays for Enzymes. In: Markossian S, Sittampalam GS, Grossman A, et al., editors. *Assay Guidance Manual*

[Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.

Tills.O. Sun. X. Rundle, D., Heimbach T. Gibson A. Cartwright unM. Palmer unT. Rudin-Bitterli . *Biologie marine expérimentale et d'écologie* , 480 , 54-61

Wolfgang, D. (2009). Le rôle de la biotransformation et de la bio activation dans la toxicité, Allemagne,

Wright, DA., Purcell, JE. (1997). Effect of salinity on ionic shifts in mesohaline Scyphomedusae, *Chysaora quinquecirrha*. *Biol Bull* 192: 332–339.

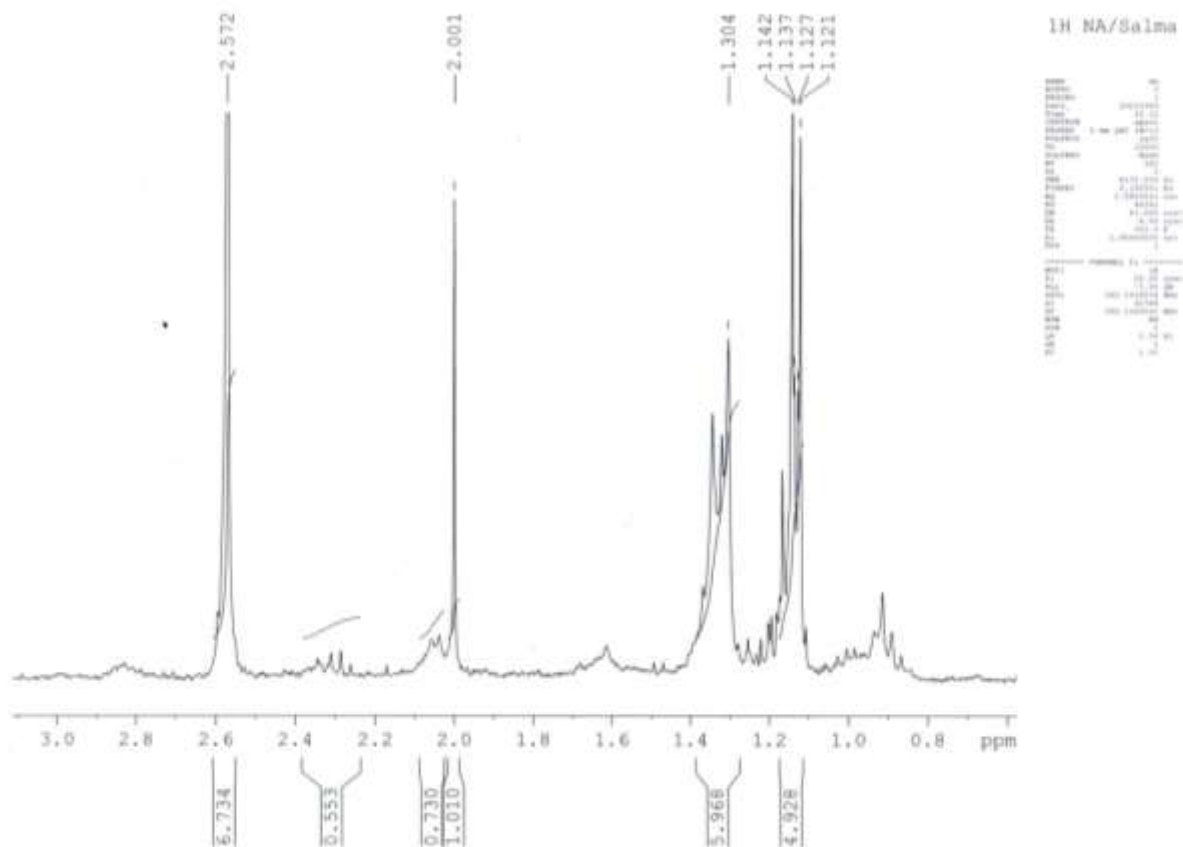
Références Web

[1] <https://fancuba.com/2018/06/13/les-piqures-de-meduses-jellyfish/>.

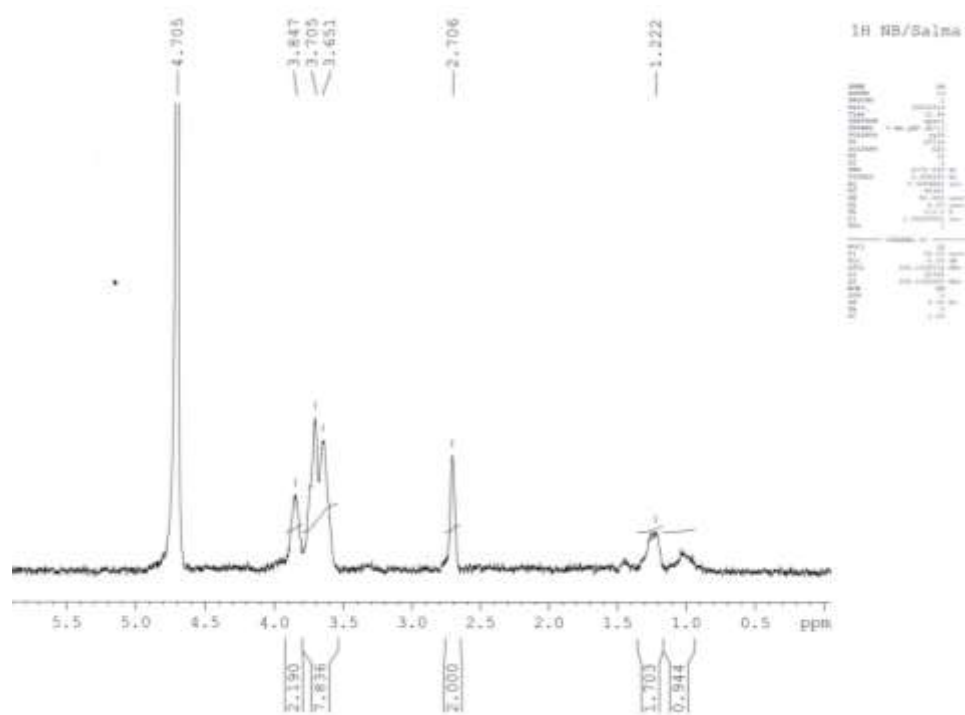
[2] <http://www.ciesm.org/gis/JW/build/JellyBlooms.php>.

[3] [Ocean-acidification-what-it-means-and-how-to-stop-it](#)

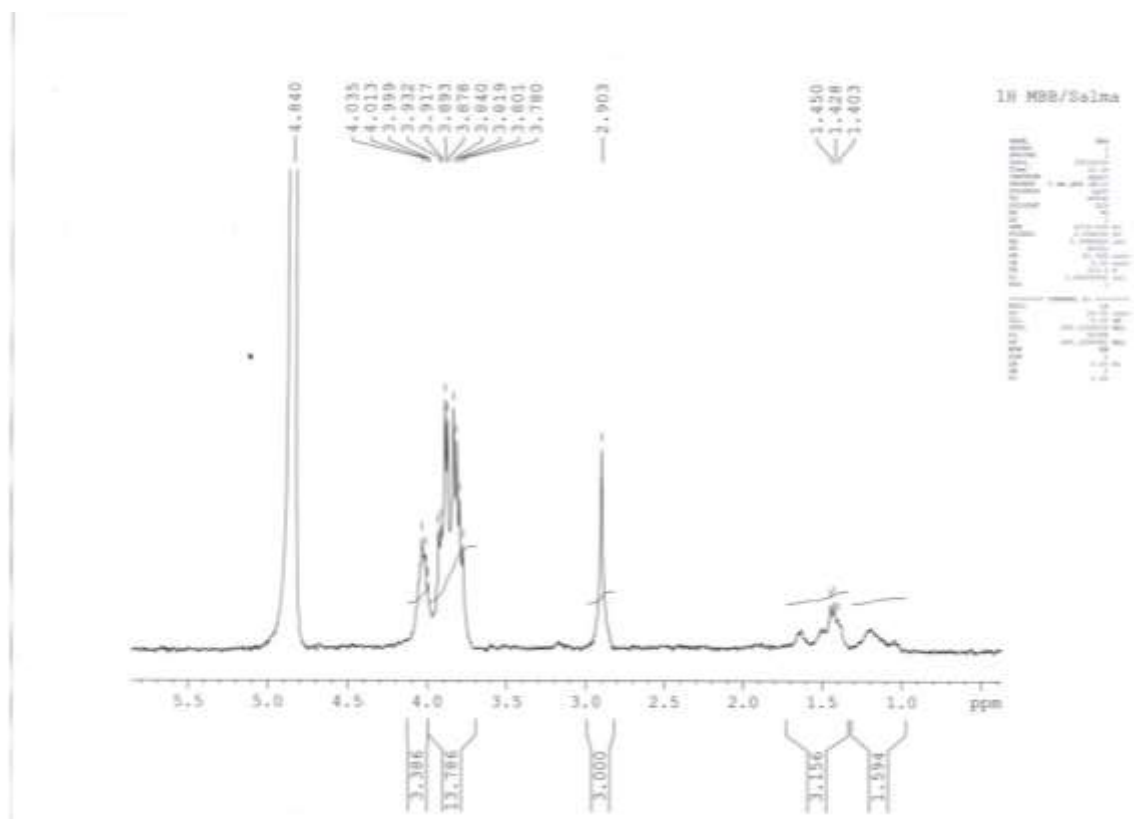
Annexes



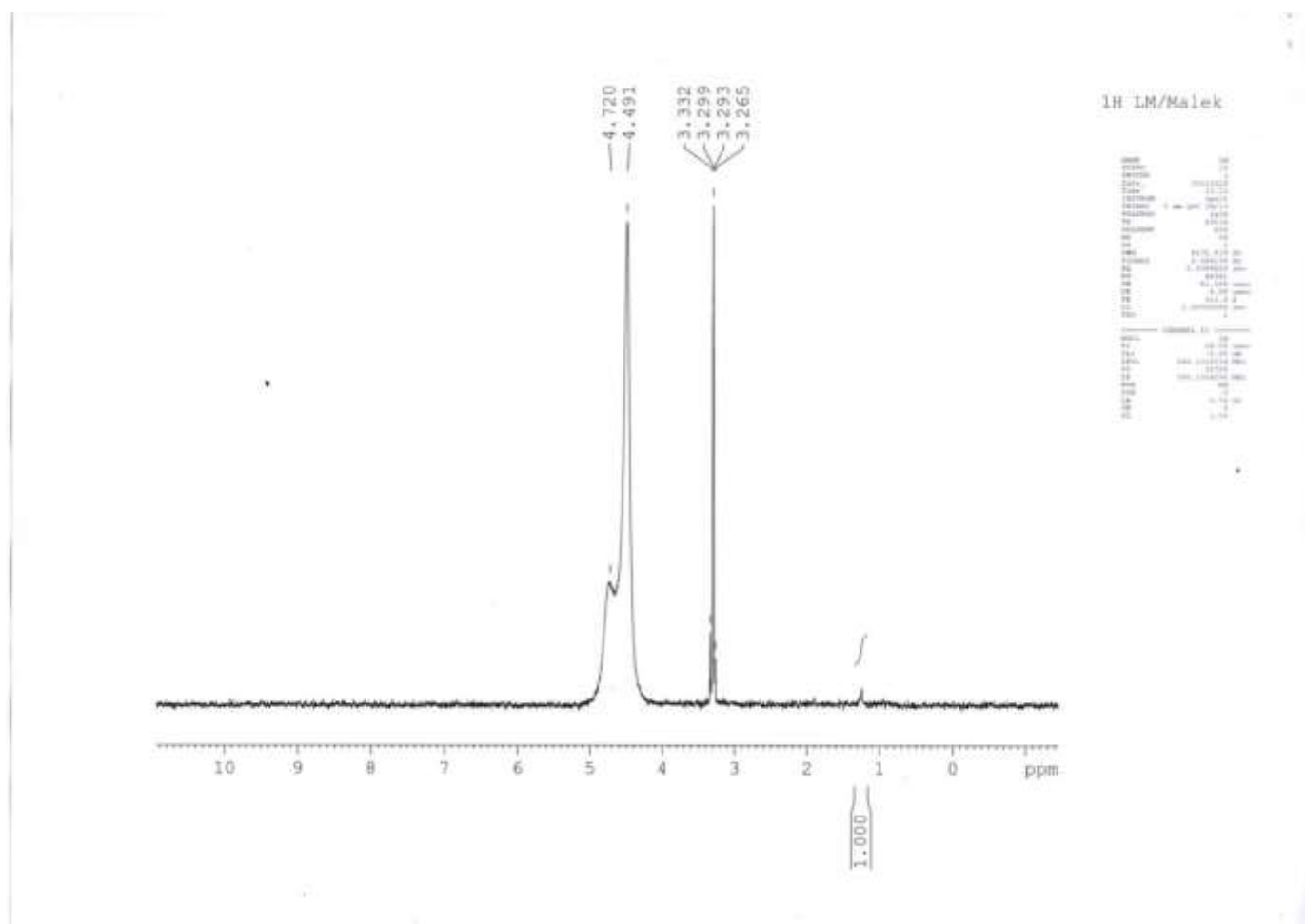
Annexe 1: Spectre RMN¹H de l'extrait d'acétate d'éthyle de contrôle négatif de la biotransformation (NA) (CDCL₃, 300MHz)



Annexe 2 : Spectre RMN¹H de l'extrait butanolique de contrôle négatif de la biotransformation (NB) (CDCl₃, 300MHz)



Annexe 3 : Spectre RMN¹H de l'extrait butanolique de la méduse après biotransformation (MBB) (CDCl₃, 300MHz)



Annexe 4 : Spectre RMN¹H de l'extrait méthanolique de la méduse lyophilisée (LM) (CDCl₃, 300MHz)

Résumé

Le bassin méditerranéen est l'une des régions les plus touchées par les phénomènes de prolifération des méduses, principalement en raison de la présence de scyphozoaires, tels que *Rhizostoma pulmo*. Dans les pays asiatiques, les méduses sont largement étudiées pour leurs bienfaits sur la santé, mais leurs valeurs nutritionnelles et nutraceutiques restent encore faiblement caractérisées.

L'abondance de ces espèces dans la baie de Monastir et surtout pendant l'été nous a donné l'idée d'étudier sa composition chimique et penser à la valorisation de ces organismes marginalisés.

Cette étude a été enrichie grâce à plusieurs études faites ; partant de la lyophilisation, jusqu'à la détermination de teneurs des protéines et des sucres, le profil des acides gras, avant de passer à des extractions (liquide-liquide/macération) et à la biotransformation. Nos résultats ont illustré un poids sec de *Rhizostoma pulmo* égal à 3,84% après lyophilisation, ainsi que des teneurs en protéines de 53 % et en sucres neutres de 30,7%. Par ailleurs, le profil des acides gras nous a permis d'identifier ceux les plus abondants chez cette espèce, à savoir l'acide palmitique et l'acide stéarique.

Des techniques de caractérisation chimique de haute résolution (RMN¹H et FTIR) ont été utilisées pour certains extraits obtenues, pour passer à la fin à des études à la recherche d'activités biologiques potentielles (activité anti- α -amylase et l'activité anticoagulante), dont la première a révélé de résultats prometteurs avec l'identification de 3 types d'inhibiteurs de cette activité (inhibiteur incompétitif de ML, inhibiteur non compétitif de LM et inhibiteur mixte de LA).

Ces résultats suggèrent que les biomasses des méduses méditerranéennes peuvent représenter une source précieuse de composés naturels, non seulement pour des applications biomédicales ou pharmaceutiques, mais aussi comme des ingrédients alimentaires comparables aux espèces des méduses asiatiques les plus populaires.