



Université du Québec
à Rimouski

**DÉTECTION D'EFFETS ANTIMICROBIENS ET
ANTIADHÉSIFS D'EXTRAITS DE COPRODUITS DU
CONCOMBRE DE MER (*Cucumaria frondosa*) ET
APPLICATION DANS LA LUTTE CONTRE LES BIOFILMS
BACTÉRIENS**

Mémoire présenté

dans le cadre du programme de maîtrise en océanographie

en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences

PAR

© ELISOA CAROLE ZAFIMIHARY

Mars 2022

Composition du jury :

**Réjean Tremblay, président du jury [Institut des Sciences de la mer de Rimouski,
Université du Québec à Rimouski]**

**Karine Lemarchand, directrice de recherche [Institut des Sciences de la mer de
Rimouski, Université du Québec à Rimouski]**

Laurent Girault, codirecteur de recherche [Merinov]

**Catherine Couillard, examinatrice externe [Institut Maurice Lamontagne, Ministère
des Pêches et Océans Canada]**

Dépôt initial le [01 Décembre 2021]

Dépôt final le [23 Mars 2022]

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près et de loin à la réalisation de ce projet de mémoire, pour leur soutien et leur patience, sans eux, ce mémoire n'aurait pas vu le jour.

Premièrement, je remercie ma professeure Karine Lemarchand, elle m'a accueillie alors qu'elle ne me connaissait pas encore, elle m'a toujours soutenue même dans les moments les plus difficiles de mon intégration, elle m'a toujours inspirée dans sa manière de travailler et son excellence en transfert de connaissance. Je remercie également mon co-directeur Laurent Girault ainsi que toute l'équipe de Mérinov, pour leurs nombreux conseils et pour m'avoir soutenu pendant mes travaux de laboratoire.

J'aimerais aussi porter une attention à l'équipe du laboratoire de microbiologie de l'ISMER, spécialement à Kim Doiron, Mathieu Millour et Dominique Massé, pour leur aide et leurs conseils durant mes travaux de laboratoire. Je remercie aussi Mitacs, l'entreprise Les enduits Mirapakon, Merinov, poissonnerie Cloridorme et UQAR/ISMER pour leur soutien financier.

Je remercie également mes amis pour leur soutien sans limite, Christelle, Anne-Sophie, Abi, Prince et Nadia pour m'avoir supportée tout au long de ce processus. ; sans eux, j'aurais déjà perdu le sourire, merci infiniment.

Je dédie ce mémoire à ma famille qui, de loin m'ont toujours encouragée et soutenue afin que je ne perde pas mon objectif de vue, mille mercis, tout ce que j'ai vécu durant la réalisation de ce projet m'a changé et m'a fait devenir une meilleure version de moi-même, grâce à vous tous, merci infiniment.

RESUMÉ

Au Québec, l'exploitation de l'espèce de concombre de mer *Cucumaria frondosa* génère une quantité considérable de coproduits à éliminer. Cette biomasse est reconnue dans la littérature en tant que source de molécules bioactives présentant des activités antimicrobiennes intéressantes, pouvant être valorisées et utilisées dans le domaine des biotechnologies. La présente étude a pour objectif d'évaluer le potentiel antibactérien d'extraits riches en saponines provenant de coproduits de *C. frondosa* pour des applications dans le domaine agroalimentaire et pour la réduction du biofouling. L'effet antibactérien de ces extraits a été évalué sur des bactéries agroalimentaires et marines, et l'effet antiadhésif a été analysé sur des bactéries marines responsables de formation de biofilms en milieu marin.

Les tests d'activité antibactérienne ont portés sur des extraits enrichis en saponine, bruts ou traités par dialyse, préparés à partir de coproduits de concombres de mer pêchés sur la côte nord de la Gaspésie durant l'été 2017. Les analyses ont été effectuées dans des microplaques de 96 puits, en conditions contrôlées, en présence de 5 concentrations d'extraits. Des cinétiques de croissance de 24h ont été réalisées avec huit répliques du produit par concentration, puis, la densité optique a été mesurée automatiquement toutes les 30 minutes par spectrophotométrie. La cinétique bactérienne a permis de déterminer les temps de latence, la concentration minimale inhibitrice (CMI), les taux de croissance et la densité optique à 24h pour chacune des souches bactériennes en présence des différentes concentrations testées. Une solution pure de saponines commerciales a également été testée dans les mêmes conditions pour vérifier les effets des saponines sur les souches bactériennes.

Les résultats obtenus montrent que les extraits expérimentaux (bruts et dialysés) ne présentent pas d'effets antibactériens significatifs par contre, les extraits expérimentaux dialysés présentent des effets antiadhésifs intéressants ; les extraits empêchent l'adhésion des bactéries à partir de la concentration 1mg.mL^{-1} et on atteint 100% de réduction de l'adhésion à 5mg.mL^{-1} de concentration. Les extraits riches en saponines ne présentent pas d'effets antibactériens significatifs, toutefois, les résultats de ce projet pourraient justifier de futurs travaux dans un but d'une potentielle exploitation du pouvoir antiadhésif des extraits.

Mots clés : *Cucumaria frondosa*, coproduit, saponines, extraits, antibactérien, antiadhésifs, valorisation.

ABSTRACT

In Quebec, the exploitation of the sea cucumber species *Cucumaria frondosa* generates a considerable quantity of co-products to be disposed of, while this biomass is recognized in the literature as a source of bioactive molecules with interesting antimicrobial activities, which can be valued and used in the field of biotechnology. The present study aims to assess the antibacterial potential of saponin-rich extracts of *C. frondosa* co-products, for applications in the food industry and for biofouling reduction. The antibacterial effect of these extracts was evaluated on agri-food and marine bacteria, and the antiadhesive effect was analyzed on marine bacteria responsible for biofilm formation in the marine environment.

Antibacterial activity tests were performed on saponin-enriched extracts, raw or dialysis-treated, prepared from sea cucumber co-products fished on the north coast of Gaspésie during the summer 2017. The analyses were performed in 96-well microplates, under controlled conditions, in the presence of 5 concentrations of extracts. Growth kinetics for 24 hours were performed with eight replicates of the product per concentration, then, the optical density was automatically measured every 30 minutes by spectrophotometry. Bacterial kinetics were used to determine lag times, minimum inhibitory concentration (MIC), growth rates and optical density at 24 hours for each bacterial strain in the presence of the different concentrations tested. A pure solution of commercial saponins was also tested under the same conditions to verify the effects of saponins on the bacterial strains.

The results obtained show that the experimental extracts (raw and dialyzed) do not show significant antibacterial effects. On the other hand, the experimental dialyzed extracts show interesting anti-adhesive effects; the extracts prevent the adhesion of bacteria from the concentration 1mg.mL^{-1} and we even reach 100% reduction of adhesion at 5mg.mL^{-1} of concentration. The extracts rich in saponins do not present significant antibacterial effects, however, the results of this project could justify future work with the aim of a potential exploitation of the anti-adhesive power of these extracts .

Keywords: *Cucumaria frondosa*, coproducts, saponins, extracts, antibacterial, antiadhesives, valuation.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	v
RÉSUMÉ	vi
ABSTRACT	viii
TABLE DES MATIÈRES	x
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES FIGURES	xiii
1. INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1 GENERALITES SUR LES CONCOMBRES DE MER	3
1.1.1 Caractéristiques des concombres de mer	4
1.1.2 Biologie des concombres de mer.....	6
1.1.3 L'espèce de concombre de mer <i>Cucumaria frondosa</i>	7
1.2 L'EXPLOITATION DES CONCOMBRES DE MER	8
1.3 POTENTIEL BIOTECHNOLOGIQUE DES CONCOMBRES DE MER ...	10
1.4 INTERETS DES CONCOMBRES DE MER DANS LE DOMAINE DE LA MICROBIOLOGIE	12
1.4.1 Propriétés antibactériennes des extraits des concombres de mer	13
1.4.2 Propriétés antiadhésives des extraits de concombres de mer	14
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	17
2.1 PREPARATION DES EXTRAITS RICHES EN SAPONINES DE COPRODUITS DE <i>C. FRONDOSA</i>	17
2.1.1 Préparation des extraits riches en saponines de coproduits de <i>C. frondosa</i>	17
2.1.2 Production d'extraits riches en saponines à partir de coproduits de <i>C.</i> <i>frondosa</i>	17
2.2 ANALYSE DE L'EFFET ANTIMICROBIEN DES EXTRAITS RICHES EN SAPONINES DE COPRODUIT DE <i>C. FRONDOSA</i>	18

2.2.1	Présentation des souches bactériennes utilisées pour les analyses ...	20
2.2.2	Préparation des souches bactériennes pour les analyses	22
2.2.3	Préparation des milieux de culture et des solutions	24
2.2.4	Préparation des traitements	24
2.2.5	Préparation des microplaques	25
2.2.6	Mesure de croissance bactérienne	26
2.3	EFFETS ANTIADHESIFS DES EXTRAITS RICHES EN SAPONINES DE <i>C. FRONDOSA</i>	27
2.3.1	Préparation des solutions	28
2.3.2	Préparation des revêtements antiadhésifs	28
2.3.3	Préparation des souches bactériennes	29
2.3.4	Détermination de la durée d'incubation	30
2.3.5	Préparation de la microplaque	31
2.4	EXTRACTION ET TRAITEMENTS DES DONNEES	34
3.	RÉSULTATS	35
3.1	LES EXTRAITS DE COPRODUITS DE <i>C. FRONDOSA</i>	35
3.2	POTENTIEL ANTIBACTERIEN DES EXTRAITS RICHES EN SAPONINES DE COPRODUITS DE <i>C. FRONDOSA</i>	36
3.2.1	Analyses du potentiel antibactérien des saponines commerciales	36
3.2.2	Analyses du potentiel antibactérien des extraits bruts riches en saponines de coproduits de concombres de mer	38
3.2.3	Analyses du potentiel antibactérien des extraits dialysés riches en saponines de coproduits de concombres de mer	42
3.3	POTENTIEL ANTIADHESIF DES EXTRAITS RICHES EN SAPONINES DE COPRODUITS DE <i>C. FRONDOSA</i>	44
4.	DISCUSSION	46
5.	CONCLUSION	55
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	57

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Conditions de culture par souche bactérienne	23
Tableau 2: Composition globale des extraits riches en saponines bruts de coproduits de <i>C. frondosa</i> (EDG: Équivalents diosgénine)	35
Tableau 3: Constituants spécifiques	35

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Anatomie externe du <i>Cucumaria frondosa</i> (Image par E. A. Lazo-Wasem).....	5
Figure 2: Représentation des zones de pêche aux concombres de mer dans le Saint-Laurent (zones délimitées dans le rapport du Ministère des Pêches et Océans Canada (MPO 2017))	7
Figure 3: Étapes de la formation d'un biofilm bactérien (Funke et al. 2016)	14
Figure 4: Cinétique bactérienne (1: temps de latence; 2: phase de croissance).....	19
Figure 5: Plan de plaque pour les analyses d'effet antibactérien des extraits riches en saponines de coproduits de <i>C. frondosa</i>	26
Figure 6: Plan de plaque des tests de la meilleure période d'incubation pour la formation du biofilm bactérien (8 répliquas par test).....	30
Figure 7: Plan de plaque des analyses de la formation de biofilm bactérien en présence de l'enduit MK100 et des différentes concentrations de traitements antiadhésifs (8 répliquas par test).....	32
Figure 8: Évolution de la densité optique (DO) en fonction du temps de la culture bactérienne effectuée avec les souches marines <i>S. colwelliana</i> , <i>V. splendidus</i> , <i>P. haloplanktis</i> , <i>P. kocurii</i> et <i>R. denitrificans</i> , en présence de 5 concentrations de saponines commerciales, et incubée pendant 24h. Les résultats sont représentés sous forme de moyennes et écarts-types, le temps de culture des bactéries est représenté en abscisse, et les valeurs de densités optiques correspondant à l'évolution de la croissance des bactéries sont représentées en ordonnée. La courbe en rouge étant la courbe du contrôle positif, et les dégradés de couleur verte représentent les courbes des analyses avec les 5 concentrations de saponines.....	37
Figure 9: Évolution de la densité optique (DO) en fonction du temps de la culture bactérienne effectuée avec les souches d'intérêt agroalimentaires <i>V. alginolyticus</i> , <i>L. innocua</i> , <i>K. rhizophilla</i> , <i>E. coli</i> et, en présence de 5 concentrations d'extraits bruts et incubées pendant 24h. Les résultats sont représentés sous forme de moyennes et écarts-types, le temps de culture des bactéries est représenté en abscisse, et les valeurs de densités optiques correspondant à l'évolution de la croissance des bactéries sont représentées en ordonnée. La courbe en rouge étant la courbe du contrôle positif, et les	

dégradés de couleur verte représentent les courbes des analyses avec les 5 concentrations d'extraits bruts..... 39

Figure 10: Évolution de la densité optique (DO) en fonction du temps de la culture bactérienne effectuée avec les souches marines *S. colwelliana*, *V. splendidus*, *P. haloplanktis*, *P. kocurii* et *R. denitrificans* et, en présence de 5 concentrations d'extraits bruts et incubées pendant 24h. Les résultats sont représentés sous forme de moyennes et écarts-types, le temps de culture des bactéries est représenté en abscisse, et les valeurs de densités optiques correspondant à l'évolution de la croissance des bactéries sont représentées en ordonnée. La courbe en rouge étant la courbe du contrôle positif, et les dégradés de couleur verte représentent les courbes des analyses avec les 5 concentrations d'extraits bruts..... 41

Figure 11: Évolution de la densité optique (DO) en fonction du temps de la culture bactérienne effectuée avec les souches marines *V. splendidus*, *P. haloplanktis*, *R. denitrificans* et *S. colwelliana*, en présence de 5 concentrations d'extraits dialysés riches en saponines, et incubée pendant 24h. Les résultats sont représentés sous forme de moyennes et écarts-types, le temps de culture des bactéries est représenté en abscisse, et les valeurs des densités optiques correspondant à l'évolution de la croissance des bactéries sont représentées en ordonnée. La courbe en rouge étant la courbe du contrôle positif, et les dégradés de couleur brun représentent les courbes des analyses avec les 5 concentrations d'extraits..... 43

Figure 12: Pourcentages de réduction de l'adhésion des souches marines *V. splendidus*, *P. haloplanktis*, *R. denitrificans* et *S. colwelliana*, *Planococcus kocurii* en fonction des concentrations en antiadhésifs. Les histogrammes bruns représentent les analyses effectuées avec les extraits bruts, les histogrammes bleus représentent les analyses effectuées avec les extraits dialysés et les histogrammes verts représentent les analyses effectuées avec les saponines commerciales. Les concentrations en antiadhésifs sont représentées en abscisse, et les valeurs des pourcentages de réduction de l'adhésion sont représentées en ordonnée. Les analyses effectuées avec la concentration 0 mg.mL⁻¹ représentent les contrôles positifs (analyses en absence d'antiadhésifs)..... 45

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Depuis plus d'un siècle, les concombres de mer font l'objet d'une pêche commerciale qui s'est rapidement développée au cours des deux dernières décennies, à la demande des pays asiatiques (Conand 2001; Conand 2004). Ils sont transformés en produit sec appelé Hai Shen, trévang ou bêche de mer et sont exportés principalement vers la Chine orientale et vers tous les « China Town » des grandes villes du monde pour des fins alimentaires et médicinales.

La majorité de la production mondiale provient des pays tropicaux, mais il existe également un marché en Amérique du nord tel qu'au Maine et dans trois provinces maritimes du Canada (Conand 2004; Conand 2017). L'exploitation du concombre de mer sur la côte est de l'Amérique du Nord a débuté dans les années 1970 (Bradshaw et al. 1991; Sutterlin and Waddy 1975); les captures sont représentées exclusivement par l'espèce de concombre de mer *Cucumaria frondosa* (Toral-Granda et al. 2008). Au Québec, la pêche au concombre de mer a débuté en 2008 et elle est toujours à la phase exploratoire. L'entreprise québécoise « Poissonnerie de Cloridorme » (Cloridorme, Québec, Canada) (partenaire de ce projet), a commencé l'exploitation du concombre de mer « *C. frondosa* » depuis 2012; 680 tonnes ont été transformées en 2014 (Bryl et al. 2015).

L'exploitation des concombres de mer génère une quantité considérable de coproduits à éliminer (environ 60 % de coproduits par rapport au poids frais) (Cui et al. 2007). Au Canada, les coproduits de pêches sont généralement éliminés par compostage ou entreposés dans des sites d'enfouissement réglementaire, mais l'enfouissement des coproduits organiques putrescibles sera interdit à partir de 2022, selon la stratégie ministérielle de développement durable 2020-2023 (un moratoire mis en vigueur par le gouvernement du Canada). Les entreprises comme « Poissonnerie de Cloridorme » sont donc actuellement à la recherche de nouveaux moyens de valorisation de leurs coproduits de pêche pour trouver une

alternative à l'enfouissement et pour rajouter une plus-value à leurs produits, d'où la participation de cette entreprise à ce projet de maîtrise.

En dehors de la consommation, les concombres de mer représentent un potentiel considérable pour la recherche de nouvelles substances intéressantes dans le milieu des biotechnologies. Des recherches scientifiques ont confirmé la présence d'agents antimicrobiens et antiadhésifs à base de saponines et d'enzymes dans les concombres de mer, plus précisément dans le système digestif et son contenu, dans le système aquifère, dans le système nerveux et dans le liquide coelomique (De Marco et al. 2017; Gianasi et al. 2017b; Jin et al. 2009). Ces saponines sont plus concentrées dans le tégument des concombres de mer, mais elles sont également présentes dans les autres parties du corps qui sont rejetées en tant que coproduits, lors de la transformation des concombres de mer en denrées consommables (tentacules, système digestif, contenu du tractus digestif, gonades, appareil respiratoire).

Les coproduits de concombres de mer représentent alors un potentiel considérable pour la recherche de nouveaux antimicrobiens naturels. Dans ce contexte, l'entreprise québécoise « Les Enduits Mirapakon » a collaboré à ce projet de maîtrise dans le but de trouver un nouveau composant antimicrobien à partir des coproduits de concombres de mer. Cette entreprise produit des peintures antisalissures sans biocides pour les bateaux et pour les équipements immergés en milieu marin ; et leurs équipes continuent à chercher de nouvelles substances naturelles efficaces pour introduire dans la composition de ces peintures. Le centre intégré de recherche industrielle « Merinov » a également collaboré à ce projet, dans le but de tester l'efficacité des substances antimicrobiennes issues des coproduits de concombres de mer, pour des applications dans le domaine agroalimentaire. L'utilisation des coproduits de concombre de mer comme source de composés antimicrobiens serait alors un moyen de lutte contre la colonisation bactérienne dans le domaine agroalimentaire et dans le domaine marin, ainsi qu'une potentielle source de valorisation de cette biomasse qui est éliminée en tant que déchet pour les entreprises de pêche.

Ce projet de maîtrise a donc comme objectif principal d'évaluer le potentiel antimicrobien provenant d'extraits de coproduits de *C. frondosa* pour des applications industrielles dans le domaine agroalimentaire et dans le domaine de la réduction du biofouling. Le projet a été réalisé sous la supervision de Karine Lemarchand, professeure en bactériologie marine et en écotoxicologie microbienne à l'Institut des Sciences de la Mer (ISMER); en collaboration avec les équipes de Laurent Girault, chercheur industriel à Merinov (Centre d'Innovation de l'aquaculture et des pêches du Québec) ; et la compagnie « Les Enduits Mirapakon Inc. ».

Le premier objectif spécifique est d'évaluer l'effet antimicrobien d'extraits riches en saponines de coproduits de *C. frondosa* sur des bactéries d'intérêt agroalimentaire et sur des bactéries marines, afin de documenter le potentiel antimicrobien de ces extraits pour une utilisation dans le domaine agroalimentaire et dans la lutte contre le biofouling dans le domaine du transport maritime. Le deuxième objectif spécifique est d'évaluer l'effet antiadhésif des extraits sur des cultures pures de bactéries marines, dans le but de recueillir un patron d'effets antiadhésifs pour utilisation dans la lutte contre le biofouling dans le domaine du transport maritime.

1.1 GENERALITES SUR LES CONCOMBRES DE MER

Les holothuries connues dans le monde occidental sous le nom de concombres de mer sont des animaux comestibles très appréciés en Chine, en Corée, au Japon, en Malaisie, en Indonésie et en Russie. Depuis plus d'un siècle, les concombres de mer font l'objet d'une pêche commerciale qui s'est rapidement développée au cours de ces deux décennies, à la demande des pays asiatiques (Conand 2001; Conand 2004) . Plus de 1500 espèces sont connues et une centaine sont exploitées pour la consommation et pour la médecine traditionnelle chinoise. Les espèces d'holothuries comestibles possèdent des caractéristiques communes, telles que la basse teneur en matières grasses et de cholestérol, mais une teneur élevée en protéines (Wen et al. 2010).

Les concombres de mer ont été longtemps utilisés comme produits comestibles, mais l'intérêt pour ces invertébrés dans le domaine de la biotechnologie a été attesté dès le XIV^e siècle, avec la médecine traditionnelle chinoise et ensuite avec la découverte des substances pharmacodynamiques, antifongiques et antitumorales. Plusieurs molécules issues du concombre de mer ont fait l'objet de nombreuses recherches scientifiques durant ces dernières décennies ; et ces molécules présentent des spécificités liées à l'espèce de concombre de mer et leur milieu de vie.

1.1.1 Caractéristiques des concombres de mer

Les concombres de mer sont des animaux cylindriques généralement de couleur brun, ils appartiennent à l'embranchement des échinodermes et à la classe des holothuridae. Le nom échinoderme vient de deux termes grecs: echinos (épineux) et derma (peau) se référant aux structures calcaires épineuses sur leur peau, et le terme holothurie vient du mot Grec « Thurios » qui signifie impudique (Ludwig 1889-1892). L'embranchement des échinodermes est exclusivement marin et constitue l'une des phyla les mieux caractérisées du règne animal (Samyn et al. 2006). La classe des holothuries comporte six ordres, tels que, les Dendrochirotida, les Elaspodida, les Molpadida, les Persiculida, les Synallactida et les Holothuriida qui sont également appelés Aspidochirotida (holothuries ayant des organes arborescents) (Ludwig 1891; Worms 2020). Cette classe est la dernière classe qui s'est différenciée, les premiers fossiles remontent à l'Ordovicien inférieur (450-500 millions d'années) (Gilliland 1993; Reich 1999; Reich 2001).

Les holothuries ont une taille très variable, allant de quelques millimètres à plus de 3 m ; leurs corps présentent une symétrie pentaradiale avec une symétrie bilatérale secondaire (figure 1), il existe une face dorsale (bivium) et une face ventrale (trivium) qui est couverte de nombreux pieds ambulacraires (podia) munis de ventouses aux extrémités pour permettre à l'animal de se fixer et de se déplacer sur le substrat (Samyn et al. 2006). Les holothuries sont morphologiquement molles à cause de leur squelette qui n'est constitué que

de plaques de calcaires microscopiques (spicules) isolées et dispersées dans la couche dermique de leur peau et dans leurs tissus (Samyn et al. 2006). Le maintien est en grande partie assuré par la présence dans la paroi d'un type particulier de collagène, dont la rigidité est commandée par influx nerveux. Grâce à ce composant, il est possible pour les échinodermes de ramollir ou durcir leur corps à divers degrés et de maintenir des positions contractées sans effort musculaire. La partie intérieure du corps des holothuries est constituée par un liquide coelomique où baigne le tube digestif, le système respiratoire et les gonades. Le tube digestif relie l'anus (sur la partie postérieure) et la bouche (partie antérieure) qui est entourée d'une couronne de 10 à 30 tentacules de tailles égales servant à ingérer les particules alimentaires (Samyn et al. 2006) ; la morphologie de ces tentacules varie en fonction de la systématique des ordres au sein de la classe (Bruckner 2006).

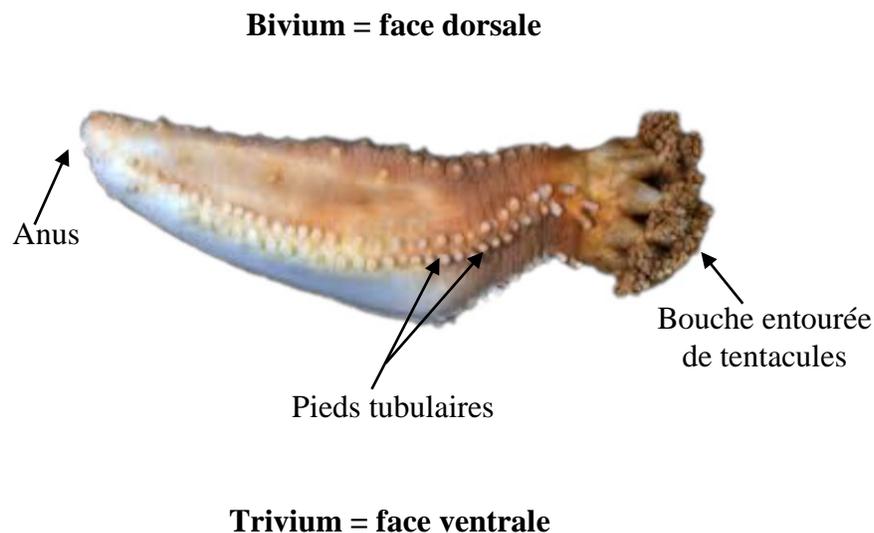


Figure 1: Anatomie externe du *Cucumaria frondosa* (Image par E. A. Lazo-Wasem)

1.1.2 Biologie des concombres de mer

Peu d'informations sont publiées sur la biologie de la population des concombres de mer, par rapport aux autres ressources marines vivantes. Les concombres de mer sont présents dans toutes les régions de l'océan, de la zone intertidale à l'océan profond et du polaire au tropical. Ils sont répartis selon le climat, la plupart des espèces se trouvent dans les régions tropicales, mais il existe également des espèces d'eaux froides (Conand 1989). Ces animaux ne partagent pas les mêmes caractéristiques et traits. Leurs caractéristiques écologiques diffèrent d'une espèce à l'autre (Bruckner 2006), ils se trouvent dans de nombreux biotopes marins, et sont connus comme étant les détritivores les plus importants des faunes récifales (Samyn et al. 2006).

Presque tous les concombres de mer sont benthiques, certains sont sédentaires (vivant fixés sur ou dans le substrat) et la plupart sont vagiles (capables de se déplacer lentement sur le fond, à une vitesse comprise entre 5 et 50 cm/h) (Conand et al. 2016). Les sexes sont toujours séparés, seules quelques espèces sont hermaphrodites (morphologiquement mâle et femelle) ; les gonades forment de petites touffes situées dans la partie antérieure de l'animal. Les concombres de mer sont tous ovipares, la fécondation est sexuée et externe (les gamètes sont relargués dans l'eau où a lieu la fécondation), et le développement larvaire est indirect (présence d'un stade larvaire) (Conand et al. 2016). Il existe également de nombreuses espèces de concombres de mer (comme *Holothuria atra* ou *Stichopus chloronotus*) qui sont capables d'une reproduction asexuée par scission, c'est-à-dire, un rétrécissement apparaît progressivement chez l'animal, qui va par la suite se couper en deux parties ; la plaie se referme et chaque partie régénère ensuite un individu complet en deux à six mois (Conand et al. 2016).

1.1.3 L'espèce de concombre de mer *Cucumaria frondosa*

Dans ce projet, les attentions sont portées particulièrement sur l'espèce de concombre de mer *Cucumaria frondosa*. Cette espèce est généralement de couleur brune, elle possède dix tentacules buccaux orangés, ainsi que cinq rangées de pieds ambulacraires (Desrosiers et al. 1989; Gosner 2014; Hyman 1955). Cette espèce vit dans les eaux tempérées, elle est principalement retrouvée dans les zones nordiques telles que le nord de l'Europe, le nord de la Russie, le nord de l'Amérique, et dans l'Arctique (Gosner 2014; Gudimova et al. 2004; Hyman 1955; Jordan 1972). Le *C. frondosa* se retrouve jusqu'à 300 m de profondeur et plus (So et al. 2011), elle est présente dans le golfe et l'estuaire du Saint-Laurent et à Terre-Neuve, de l'estran jusqu'à 30 m de profondeur (Hamel and Mercier 1996b; Jordan 1972). Au Nouveau-Brunswick, *C. frondosa* se retrouve entre 5 à 8 m de profondeur ; et au Québec, cette espèce est capturée dans les eaux côtières de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent jusqu'à 36 m de profondeur ; les zones de pêche sont représentées sur la figure 2 (MPO 2014; Singh et al. 1999).

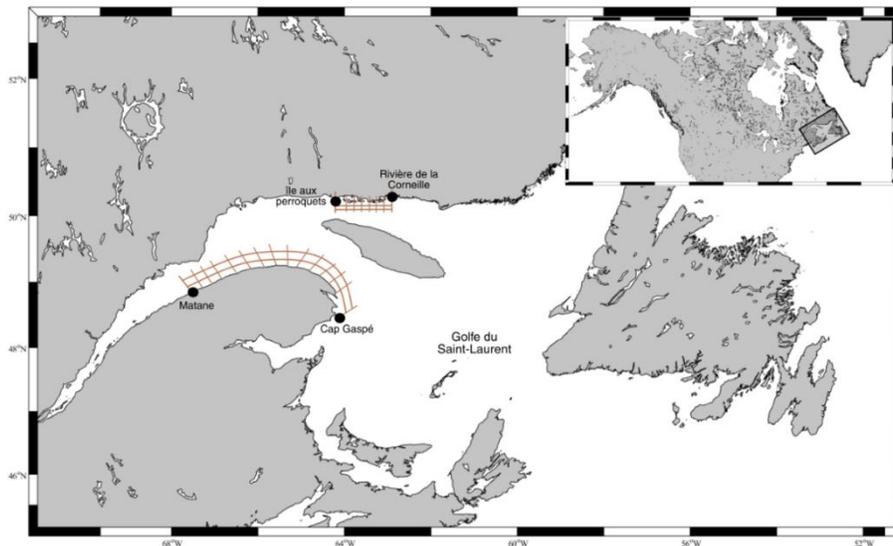


Figure 2: Représentation des zones de pêche aux concombres de mer dans le Saint-Laurent (zones délimitées dans le rapport du Ministère des Pêches et Océans Canada (MPO 2017))

C. frondosa préfère un environnement marin où il y a des courants modérés à forts, elle vit en groupe sur les substrats durs, mais elle peut également être retrouvée sur du gravier, la boue ou le sable du fond marin (Feindel 2002; Gosner 2014; Singh et al. 1999). Les prédateurs de *C. frondosa* sont généralement les étoiles de mer *Solaster endeca* et *Asteria vulgaris* mais l'oursin vert *Strongylocentrotus droebachiensis* représente aussi une menace pour les juvéniles de taille inférieure à 25 mm (Hamel and Mercier 1996a; Jordan 1972; So et al. 2010). Les adultes de *C. frondosa* sont également consommés par le phoque barbu, le loup de mer et le morse (Gianasi et al. 2021; Nunavut 2012). *C. frondosa* a une durée de vie allant jusqu'à 10 ans (Hamel and Mercier 1996b). Elle effectue une reproduction asexuée et une fécondation externe et la saison de ponte varie généralement de mars à juillet ; au Québec, la ponte a lieu à mi-juin (Hamel and Mercier 1996b; Mercier and Hamel 2009). Dans l'estuaire du Saint-Laurent, le stade larvaire dure environ 48 jours, la maturité sexuelle commence à être atteinte à des tailles de 80 à 102 mm, à un âge de 33 mois (Falk-Petersen 1982; Hamel and Mercier 1996b). Cette espèce peut atteindre une taille maximale de 35 cm ; à 50 cm ; (Desrosiers et al. 1989; Gianasi et al. 2021; Gosner 2014; Hamel and Mercier 1996b) le poids corporel est variable, en fonction de la quantité d'eau retenue dans les cavités corporelles (dans l'arbre respiratoire, la vésicule polienne et d'autres sections du système hydrovasculaire), mais en général les adultes de *C. frondosa* pèsent entre 100 et 1 000 g (Gianasi et al. 2021).

1.2 L'EXPLOITATION DES CONCOMBRES DE MER

La capture mondiale des concombres de mer se situait autour de 31000 tonnes en 2015, 48000 tonnes en 2018 et la demande est toujours en augmentation (Bodiguel and Ward 2014; FAO 2020). La majorité de la production mondiale provient des pays tropicaux, dont le Pacifique Centre-Ouest avec 6675 tonnes par année (t.p.a.) et l'Océan Indien occidental avec 4179 t.p.a. ; mais il existe également un marché dans les pays nordiques tels que sur la côte est de l'Amérique du Nord, le Maine et trois provinces maritimes du Canada (Conand 2004; Conand 2017).

L'exploitation du concombre de mer sur la côte est de l'Amérique du Nord a débuté dans les années 1970 (Bradshaw et al. 1991; Sutterlin and Waddy 1975) ; les captures sont représentées exclusivement par l'espèce de concombre de mer *Cucumaria frondosa* (Toral-Granda et al. 2008). Une pêche industrielle avec des engins de capture mobiles a été développée au Maine avec des captures passant de 860 tonnes en 1995 à 4600 tonnes en 2003 (Campagna et al. 2005; Chenoweth and McGowan 1995). Au Canada, les débarquements ont été estimés à 4516 tonnes en 2008 et à 11450 tonnes en 2019 (Hossain et al. 2020; MPO 2019; Toral-Granda et al. 2008). L'exploitation du concombre de mer a commencé au Nouveau-Brunswick et en Nouvelle-Écosse. Au Nouveau-Brunswick, la pêche expérimentale a débuté en 1999 dans l'ouest de la baie de Fundy, plus précisément, dans la baie de Passamaquoddy (MPO 2009; Rowe et al. 2009). En Nouvelle-Écosse, la pêche expérimentale a débuté au sud de la province en 2000 puis s'est étendue au plateau néo-écossais en 2004 (MPO 1996; MPO 2005). La province de Terre-Neuve-Labrador a ensuite commencé une pêche au *C. frondosa* sur le banc de Saint-Pierre, en 2003 (MPO 2009).

Au Québec, la pêche au concombre de mer est toujours au stade exploratoire, elle a débuté en 2008 sur la rive nord de la Gaspésie et sur la Côte-Nord. La récolte est abondante entre Matane et Cap-Gaspé, principalement dans les secteurs de Les Méchins, Mont-Louis et Petite-Vallée (Campagna et al. 2005). Les débarquements ont totalisé 1 037 t en 2016, dont 49 % provenaient de la rive nord de la Gaspésie et 51 % provenaient de la Moyenne-Côte-Nord (en Minganie) (MPO 2017). La moyenne des débarquements annuels de concombre de mer était de 1085.7 t de 2017 à 2020 dont 57,4 % provenaient de la rive nord de la Gaspésie et 42,6 % provenaient de la Côte-Nord (MPO 2021).

Les débarquements ont presque doublé dans l'est du Canada entre 2006 et 2011, mais la qualité du traitement des concombres de mer lors de la transformation compte également pour rehausser le prix du produit. La demande internationale en concombre de mer est très élevée contrairement au potentiel de débouchés locaux ; par conséquent, les pêcheurs et exportateurs doivent s'adapter à la demande du marché asiatique et développer d'importants contacts d'affaires (Dallaire et al. 2013).

1.3 POTENTIEL BIOTECHNOLOGIQUE DES CONCOMBRES DE MER

L'exploitation des concombres de mer génère une quantité considérable de coproduits à éliminer (environ 60 % de coproduits par rapport au poids frais) (Cui et al. 2007). Actuellement, ces coproduits sont compostés ou entreposés dans des sites d'enfouissements réglementaires ; mais à partir de 2022, l'enfouissement des matières organiques putrescibles sera interdit selon la stratégie ministérielle de développement durable 2020-2023, qui est un moratoire mis en vigueur par le gouvernement du Canada. En raison de ces pertes et des coûts associés à l'élimination réglementaire de ces coproduits de la pêche, la voie de la valorisation est considérée pour accroître la valeur ajoutée des pêcheries, mais également pour réduire les effets polluants qui résultent de la production de déchets (Arvanitoyannis and Kassaveti 2008; Islam et al. 2004). Cette voie s'inscrit dans l'approche des biotechnologies marines, qui visent à valoriser le potentiel offert par la biodiversité des océans à travers de nombreuses applications (pharmaceutiques, alimentaires, cosmétiques, environnementales, etc). Au Québec, l'entreprise Poissonnerie de Cloridorme inc. (Cloridorme, Québec), partenaire de ce projet de recherche, a commencé à exploiter le concombre de mer en 2012, plus particulièrement l'espèce « *Cucumaria frondosa* », pour diversifier son marché. Dès 2013, 400 tonnes ont été transformées pour augmenter à 680 tonnes en 2014 et l'augmentation se poursuit (Bryl et al. 2015). Afin de rentabiliser cette exploitation, il est aujourd'hui nécessaire de valoriser les coproduits perdus, d'où la participation de cette entreprise au présent projet de recherche.

De nombreux chercheurs considèrent les invertébrés marins comme des sources beaucoup plus importantes de nouveaux agents antitumoraux, antiviraux et anti-inflammatoires que tout autre groupe d'espèces terrestres (Molinski et al. 2009) ; environ 27000 composés chimiques différents ont actuellement été isolés à partir d'espèces marines (Altmann 2017). Le commerce du *C. frondosa* a longtemps été limité à des fins alimentaires et culturelles pour les pays asiatiques comme la Chine, le Japon et les « China Town » dans

les pays occidentaux ; mais, la découverte et la mise au point de nouveaux agents nutraceutiques et pharmaceutiques immunostimulants provenant de cette espèce de concombre de mer font actuellement l'objet de nombreuses recherches et d'intérêts commerciaux.

Les recherches de composés bioactifs dans le *C. frondosa* sont surtout axées sur les peptides contenus dans la paroi musculaire de l'animal ; mais de plus en plus de chercheurs s'intéressent sur les autres parties du corps de l'animal pour démontrer la présence d'autres composés bioactifs. Une étude effectuée avec le *C. frondosa* a révélé la présence de composés bioactifs avec une activité pharmacologique expérimentale confirmée, ces composés sont respectivement : la chondroïtine sulfate fucosylée ; les triterpène glycosides (frondosides A, A1, A6, 24-déhydrofrondoside A6) ; les cérébrosides et les phospholipides (Khotimchenko 2018). Les triterpènes glycosides du *C. frondosa* ont une activité anticancéreuse et antimicrobienne, ils présentent des effets cytotoxiques contre diverses cellules tumorales ; et peuvent induire l'apoptose des cellules leucémiques de manière caspase-dépendante ou indépendante, selon la structure de l'espèce de concombre de mer (Jin et al. 2009).

Dans le cadre de ce projet, les composés étudiés sont les saponines (frondosides A) issues des extraits de coproduits de *C. frondosa*. Les coproduits de *C. frondosa* sont principalement constitués des organes internes, des tentacules, des gonades, des œufs, des parties du tégument, de l'appareil respiratoire et du liquide cœlomique. Cette biomasse est reconnue dans la littérature comme une source intéressante de molécules bioactives pour le secteur des biotechnologies et plusieurs études ont été menées sur la valorisation des concombres de mer en termes de source de molécules présentant des activités antifongiques, antioxydants et antimicrobiens (Guerard et al. 2007; Kristinsson and Rasco 2000). Haug *et al.* (2002) ont démontré les activités antimicrobiennes en raison de la présence de plusieurs enzymes cruciales dans des extraits de *C. frondosa*. Il a été rapporté que les œufs de *C. frondosa* présentaient des propriétés antimicrobiennes nettement supérieures à celles des extraits de la paroi corporelle de l'animal (Haug et al. 2002). Un peptide antimicrobien a également été identifié dans le fluide cœlomique du *C. frondosa*, présentant une large gamme

d'activité antimicrobienne contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives. Les organes internes du *C. frondosa*, particulièrement les gonades ont également une riche source d'acides gras saturés et ces composants sont actuellement reconnus dans la littérature en tant qu'antiadhésifs naturels (De Marco et al. 2017; Gianasi et al. 2017a; Mamelona et al. 2010). Plusieurs recherches ont démontré la présence de peptides, d'acides gras saturés et d'enzymes antimicrobiens et antiadhésifs dans les organes internes du *C. frondosa*, mais dans ce projet, les composés étudiés sont les saponines de coproduits de concombre de mer, afin de comparer les effets antibactériens des saponines commerciales, extraits bruts et extraits dialysés et d'évaluer leur potentiel en tant qu'antimicrobiens naturels, pour une application dans la lutte contre la colonisation bactérienne.

1.4 INTERETS DES CONCOMBRES DE MER DANS LE DOMAINE DE LA MICROBIOLOGIE

Les concombres de mer ont un intérêt commercial et biotechnologique. Bien que cela soit récent, de plus en plus de recherches sont faites sur les propriétés antibactériennes des concombres de mer *C. frondosa*. Les concombres de mer sont des organismes très peu mobiles ou sessiles, n'ayant pas de systèmes de défense bien développés, ils sécrètent des toxines sur leurs parois corporelles pour se protéger des prédateurs (Conand 2004). Ces substances contenues dans les concombres de mer présentent des propriétés antibactériennes, antifongiques et antivirales et elles comprennent des peptides et des saponines complexes permettant à l'animal de se protéger contre la colonisation des microorganismes parasites ou pour immobiliser leurs prédateurs (Hossain et al. 2020). Ces toxines sont différentes pour chaque espèce de concombre de mer, ce qui rend ces invertébrés très intéressants au point de vue de la diversité en substances bioactives (Tripoteau 2015).

1.4.1 Propriétés antibactériennes des extraits des concombres de mer

Les bactéries *Vibrio sp*, plus précisément les *Vibrio harveyi* et *Vibrio alginolyticus* sont les principaux parasites des concombres de mer. Ces agents pathogènes causent une ulcération cutanée sur leur paroi corporelle pouvant provoquer la mort des individus. Les bactéries créent des galles à la surface de l'épiderme, percent l'arbre respiratoire ou creusent dans la paroi corporelle jusqu'au cœlome, une zone de l'épiderme atteinte est totalement détruite exposant les fibres de collagène et les osselets au milieu extérieur (Eeckhaut et al. 2003).

La survie des concombres de mer dépend des mécanismes antimicrobiens ; pour se protéger contre les infections, ils sécrètent des toxines antimicrobiennes. Ces substances sont produites dans le muscle, dans les parois corporelles et cutanées, elles sont différentes selon les espèces de concombres de mer. Pour l'espèce *C. frondosa*, de nombreuses études ont été effectuées et ont prouvé l'existence de substances bioactives (principalement des saponines) qui agissent sur les bactéries pathogènes en les éliminant (effet bactéricide), en arrêtant leur croissance (effet bactériostatique) ou en leur empêchant d'envahir les parois cutanées (effet antiadhésif) (Haug et al. 2002).

Des activités antibactériennes contre plusieurs espèces de bactéries Gram-positives et Gram-négatives ont également été détectées dans le fluide cœlomique du *C. frondosa* (In Beauregard et al. 2001). Un complexe de phospholipides enrichis en acide eicosapentaénoïque (EPA-PL) contenu dans les triterpènes glycosides présente également des propriétés antibactériennes et antifongiques, réduisant les dommages oxydatifs dans la lignée cellulaire PC12 de phéochromocytome surrénal du rat, induits par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le tert-butylhydroperoxyde (t-BHP) ; le prétraitement des cellules PC12 avec du EPA-PL a réduit les dommages et a augmenté le taux de survie de manière proportionnelle à la dose administrée (Wu et al. 2013). Les activités antibactériennes des extraits du *C. frondosa* sur les bactéries marines sont très peu connues et ce projet figure parmi les premiers qui traitent ce sujet.

1.4.2 Propriétés antiadhésives des extraits de concombres de mer

En milieu naturel, de nombreux microorganismes vivent attachés à des substrats et forment des biostructures complexes appelées biofilms ; ces microorganismes colonisent des surfaces et renforcent leur structure de défense et de survie à l'aide de ces biostructures (Funke et al. 2016). Le biofilm est un regroupement complexe de microorganismes qui vivent agglomérés les uns aux autres et fixés à une surface solide en contact avec l'eau ; il est composé de microorganismes constitués de plusieurs espèces fonctionnant de manière coordonnée (Funke et al. 2016). Les bactéries formant un biofilm organisent leurs activités et forment des regroupements grâce à la signalisation chimique entre les cellules afin d'avoir accès à des réserves communes de nutriments et se protéger de la dessiccation, des antibiotiques et du système immunitaire de leur hôte (Funke et al. 2016). La figure 3 ci-après illustre les différentes étapes de la formation d'un biofilm.

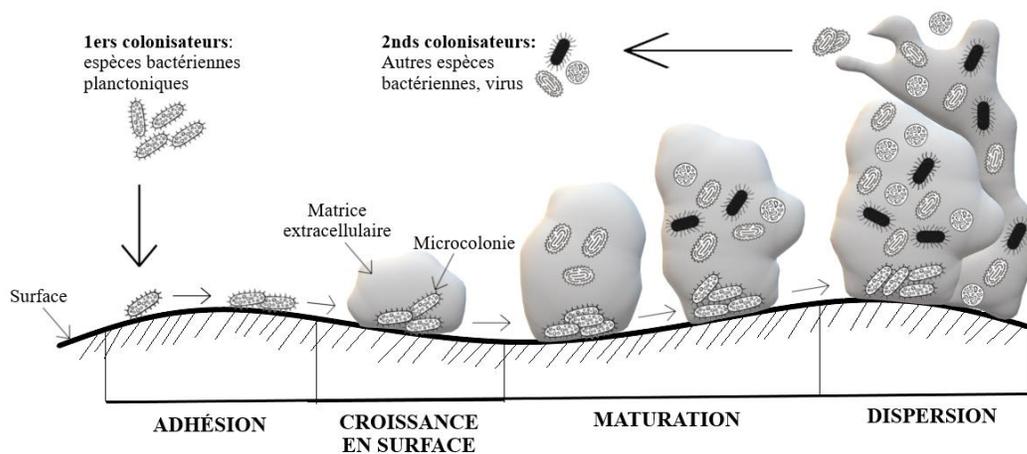


Figure 3: Étapes de la formation d'un biofilm bactérien (Funke et al. 2016)

L'adhésion correspond à la fixation des bactéries planctoniques (premiers colonisateurs) sur une surface recouverte de matière organique. La croissance en surface est

la multiplication des microorganismes et la production d'une matrice extracellulaire, composée d'eau, de déchets métaboliques et de différents polymères (protéines, ADN et des polysaccharides) produits par les micro-organismes ou par leur hôte ; cette matrice sert d'élément nutritif ou de protection. Les microorganismes produisent également des molécules de signalisation chimique appelées auto-inducteurs qui participent à la détection du quorum ; la quantité d'auto-inducteurs augmentent avec la densité microbienne, ces molécules attirent de nouveaux microorganismes. Lors de l'étape de la maturation, le biofilm s'épaissit grâce à l'arrivée de nouveaux venus et à la multiplication de ceux déjà présents (Funke et al. 2016).

Des canaux se forment dans la matrice afin de permettre la circulation des substances nutritives et pour éviter que les microorganismes se trouvant dans la partie inférieure de la matrice soient coupés des nutriments et baignent dans les déchets toxiques. Les différents microorganismes à l'intérieur du biofilm ont des rôles spécifiques et interagissent entre eux (les déchets des uns peuvent devenir une source d'énergie pour d'autres). La dispersion correspond au détachement de quelques microorganismes ou des fragments du biofilm, ces microorganismes reprennent leur forme planctonique et peuvent s'implanter ailleurs et former à nouveau un biofilm (Funke et al. 2016).

Les biofilms bactériens sont responsables de réactions inflammatoires et d'ulcérations cutanées chez les concombres de mer. Pour se protéger, les concombres de mer sécrètent un mucus épais recouvrant tout son corps ; cette sécrétion est principalement composée de protéines, de saponines et d'enzymes bactéricides, naturellement synthétisés par les concombres de mer afin d'éviter la formation des biofilms bactériens en éradiquant les microorganismes pathogènes lors de l'adhésion ou en solubilisant la matrice extracellulaire grâce à la rupture des liaisons chimiques entre les polysaccharides (Funke et al. 2016).

L'encrassement des coques des bateaux est provoqué par des bactéries formatrices de biofilms, elles colonisent les surfaces en contact avec l'eau et forment des structures qui peuvent évoluer jusqu'à atteindre un volume considérable et difficile à éliminer (Roux and Ghigo 2006). Ceci est une source de problème pour les compagnies de transport du fait que

les bateaux encrassés sollicitent plus de carburant et leur nettoyage nécessite un grand budget (Quiniou and Compère 2021). Pour lutter contre l'encrassement, les compagnies de transport maritime utilisent des peintures antisalissures pour réduire, voire empêcher la colonisation des organismes marins sur les coques de bateaux. Dans le domaine de la transformation agroalimentaire, les surfaces de manipulation ne sont pas toutes atteignables lors de la désinfection. Certains endroits peuvent être tapissés et colonisés par des bactéries susceptibles d'être responsables de contaminations (Sylla 2011). Ces bactéries peuvent être facilement éliminées lors des premiers stades de formation des biofilms bactériens en utilisant des produits antibactériens ; il est également possible d'empêcher la formation des biofilms bactériens, en utilisant des produits antiadhésifs.

Les moyens de lutte actuels contre ces bactéries impliquent l'utilisation de substances chimiques biocides pouvant être dangereuses pour d'autres organismes, c'est d'ailleurs pour cette raison que de plus en plus de chercheurs s'impliquent dans la recherche de nouveaux moyens naturels moins nocifs pour lutter contre la colonisation bactérienne en milieu agroalimentaire et en milieu marin (Le Norcy 2017). Les coproduits de concombres de mer seraient un bon candidat pour la recherche de substances naturelles antimicrobiennes et antiadhésives.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 PREPARATION DES EXTRAITS RICHES EN SAPONINES DE COPRODUITS DE *C. FRONDOSA*

2.1.1 Préparation des extraits riches en saponines de coproduits de *C. frondosa*

L'équipe du laboratoire de fractionnement de Mérimov effectue annuellement un échantillonnage de coproduit de concombre de mer issu de l'exploitation de l'entreprise « Poissonnerie de Cloridorme » (entreprise producteur et exportateur de poisson et de fruits de mer à Cloridorme, Québec, Canada). Les coproduits sont récupérés pendant la transformation des concombres de mer fraîchement débarqués. Lors des échantillonnages, les coproduits sont déposés dans des contenants fermés (15 litres), puis conservés dans une glacière, pour éviter la décomposition durant le transport jusqu'au laboratoire de fractionnement de Merinov (Gaspé, Québec, Canada). Les échantillons sont ensuite broyés dans un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une soupe de coproduits, puis conservés à -80 °C. Les échantillons utilisés dans ce projet sont issus du lot d'échantillonnage de l'année 2017.

2.1.2 Production d'extraits riches en saponines à partir de coproduits de *C. frondosa*

Les extraits de coproduits de *C. frondosa* produits dans ce projet sont issus d'une extraction avec différents solvants suivie d'une précipitation à la fin. L'extraction a été réalisée selon un protocole développé par Mathieu Millour (Ph.D. ISMER/UQAR), modifié sur la base du protocole en vigueur dans les laboratoires de chimie de Merinov (ce protocole étant soumis à des clauses de confidentialité, il ne sera pas détaillé dans ce mémoire). Les solvants utilisés sont l'éthanol, le n-hexane, le dichlorométhane, le chloroforme et le 1-

butanol. Une dialyse additionnelle a été effectuée après les étapes d'extraction, afin de retirer le sel contenu dans les extraits (les extraits obtenus suite au protocole d'extraction contiennent environ 40% de sel). Ce procédé a été réalisé avec un sac à dialyse de « spectrum laboratory » et une membrane de porosité de 100 à 500 Dalton (Spectra/Por® biotech cellulose ester dialysis membranes, diamètre : 20 mm, N°131060).

Les différentes étapes d'extraction effectuées lors de ce projet ont permis de produire des extraits bruts riches en saponines et des extraits riches en saponines dialysés ; qui ont ensuite été utilisés pour réaliser les mesures d'activité antimicrobienne et antiadhésive. La composition de ces extraits a été vérifiée par l'équipe du laboratoire de chimie de Mérinov en utilisant de la diosgénine en tant que témoin (de la marque Fisher scientifique, Thermo Scientific Alfa Aesar j60976.22). Le dosage des lipides et des caroténoïdes a été réalisé par extraction à l'aide d'un mélange de chloroforme, méthanol et eau ; le dosage des acides aminés (protéines) a été effectué en chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase inversée (LC 18) à l'aide d'une méthode proposée par Waters®. La teneur en minéraux (cendres) consiste en un dosage gravimétrique par calcination à haute température.

2.2 ANALYSE DE L'EFFET ANTIMICROBIEN DES EXTRAITS RICHES EN SAPONINES DE COPRODUIT DE *C. FRONDOSA*

Le potentiel antimicrobien des extraits riches en saponines de coproduits de *C. frondosa* a été évalué en conditions contrôlées en présence de 6 concentrations d'extraits riches en saponines (0 mg.mL⁻¹, 0,25 mg.mL⁻¹, 0,5 mg.mL⁻¹, 1 mg.mL⁻¹, 1,5 mg.mL⁻¹ et 2 mg.mL⁻¹ (Concentrations finales). Une solution pure de saponines commerciales a également été testée dans les mêmes conditions pour vérifier les effets des saponines sur les souches bactériennes, afin de s'en servir comme référence pour les analyses avec les extraits bruts et les extraits dialysés. Les saponines pures commerciales sont issues de la plante Quillaja, commercialisées par la compagnie Fisher (N° S672, N° cas : 8047-15-2).

Les analyses ont été réalisées dans des microplaques de 96 puits, en milieu stérile via des cinétiques de croissance de 24h avec huit réplicas du produit par concentration. La densité optique a été mesurée automatiquement toutes les 30 minutes par spectrophotométrie (595 nm de longueur d'onde pour les analyses avec les souches marines et 600 nm pour les souches agroalimentaires). La cinétique bactérienne a permis de déterminer les temps de latence, la concentration minimale inhibitrice (CMI), les taux de croissance et la densité optique à 24h (DO_{max} atteinte durant une croissance de 24h) pour chacune des souches bactériennes en présence des différentes concentrations testées (figure 4).

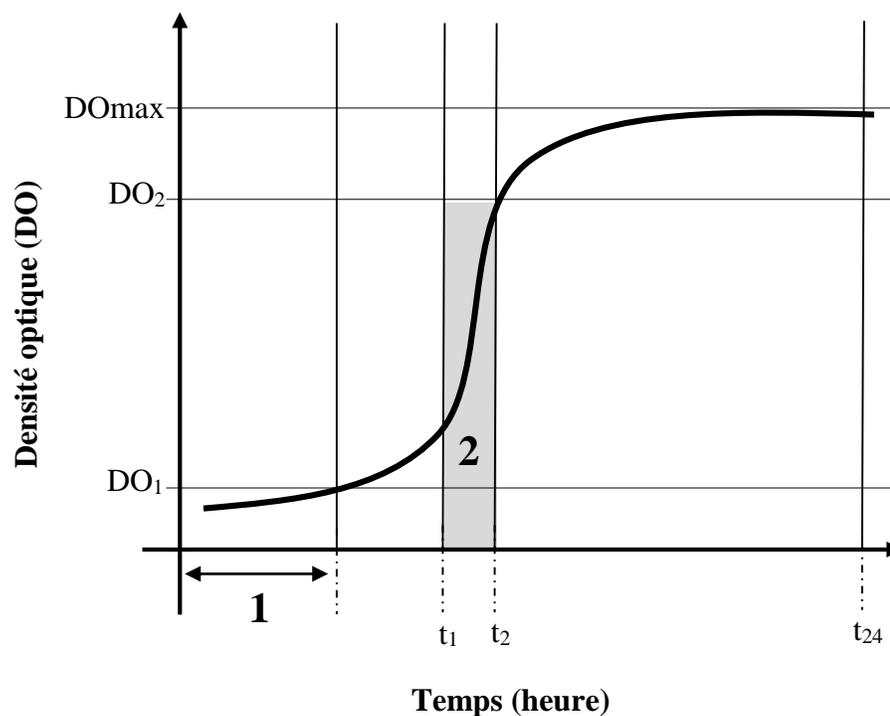


Figure 4: Cinétique bactérienne (1: temps de latence; 2: phase de croissance)

2.2.1 Présentation des souches bactériennes utilisées pour les analyses

Dans ce projet, 2 catégories de cibles bactériennes ont été considérées : des bactéries d'intérêt agroalimentaires et des bactéries marines formatrices de biofilms. Les bactéries d'intérêt agroalimentaire sont *Kocuria rhizophila* (ATCC® 9341™; Gram +), *Escherichia coli* (ATCC® 25922™; Gram -), *Listeria innocua* (NRRL B-33003 ; Gram +) et *Vibrio alginolyticus* (ATCC® 17749™; Gram -). Ces bactéries ont été sélectionnées parce que ce sont des souches responsables de contaminations en milieu agroalimentaire et également parce que ce sont des souches bactériennes de référence qui étaient disponibles dans le laboratoire de microbiologie de Merinov, où a eu lieu les analyses de l'effet antimicrobien des extraits de coproduits de *C. frondosa* sur les bactéries agroalimentaires.

Les souches marines formatrices de biofilms sont *Vibrio splendidus* 7SHRW (Mateo *et al.*, 2009 ; Gram -), *Pseudoalteromonas haloplanktis* (ATCC® 14393™; Gram -), *Roseobacter denitrificans* (ATCC® 33942™; Gram -), *Shewanella colwelliana* (ATCC® 39565™; Gram -) et *Planococcus kocurii* (ATCC® 43650™; Gram +). Ces souches ont été sélectionnées parce que ce sont des bactéries de référence et formatrices de biofilm en milieu marin, d'intérêt pour notre partenaire industriel « Les Enduits Mirapakon » ; et également parce que ces bactéries sont présentes dans le Saint-Laurent et sont disponibles dans le laboratoire de microbiologie de l'ISMER, où a eu lieu les analyses de l'effet antimicrobien et antiadhésif des extraits de coproduits de *C. frondosa*.

2.2.1.1 Les souches de référence agroalimentaires

Escherichia coli (ATCC® 25922™) est une bactérie aérobie présente dans les aliments et dans l'environnement ; c'est un bacille Gram négatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Sa taille varie en fonction des conditions de croissance (entre 0,5 à 3 µm), pesant de 0,5 à 5 picogrammes. La croissance optimale de cette souche bactérienne

est atteinte dans le milieu Trypticase Soy Agar/Broth (TSA/TSB), à une température de 37 °C.

Listeria innocua (NRRL B-33003) est une bactérie aérobie, substitut non pathogène du *Listeria monocytogène* (CECT 4032). C'est une bactérie à Gram positif en forme de bâtonnet qui peut vivre individuellement ou s'organiser en chaînes avec d'autres bactéries. La croissance optimale de cette souche bactérienne est atteinte dans le milieu Trypticase Soy Agar/Broth (TSA/TSB) enrichi en extrait de levure (YE), à une température de 37 °C.

Kocuria rhizophila (ATCC® 9341™) est une bactérie aérobie de Gram positif qui se trouve fréquemment dans le sol. Elle est souvent utilisée dans l'industrie pour les tests antimicrobiens et dans la préparation des aliments. La croissance optimale de cette souche bactérienne est atteinte dans le milieu Trypticase Soy Agar/Broth (TSA/TSB), à une température de 30 °C.

Vibrio alginolyticus (ATCC® 17749™) est un bacille Gram-négatif, incurvé et flagellé, de 2 à 3 µm de long. La croissance optimale de cette souche bactérienne aérobie et halophile est atteinte dans le milieu Marine Agar/Broth (MA/MB), à une température de 37 °C.

2.2.1.2 Les souches de référence marines

Pseudoalteromonas haloplanktis (ATCC® 14393™) est une bactérie aérobie à Gram négatif appartenant à la famille des *Pseudoalteromonadaceae*. Cette bactérie présente dans l'environnement marin et les milieux froids, a une taille qui varie entre 0,2 à 3 µm. La croissance optimale de cette souche est atteinte dans le milieu Marine Agar/Broth 2216 (MA/MB), à une température de 26 °C.

Planococcus kocurii (ATCC® 43650™) est une bactérie halotolérante des milieux froids; c'est une bactérie aérobie à Gram positif qui atteint sa croissance optimale dans de l'eau peptonée ou de l'eau de mer, à une température de 20 °C.

Roseobacter denitrificans (ATCC[®] 33942[™]) est une bactérie aérobie, Gram négatif qui se trouve dans les milieux marins. Les *Roseobacter* reflètent un environnement dynamique et ont diverses interactions avec le plancton marin. La croissance optimale de cette souche est atteinte dans le milieu Marine Agar/Broth 2216 (MA/MB), à une température de 26 °C.

Shewanella colwelliana (ATCC[®] 39565[™]) est une bactérie hétérotrophique anaérobie facultative présente dans l'environnement aquatique et les milieux à basse température. C'est une bactérie à Gram négatif appartenant à l'ordre des Alteromonas. La croissance optimale de cette souche est atteinte dans le milieu Marine Agar/Broth 2216 (MA/MB), à une température de 26 °C.

Vibrio splendidus 7SHRW (Mateo et al. 2009) est une bactérie flagellée à Gram négatif vivant dans les milieux marins, environnement océanique et aussi dans les organismes des bivalves. La croissance optimale de cette souche bactérienne anaérobie facultative est atteinte dans le milieu Marine Agar/Broth 2216 (MA/MB), à une température de 25 °C.

2.2.2 Préparation des souches bactériennes pour les analyses

Une préculture de 24 h a été réalisée selon une dilution au centième (100 µL de culture dans 10 mL de milieu de culture adapté) à partir des souches conservées à -80 °C dans du glycérol, puis un repiquage a été effectué (la culture étant incubée pendant 24 h) avant l'analyse. Les conditions de culture de chacune des souches bactériennes sont spécifiées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Conditions de culture par souche bactérienne

Souches agroalimentaires	Milieux de culture	Températures d'incubation
<i>Kocuria rhizophila</i>	Trypic Soy Broth	30 °C
<i>Escherichia coli</i>	Trypic Soy Broth	37 °C
<i>Listeria innocua</i>	Trypic Soy Broth + 1,2 % d'extrait de levure	37 °C
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Trypic Soy Broth + 2 % de NaCl	37 °C
Souches marines	Milieu de culture	Température d'incubation
<i>Vibrio splendidus</i> 7SHRW (Mateo <i>et al.</i> , 2009)	Marine Broth	25 °C
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	Marine Broth	25 °C
<i>Roseobacter denitrificans</i>	Marine Broth	25 °C
<i>Shewanella colwelliana</i>	Marine Broth	25 °C
<i>Planococcus kocurii</i>	Marine Broth	25 °C

Après une incubation de 24h, les bactéries ont été nettoyées à trois reprises avant l'ensemencement sur la microplaque, afin d'éliminer toute trace résiduelle de milieu de culture. Le nettoyage a été réalisé selon le protocole suivant en conditions stériles: centrifugation de la solution bactérienne à 5000 rpm pendant 5 minutes (afin de séparer le culot bactérien du milieu de culture), élimination du surnageant, ajout de 10 mL d'eau physiologique stérile et homogénéisation délicate.

Lors du dernier nettoyage, le culot bactérien a été repris dans 1 mL d'eau physiologique stérile et 20 µL de cette solution ont ensuite été inoculés dans 4900 µL d'eau physiologique

pour former l'inoculum à environ 4.10^6 bactéries.mL⁻¹, qui servira à l'ensemencement des microplaques.

2.2.3 Préparation des milieux de culture et des solutions

Les milieux de culture ont été choisis selon les critères requis pour la croissance optimale des souches bactériennes. Le milieu Trypic Soy Broth (TSB) a été utilisé pour les analyses avec les souches d'intérêt agroalimentaire, il a été utilisé tel quel pour les souches *Kocuria rhizophila* et *Escherichia coli* ; a été supplémenté par 0,6 % l'extrait de levure (concentration finale) pour la souche *Listeria innocua* (TSB-YE) ; et a été enrichi en NaCl (2 % de la concentration finale) pour la souche *Vibrio alginolyticus*, (TSB 2 % NaCl). Le milieu Marine Broth (MB ; Difco 2216) a été utilisé pour la croissance des souches marines *Vibrio splendidus* (7SHRW), *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Roseobacter denitrificans*, *Shewanella colwelliana*, *Planococcus kocurii*.

Avant leur utilisation en microplaques, les extraits ont été dilués dans de l'eau nanopure (pH 7,43 ±0,2) et les souches bactériennes ont été diluées dans de l'eau physiologique à 9 g.L⁻¹ de NaCl (pH 7,44 ±0,2). Toutes les solutions d'eau préparées ont été préalablement stérilisées par filtration sur une membrane Durapore de 0,22 µm de porosité et autoclavées à 121 °C pendant 15 min, puis conservées à 4 °C.

2.2.4 Préparation des traitements

Trois types de traitements ont été utilisés pour les analyses d'activités antibactériennes; le premier traitement correspond aux extraits bruts riches en saponines de coproduits de *C. frondosa*, le second correspond aux extraits dialysés (extraits bruts dialysés) et le troisième correspond aux saponines commerciales.

Tous ces traitements ont ensuite été dilués avec de l'eau nanopure pour avoir une solution mère à 8 mg.mL^{-1} de concentration (en extraits ou en saponines commerciales); cette solution a été diluée une seconde fois avec de l'eau nanopure lors de l'ensemencement sur microplaque afin d'avoir une gamme de cinq concentrations, soit, $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, 1 mg.mL^{-1} , $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ et 2 mg.mL^{-1} (Concentration finale par puits).

2.2.5 Préparation des microplaques

Une microplaque de 96 puits a été utilisée pour chaque expérience ; comme illustrée sur la figure 5, un contrôle positif (ensemencement des souches bactériennes sans antimicrobien) a été fait pour mesurer la croissance optimale de la souche, des contrôles négatifs sans cellules bactériennes (milieu de culture, eau et antimicrobien) ont également été effectués pour enlever les valeurs des blancs lors des traitements des données et pour vérifier l'absence de contamination microbienne lors des expérimentations.

Tous les puits de la microplaque ont été préparés de la même manière, seuls les traitements changent en fonction de la gamme de concentration analysée. Les puits du contrôle positif contiennent $200 \mu\text{L}$ de solution, soient, $100 \mu\text{L}$ de milieu de culture 2 fois concentrés (2X) (concentration finale 1X), $50 \mu\text{L}$ d'inoculum bactérien et $50 \mu\text{L}$ d'eau nanopure. Les puits des contrôles négatifs sont constitués de $200 \mu\text{L}$ de solution ; dont, $100 \mu\text{L}$ de milieu de culture 2X, $50 \mu\text{L}$ d'eau physiologique et un volume d'eau nanopure proportionnel au volume d'extraits introduits dans les puits. Le traitement a été introduit dans la microplaque selon une gamme de concentration croissante, telle que $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, 1 mg.mL^{-1} , $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ et 2 mg.mL^{-1} de traitement par millilitre de solution contenue dans un puits de la microplaque.

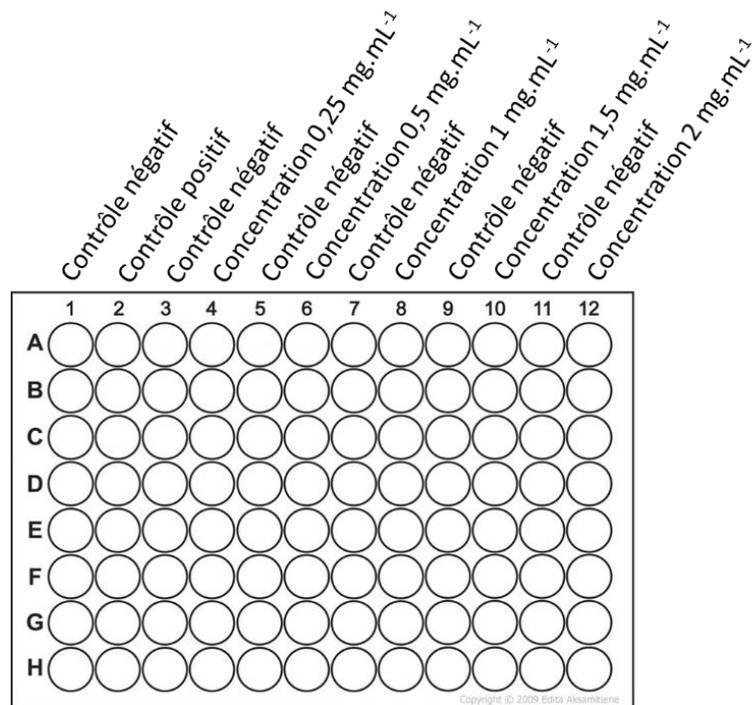


Figure 5: Plan de plaque pour les analyses d'effet antibactérien des extraits riches en saponines de coproduits de *C. frondosa*.

2.2.6 Mesure de croissance bactérienne

Une mesure de cinétique de croissance bactérienne a été réalisée à partir de la mesure de la densité optique (DO), les lectures de DO ont été faites durant 24 h à un intervalle régulier de 30 minutes suite à une agitation automatique de 10 secondes, à une longueur de 595 nm pour les mesures avec les souches marines et à une longueur d'onde de 600 nm pour les mesures avec les souches agroalimentaires. Les longueurs d'onde sont différentes pour les deux souches, en raison de la disponibilité des appareils utilisés lors des analyses qui ont été réalisées dans les laboratoires de Merinov dans le cas des souches d'intérêt agroalimentaire et dans les laboratoires de l'ISMER pour les souches marines. Des tests comparatifs réalisés sur la souche *E.coli* dans les laboratoires de l'ISMER a permis de démontrer qu'il n'y avait pas de différence de lecture significative entre les deux appareils.

Les lectures de DO ont été réalisées avec un spectrophotomètre Spectrafluor Plus (disponible l'ISMer) pour les analyses de l'effet antimicrobien avec les souches marines ; et sur un spectrophotomètre multiscan ascent (disponible dans le laboratoire de microbiologie de Merinov) pour les analyses de l'effet antibactérien avec les souches agroalimentaires.

La cinétique de la croissance bactérienne sur 24 h a permis de déterminer le taux de croissance (μ) de chacune des souches en fonction des différents traitements, à l'aide de l'équation (1).

$$\mu = \frac{\log DO_2 - \log DO_1}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

Où DO_2 correspond à la valeur de la densité optique maximale de la phase de croissance exponentielle de la population bactérienne, DO_1 représente la densité optique minimale à partir de laquelle la phase de croissance exponentielle débute et (t_2-t_1) correspond à la durée du doublement de la population.

Les temps de latence et les valeurs de densité optique maximale (DO_{\max} atteinte durant une croissance de 24h) ont également été déterminés afin de mettre en évidence les variations de la croissance des souches bactériennes en absence et en présence des traitements analysés. Les temps de latence ont été définis à partir de t_0 jusqu'au début de la phase exponentielle de croissance ($DO = 0,1$), et les DO_{\max} ont été déterminées par la valeur de la densité optique maximale atteinte durant la phase stationnaire de la croissance bactérienne.

2.3 EFFETS ANTIADHESIFS DES EXTRAITS RICHES EN SAPONINES DE *C. FRONDOSA*

L'effet antiadhésif des extraits riches en saponines de *C. frondosa* a été quantifié uniquement sur les souches marines analysées, en raison de leur capacité reconnue à former

des biofilms sur les surfaces immergées en milieu marin. Cette analyse a été effectuée par la méthode de coloration au crystal violet.

La formation du biofilm bactérien a été évaluée sur un revêtement neutre développé par la compagnie « Les enduits Mirapakon ». Les analyses ont été effectuées dans des microplaques de 96 puits par ensemencement des souches bactériennes en présence de composés testés (extraits de coproduits et saponines commerciales). Deux gammes de concentrations de saponines de plantes et d'extraits riches en saponines de *C. frondosa* dialysés ont été expérimentées afin de déterminer les pourcentages de réduction de la bioadhésion des souches bactériennes en présence des différentes concentrations d'antimicrobiens.

2.3.1 Préparation des solutions

Le milieu de culture a été préparé selon les critères requis pour la croissance optimale des souches bactériennes marines. Le milieu Marine Broth (MB ; Difco 2216) a été utilisé pour la croissance des souches marines *Vibrio splendidus* (7SHRW), *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Roseobacter denitrificans*, *Shewanella colwelliana* et *Planococcus kocurii* .

Des solutions de Sea Salt Sigma Aldrich (28 PSU, pH=7,4 ±0,2) et de tampon phosphate salin (PBS) (C = 0,024 mol.L⁻¹, pH=7,4 ±0,2) ont également été préparées pour les nettoyages des souches bactériennes lors des analyses. Toutes les solutions d'eau préparées ont été préalablement stérilisées par filtration sur une membrane Durapore de 0,22 µm de porosité (pour éliminer les particules) et autoclavées à 121 °C pendant 15 min, puis conservées à 4 °C.

2.3.2 Préparation des revêtements antiadhésifs

Trois types de traitements ont été utilisés pour les analyses d'effet antiadhésif des extraits de coproduits de *C. frondosa* ; le premier traitement a été effectué avec les extraits

riches en saponines brutes, le second avec les extraits dialysés, et le troisième avec une solution pure de saponines commerciales. Deux gammes de quatre concentrations ont été expérimentées, soit 0,5 mg.mL⁻¹, 1 mg.mL⁻¹, 2,5 mg.mL⁻¹ et 5 mg.mL⁻¹ pour la première gamme, et 0,25 mg.mL⁻¹, 0,75 mg.mL⁻¹, 1,25 mg.mL⁻¹ et 1,75 mg.mL⁻¹ pour la deuxième gamme. Les traitements antiadhésifs ont été préparés à partir d'une solution mère à 250 mg.mL⁻¹.

Le revêtement neutre utilisé lors des analyses est l'enduit MK100 neutre (Les Enduits Mirapakon, Inc.), qui est l'enduit de base dans lequel les traitements antiadhésifs ont été incorporés en tenant compte des gammes de concentration de traitements antiadhésifs prévues pour les analyses de bioadhésion. Les solutions ont été préparées avant l'ensemencement sur des microplaques (selon un protocole tenu sous propriété intellectuelle), et ont été introduites dans les microplaques pour y être séchées à température ambiante pendant 24h, afin de servir de support pour les analyses de bioadhésion.

2.3.3 Préparation des souches bactériennes

En partant des souches marines conservées à -80 °C dans du glycérol, une préculture a été effectuée selon une dilution au centième (1/100 dans 10 mL d'eau physiologique) dans du milieu Marine Broth, puis les souches bactériennes ont été incubées à 25 °C pendant 24 h.

Avant l'ensemencement dans la microplaque, les souches bactériennes ont été nettoyées à trois reprises avec une solution de Sea Salt Sigma Aldrich, afin d'éliminer toutes traces résiduelles de milieu de culture (le protocole de nettoyage des souches bactériennes est le même que celui utilisé pour les analyses d'activités antibactériennes, décrit dans la section 2.2.2 de ce mémoire). Après les nettoyages, 1 mL de Sea Salt Sigma Aldrich a été ajouté dans le tube contenant le culot bactérien, puis le mélange a été homogénéisé ; 15 µL de cette solution a ensuite été ajouté à 14,985 µL de milieu Marine Broth pour former l'inoculum à environ 4.10⁶ bactéries.mL⁻¹.

2.3.4 Détermination de la durée d'incubation

Un test préliminaire a été effectué pour déterminer le temps d'incubation optimal permettant aux souches bactériennes de former un biofilm stable sur l'enduit MK100 lors des analyses. Trois durées d'incubations (48 h, 72 h et 96 h) ont été expérimentées avec toutes les souches de bactéries marines, en présence de l'enduit MK100 seul.

Trois microplaques de 96 puits ont été utilisées pour effectuer ces tests. Tel qu'illustré sur la figure 6, le plan de plaque est constitué d'un contrôle positif (ensemencement des souches bactériennes seules), d'un contrôle négatif sans cellules bactériennes (milieu de culture et solutions d'eaux seulement) pour mesurer la croissance optimale de la souche, de contrôle de l'enduit MK100 (milieu de culture et MK100) pour enlever les valeurs des blancs lors des traitements des données, et des tests avec l'enduit MK100 (inoculum et MK100).

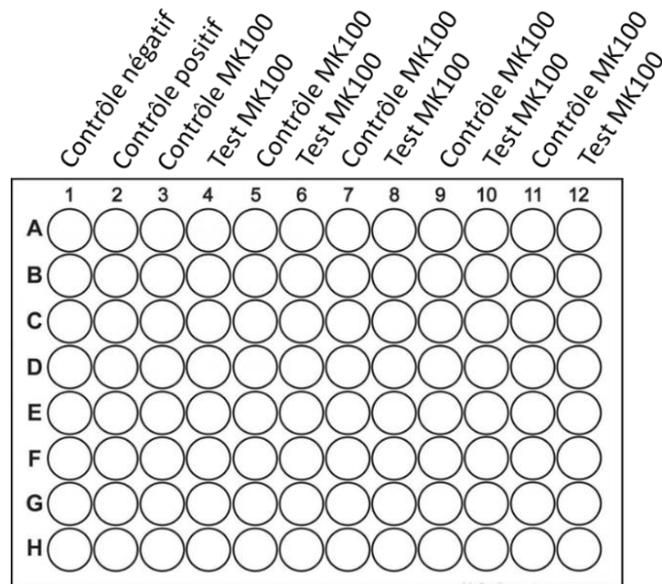


Figure 6: Plan de plaque des tests de la meilleure période d'incubation pour la formation du biofilm bactérien (8 répliques par test)

Les puits du contrôle positif contiennent 200 μL d'inoculum à environ 4.10^6 bactéries.mL⁻¹, les puits des contrôles négatifs sont constitués de 200 μL de milieu Marine Broth et les puits des contrôles MK100 ont été enduits avec 40 μL de MK100 (à l'aide d'un pinceau mousse) puis séchés à plat pendant 24 h à température ambiante. Les puits tests sont constitués par du MK100 séché pendant 24 h et 200 μL d'inoculum bactérien. Les microplaques ont ensuite été incubées à température ambiante, pendant 48 h pour la première plaque, 72 h pour la deuxième et 96 h pour la troisième.

2.3.5 Préparation de la microplaque

2.3.5.1 Préparation des microplaques pour tests de bioadhésion

Avant la coloration au crystal violet, les souches bactériennes ont étéensemencées dans des microplaques de 96 puits en présence des traitements antiadhésifs (extraits riches en saponines de coproduits de *C. frondosa* brutes et dialysées, et saponines commerciales, selon les deux gammes de concentration) et en présence de l'enduit MK100, afin d'expérimenter la formation des biofilms bactériens.

Pour les ensemencements avec les concentrations en traitements antiadhésifs (0,5 mg.mL⁻¹, 1 mg.mL⁻¹, 2,5 mg.mL⁻¹, 5 mg.mL⁻¹ et 0,25 mg.mL⁻¹, 0,75 mg.mL⁻¹, 1,25 mg.mL⁻¹ et 1,75 mg.mL⁻¹), les microplaques enduites avec les solutions MK100 contenant les concentrations en composés antiadhésifs ont été inoculées avec les souches bactériennes selon le plan de plaque illustré par la figure 7. Un contrôle négatif (milieu de culture sans souches bactériennes), un contrôle positif (milieu de culture avec souches bactériennes), un contrôle négatif de l'enduit MK100 (enduit MK100 et milieu Marine Broth) et un contrôle positif de l'enduit MK100 (enduit MK100 avec souches bactériennes) ont été effectués afin de vérifier les contaminations. Des contrôles de l'enduit MK100 contenant les concentrations en composés antiadhésifs ont également été faits pour enlever les valeurs des blancs lors des traitements des données.

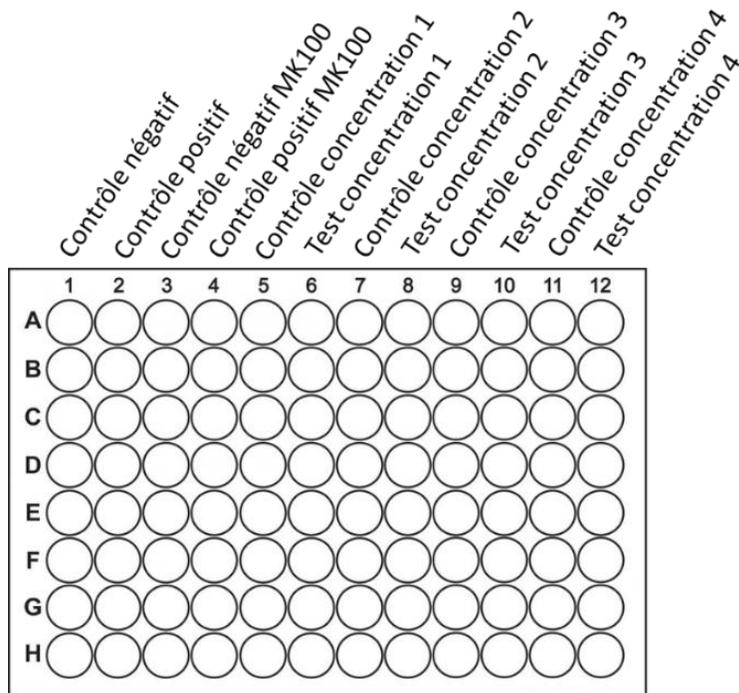


Figure 7: Plan de plaque des analyses de la formation de biofilm bactérien en présence de l'enduit MK100 et des différentes concentrations de traitements antiadhésifs (8 répliques par test)

Les puits du contrôle positif contenaient 200 μL d'inoculum à environ 4.10^6 bactéries. mL^{-1} , les puits des contrôles négatifs sont constitués de 200 μL de milieu Marine Broth. Tous les autres puits contenant du MK100 ont été peints avec 40 μL de MK100 (à l'aide d'un pinceau mousse) puis séchés à plat pendant 24h à température ambiante. Les puits contrôles négatifs MK100 sont constitués par du MK100 et 200 μL de Marine Broth ; les puits contrôles positifs MK100 contiennent du MK100 et 200 μL d'inoculum. Les puits contrôles avec les concentrations en antiadhésifs contiennent du MK100 (incorporé de traitement antiadhésif) et 200 μL de Marine Broth, les puits tests sont constitués de MK100 (incorporé de traitement antiadhésif) et de 200 μL d'inoculum.

Les microplaques ont ensuite été incubées à plat pendant 96 h (sans agitation), à température ambiante pour analyser la formation des biofilms bactériens.

2.3.5.2 Mesure de la présence de cellules bactériennes dans le surnageant

Après incubation, 150 μ L de surnageant de chaque puits des microplaques a été transféré dans une microplaque stérile pour analyser l'abondance des cellules bactériennes dans le surnageant par une lecture de la densité optique à 595 nm avec un spectrophotomètre multiscan Ascent.

2.3.5.3 Marquage au crystal violet

Une coloration au crystal violet a été effectuée pour colorer les cellules bactériennes qui ont adhéré ; les microplaques issues de l'ensemencement avec les enduits contenant les différentes concentrations de composés antiadhésifs ont été rincées à trois reprises avec 200 μ L de sea salt Sigma Aldrich par puits, puis séchées à 37 °C pendant 15 minutes. Les puits ont par la suite été marqués avec 200 μ L de crystal violet à 0.1 % pendant 15 minutes pour colorer les noyaux des cellules vivantes afin de pouvoir les quantifier, puis rincés à trois reprises avec 200 μ L de tampon PBS et séchées à 37 °C pendant 15 minutes. Une resuspension avec 200 μ L d'éthanol à 70 % a ensuite été faite, et finalement, 150 μ L des solutions d'éthanol introduits dans chaque puits ont été transférés dans une autre microplaque pour une lecture de la densité optique à 630 nm, avec le spectrophotomètre multiscan Ascent thermo scientific, pour observer la bioadhésion.

2.4 EXTRACTION ET TRAITEMENTS DES DONNEES

Les calculs effectués avec les moyennes et les écarts-types des données de densité optique obtenues suite aux analyses du potentiel antiadhésif des composants antiadhésifs (extraits riches en saponines de coproduits de *C. frondosa* brutes et dialysées, et saponines commerciales, selon les deux gammes de concentration) par la méthode de coloration au crystal violet ont permis de déterminer le pourcentage de réduction de l'adhésion des souches bactériennes en présence des composants antiadhésifs, et de comparer ces pourcentages entre les différentes concentrations de composants antiadhésifs, et ainsi évaluer l'efficacité des composants antiadhésifs. Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel R STUDIO version 1.1.463 ; la normalité des données de densité optique a été vérifiée avec le test de Shapiro-Wilk (Shapiro and Wilk 1965), ensuite les données de densité optique ont été analysées par analyse de la variance à un facteur (ANOVA) en utilisant le test de Tukey pour identifier les différences entre les groupes (concentrations en extraits). Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives lorsque la valeur de p était inférieure à 0,05 ($p < 0.05$).

3. RESULTATS

3.1 LES EXTRAITS DE COPRODUITS DE *C. FRONDOSA*

Le tableau 2 illustre les proportions des composants constituant les extraits bruts riches en saponines de coproduits de *C. frondosa* obtenus après la première étape d'extraction. Les mesures de certains paramètres se recourent, comme le cas du NaCl et les cendres, et également les lipides et les caroténoïdes. L'identification de ces échantillons d'extraits bruts révèle une forte proportion en lipides et en sel, mais la proportion en saponines contenues dans ces extraits est également considérable (voir tableau 2 et 3).

La dialyse effectuée après les étapes d'extraction ont permis de retirer le plus de sel contenu dans les extraits, permettant ainsi de réaliser les analyses de l'effet antibactérien et antiadhésif des extraits riches en saponines de coproduits de *C. frondosa*.

Tableau 2: Composition en matières sèches des extraits riches en saponines bruts de coproduits de *C. frondosa* (EDG: Équivalents diosgénine)

Échantillons	Protéines (g.100g ⁻¹)	Glycogène (g.100g ⁻¹)	Lipides (g.100g ⁻¹)	Cendres (g.100g ⁻¹)
Extraits bruts évaporés à sec	18,480	0,250	37,280	26,030

Tableau 3: Dosage des saponines, NaCl et caroténoïdes des extraits riches en saponines bruts de coproduits de *C. frondosa*

Échantillons	Saponines (EDG g.100g ⁻¹)	NaCl (g.100 g ⁻¹)	Caroténoïdes (g.100g ⁻¹) (éthanol)
Extraits bruts évaporés à sec	20,418	27,310	0,113

3.2 POTENTIEL ANTIBACTERIEN DES EXTRAITS RICHES EN SAPONINES DE COPRODUITS DE *C. FRONDOSA*

3.2.1 Analyses du potentiel antibactérien des saponines commerciales

Les analyses du potentiel antibactérien effectuées avec les saponines commerciales ont été effectuées avec les souches marines. Ces analyses ont permis de vérifier les effets des saponines sur les souches bactériennes, afin de s'en servir comme référence pour les analyses avec les extraits bruts et les extraits dialysés.

L'évolution de la croissance bactérienne des cinq souches marines, en fonction du temps, est présentée sur la figure 8. Les 5 souches marines réagissent différemment en présence des saponines commerciales, mais en général, l'ajout des saponines aux cultures des souches bactériennes augmente significativement les valeurs des temps de latence au fur et à mesure que la concentration en saponines augmente ($P < 0.05$). Cette augmentation est surtout remarquée pour la souche *S. colwelliana* ; la phase de latence dure jusqu'à 13.5 h à la concentration de 2 mg.mL^{-1} de saponines.

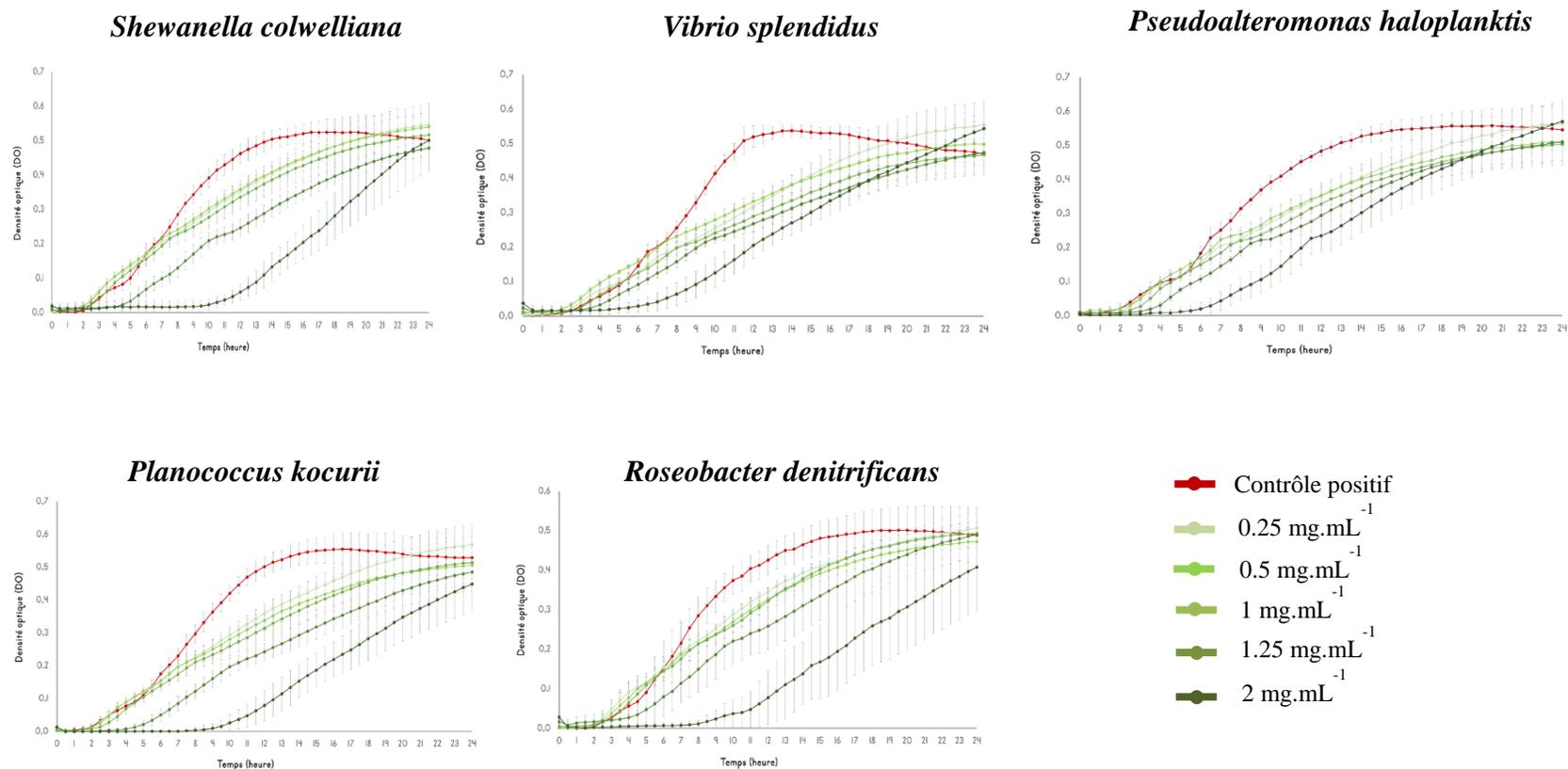


Figure 8: Évolution de la densité optique (DO) en fonction du temps de la culture bactérienne effectuée avec les souches marines *S. colwelliana*, *V. splendidus*, *P. haloplanktis*, *P. kocurii* et *R. denitrificans*, en présence de 5 concentrations de saponines commerciales, et incubée pendant 24h. Les résultats sont représentés sous forme de moyennes et écarts-types, le temps de culture des bactéries est représenté en abscisse, et les valeurs de densités optiques correspondant à l'évolution de la croissance des bactéries sont représentées en ordonnée. La courbe en rouge étant la courbe du contrôle positif, et les dégradés de couleur verte représentent les courbes des analyses avec les 5 concentrations de saponines.

3.2.2 Analyses du potentiel antibactérien des extraits bruts riches en saponines de coproduits de concombres de mer

L'évaluation du potentiel antibactérien des extraits bruts riches en saponines de coproduits de *C. frondosa* a été effectuée sur les souches agroalimentaires et sur les souches marines.

3.2.2.1 Analyses effectuées avec les souches agroalimentaires

L'évolution de la croissance bactérienne des quatre souches agroalimentaires, en fonction du temps, est présentée sur la figure 9. Les 4 souches réagissent différemment en présence des extraits bruts, il n'y a pas d'effet significatif des extraits ($P > 0.05$). Les valeurs des temps de latence et des taux de croissance en présence des extraits sont identiques à celles des contrôles sans antimicrobiens.

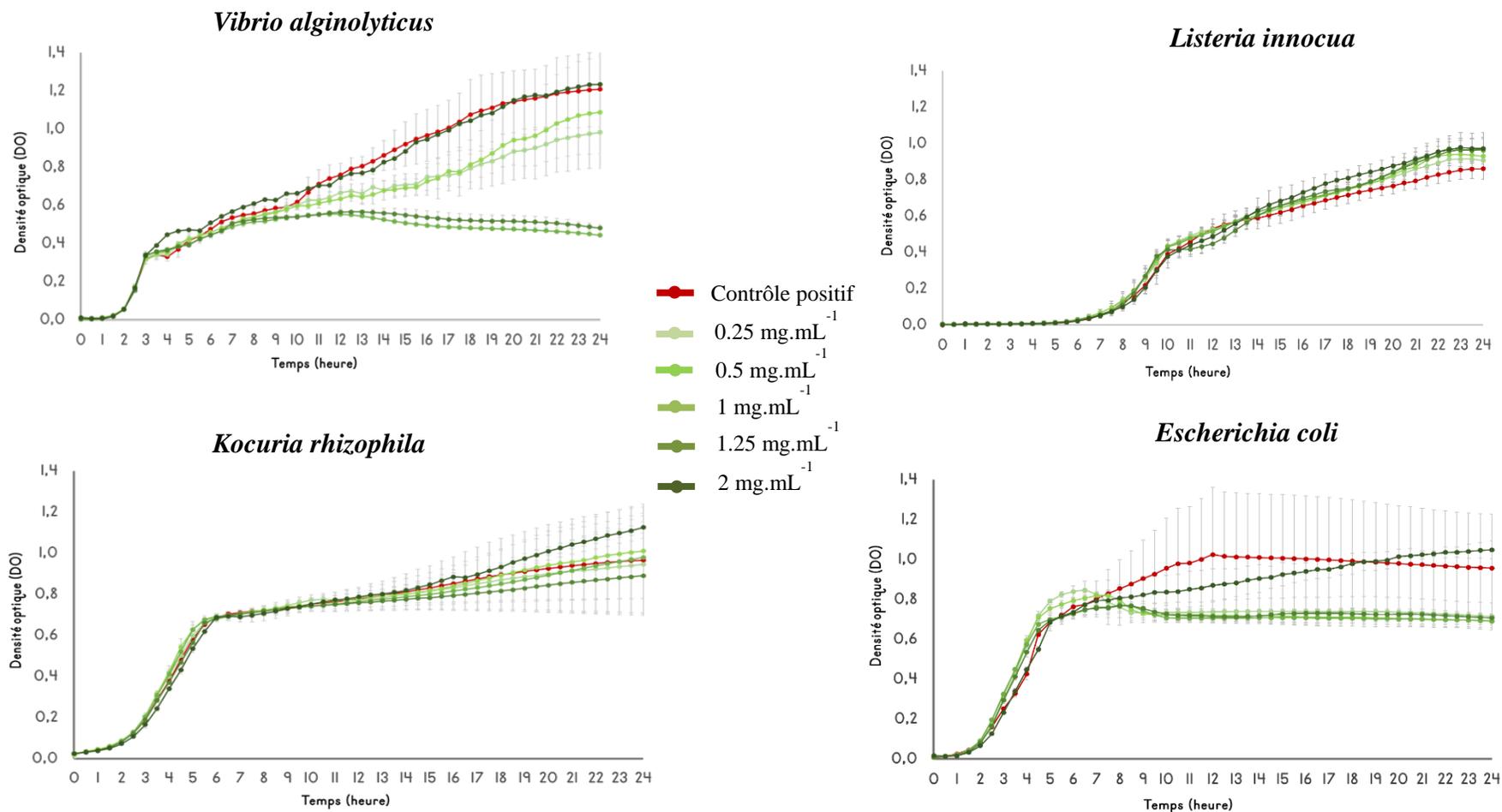


Figure 9: Évolution de la densité optique (DO) en fonction du temps de la culture bactérienne effectuée avec les souches d'intérêt agroalimentaires *V. alginolyticus*, *L. innocua*, *K. rhizophila*, *E. coli* et, en présence de 5 concentrations d'extraits bruts et incubées pendant 24h. Les résultats sont représentés sous forme de moyennes et écarts-types, le temps de culture des bactéries est représenté en abscisse, et les valeurs de densités optiques correspondant à l'évolution de la croissance des bactéries sont représentées en ordonnée. La courbe en rouge étant la courbe du contrôle positif, et les dégradés de couleur verte représentent les courbes des analyses avec les 5 concentrations d'extraits bruts.

3.2.2.2 Analyses effectuées avec les souches marines

L'évaluation du potentiel antibactérien des extraits bruts riches en saponines de coproduits de *C. frondosa* a également été effectuée sur les souches marines. La figure 10 illustre l'évolution de la croissance bactérienne des cinq souches marines, en fonction du temps.

Les 5 souches réagissent différemment en présence des extraits bruts. Il n'y a pas d'effets significatifs des extraits sur les temps de latence et les taux de croissance des souches bactériennes ($P > 0.05$), par contre, à une concentration élevée (2 mg.mL^{-1}), les extraits bruts stimulent la croissance des souches bactériennes. Les valeurs de densité optique (DO) des analyses avec la concentration 2 mg.mL^{-1} d'extraits bruts sont nettement plus élevées par rapport aux valeurs de densité optique des contrôles positifs, à titre d'exemple, pour la souche *R. denitrificans*, la DO_{max} atteint une valeur de 0.742 tandis que pour le contrôle positif, la DO_{max} équivaut à 0.478.

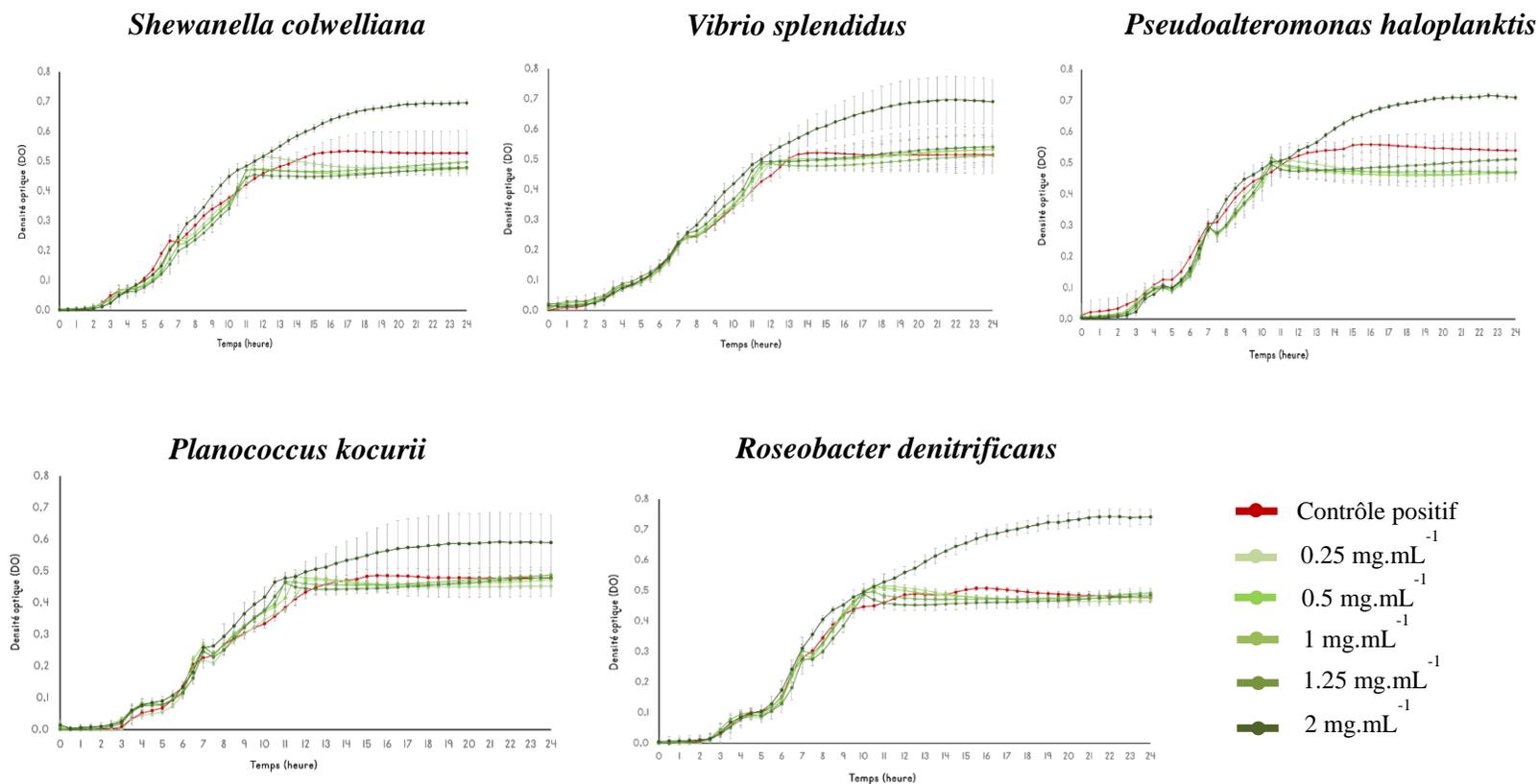


Figure 10: Évolution de la densité optique (DO) en fonction du temps de la culture bactérienne effectuée avec les souches marines *S. colwelliana*, *V. splendidus*, *P. haloplanktis*, *P. kocurii* et *R. denitrificans* et, en présence de 5 concentrations d'extraits bruts et incubées pendant 24h. Les résultats sont représentés sous forme de moyennes et écarts-types, le temps de culture des bactéries est représenté en abscisse, et les valeurs de densités optiques correspondant à l'évolution de la croissance des bactéries sont représentées en ordonnée. La courbe en rouge étant la courbe du contrôle positif, et les dégradés de couleur verte représentent les courbes des analyses avec les 5 concentrations d'extraits bruts.

3.2.3 Analyses du potentiel antibactérien des extraits dialysés riches en saponines de coproduits de concombres de mer

L'évaluation du potentiel antibactérien des extraits dialysés sur les souches marines a été effectuée avec 4 souches marines seulement. Normalement, les analyses auraient dû être faites avec les 5 souches marines, mais faute de temps à cause de la fermeture des laboratoires lors du premier confinement en rapport avec la pandémie covid-19, la dernière analyse n'a pu être effectuée.

L'évolution de la croissance bactérienne des quatre souches marines en fonction du temps est présentée sur la figure 11. Les 4 souches réagissent différemment en présence des extraits dialysés ; il n'y a pas d'effets significatifs des extraits sur les temps de latence et les taux de croissance des souches bactériennes ($P > 0.05$), sauf pour la souche *P. haloplanktis*, l'analyse avec la concentration 1 mg.mL^{-1} montre une valeur significative du temps de latence (10.5 h) par rapport au contrôle positif (6.5 h), ceci est dû à la manipulation lors des analyses. Il est également remarqué que les extraits dialysés stimulent la croissance des souches bactériennes après la phase de croissance exponentielle, surtout pour les analyses effectuées avec une concentration élevée (2 mg.mL^{-1}). Pour la souche *V. splendidus*, ce regain de croissance est significatif ($P < 0.05$); la valeur de la DO_{max} de l'analyse avec 2 mg.mL^{-1} ($\text{DO}_{\text{max}} = 0.948$) d'extrait dialysé atteint plus du double de la valeur de la DO_{max} du contrôle sans antimicrobien ($\text{DO}_{\text{max}} = 0.347$).

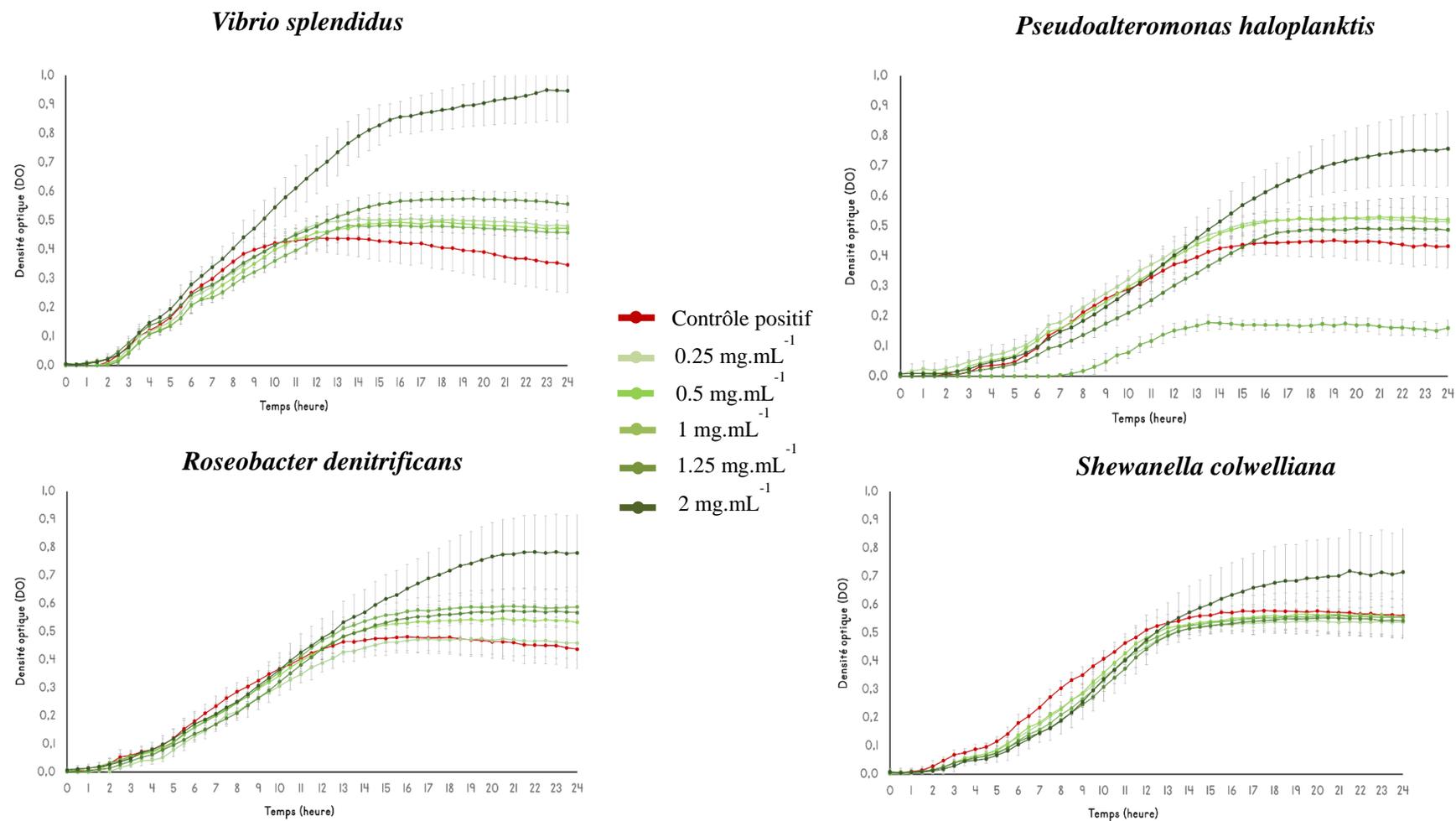


Figure 11: Évolution de la densité optique (DO) en fonction du temps de la culture bactérienne effectuée avec les souches marines *V. splendidus*, *P. haloplanktis*, *R. denitrificans* et *S. colwelliana*, en présence de 5 concentrations d'extraits dialysés riches en saponines, et incubée pendant 24h. Les résultats sont représentés sous forme de moyennes et écarts-types, le temps de culture des bactéries est représenté en abscisse, et les valeurs des densités optiques correspondant à l'évolution de la croissance des bactéries sont représentées en ordonnée. La courbe en rouge étant la courbe du contrôle positif, et les dégradés de couleur brun représentent les courbes des analyses avec les 5 concentrations d'extraits.

3.3 POTENTIEL ANTIADHESIF DES EXTRAITS RICHES EN SAPONINES DE COPRODUITS DE *C. FRONDOSA*

L'évaluation du potentiel antiadhésif des extraits riches en saponines de coproduits de *C. frondosa* a été effectuée sur les souches marines formatrices de biofilms. Les analyses ont été effectuées avec les saponines commerciales, les extraits bruts et les extraits dialysés.

Pour les 5 souches bactériennes, une réduction significative de la bioadhésion est observée à partir de 1 mg.mL⁻¹ de concentration en saponines commerciales et en extraits dialysés (P <0.05), comme présentés sur la figure 12. Les analyses effectuées avec les saponines commerciales présentent le plus de réduction de l'adhésion des souches bactériennes, les effets sont surtout remarquables pour les souches *P. haloplanktis* (69 %) et *P. kocurii* (77 %). Le maximum de réduction de l'adhésion en présence des saponines commerciales est observé à la concentration 2.5 mg.mL⁻¹, avec la souche *V. splendidus* (100 %).

Les extraits bruts ne présentent pas d'effets remarquables sur l'adhésion des souches bactériennes, par contre, les extraits dialysés réduisent significativement l'adhésion des souches à partir de la concentration 2.5 mg.mL⁻¹ (P <0.05); les valeurs atteignent 69 % de réduction pour la souche *S. colwelliana* et 83 % pour la souche *R. denitrificans*. Les effets des extraits dialysés sont significatifs avec les souches *S. colwelliana* (80 %) et *R. denitrificans* (100 %) à une concentration de 5 mg.mL⁻¹ (P <0.05).

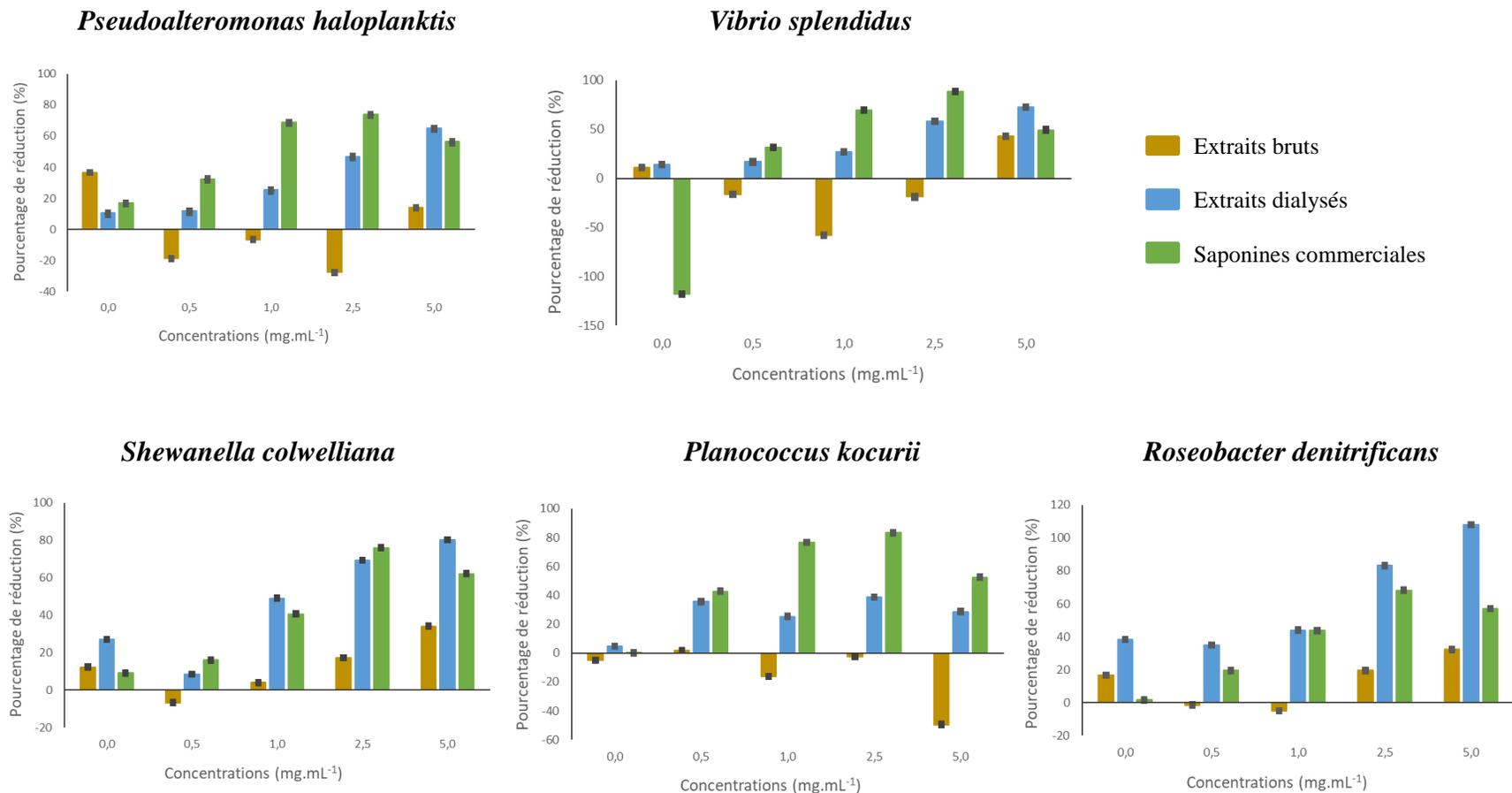


Figure 12: Pourcentages de réduction de l'adhésion des souches marines *V. splendidus*, *P. haloplanktis*, *R. denitrificans* et *S. colwelliana*, *Planococcus kocurii* en fonction des concentrations en antiadhésifs. Les histogrammes bruns représentent les analyses effectuées avec les extraits bruts, les histogrammes bleus représentent les analyses effectuées avec les extraits dialysés et les histogrammes verts représentent les analyses effectuées avec les saponines commerciales. Les concentrations en antiadhésifs sont représentées en abscisse, et les valeurs des pourcentages de réduction de l'adhésion sont représentées en ordonnée. Les analyses effectuées avec la concentration 0 mg.mL⁻¹ représentent les contrôles positifs (analyses en absence d'antiadhésifs).

4. DISCUSSION

Plusieurs études relatives à la recherche de composés antimicrobiens et antiadhésifs utilisant les concombres de mer ont déjà été effectuées par le passé (Haug et al. 2002; Wu et al. 2013), toutefois, ces études ont porté sur différents éléments du concombre de mer (le tégument, le liquide coelomique, ...), mais n'ont pas réellement prêté une attention particulière aux coproduits comme c'est le cas dans la présente étude. Au niveau des coproduits, Ramalho *et al* 2020 ont effectué des recherches sur des coproduits du concombre de mer *C. frondosa* et ont démontré la présence en quantité élevée de composés bioactifs tels que des protéines, des acides gras oméga-3, des minéraux et des saponines (Ramalho et al. 2020). Étant constitués par les organes internes et des parties des téguments des concombres de mer, les coproduits représentent un potentiel intéressant dans la recherche de composants antimicrobiens et antiadhésifs. Cette étude a été réalisée dans ce contexte, afin d'évaluer le potentiel antibactérien et antiadhésif des coproduits du concombre de mer « *C. frondosa* » pour application dans la lutte contre la colonisation bactérienne sur les surfaces de travail dans le milieu agroalimentaire, et sur les équipements immergés dans le domaine du transport maritime et de la navigation de plaisance.

Parmi les différents traitements utilisés lors des analyses du potentiel antibactérien des extraits riches en saponines de coproduits de concombres de mer, les saponines commerciales qui ont été utilisées en tant que contrôles ont démontré que les saponines retardent la croissance des souches bactériennes utilisées, surtout à une concentration de 2 mg.mL⁻¹. Ces saponines commerciales présentent des effets bactériostatiques sur les souches marines analysées, retardant ainsi la phase de croissance exponentielle des souches bactériennes. Les résultats obtenus avec les saponines commerciales valident le fait que le test utilisé peut détecter les effets antibactériens d'un type de saponine commerciale et pourrait donc

potentiellement permettre de détecter les effets d'autres saponines telles que celles retrouvées dans les extraits de concombres de mer.

Les analyses effectuées avec les extraits expérimentaux (extraits bruts et dialysés) n'ont pas démontré des effets antibactériens significatifs sur les souches agroalimentaires ($P > 0.05$); et avec les souches marines, les résultats obtenus avec les analyses en présence de ces extraits expérimentaux, en particulier les extraits bruts montrent une croissance bactérienne plus élevée que les autres surtout à une concentration de 2 mg.mL^{-1} ($P > 0.05$). Les résultats des analyses du potentiel antiadhésif des saponines commerciales démontrent des effets antiadhésifs significatifs ($P < 0.05$) avec une réduction de l'adhésion jusqu'à 100 % des souches bactériennes marines testées avec les concentrations 2.5 mg.mL^{-1} et 5 mg.mL^{-1} de saponines. Ces saponines commerciales ont agi en tant qu'antiadhésifs en réduisant l'adhésion des souches bactériennes marines à partir d'une concentration de 1 mg.mL^{-1} . Les analyses en présence des extraits bruts riches en saponines de coproduits de *C. frondosa* n'ont pas montrés des effets antiadhésifs significatifs ($P < 0.05$), par contre, pour ce qui est des analyses effectuées avec les extraits dialysés, des effets antiadhésifs significatifs sont remarqués à partir de la concentration 1 mg.mL^{-1} ($P < 0.05$), l'adhésion des souches bactériennes marines est réduite jusqu'à 100 % à une concentration de 5 mg.mL^{-1} .

Les résultats des analyses effectuées dans cette étude démontrent qu'il y a plus d'effets significatifs antibactériens et antiadhésifs avec les saponines commerciales qu'avec les extraits expérimentaux. Les saponines commerciales (utilisées en tant que contrôles) sont des saponines pures issues de la plante Quillaja ; différentes études ont déjà été effectuées sur l'activité antibactérienne et antiadhésive des saponines de Quillaja suggérant que l'activité biologique des saponines est liée à leur constitution chimique (Antolak et al. 2018; Patra and Saxena 2009; Yoshiki et al. 1999). Les extraits riches en saponines de coproduits du concombre de mer *C. frondosa* (extraits bruts et dialysés), appelés extraits expérimentaux dans cette étude, ne sont pas purs ; ils contiennent d'autres composants, dont $37.28 \text{ g.100g}^{-1}$ de lipides et $27.31 \text{ g.100g}^{-1}$ de sels tel que démontré dans les résultats de l'identification des extraits (tableau 2 et 3). La différence d'effets entre les saponines commerciales et les extraits

expérimentaux est probablement due au fait que ces extraits expérimentaux contiennent d'autres composants pouvant influencer les résultats lors des analyses. Parmi les extraits expérimentaux, les extraits dialysés présentent des résultats intéressants pour les analyses de la bioadhésion, par contre, les résultats des analyses effectuées avec les extraits bruts n'ont pas démontré des effets significatifs. Toutefois, cette différence d'effets entre les saponines commerciales et extraits expérimentaux peut être due au fait que ces extraits expérimentaux ne sont pas assez purifiés par rapport aux saponines commerciales. Des études effectuées sur des concombres de mer *Holothuria lessona* ont démontré que même purifiées, les échantillons d'extraits de saponines révèlent la présence de 89 congénères de saponines, dont 35 nouvelles saponines et 54 connues, dont les glycosides. Les glycosides triterpéniques identifiés ont montré de puissantes activités antifongiques contre les champignons testés, mais n'ont eu aucun effet antibactérien (Bahrami et al. 2018). En conséquence, il serait possible que les extraits expérimentaux analysés dans cette étude ne présentent pas d'effets antibactériens sur les souches bactériennes testées, mais qu'elles présentent d'autres effets sur la croissance microbienne qui ne semble pas interférer avec cette étude.

Les courbes obtenues à tendance plus élevée que les autres lors des analyses en présence des extraits expérimentaux bruts sur les souches agroalimentaires peuvent être expliquées par la présence d'interférences en lien avec la composition de ces saponines expérimentales. Vu que ces extraits contiennent d'autres éléments dans leur composition (lipides ; ...), il est possible que ces éléments provoquent un effet stimulateur de la croissance bactérienne. Les bactéries ont dû assimiler ces éléments en tant que nutriments pour leur croissance ; ainsi, les effets antibactériens des extraits expérimentaux bruts n'ont pas pu être observés. Des recherches effectuées par Arabski *et al.* 2012 sur les saponines triterpénoïdes, ont démontré une augmentation de la croissance de la souche bactérienne *E. coli* lorsqu'elle est exposée aux saponines. Ces chercheurs ont affirmé que les saponines peuvent augmenter la perméabilité cellulaire et l'afflux de nutriments ; au lieu d'ouvrir l'espace intercellulaire à des conditions extracellulaires potentiellement nocives, les pores nouvellement formés dans les membranes bactériennes permettent le passage des nutriments dans la cellule, ce qui permet aux bactéries de prospérer (Arabski et al. 2012). Dans le cas de cette étude, il est

suggéré que les autres éléments contenus dans les extraits ont interféré en tant que nutriments dans la croissance des bactéries et que les saponines contenues dans ces extraits ont joué le rôle de stimulateurs de croissance bactérienne. De plus, la présence de sels en quantité considérable dans les extraits expérimentaux bruts pourrait également justifier cette interférence sur la croissance bactérienne lors des analyses ; les résultats obtenus dans cette étude sont cohérents avec ceux trouvés dans le travail de Lorent J. H. *et al* sur la nature amphiphile des saponines et leurs effets sur les membranes artificielles et biologiques ; ces chercheurs ont prouvé que les saponines interagissent préférentiellement avec les sels, en raison de leur propriété amphiphile, pouvant ainsi réduire leur capacité tensioactive (Lorent et al. 2014); suggérant que les sels contenus dans les extraits expérimentaux bruts (utilisés dans ce projet) ont réduit la propriété antibactérienne des saponines contenues dans les extraits.

Les effets bactériostatiques provoqués par les saponines commerciales et les extraits expérimentaux dialysés peuvent être expliqués par le mode d'action des saponines contenues dans ces extraits sur les souches bactériennes. Les effets des saponines commerciales sont plus marqués par rapport aux effets des extraits expérimentaux dialysés, parce que les proportions de saponines contenues dans ces deux types de traitements ne sont pas les mêmes et également dû au fait que les autres éléments contenus dans les extraits expérimentaux dialysés peuvent provoquer des interférences malgré le fait que ces extraits expérimentaux dialysés ont déjà subi une étape de purification de plus que les extraits expérimentaux bruts. Toutefois, des études effectuées avec des saponines sur des souches bactériennes démontrent différents effets des saponines ainsi que leurs propriétés bactériostatiques à une certaine concentration. Fleck *et al.* 2019 ont démontré une augmentation de la sensibilité des cultures bactériennes testées en présence d'un prétraitement avec une solution de saponine à 1% ; les cultures préexposées à la solution de saponine et soumises au bromure de N-éthyl-N,N-diméthylhexadécylammonium (QAC) ont montré la moitié de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par rapport aux bactéries non traitées à la saponine (Fleck et al. 2019). Des études sur les activités antioxydantes et antimicrobiennes d'extraits du concombre de mer *Holothuria tubulosa* ont également affirmé le statut bactériostatique plutôt qu'un effet

bactéricide des extraits méthanoliques riches en saponines, dans une gamme de concentrations moins élevée que celle utilisée dans la présente étude (la concentration maximale analysée lors de ces recherches est de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), suggérant que les saponines présentent des effets retardateurs de la croissance des bactéries même à partir d'une faible concentration (Künili and Arik 2018). Ces études confirment bien les observations réalisées dans le cadre de ce projet en utilisant les extraits expérimentaux, il est démontré que des saponines pures ont des effets antibactériens et antiadhésifs considérables, par contre les extraits utilisés dans ce projet n'ont pas d'effet considérable à moindre concentration, ce qui semble être dû au fait que les extraits expérimentaux analysés dans le cadre de cette étude ne sont pas purs ou que les mesures de concentrations en saponines effectuées ne reflètent pas réellement la concentration en saponines contenues dans les extraits expérimentaux analysés dans le cadre de cette étude.

Les concentrations en saponines utilisées peuvent également influencer les résultats des analyses de l'effet antimicrobien des saponines de coproduits de *C. frondosa*. Les concentrations utilisées lors de cette étude sont d'un maximum de 2 mg.mL^{-1} d'extraits expérimentaux ; les résultats présentent que les effets antibactériens sont observés lors des analyses effectuées avec les saponines commerciales, mais pas avec les extraits expérimentaux. Ceci peut être dû au dosage en saponines dans les extraits testés ; plus précisément, l'estimé de la concentration en saponines dans les extraits expérimentaux n'est pas représentatif vu que les saponines n'ont pas été mesurées en tant que telles, mais qu'on a plutôt fait un estimé de la concentration en saponines contenues dans les extraits. Il serait donc possible que les valeurs des concentrations testées ne représentent pas les concentrations en saponines, alors qu'avec les saponines commerciales, il y a réellement les vraies concentrations. Muhammad Imran Khan et al. ont démontré des effets antibactériens significatifs avec des extraits de saponines issues de graines de thé vert, à une concentration maximale de 0.1 mg.mL^{-1} . Il est donc suggéré que l'absence d'effets antibactériens des extraits expérimentaux dans cette présente étude n'a pas de lien avec le dosage des extraits, mais c'est possiblement dû à la nature des extraits et des saponines contenus dans ces extraits expérimentaux (Khan et al. 2018).

L'absence d'effets antibactériens significatifs des extraits expérimentaux pourrait également être expliquée par le fait qu'il y a moins de composés saponifiques dans les coproduits. Les coproduits utilisés dans ce projet sont constitués par les parties internes et les résidus de tentacules des concombres de mer. Hossain *et al.* 2020 ont démontré que les saponines de *C. frondosa* se retrouvent en majorité dans le tégument de l'animal (Hossain *et al.* 2020), mais Ramalho *et al.* 2020 ont par contre stipulé dans leurs analyses sur des coproduits de *C. frondosa* (Ramalho *et al.* 2020), qu'il y a un taux considérable de saponines dans les coproduits de concombres de mer (composés du système digestif, du système respiratoire et des gonades) tout comme rencontré dans cette présente étude. L'absence des effets antibactériens pourrait donc être liée, soit au fait que les saponines contenues dans les coproduits ne sont pas de nature antibactérienne, mais possèdent d'autres fonctionnalités comme vue précédemment (Bahrami *et al.* 2018), soit les autres éléments qui constituent les extraits expérimentaux provoquent des interférences lors des analyses, masquant ainsi les effets antibactériens des saponines.

Les extraits de coproduits de *C. frondosa* utilisés dans ce projet sont issus des concombres de mer qui ont été capturés en été 2017 dans les zones de pêche situées entre Matane et Cap Gaspé (zones comprises entre 5 et 85 mètres de profondeur) (Campagna *et al.* 2005), ils ont été transformés juste après la capture et conservés jusqu'en 2019, avant les étapes d'extraction des saponines. Il est connu que la taille et la nature des concombres de mer capturés varient dépendamment de la zone où ils ont été pêchés. Gosner 2014 a démontré que les individus retrouvés en eaux peu profondes sont plus petits (Gosner 2014), il donc est possible que l'âge et l'état physiologique des concombres de mers utilisés dans ce projet soient la raison de leur variation en composés saponifiques ; toutefois, aucune données dans la littérature n'est disponible à ce propos. La saison de capture, la saison de ponte ainsi que la durée de conservation des coproduits avant la phase d'extraction peuvent également influencer sur la composition des concombres de mer. Abuzaytoun 2017 a démontré que les proportions des classes de lipides contenus dans les concombres de mer varient selon la saison, avec des proportions plus élevées de lipides éthers dans les récoltes d'hiver et de printemps (Abuzaytoun 2017). Des études ont confirmé que la saison de ponte varie de mars à juillet

selon les endroits (Hyman 1955), au Québec, la saison de ponte a lieu à la mi-juin (Hamel and Mercier 1996b). Il est suggéré que tous ces paramètres interfèrent dans la composition moléculaire des extraits utilisés, pouvant ainsi influencer les résultats obtenus lors de cette étude. Cet effet de lot pourrait être contrôlé en comparant plusieurs lots de coproduits lors des analyses des effets antibactériens, ce qui n'a pas été le cas dans cette étude par manque de matériels biologiques (lots de coproduits). Les résultats des analyses des effets antiadhésifs des extraits riches en saponines de coproduits de *C. frondosa* montrent des effets significatifs avec les saponines commerciales et les extraits expérimentaux dialysés à partir de la concentration 1 mg.mL^{-1} (surtout pour les saponines commerciales), par contre, les saponines expérimentales brutes ne présentent pas d'effets antiadhésifs significatifs. Ces résultats sont probablement dus au fait que la composition des saponines expérimentales peut interférer lors des analyses, ceci, en rapport avec les procédés d'extraction (les extraits expérimentaux ne sont pas assez purifiés). Tout comme commenté dans les discussions sur les effets antibactériens des extraits expérimentaux, la nature des coproduits utilisés et leur provenance pourrait également influencer le potentiel antiadhésif des extraits expérimentaux.

Les résultats des analyses du potentiel antiadhésif des extraits expérimentaux dialysés et commerciaux démontrent des effets antiadhésifs significatifs à partir de 1 mg.mL^{-1} , alors que ces deux extraits sont différents au niveau de la concentration en saponines. Il est possible que cette ressemblance d'effets soit due au fait qu'il y a d'autres facteurs qui interfèrent dans la composition des extraits dialysés utilisés, pouvant favoriser le potentiel antiadhésif de ces extraits. Le potentiel antiadhésif des saponines a déjà été démontré dans les recherches avec la plante Quillaja (Antolak et al. 2018), mais des études effectuées sur des concombres de mer de la classe Holothuridae ont également démontré que des composés bioactifs contenus dans les concombres de mer prévenaient l'adhésion bactérienne (Soliman et al. 2016); suggérant que les saponines contenues dans les extraits dialysés analysés dans ce projet ne sont pas forcément les seules responsables des effets antiadhésifs; il se pourrait que d'autres éléments contenus dans les extraits agissent également en tant qu'antiadhésifs, expliquant le fait que les saponines commerciales et extraits expérimentaux ont les mêmes effets à 1 mg.mL^{-1} de concentration.

Les extraits expérimentaux dialysés présentent des effets significatifs de l'adhésion à partir de 1 mg.mL^{-1} tout comme les saponines commerciales ; ces résultats démontrent que les extraits dialysés agissent en tant qu'antiadhésifs à partir de 1 mg.mL^{-1} de concentration. Des études effectuées sur des extraits riches en saponines de concombres de mer démontrent des effets antiadhésifs significatifs sur des diatomées, à des concentrations maximales de 0.15 mg.mL^{-1} , ce qui est largement plus bas que ce qui a été utilisé dans la présente étude (Kamyab et al. 2020). Cependant, il serait possible que les extraits expérimentaux dialysés utilisés dans ce projet présentent des effets antiadhésifs significatifs à partir d'une plus faible concentration, dépendamment du niveau de purification des extraits lors de l'extraction.

Les résultats de la présente étude démontrent que les coproduits du concombre de mer *C. frondosa* ont montré des propriétés antibactériennes (bactériostatiques) et antiadhésives contre les bactéries marines formatrices de biofilms en milieu immergé, mais ces propriétés sont toutes limitées dans leur ampleur. Les activités antibactériennes observées restent toutefois très limitées pour les extraits, ce qui n'est pas le cas pour les activités antiadhésives. Le potentiel antibactérien des extraits de coproduits de *C. frondosa* n'est pas marquant, par contre, il y a un potentiel intéressant avec les antiadhésifs et qui pourrait être utilisé dans le domaine de la biotechnologie à condition de valider la reproductibilité, en tenant en compte des autres facteurs qui peuvent interférer dans la composition des extraits (lots de coproduits, saison de pêche ; ...). Le potentiel antiadhésif des extraits riches en saponines de coproduits de *C. frondosa* démontré dans les résultats pourraient aussi présenter un grand intérêt dans le domaine de la conservation du milieu marin ; vu que ces extraits ne tuent pas les bactéries, mais qu'ils empêchent simplement leur adhésion sur les surfaces immergées. Ces extraits sont également intéressants parce qu'ils sont non sélectifs, c'est-à-dire, ils n'agissent qu'avec les bactéries formatrices de biofilms marins et ne contiennent pas de substances biocides pouvant représenter un risque pour l'environnement marin. Malgré l'extraction et les procédés de purification effectués lors de cette étude afin d'obtenir des extraits riches en saponines, il restait encore des impuretés dans les extraits utilisés. Ces procédés d'extraction nécessitent du temps et beaucoup de solvants afin d'obtenir une petite portion de saponines utilisables pour effectuer les analyses des effets antibactériens et antiadhésifs. Cependant, il

est connu que les procédés d'extraction permettant d'obtenir des saponines pures sont coûteux et nécessitent beaucoup de temps, cela ne va pas dans l'intérêt des entreprises de pêche dans un contexte de valorisation de coproduits. Bien que les extraits ne sont pas purs, les résultats des analyses des effets antiadhésifs de ces extraits riches en saponines de coproduits de *C. frondosa* pourraient être intéressants pour de futures recherches, dans un but d'une potentielle exploitation du pouvoir antiadhésif des extraits.

5. CONCLUSION

En conclusion, les effets antibactériens et antiadhésifs des extraits riches en saponines de concombres de mer *C. frondosa* ont été analysés. Ce projet d'étude a été effectué dans le but de documenter un nouveau moyen de valorisation des coproduits de concombres de mer issus de l'exploitation de l'entreprise « Poissonnerie de Cloridorme » ; et également afin de trouver un nouveau composant antibactérien et antiadhésif pour application dans la fabrication de peintures antisalissure sans biocides pour l'entreprise « Les Enduits Mirapakon ». Les extraits bruts et dialysés riches en saponines de coproduits de concombre de mer utilisés pour réaliser les analyses de l'effet antibactérien et antiadhésif sont issus des étapes d'extraction effectuées dans le laboratoire de chimie de Merinov (partenaire de ce projet) et dans le laboratoire de microbiologie de l'ISMER. Des saponines commerciales issues de la plante Quillaja ont également été utilisées à titre de références ; les analyses ont été effectuées avec des souches agroalimentaires et des souches marines formatrices de biofilms.

Les extraits bruts et les extraits dialysés ne présentent pas d'effets antibactériens significatifs, contrairement aux saponines commerciales qui agissent en tant que retardateurs de croissance pour les bactéries marines à partir d'une concentration de 1 mg.mL⁻¹. Les analyses du potentiel antiadhésif n'ont pas révélé d'effets significatifs des extraits bruts contrairement à ce qui a été observé avec les extraits dialysés. De futures études sont requises pour étudier le lien entre les différences de composition chimique de ces deux types d'extraits et les différences d'effet antiadhésif observées. Par contre les analyses du potentiel antiadhésif des extraits dialysés et les saponines commerciales ont révélé des effets significatifs à partir d'une concentration de 1 mg.mL⁻¹, les extraits dialysés et les saponines commerciales réduisent jusqu'à 100 % l'adhésion des souches marines à une concentration de 5 mg.mL⁻¹. Les résultats de ce projet ont permis de savoir que les extraits riches en saponines de coproduits de *Cucumaria frondosa* présentent un potentiel intéressant pour la lutte contre la bioadhésion en milieu marin, bien que les effets antibactériens ne sont pas marqués. Les extraits nécessitent une purification supplémentaire afin d'obtenir des résultats

plus reproductibles ; mais les résultats obtenus sur les propriétés antiadhésifs des extraits riches en saponines de coproduits de *Cucumaria frondosa* pourraient justifier de futurs travaux dans un but d'une potentielle d'exploitation du pouvoir antiadhésif des extraits .

L'objectif de cette étude étant d'évaluer le potentiel antimicrobien d'extraits de coproduits de *C. frondosa* pour des applications industrielles dans le domaine agroalimentaire et dans le domaine de la réduction du biofouling ; cette étude nous a permis de démontrer que les activités antibactériennes potentielles ne mèneront probablement pas à une valorisation, mais qu' il serait intéressant de poursuivre les explorations des capacités antiadhésives de ces extraits pour vérifier le potentiel de valorisation et de commercialisation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abuzaytoun, R. 2017. Seasonal variation of lipid and carotenoid content of *Cucumaria frondosa* viscera oil and the development of methods for its quality control.
- Altmann, K.-H. 2017. Drugs from the oceans: marine natural products as leads for drug discovery. *Chimia International journal for chemistry* 71: 646-652.
- Antolak, H., U. Mizerska, J. Berlowska, A. Otlewska, and D. Kregiel. 2018. Quillaja saponaria saponins with potential to enhance the effectiveness of disinfection processes in the beverage industry. *Applied sciences* (3)8: 368.
- Arabski, M., Wegierek-Ciuk, A., Czerwonka, G., Lankoff, A., and Kaca, W. 2012. Effects of saponins against clinical *E. coli* strains and eukaryotic cell line. *Journal biomedicine and biotechnology*: 286216.
- Arvanitoyannis, L. S., and A. Kassaveti. 2008. Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. *International journal of food science & technology* 43: 726-745.
- Bahrami, Y., W. Zhang, and M. M. C. Franco. 2018. Distribution of saponins in the sea cucumber *Holothuria lessoni*; the body wall versus the viscera, and their biological activities. *Marine drugs* 16(11): 423.
- Bodiguel, C., and A. Ward. 2014. Haute valeur et surexploitation: la nécessité d'une meilleure gestion des pêcheries du concombre de mer. Smart fiche 13, Food and agriculture organization of the United Nations (FAO). 4.
- Bradshaw, V., C. Ryan, and C. Cooper. 1991. Experimental harvesting and processing of sea cucumber (*Cucumaria frondosa*) in Saint Mary's bay, Nova Scotia, June 1990. Fisheries development and fishermen's service division, Scotia-Fundy region, DFO, Project report 161: 14.
- Bruckner, A. W. 2006. Proceedings of the CITES workshop on the conservation of sea cucumbers in the families Holothuriidae and Stichopodidae. NOAA technical memorandum NMFSOPR 34, silver spring, MD: 244.
- Bryl, P., M.-E. Carbonneau, and N. Renaud. 2015. Les coproduits de la transformation du concombre de mer. Rapport de recherche-développement, Merinov N°15-02: 8p.
- Campagna, S., J. Lambert, and P. Archambault. 2005. Abondance et distribution du concombre de mer (*Cucumaria frondosa*) et prises accidentelles obtenues par dragage entre Matane et Cap-Gaspé (Québec) en 2004. Sciences branch, Maurice Lamontagne Institute.
- Chenoweth, S. B., and J. McGowan. 1995. Sea cucumbers in Maine: fishery and biology. Me. department of marine resources.
- Conand, C. 1989. Les Holothuries aspidochirotés du lagon de Nouvelle-Calédonie: biologie, écologie et exploitation.

- Conand, C. 2001. Overview of sea cucumbers fisheries over the last decade-what possibilities for a durable management. Baker M. [eds.]. *Echinoderms 2000*: 339-344.
- Conand, C. 2004. Present status of world sea cucumber resources and utilization: An international overview. *In* Lovatelli A., Conand C., Purcell S., Uthicke S., Hamel J. F. and Mercier A. [eds.], *Advances in sea cucumber aquaculture and management*. FAO fisheries technical paper No. 463. 425 p.: 13-23.
- Conand, C. 2017. Expansion of global sea cucumber fisheries buoys exports. *Revista de biología tropical* 65: 1-10.
- Conand, C., S. Ribes-Beaudemoulin, F. Trentin, T. Mulochau, and E. Boissin. 2016. Oursins, étoiles de mer et autres échinodermes. Biodiversité de la Réunion. les éditions du cyclone.
- Cui, F.-X. and others 2007. Characterization and subunit composition of collagen from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Food chemistry* 100: 1120-1125.
- Dallaire, J.-P., D. Hamel, and C. Le Mer. 2013. Évaluation du potentiel de la pêche au concombre de mer (*Cucumaria frondosa*) en Minganie, Nord du golfe du Saint-Laurent (Québec). *Rapp. tech. can. sci. halieut. aquat.* 3052 : v + 32 p: 32.
- De Marco, S., M. Piccioni, D. Muradyan, C. Zadra, R. Pagiotti, and P. Donatella. 2017. Antibiofilm and antiadhesive activities of different synbiotics. *Journal of probiotics & health* 05(3): 182-191.
- Desrosiers, A., J. Lavallée, Michaud J. C., and W. J.R. 1989. Évaluation du potentiel commercial du concombre de mer (*Cucumaria frondosa*). Programme de développement de l'Est du Québec, Ministère des Pêches et Océans région du Québec, division du développement. Rapport 32. 116 p.
- Eeckhaut, I., E. Parmentier, P. Becker, S. Silva, and M. Jangoux. 2003. Parasites and biotic diseases in field and cultivated sea cucumbers. *Adv. Sea Cucumber Aquac. Manag.:* 311-325.
- Falk-Petersen, I. B. 1982. Breeding season and egg morphology of echinoderms in Balsfjorden, Northern Norway. *Sarsia.* 67 (4): 215–221.
- FAO. 2020. State of world fisheries and aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. 200: 15(224).
- Feindel, S. 2002. Status of the Maine sea cucumber (*Cucumaria frondosa*) fishery. Report to the standing legislative committee on marine resources. Maine: department of Marine resources: 35.
- Fleck, J. and others 2019. Saponins from *Quillaja saponaria* and *Quillaja brasiliensis*: Particular chemical characteristics and biological activities. *Molecules* 24(1): 171.
- Funke, B. R., C. L. Case, M. Dupuis, and L. Martin. 2016. Introduction à la microbiologie. ERPI Sciences Troisième édition: 1074 p.
- Gianasi, B. L., J.-F. Hamel, E. M. Montgomery, J. Sun, and A. Mercier. 2021. Current knowledge on the biology, ecology, and commercial exploitation of the sea cucumber *Cucumaria frondosa*. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 29: 582-653.
- Gianasi, B. L., C. Parrish, J.-F. Hamel, and A. Mercier. 2017a. Supplementary data influence of diet on growth, reproduction, and lipid and fatty acid composition in the sea cucumber *Cucumaria frondosa*. *Aquaculture research* 48(7): 3413-3432.

- Gianasi, B. L., C. C. Parrish, J. F. Hamel, and A. Mercier. 2017b. Influence of diet on growth, reproduction and lipid and fatty acid composition in the sea cucumber *Cucumaria frondosa*. *Aquaculture research* 48(7): 3413-3432.
- Gilliland, P. M. 1993. The skeletal morphology, systematics and evolutionary history of holothurians. *Spec pap palaeontol* 47: 1-147.
- Gosner, K. L. 2014. *Atlantic seashore: A field guide to sponges, jellyfish, sea urchins, and more*. Houghton mifflin harcourt.
- Gudimova, E. N., A. Gudimov, and P. Collin. 2004. A study of the biology for fishery in two populations of *Cucumaria frondosa*: In the Barents Sea (Russia) and in the Gulf of Maine (USA). *Echinoderms münchen: proceedings of the 11th international echinoderm conference*: 269-275.
- Guerard, F., M. T. Sumaya-Martinez, D. Laroque, A. Chabeaud, and L. Dufossé. 2007. Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards. *Process biochemistry* 42: 1486-1491.
- Hamel, J. F., and A. Mercier. 1996a. Gonad morphology and gametogenesis of the sea cucumber *Cucumaria frondosa*.
- Hamel, J. F., and A. Mercier. 1996b. Gonad morphology and gametogenesis of the sea cucumber *Cucumaria frondosa*. *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin* 8: 22-33.
- Haug, T., A. K. Kjuul, O. Styrvold, E. Sandsdalen, Ø. Olsen, and K. Stensvåg. 2002. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *Journal of invertebrate pathology* 81: 94-102.
- Hossain, A., D. Dave, and F. Shahidi. 2020. Northern sea cucumber (*Cucumaria frondosa*): A potential candidate for functional food, nutraceutical, and pharmaceutical sector. *Marine drugs* 18: 274.
- Hyman, L. H. 1955. *The invertebrates. Echinodermata* New York 4: 763 pp.
- In Beaugregard, K. A., N. T. Truong, H. Zhang, W. Lin, and G. Beck. 2001. The detection and isolation of a novel antimicrobial peptide from the echinoderm *Cucumaria frondosa*, p. 55-62. *Phylogenetic perspectives on the vertebrate immune system*. Springer.
- Islam, M. S., S. Khan, and M. Tanaka. 2004. Waste loading in shrimp and fish processing effluents: potential source of hazards to the coastal and nearshore environments. *Marine pollution bulletin* 49: 103-110.
- Jin, J. O. and others 2009. Differential effects of triterpene glycosides, frondoside A and cucumarioside A2-2 isolated from sea cucumbers on caspase activation and apoptosis of human leukemia cells. *FEBS letters* 583(4): 697-702.
- Jordan, A. J. 1972. *On the ecology and behavior of Cucumaria frondosa (Echinodermata: Holothuroidea) at Lamoine beach, Maine*. University of Maine.
- Kamyab, E. and others 2020. Anti-fouling effects of saponin-containing crude extracts from tropical Indo-Pacific sea cucumbers. *Marine drugs* 18(4): 181.
- Khan, M. I., A. Ahhmed, J. H. Shin, J. S. Baek, M. Y. Kim, and J. D. Kim. 2018. Green tea seed isolated saponins exerts antibacterial effects against various strains of gram positive and gram negative bacteria, a comprehensive study in vitro and in vivo. *Evidence-based complementary and alternative medicine* 2018.

- Khotimchenko, Y. 2018. Pharmacological potential of sea cucumbers. *International journal of molecular sciences* 19(5): 1342.
- Kristinsson, H., and B. A. Rasco. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical reviews in food science and nutrition* 40(1): 43-81.
- Künili, I., and C. Arik, F. 2018. Antioxidant and antimicrobial activity of sea cucumber (*Holothuria tubulosa*, Gmelin 1791) extracts. *Çanakkale onsekiz mart university journal of marine sciences and fisheries* 1(2): 66-71.
- Le Norcy, T. 2017. Étude et valorisation de composés naturels ou d'analogues de synthèse contrôlant l'adhésion de salissures marines. Université de Bretagne Sud.
- Lorent, J. H., J. Quetin-Leclercq, and M.-P. Mingeot-Leclercq. 2014. The amphiphilic nature of saponins and their effects on artificial and biological membranes and potential consequences for red blood and cancer cells. *Organic & biomolecular chemistry* 12: 8803-8822.
- Ludwig, H. 1889-1892. Echinodermen: Die Zeewalzen. Broon's klassen und ordnungen des their-reichs, wissenschaftlich dargestellt in wort und bild. CF. Winter'sche verlagshandlung, leipzig: 460.
- Ludwig, H. L. 1891. *Ankyroderma musculus* (risso), eine molpadiide des mittelmeeres, nebst bemerkungen zur phylogeni und systematik der holothurien. 51: 569-612.
- Mamelona, J., R. Saint-Louis, and E. Pelletier. 2010. Proximate composition and nutritional profile of by-products from green urchin and Atlantic sea cucumber processing plants. *International journal of food science & technology* 45(10): 2119-2126.
- Mateo, D. R., A. Siah, M. T. Araya, F. C. J. Berthe, G. R. Johnson, and S. J. Greenwood. 2009. Differential in vivo response of soft-shell clam hemocytes against two strains of *Vibrio splendidus*: Changes in cell structure, numbers and adherence. *Journal of invertebrate pathology* 102(1): 50-56.
- Mercier, A., and J.-F. Hamel. 2009. Advances in marine biology: endogenous and exogenous control of gametogenesis and spawning in echinoderms.
- Molinski, T., D. Dalisay, S. Lievens, and J. Saludes. 2009. Drug development from marine natural products. *Nature reviews. Drug discovery* 8: 69-85.
- MPO. 1996. Holothurie du plateau néo-écossais. Rapport sur l'état des stocks 96/125F. Région des Maritimes: 2 p.
- MPO. 2005. Expert opinion on whether the stage I (experimental) license for sea cucumber in 4X should proceed to stage II. . Expert Opinion 2005/07. Maritimes Region. 16 p.
- MPO. 2009. Évaluation de la pêche exploratoire de l'holothurie (*Cucumaria frondosa*) dans le sud-ouest du Nouveau-Brunswick. Avis scientifique 2009/014. Région des Maritimes: 13 p.
- MPO. 2014. Évaluation de la pêche au concombre de mer dans les eaux côtières du Québec en 2013. Secr. can. de consult. sci. du MPO. Avis sci. 2014/054.
- MPO. 2017. Compte rendu de l'examen régional par des pairs sur l'évaluation de la pêche au concombre de mer des eaux côtières du Québec. Secr. can. de consult. sci. du MPO. Compte rendu 2017/035 compte rendu 2017/035.
- MPO. 2019. Débarquement des pêches maritimes. Disponible en ligne à <https://www.dfo-mpo.gc.ca/stats/commercial/land-debarq/sea-maritimes/s2019pq-fra.htm>.

- MPO. 2021. Évaluation de la pêche au concombre de mer des eaux côtières du Québec en 2020. Secr. can. de consult. sci. du MPO. Avis sci. 2021/042.
- Nunavut. 2012. Nunavut coastal resource inventory: Grise Fiord. Department of Environment. Government of Nunavut.
- Patra, A., and J. Saxena. 2009. The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutrition research reviews* 22(2): 204-219.
- Quiniou, F., and C. Compère. 2021. La chimie et la mer. Chapitre 3 : La chimie à l'assaut des biosalissures: 177-194.
- Ramalho, A., N. Leblanc, M.-G. Fortin, A. Murette, A. Tchernof, and H. Jacques. 2020. Characterization of a coproduct from the sea cucumber *Cucumaria frondosa* and Its effects on visceral adipocyte size in male wistar rats. *Marine drugs* 18(11): 530.
- Reich, M. 1999. Ordovizische und silurische Holothurien (Echinodermata). *Festschrift zum 65: 479-488.*
- Reich, M. 2001. Ordovician holothurians from the Baltic sea area. *Echinoderms 2000: proceedings of the 10th international conference, Dunedin* 31: 93-96.
- Roux, A., and J.-M. Ghigo. 2006. Les biofilms bactériens. *Bulletin de l'académie vétérinaire de France*: 261.
- Rowe, S. and others 2009. Assessment of the exploratory fishery for sea cucumber (*Cucumaria frondosa*) in Southwest New Brunswick. *DFO Can. Sci. Advis. Sec. Res. Doc. 2009/005. viii: 23 p.*
- Samyn, Y., D. Vandenspiegel, and C. Massin. 2006. Taxonomie des holothuries des Comores. 1: 20.
- Shapiro, S. S., and M. B. Wilk. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52: 591-611.
- Singh, R., B. A. MacDonald, M. L. H. Thomas, and P. Lawton. 1999. Patterns of seasonal and tidal feeding activity in the dendrochirote sea cucumber *Cucumaria frondosa* (Echinodermata: Holothuroidea) in the bay of Fundy, Canada. *Marine ecology progress series* 187: 133-145.
- So, J., J. F. Hamel, and A. Mercier. 2010. Habitat utilisation, growth and predation of *Cucumaria frondosa*: implications for an emerging sea cucumber fishery. *Fisheries Management and Ecology* 17: 473-484.
- So, J. J., S. Uthicke, J.-F. Hamel, and A. Mercier. 2011. Genetic population structure in a commercial marine invertebrate with long-lived lecithotrophic larvae: *Cucumaria frondosa* (Echinodermata: Holothuroidea). *Marine Biology* 158: 859-870.
- Soliman, Y. A., A. M. Ibrahim, H. R. Z. Tadros, A. E. A. Abou-Taleb, A. H. Moustafa, and M. A. Hamed. 2016. Antifouling and antibacterial activities of marine bioactive compounds extracted from some red sea cucumber. *Contemp appl Sci* 3: 83-103.
- Sutterlin, A. M., and S. L. Waddy. 1975. Harvesting, processing, and composition of sea cucumber meal as a possible substitution for herring meal in trout diets. *Environnement Canada, fish. mar. ser. tech. rep.* 531:8p.
- Sylla, Y. 2011. Nettoyage en place des lignes agro-industrielles : Etude cinétique d'élimination des biofilms négatifs au sein des installations fermées dans les industries agroalimentaires. *AgroParisTech.*

- Toral-Granda, V. and others 2008. Sea cucumbers. A global review on fishery and trade. SPC Bêche-de-mer Information Bulletin 28: 4-6.
- Tripoteau, L. 2015. Upgrading of byproducts from the holothurian *Cucumaria frondosa* by the study of bioactive extracts and ecotoxicological approach of the secondary metabolites released under stress conditions. Université de Bretagne Sud.
- Wen, J., C. Hu, and S. Fan. 2010. Chemical composition and nutritional quality of sea cucumbers. Journal of the science of food and agriculture 90(14): 2469-2474.
- Worms. 2020. Actinopoda.
<https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=1393249>.
- Wu, F.-J. and others 2013. The protective effect of eicosapentaenoic acid-enriched phospholipids from sea cucumber *Cucumaria frondosa* on oxidative stress in PC12 cells and SAMP8 mice. Neurochemistry international 64: 9-17.
- Yoshiki, Y., S. Kudou, and K. Okubo. 1999. Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoid saponins from soybean. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 62(12): 2291-2299.

