

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologique
Spécialité : Biotechnologie microbienne



Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Etude comparative de l'activité
antimicrobienne des extraits d'algues
marines obtenus par fluides pressurisés et
par extraction classique**

Présenté par :

BENSALEM Yasmina & HASSANI Nawal

Soutenu le : **12 Juin 2016**

Devant le jury composé de :

Mr MOUSSAOUI B.	MAA	Président
Mme IDRES KERAMANE B.	MAA	Encadreur
Mme MERDJANE LAINCER F.	MAA	Examineur

Année universitaire : 2015 / 2016

Remerciements



NOUS remercions tout d'abord à ALLAH tout puissant pour nous avoir donné la volonté, la patience et le courage nécessaire pour mener ce modeste travail.

*Nous tenons particulièrement nos profonds remerciements et nos vifs remerciements à Notre promotrice **M^{me} IDRES KERAMANE B** Pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils, ses encouragements et la confiance qui nous ont permis de mener à bien cette étude.*

*On tient à exprimer nos profonds respect et remerciements à **Mr MOUSSAOUI B**, d'avoir accepté de présider notre soutenance, ainsi que le jury.*

*On tient également nos remerciements à **Mme MERDJANE LAINCER F** pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de lire, corriger et examiner ce mémoire.*

*Un grand merci pour **Mr Adjebli** qui nous a appris l'étude statistique dont on lui adresse tout son respect pour sa disponibilité et sa gentillesse.*

*Nos vifs remerciements s'adressent aux techniciennes du laboratoire mycologie pour leur aide et leurs conseils et je pense spécialement à **FATMA ZAHRA** et du bloc 9, aux secrétaires des départements de Microbiologie, ainsi qu'aux techniciennes de l'animalerie pour leurs très grandes aides et leurs gentillesse,*

Enfin, nos remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail et qui nous ont encouragés et soutenus à tout moment.



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

*A mes très chers parents qui ont toujours été derrière moi et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur, de persévérance, de l'amour et de la force et dont je suis fière et reconnaissante
D'avoir comme parents.*

Pour vous mes très chers et irremplaçables :

A mes chères sœurs : Hakima ainsi que son mari, Siham, Lamou et Souad.

A mes chers frères : Atheman ainsi que sa femme, Karim et Azzedine.

A mes très chères nièces : Dalia, Bouchera et Mordjane.

A mon très cher neveu Mehdi.

A mes cousines et cousins.

A tous mes amis

*A ma binôme Nawal, elle m'a supporté tout le long de ce travail et à qui je souhaite tout le
Bonheur du monde et de la réussite.*

A tous les gens de ma promotion, enseignants et étudiants.

A ceux qui me sont chers et qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail.

Mina

Dédicaces

J'ai le plaisir de dédies ce modeste travail à :

A mes très chers parents, les prunelles de mes yeux.

A ma grand-mère.

A la mémoire de ma chère tante, que dieu l'accueil en son vaste paradis.

A mes chers frères : Akli et Nadjim.

Mes adorables sœurs Sabah, Rbiha ainsi que leurs petites familles et Chahinez, Fatsiha, Ahlam, Hiba

A mes cousins et cousines.

A toute la famille Hassani et Abbaci.

Mes chères amies à leur tête : Sadjia, Fatiha, Monia, Assia, Kamy, Dihia et bien sur ma binôme mina.

Enfin à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

NAWAL

Liste des tableaux

Tableau I : Caractéristiques botaniques des espèces d'algues marines récoltées	09
Tableau II: les différentes souches bactériennes et fongiques utilisées.....	15
Tableau III: Concentrations minimal inhibitrices des différents extraits d'extraction classique vis-à-vis <i>SARM</i>	33
Tableau IV : Concentrations minimal inhibitrices des différents extraits d'extraction classique vis-à-vis <i>E.oli</i>	34
Tableau V : Concentrations minimal inhibitrices des différents extraits d'extraction classique vis-à-vis <i>candida albicans</i>	34
Tableau VI: Concentrations minimal inhibitrices des différents extraits de la PLE vis-à-vis d' <i>E.coli</i>	35
Tableau VII : Concentrations minimal inhibitrice des différents extraits de la PLE vis-à-vis de <i>SARM</i>	35

Liste des figures

Figure 1 : Structure de base des flavonoïdes.....	4
Figure 2 : Structure de base des phlorotannins (i) et de quelques phlorotannins.....	5
Figure 3 : Cartographie de la station de récolte des algues marines étudiées.....	7
Figure 4 : Photographie de la station de récolte EL'ach El Baz.....	7
Figure 5 : Photographie du broyeur Fritsch.....	8
Figure 6: Photographies des espèces d'algues marines récoltées.....	9
Figure 7: Protocole d'extraction des composés phénoliques.....	12
Figure 8: Protocole du dosage des composés phénoliques totaux.....	14
Figure 9: Taux d'extraction par la méthode classique	19
Figure 10: Taux d'extraction par méthode PLE.....	20
Figure 11: dosage des composés phénoliques totaux des extraits obtenus par extraction classique	22
Figure 12: dosage des composés phénoliques totaux des extraits de la PLE	23
Figure 13: Activité antimicrobienne des différents extraits de l'extraction classique. vis-à-vis de SARM	25
Figure 14 : activité antibactérienne des différents extraits de la PLE vis-à-vis de <i>SARM</i>	26
Figure 15 : activité antibactérienne des extraits de l'extraction classique vis-à-vis <i>E. coli</i>	28
Figure 16 : activité antibactérienne des différents extraits de la PLE vis-à-vis de <i>E. coli</i>	29
Figure 17 : activité antibactérienne des différents extraits de l'extraction classique vis-à-vis de <i>Candida albicans</i>	30

Liste des abréviations

ATCC : Américain Type Culture Collection

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CEVA : Centre d'Etude de Valorisation des Algues

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : concentration Maximale Inhibitrice

INCT : Institut National de Cartographie et de Télédétection

L.M.A : Laboratoire de Microbiologie Appliquée

PLE : extraction par fluide pressurées

PT : phlorotannins

SARM : *Staphylococcus aureus* Résistante à Méthicilline

UAMB : Université Abderrahmane Mira Bejaia

UFC : Unité Formant Colonie

Sommaire

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	1

Synthèse bibliographique

I. Généralités sur les algues marines	3
I.1. Définition	3
I.2. Diversité et classification	3
II. Les composés bioactif	4
II.1. Les composés phénoliques	4
II.1.1. Flavonoides	4
II.1.2. Tannins	5
II.2. Caroténoïdes	5
II.3. Phycoérythrénes	6
III. Méthodes d'extraction	6
III.1. Extraction par fluide pressurisée(PLE)	6
III.2. Extraction classique solide-liquide	6

Matériels et méthodes

I. Matériel végétal	7
II. Extraction des composés actifs	10
II.1. Détermination du rendement	11
III. Dosage des composés phénoliques des extraits	13
IV. Etude de l'activité antimicrobienne des extraits d'algues	15
IV.1. Les souches cibles	15
IV.2. Standardisation des inocula	15
IV.3. Evaluation de l'effet antimicrobien	16
IV.3.1. Antibiogrammes	16
IV.3.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices sur milieu liquide	17
IV.3.2.1. Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB)	17
V. Etude statistique	18

Résultats et discussions

I. Taux d'extraction des composés phénoliques	19
I.1. Extraction classique solide-liquides	19
I.2. Extraction par fluides pressurisées	20
II. Dosage des composés phénoliques	22
III. Activité antimicrobienne	23
III.1. Antibiogramme	25
III.1.1. Activité antimicrobienne à l'égard des Gram positif(<i>SARM</i>)	25
III.1.2. Activité antimicrobienne à l'égard des Gram négatif (<i>E Coli</i>)	27

III.1.3. Activité antimicrobienne à l'égard de la levure (<i>Candida albicans</i>).....	30
III.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et des concentrations minimales bactéricides.....	32
Conclusion	38
Références bibliographiques	
Glossaire	
Annexe	

Le milieu marin et les organismes qui l'habitent constituent une source infinie de Molécules actives à structure chimique originale (**Glombitza et al., 1979 ; Smit, 2004**). Ces composés sont synthétisés par des voies métaboliques différentes de celles observées en Milieu terrestre. Parmi les organismes marins, les algues, qui sont le plus souvent fixées sur un substrat (**Paul et Fenical, 1987 ; Steinberg et Schneider ,1997**).

Les algues occupent une place importante dans le milieu marin avec plus de 1200 espèces appartenant à tous les niveaux évolutifs, capables de produire des substances dont l'action constitue dans certains cas, un élément de protection contre les prédateurs naturels. Les algues marines constituent un énorme réservoir de molécules naturelles potentiellement actives (**Rajeev et Xu ,2004 ; Blunt et al ; 2009**).

Les substances chimiques de colonisation et de répulsion, correspondent à la demande actuelle en molécules naturelles bioactives (**Valls et al., 1993 ; Manéchal et al ., 2004 ; Charles ,2008 ; Younes F et al., 2009**).

De nos jours, l'intérêt croissant pour la formulation de nouveaux nutriments fonctionnels continue d'encourager la recherche de nouvelles ingrédients alimentaires. Parallèlement à cette tendance il serait intéressant de remplacer les conservateurs synthétiques par des substances d'origine naturelle ces conservateurs naturels peuvent provenir des plantes, des micro-algues et des macroalgues. (**Santoyo S et al., 2009**).

Dans notre travail nous nous baserons sur les algues et leur capacité de synthétiser des métabolites bioactifs (**Gonzalez del Val et al., 2001**). en effet les algues possèdent des activités biologiques telles qu'anticoagulante (**Donadieu ,1985**), anticancéreuse (**Kang et al., 2009**) antioxydante (**Devi et al.,2011 ; Santoyo S et al.,2009**) et une activité antibactérienne (**Chiheb et al., 2010**).

En Algérie, Dans le cadre de la recherche sur les algues marines, il existe peu de données et d'études évaluant leur potentiel antimicrobien, L'objectif de ce présent travail est de mettre en évidence, in vitro, les propriétés antimicrobiennes de quelques extraits d'algues marines obtenus par deux différents types d'extraction à savoir extraction classique solide liquide et extraction par fluides pressurisés.

- La première partie de ce document est consacrée à une synthèse bibliographique sur les algues marines, ainsi qu'un aperçu sur leurs composés bioactifs.
- La seconde partie est consacrée à la partie expérimentale, à savoir :
 - Extraction des composés phénoliques à partir des espèces d'algues marines récoltées ;
 - Dosage des composés phénoliques de ces extraits ;
 - Evaluation de leurs activités antimicrobiennes ;
 - les résultats obtenus ainsi que leur discussion.

I. Généralité sur les algues marines

I.1. Définition

Les algues sont des êtres vivants appartenant au règne végétal. Elles constituent un ensemble hétérogène (Naegelé et Naegelé, 1967), dépourvus de racines, de tige et de feuilles, mais possédant de la chlorophylle ainsi que d'autres pigments accessoires pour réaliser la photosynthèse productrice d'oxygène (Gayral, 1975). La plupart des algues se développent en eau douce, saline ou saumâtre, sur des rochers humides, ou sur un sol mouillé mais certaines sont terrestres et sont capables de se développer sur le sol ou sur le tronc des arbres (Michel, 2000).

La taille des algues peut varier de la cellule microscopique unique, à quelques cellules en colonies et jusqu'à 7,5 m (laminaires, sargasses, macro algues) pour certaines formes multicellulaires (Hervé, 2012).

I.2. Diversités et Classification

La classification des algues se fait selon des caractéristiques spécifiques telles que les composantes de la paroi cellulaire, les pigments présents, le cycle de vie et le type de composés utilisés pour l'entreposage de la nourriture (Memory, 2006).

A partir de ces critères, les algues sont réparties en trois grandes divisions d'algues marines et leurs pigments correspondants (Davis et al., 2003) :

- Chlorophyta (algues vertes) : Chlorophylle a, b ; α -, β - et γ -carotènes et plusieurs xanthophylles.
- Phaeophyta (algues brunes) : Chlorophylle a, b ; β -carotène et fucoxanthine et plusieurs autres xanthophylles
- Rhodophyta (algue rouge) : Chlorophylle a (quelque Florideophyceae) ; R-phycoyanine et C-phycoyanine, allophycoyanine ; R- et B-phycoérythrine. α - et β -carotène et plusieurs xanthophylles.

II. Les composés bioactifs des macros algues

II.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux (**Bravo, 1998 ; Lugasi et al., 2003**) essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement. Les composés phénoliques, ne sont pas libres, ils se trouvent généralement sous forme d'esters, liés aux acides organiques, ou de glycosides, liés aux sucres (**Crozier et al., 2006 ; Vermerris et Nicholson, 2006**).

Les composés phénoliques possèdent une activité antioxydante (assure une meilleure conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidique) (**Hennebelle et al., 2004**) et une activité antimicrobienne (Le mode d'action des polyphénols sur les microorganismes peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques) (**Cowan, 1999 ; Karou et al., 2005 ; Mohamed et al., 2009**).

II.1.1. Flavonoïdes

Le terme flavonoïde (de flavus, «jaune» en latin) désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (**Bouakaz, 2006**). Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (**Havasteen, 2002**). Les flavonoïdes possèdent des activités anti-tumorales, anticarcinogènes, anti-inflammatoires et antioxydantes (**Bahorun, 1997**). La figure 1 représente la structure de base des flavonoïdes.

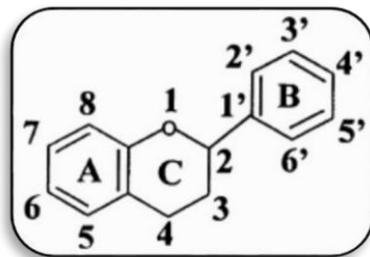


Figure 1: Structure de base des flavonoïdes (**Heim et al., 2002**).

II.1.2. Les tannins

Les tannins (ou tanins) sont des substances d'origine végétale qui ont la propriété de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible : le cuir (**Bruneton, 1999**). Les tannins sont généralement divisés en trois groupes chimiques distincts en fonction de leurs structures : les tannins hydrolysables, les tannins condensés et le troisième, groupe le moins connu, représenté par les phlorotannins. (**Koivikko, 2008**).

- **Les Phlorotannins**

Les phlorotannins représentent un sous-groupe de tannins répandus seulement chez les algues Brunes (**Wang et al., 2008**), ils sont classés en six groupes : Fucols, phlorethols, fucophlorethols, Fuhalols, isofuhalols et eckols qui diffèrent par le nombre de groupes hydroxyle et la nature chimique des liaisons (**Maschek et Baker, 2008**), ils sont connus pour avoir une activité antimicrobienne et antioxydante (**Bahorun, 1997**). La figure 2 représente la structure de base des phlorotannins et quelques phlorotannins.

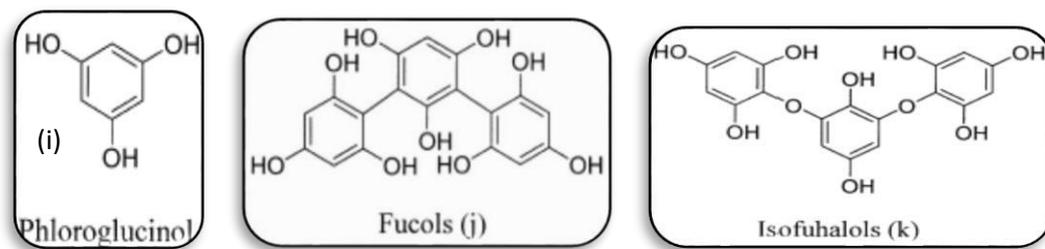


Figure 2: Structure de base des phlorotannins (i) et de quelques phlorotannins (**Maschek et Baker, 2008**).

II.2. Les caroténoïdes

Toutes les macroalgues contiennent des caroténoïdes ce sont des pigments liposolubles composées d'unités isoprènes. ceux sont de puissants antioxydants, les algues brunes sont particulièrement riches en caroténoïdes et notamment en fucoxanthine, xanthophylles et β carotène (**chouikhi, 2013**).

De nombreuses études ont démontré les propriétés anti oxydantes des caroténoïdes algaux et le rôle qu'ils jouent dans la prévention de plusieurs pathologies liées au stress oxydatif (Marfaing et Lerat, 2007).

II.3. La phycoérythrine

Parmi les protéines algales, il faut citer la présence chez les algues rouges de molécules particulières : les phycobiliprotéines, qui sont les principaux pigments de ces algues et font partie du système de collecte de l'énergie lumineuse.(Marfaing et Lerat, 2007).il a été prouvé que la Phycoérythrine possédait une activité antimicrobiennes , activité antioxydants et anticancéreux (Namasivayam et al., 2013).

III. méthodes d'extractions

III.1. Extraction liquide sous pression (PLE)

C'est une technique d'extraction solide-liquide qui a la particularité d'utiliser des solvants sous de hautes pressions et à des températures situées au-dessus du point d'ébullition des solvants. cette combinaison de pression et température élevées fournit un processus d'extraction plus rapide et plus efficace. l'augmentation de la température diminue la viscosité des solvants permettant une meilleure pénétration dans la matrice solide et des interactions solvants-matrices-molécules. de plus, les taux de diffusion deviennent plus rapides à température élevée ce qui diminue le temps d'extraction. (Santoyo, 2009)

III.2.Extraction classique solide-liquide

L'extraction solide-liquide appelée aussi extraction par solvant est une opération unitaire visant à la séparation à l'aide d'une phase liquide (solvant) d'un ou plusieurs composés (soluté) contenus dans une matrice solide. le produit est extrait par diffusion dans la phase liquide qui est ensuite séparée de la matrice solide. cette opération peut être utilisée à plusieurs fins : elle peut soit servir à éliminer un composé indésirable d'un produit solide en le dissolvant dans un liquide (lavage), soit à obtenir un composé noble contenu dans le produit solide (extraction solide-liquide) (Werner et al., 2010).

I. Matériel végétal

Les algues marines faisant l'objet de cette étude sont au nombre de six deux chlorophycophytes (*Ulva intestinalis* et *Ulva lactuca*) et trois Phéophycophyte (*Halopteris scoparia* et *Cystoseira mediterranea* et *Padina pavonica*) et un Rhodophycée (*Ceramium virgatum*). ce sont des algues très communes sur les côtes méditerranéennes.

La récolte des différentes espèces algales s'est effectuée à différents sites, et ce durant le mois de mai 2014, les algues verte et rouges ont été collectés au niveau de la plage dite EL'ach El-bez, tandis que la collecte des algues brunes s'est effectuée dans trois endroits différents, dont la plage EL'ach El-bez, Boulimate, et Backster, située à environ 22 Km à l'ouest de la ville de Bejaïa, (36° 49'58,06 N, 4° 58' 05,17'' E) (figure 03). c'est une station caractérisée par un substrat rocheux et un mode moyennement battu et calme (figure 04). ces algues ont été identifiées au niveau du laboratoire de cryptogamie à l'université

Abderrahmane Mira de Bejaïa (UAMB). les photographies des espèces d'algues marines récoltées sont présentées dans la figure 06 avec une description de chaque espèce dans le

tableau I.



Figure 03 : Cartographie de la station de récolte des algues étudiées marines (INCT, 2000).



Figure 04 : Photographie de la station de récolte (EL'ach El Baz) (Bejaïa)

Nous avons travaillé avec des extraits d'algues prêt issu d'une extraction par fluides pressurisés.

Ainsi qu'avec les mêmes espèces d'algues déjà séchées sur lesquelles nous avons procédé à une extraction par solvants classique (solide-liquide).

Ces algues ont été coupées en petits morceaux, broyées en fine poudre par broyeur Fritsch.



Figure 5 : Photographie du broyeur Fritsch.

Par la suite tamisées pour obtenir une poudre de granulométrie inférieure à 63 μm , les poudres sont mises dans des sachet et conservés dans un endroit sec, la finalité de cette étape est de mettre au point une poudre végétale qui permet l'extraction de taux importants de composés bioactifs.

Tableau I : Caractéristiques botaniques des espèces d’algues marines récoltées (Cabioc’h et al, 1992).

Figure 6 : Photographies des espèces d’algues marines récoltées.	Description	Classification)
<p style="text-align: center;"><i>Ulva lactuca</i></p> 	<p>Algue verte avec un thalle en formes foliacées irréguliè, quelques fois lobées et découpées, à consistance relativement ferme, composées de deux couches de cellules accolées, et fixées au substrat par un petit disque.</p>	<p>Règne : <i>Plantae</i> Division : <i>Chlorophyta</i> Classe : <i>Ulvophyceae</i> Ordre : <i>Ulvales</i> Famille : <i>Ulvacées</i> Genre : <i>Ulva</i></p>
<p style="text-align: center;"><i>Ulva intestinalis</i></p> 	<p>Algue verte avec un thalle en forme de tubes, plus au moins ramifiés, aplatis et parfois rubanés, Tube creux formé d'une seule couche de cellules.</p>	<p>Règne : <i>Plantae</i> Division : <i>Chlorophyta</i> Classe : <i>Ulvophyceae</i> Ordre : <i>Ulvales</i> Famille : <i>Ulvacées</i> Genre : <i>Ulva</i></p>
<p style="text-align: center;"><i>Halopteris scoparia</i></p> 	<p>Algue brune avec un thalle arbustif à axe segmenté et souvent ramifié possède de nombreux ramoules disposés radialement, rugueux. La croissance du thalle se fait à partir d'une grosse cellule appelée sphacèle et leur fixation se fait par les rhizoïdes.</p>	<p>Règne : <i>Plantae</i> Division : <i>Pheophyta</i> Classe : <i>Peophyceae</i> Ordre : <i>Sphacelariale</i> Famille : <i>Stypocaulonacées</i> Genre : <i>Halopteris</i></p>

<p style="text-align: center;"><i>cystoceira mediterranea</i></p> 	<p>Algue brune avec un thalle cylindrique, dépourvus de tophules, rameaux portant de nombreux ramules courts et épineux, ferme et réceptacle</p>	<p>Règne : <i>Plantae</i> Division : <i>Phaeophyta</i> Classe : <i>Phaeophyceae</i> Ordre : <i>Fucales</i> Famille : <i>Cystoseiracées</i> Genre : <i>Cystoseira</i></p>
<p style="text-align: center;"><i>Padina pavonica</i></p> 	<p>Algue brune avec un thalle en lame mince et souvent membraneux.</p>	<p>Règne : <i>Plantae</i> Division : <i>Phaeophyta</i> Classe : <i>Phaeophyceae</i> Ordre : <i>Dictyotale</i> Famille : <i>Dictyotacées</i> Genre : <i>Padina</i></p>
<p style="text-align: center;"><i>Ceramium virgatum</i></p> 	<p>Algue rouge avec un thalle filamenteux, à axe monosiphonné irrégulièrement ramifié, leur développement n'excède pas 30 cm de longueur. L'apex fourchu de leurs filaments forme deux pointes caractéristiques, en forme de cornes ou de pince</p>	<p>Regne : <i>plantae</i> Division : <i>Rhodophyta</i> Classe : <i>Rhodophyceae</i> Ordre : <i>Ceramiale</i> Famille : <i>Ceramiceae</i> Genre : <i>Ceramium</i></p>

II. Extraction des composés Bioactifs

L'extraction est effectuée par macération de 10 g de poudre dans 100 ml de chaque solvant à savoir : méthanol, éthanol et eau, sous agitation pendant 2 heures. Après l'agitation la solution est centrifugée (centrifugeuse NUVE NF 200) à 1500 g pendant 10 minutes, le surnageant contenant est récupéré. cette solution est filtrée, avec du papier filtre (wattman standard), le filtrat de chaque solvant est récupéré dans un bécher, ils sont ensuite incubés à l'étuve (BINDR WTB) à 40°C pour l'évaporation totale des différents solvants (**Cox et al.,**

2010) puis l'extrait sec de chaque solvant est reconstitué à une concentration de 100 mg/ml, dans leur solvant d'extraction. les extraits obtenus sont conservés dans des flacons fumés à 4°C jusqu'à utilisation ultérieure. (**Figure 7**).

II.1.Détermination des Taux d'extraction

Le rendement en extrait sec est déterminé par la différence entre le poids de l'extrait avant et après évaporation du solvant.

Le rendement d'extraction est calculé comme suit :

$$RE\% = (p1 - p0) / E \times 100$$

P0 → poids du bécher vide (mg)

P1 → poids du bécher après évaporation (mg).

E → poids de l'échantillon (mg).

RE → Rendement d'extraction exprimé en pourcentage.

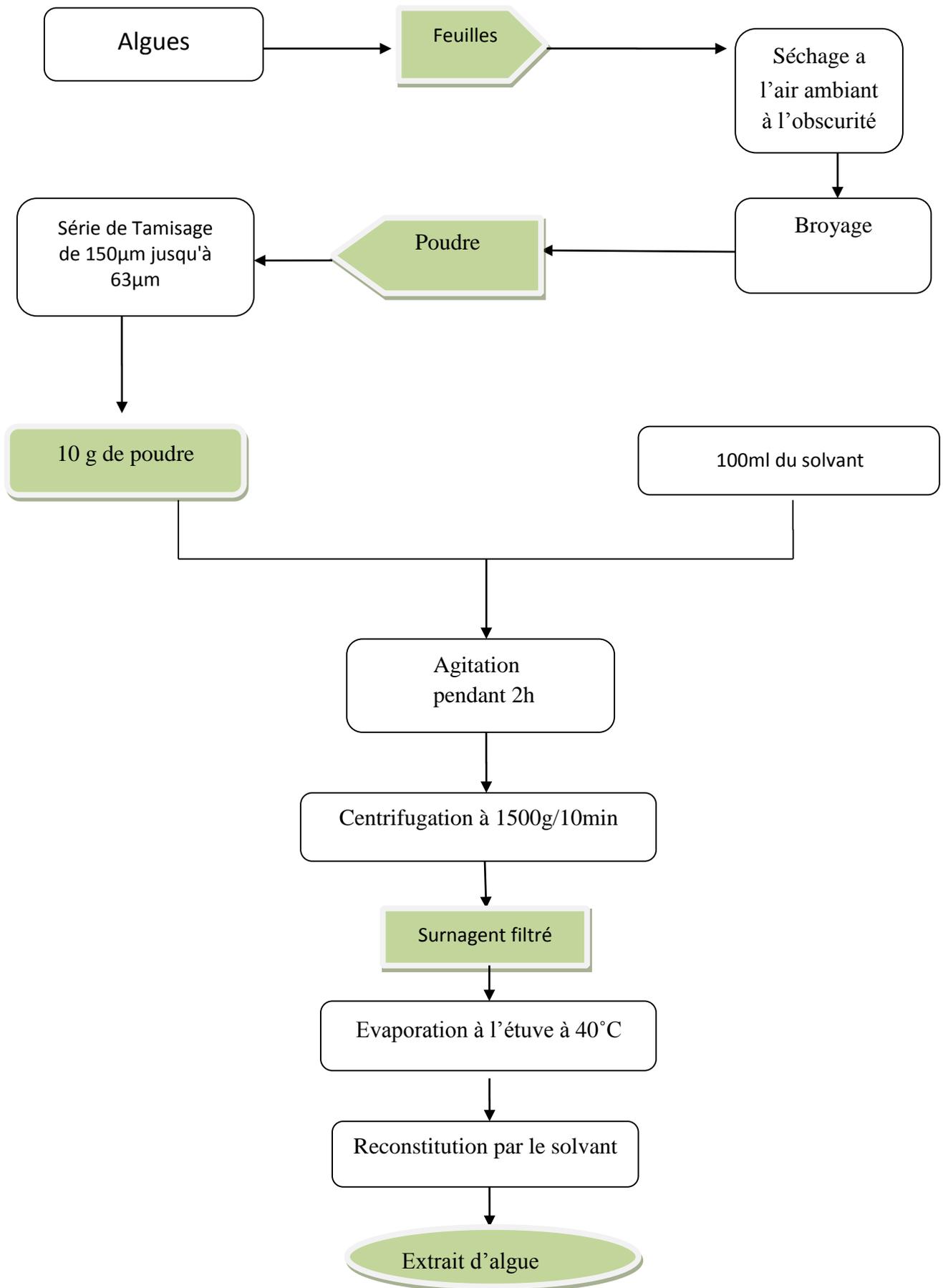


Figure 7 : Protocole d'extraction des composés phénoliques (Cox *et al.* , 2010)

III. Dosage des composés phénoliques des extraits

Les composés phénoliques sont mis en évidence en fonction de l'absorbance d'une solution mesurée dans des conditions bien déterminées, cette solution se manifeste par des colorations qui sont dus essentiellement à des réactions biochimiques.

La teneur en composés phénoliques totaux des extraits d'algues préparés ci-dessus, est déterminée par une méthode spectrophotométrique décrite par **Kuda et al., (2005)** cette méthode dérive de la méthode de **Owen et John's, (1999)** qui est basée sur la réaction des composés phénoliques avec le réactif de FOLIN-CIOCATLEU, ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique $H_3PMO_{12}O_{40}$, il est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène, selon certains auteurs la couleur dépend du nombre de groupement hydroxyle et de leur position dans les molécules, la coloration produite (dont l'absorbance maximum est comprise entre 725 et 760) est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Ribereau-Gayron et al., 1998**).

Dans 0.6ml d'eau distillé, est ajouté 10ul d'extrait, puis 50ul d'une solution de Folin Ciocalteu, après une minute, 150ul d'une solution de carbonate de sodium à 20% est ajouté, puis 190ul d'eau distillé est rajouté. ce mélange est laissé à l'obscurité pendant deux heures à température ambiante. des mesures d'absorbance sont enregistrées à 760nm en utilisant un Spectrophotomètre (**Kuda et al., 2005**) (**figure 8**).

L'acide gallique est utilisée pour la préparation de la courbe standard (Annexe I). Les résultats sont exprimés en équivalent mg d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

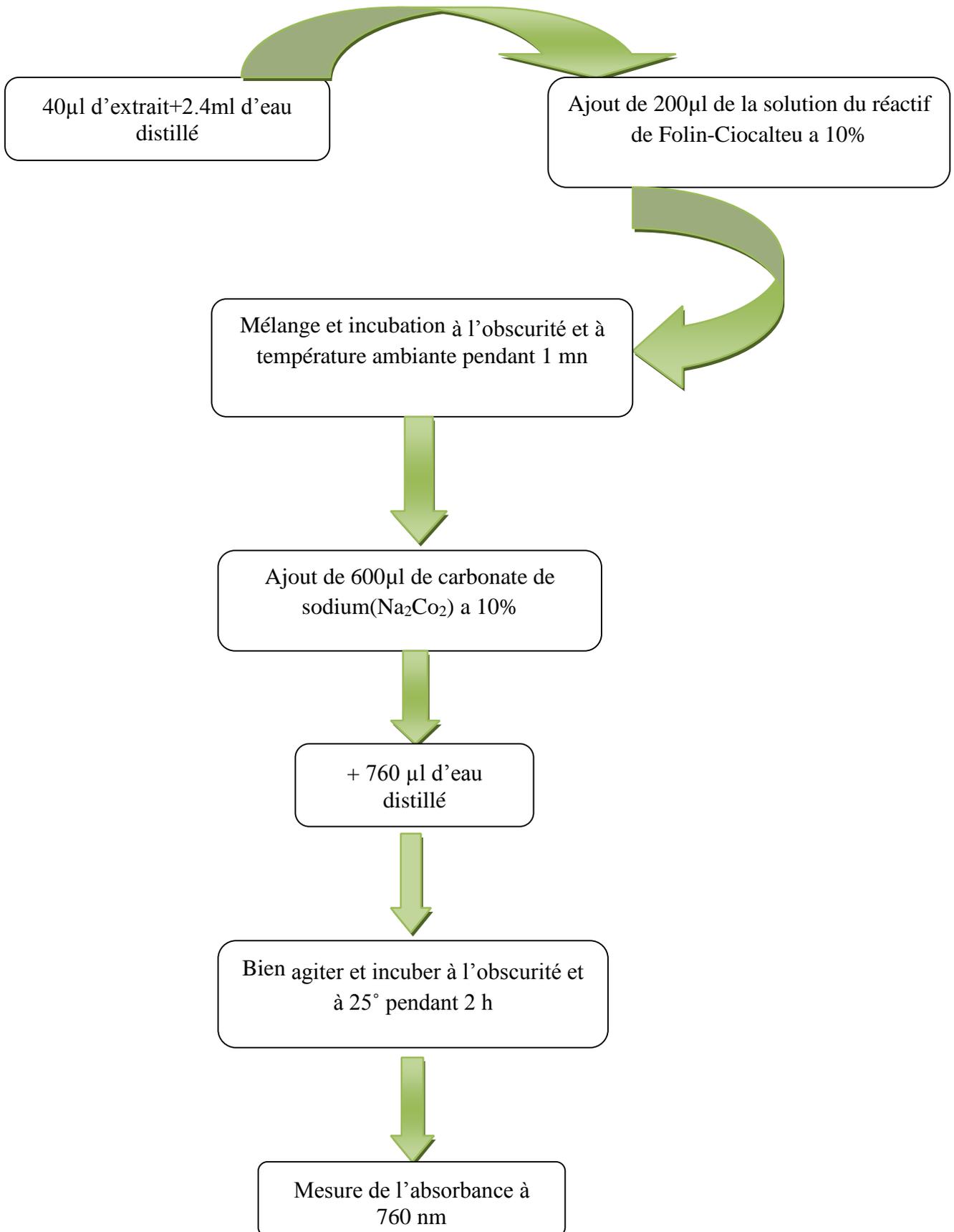


Figure 8 : Protocole du dosage des composés phénoliques totaux (Kuda et al., 2005)

IV. Etude de l'activité antimicrobienne des extraits d'algues

IV.1. Les souches cibles

Les germes qui ont fait l'objet des tests antimicrobiens englobent : une bactérie à Gram positif, une bactérie à Gram négatif ainsi qu'un levure, ces germes ont été fournis standardisés par le laboratoire de Microbiologie Appliquée (L.M.A) de l'UAMB Les détails sur les souches bactériennes étudiées sont illustrés dans le **Tableau II**.

Tableau II : Souches bactériennes et fongique utilisées :

Souches	Références
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>SARM</i>	ATCC 43300
<i>Candida Albicans</i>	ATCC 10231

ATCC : Américain Type Culture Collection.

SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méthicilline.

IV.2. Standardisation des inocula

L'activité de tout agent antimicrobien dépend de la densité de la suspension cellulaire de la souche cible utilisée, d'où la nécessité de standardiser l'inoculum bactérien.

Les germes utilisés ayant été fournis standardisés une vérification de la standardisation a été effectuée comme suit :

A partir d'une culture jeune (18h à 24h) un prélèvement de colonies est effectué, et disposé dans 5ml d'eau physiologique. la standardisation a été effectuée en se basant sur un

nombre et un type de colonie précis, le nombre de colonies prélevées pour chaque souche est comme suit :

- *SARM 07* petites colonies.
- *E. coli 07* colonies moyennes.
- *Candida Albicans 5* colonies moyennes.

Ensuite une série de dilution décimal est réalisé dans de l'eau physiologique stérile (10^{-1} à 10^{-9}), un volume de 1ml est prélever de chaque dilution et, est ensemencé en masse sur gélose nutritive (3 boites), après incubation à 37°C pendant 24h, un dénombrement est réalisé. la concentration bactérienne en UFC/ml est obtenue par l'application de la loi suivante :

$$N = \frac{\Sigma c}{(v \times 1.1 d)}$$

Σc : Somme des colonies comptées sur les deux boites retenues

V : Volume d'inoculum (1ml dans la masse /0.1ml en surface)

D : Dilution correspondant à la première boite retenue avec les l'inoculum le moins dilué.

IV.3.Evaluation de l'effet antimicrobien

IV.3.1.Antibiogrammes

Les activités antimicrobiennes des différents extraits ont été déterminées par la technique de diffusion sur gélose Muller-Hinton. Le mode opératoire utilisé est celui décrit par (Younes et al., 2009) avec quelques modification. La gélose Muller-Hinton a été ensemencé par écouvillonnage par des inocula bactériens standardisés (10^7 UFC/ml).

Des disques stériles de papier buvard ayant un diamètre de 6mm ont été déposés aseptiquement sur la gélose ensemencée et ont été immédiatement imprégnés par un volume d'extraits d'algues de 20µl ayant une concentration de 100mg/ml ensuite les boites sont mises à

4°C/2h pour la diffusion. Les solvants d'extraction respectifs sont utilisés comme témoins négatifs.

Pour la technique des spots on dépose directement 20µl d'extraits d'algues sur la géloseensemencée ensuite les boîtes sont mises à 4°C/2h pour la diffusion. les solvants d'extraction respectifs sont utilisés comme témoins négatifs.

Des zones d'inhibition autour du point d'application des disques et spots sont mesurées avec un pied à coulisse en millimètres après incubation à 37°C/24 heures pour les souches bactériennes et la levure (**Karabay-Yavasoglu et al., 2007**).

IV.3.2.Détermination des concentrations minimales inhibitrices sur milieu liquide (CMI)

La détermination des CMI des extraits d'algues étudiés vis-à-vis des trois souches testés précédemment est réalisée selon la technique de micro dilution sur microplaques stériles, tel que recommandé par le comité national pour les normes de laboratoire cliniques (**NCCLS , 1999**) avec quelque modification. la procédure est comme suit :

- 165µl de bouillon Muller-Hinton additionné de Tween 20
- 30µl des différentes concentrations des extraits allant de 10 mg/ml à 100 mg/ml ont été déposés dans chaque puits
- Chaque puits est ensuiteensemencé par 5µl de la suspension bactérienne de densité 10⁷UFC/ml
- Les microplaques ont été incubées à 37°C pendant 24h Dans ce test deux témoins sont réalisés :
 - Témoin négatif : exempt d'inoculum
 - Témoin positif : exempt d'extrait.

La CMI de chaque extrait a été déterminée visuellement par l'absence de formation d'un culot bactérien blanc (sorte de petite pelote blanche) au fond du puits. (**Santoyo et al., 2009**).

IV.3.2.2.Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB)

Des boîtes de Pétris sont coulées par de la gélose Muller Hinton et sontensemencées à partir des puits ou aucune croissance n'est observée. Après incubation à 37°C pendant 24h, une

présence de la croissance ou non est mentionnée. La CMB correspond à concentration où aucune croissance n'a été observée.

V. Etude statistique

Pour pouvoir faire une étude statistique toutes les données de la présente étude sont effectuées en 3 essais. les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. les données sont analysées en utilisant une analyse de variance (ANOVA). des différences significatives ($p < 0,05$) entre les moyennes sont déterminées par le test LSD (Low Significant Difference).

Le logiciel utilisé est STATISTICA 5.5.

I. Taux d'extraction des composés phénoliques

I.1. Extraction classique solide -liquide

Dans notre travail nous avons effectué une extraction à l'aide de 3 solvants à savoir : le méthanol l'éthanol et l'eau, le choix des solvants s'est fait en se basant sur des études antérieures qui ont montré que l'éthanol et le méthanol donnent de meilleurs taux d'extraction et sont hautement sélectifs pour les composés phénoliques **Spigno et al., (2007)**. Le choix de l'eau comme solvant émane de l'intention de travailler avec des extraits le moins nocifs possible et de pouvoir évaluer l'activité de tels extraits

Les résultats des taux d'extraction pour les six espèces marines étudiées sont représentés dans la figure 9

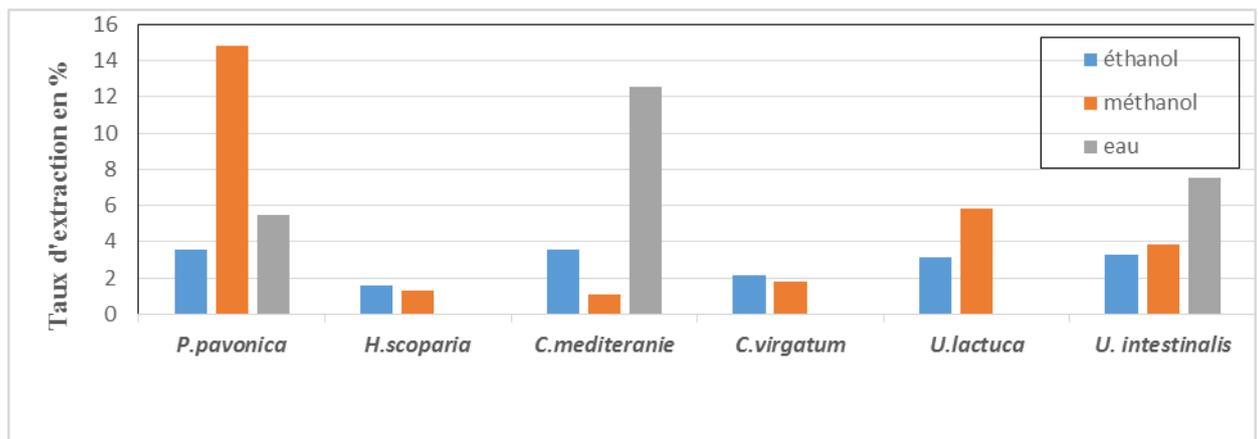


Figure 9: Taux d'extraction par la méthode classique

Nous remarquons que l'extrait méthanolique de *Padina pavonica* représente le taux le plus élevé avec 14,81%, suivi par la fraction aqueuse de *Cystoseira mediterranea* avec 12.55%. en revanche nous avons enregistré le taux le plus faible pour l'extrait méthanolique de *Cystoseira mediterranea* avec 1,1%.

I.2.Extraction par fluides pressurisé (PLE)

Les résultats des taux d'extraction obtenus sont illustres dans la figure 10

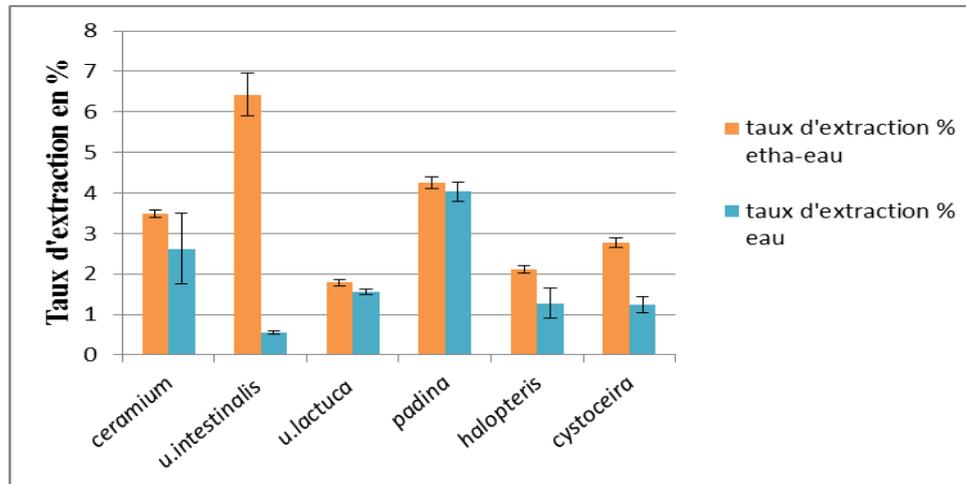


Figure10: Taux d'extraction par la méthode PLE

Les taux d'extraction les plus élevés pour les six espèces ont été obtenu par les extraits éthanolique, d'*Ulva intestinalis* a donné le meilleur rendement avec 6.42%, *Padina pavonica*, *Ceramium virgatum* et *Cystoseira mediterranea* ont donné des taux d'extraction de 4,2%, 3,3% et 2,8% respectivement.

Pour les extraits aqueux, *padina* présente le taux d'extraction le plus élevée 4,028% alors que. L'extrait aqueux d'*Ulva intestinalis* donne le taux d'extraction le plus faible 0,28%.

Les taux d'extraction des fractions aqueuses obtenues par extraction classique est supérieur au taux d'extraction de la PLE à l'exception de *Padina pavonica* qui sont relativement égaux pour les deux méthodes d'extraction, le taux d'extraction des extraits éthanolique d'*Ulva intestinalis* ; *Ceramium virgatum* ; *Halopteris scoparia* et *Cystoseira mediterranea* est meilleur avec l'extraction par PLE (6,42% ; 3,4% ; 4,2% ; 2,112% ; 2,783%) respectivement.

Plaza et al., (2010) ont enregistré des teneurs en polyphénols totaux pour l'extrait éthanolique et aqueux de l'algue brune *Himantalia elongata* de 8.29% et 9.51%

respectivement, ces résultats sont supérieurs à nos résultats obtenus avec les extraits éthanoliques des algues brunes pour la même méthode d'extraction (PLE) cette différence peut être due à l'espèce d'algue utilisée qui est plus riche en composés phénoliques.

Ben Abdallah et al., (2013) ont relevé que le méthanol présente le meilleur rendement pour les deux espèces d'algues brunes *Dictyota dichotoma* (3,01%) et *Cystoseira crinita* (2,88%) ces résultats sont relativement similaires à ceux obtenus avec *Cystoseira mediterranea* (1,1%) et *Halopteris scoparia* (1,3%) et largement inférieur à nos résultats obtenus avec l'extrait méthanolique de *padina pavonica* (14,18%).

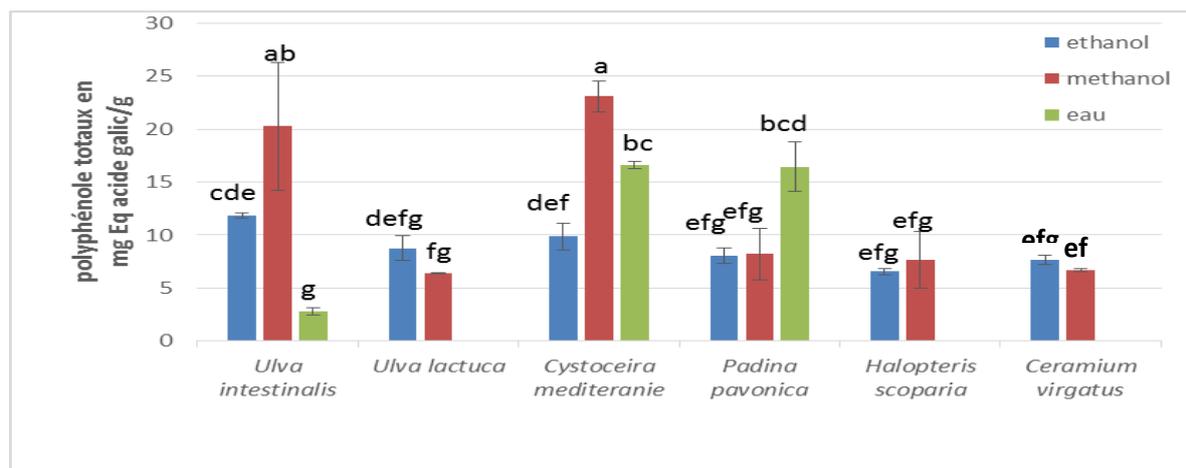
Ces différences peuvent être dues aux conditions d'extraction à savoir : la durée de macération, la vitesse de centrifugation et la température d'extraction. **Pinelo et al., (2005)** considèrent que la granulométrie de la poudre est un paramètre important dans la mesure où la réduction de la taille des particules augmente la surface de contact avec le solvant, et selon **Turkmen et al., (2006)** le rendement d'extraction dépend du solvant et de la méthode d'extraction.

Hayoni et al., (2007) ont constaté que le temps de macération affecte le taux d'extraction, et d'après **mukhopadhyay et al., (2006)** l'augmentation de la température mène à l'augmentation du taux d'extraction, cela a également été rapporté par **santoyo et al., (2009)**.

II. Dosage des composés phénoliques

II.1. Dosage des composés phénoliques pour l'extraction classique

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits éthanoliques, méthanoliques et aqueux, des six espèces d'algues marines étudiées sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g), sont représentés dans la figure 11



Les colonnes portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence

Figure 11: dosage des composés phénoliques totaux des extraits obtenus par extraction classique

Le solvant qui a donné la meilleure teneur en composés phénoliques est le méthanol avec $23,10 \pm 1,49$ et $20,27 \pm 6,038$ mg EAG/g d'extrait, et la plus faible teneur est obtenue par l'extrait aqueux avec $2,79 \pm 0,31$ mg EAG/g d'extrait d'*Ulva intestinalis*.

D'après l'étude statistique les plus grandes teneurs en polyphénols totaux sont enregistrées par l'algue brunes *Cystoseira mediterranea* ($23,10 \pm 1,49$ mg EAG /g d'extrait) et l'algue verte *Ulva intestinalis* ($20,27 \pm 6,038$ mg EAG /g d'extrait) avec une différence non significative ($p > 0,05$). Les plus faibles teneurs en composés phénoliques sont enregistrées par l'extrait aqueux d'*Ulva intestinalis*.

Calliste et al., (2001) ont rapporté que les composés phénoliques se répartissent dans les différents solvants en fonction de leur polarité. Nous pouvons déduire que nos extraits

méthanolique sont riches en composés polaires. Cet effet explique les teneurs assez élevées en polyphénols totaux enregistrées pour *Cystoseira mediterranea* et *Ulva intestinalis* obtenus par extraction classique les solvants polaire soient plus efficaces pour extraire les substances polaires et de même les solvants non polaires sont meilleurs pour l'extraction des substances apolaires

II.2. Dosage des composés phénolique des extraits par fluides pressurisés

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits éthanoliques et aqueux, des espèces d'algues marines étudiées sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg Eq AG/g), sont représenté dans la figure 12.

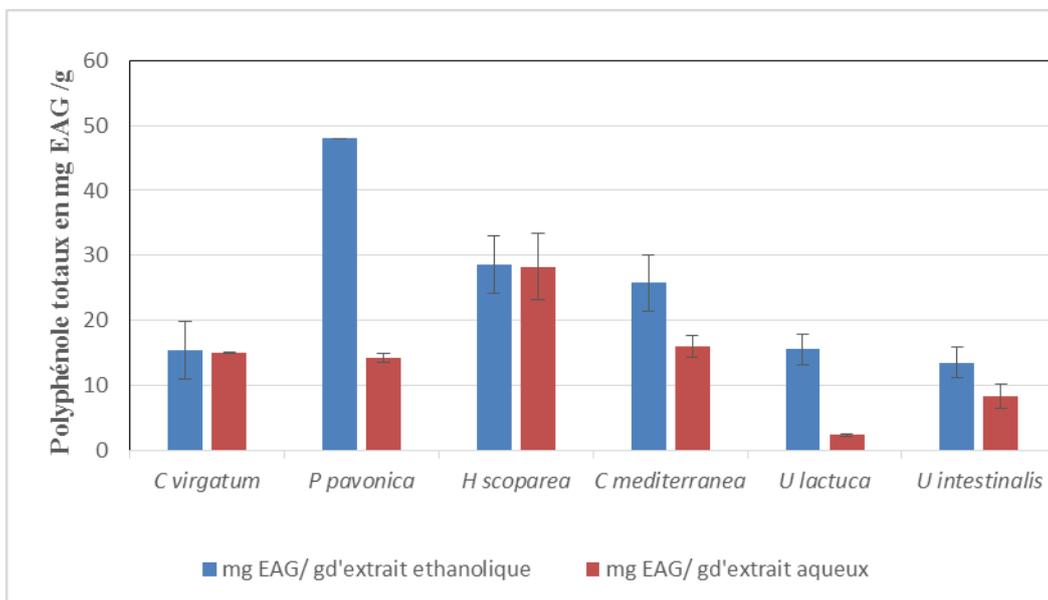


Figure 12: dosage des composés phénolique totaux des extraits de la PLE

Des teneurs élevées en composés phénoliques sont obtenues par les extraits éthanoliques des différents extraits, l'algue brune *Padina pavonica* s'est révélée être la plus riche en polyphénols (42.97 mg EAG/g), suivie de l'extrait d'*Halopteris scoparia* (29.79 mg EAG/g d'extrait), l'extrait éthanolique de *Cystoseira mediterranea* est le moins riche des trois avec un taux de 28.16 mg Eq. AG/g d'extrait.

On constate une légère différence entre les teneurs en composé phénoliques des deux extraits éthanolique d'algue verte *Ulva lactuca* et *Ulva intestinalis* avec celui de l'algue rouge *Ceramium virgatum*, cependant l'algue verte *Ulva lactuca* de même extrait se montre la plus riche en polyphénols des trois, nous notons également que la plus faible teneur en

composés phénoliques est obtenus par *Ulva intestinalis* avec un taux égal à 14.70 mg EAG/g de poudre.

Les teneurs en composés phénoliques des extraits aqueux obtenus pour *Padina pavonica* et *Cystoseira mediterranea*, diffèrent significativement de celles obtenues par les extraits éthanolique, par contre on note une légère différence pour les extraits de *Ulva intestinalis*, *Ceramium virgatum* et *Halopteris scoparia*, et une similitude pour les teneurs en polyphénols de l'algue *Ulva lactuca* concernant ces deux solvants.

L'étude comparative des deux méthodes d'extraction a montré que les meilleures teneurs en composés phénoliques sont enregistrées par l'extraction par fluides pressurisés pour tous les espèces d'algues étudiées.

Bien que l'algue rouge *Ceramium virgatum* révèle des teneurs faibles par rapport aux autres extraits, néanmoins les taux obtenues avec cet algues sont supérieurs a ceux obtenu par **Murugan & Lyes (2012)** avec l'algue rouge *Gracilaria edulis* (0.142± 0.025 mg EAG/g d'extrait) pour les deux méthodes d'extraction utilisées (l'extraction classique et la PLE).

Farvin & Jacobsen., (2013) ont trouvé que la teneur en polyphénols totaux pour les deux extrait éthanolique et aqueux d'*Ulva lactuca* s'est avéré être très proche avec 2.26±0.07 mg EAG/g et 2.24±0.03 mg EAG/g respectivement, ces taux sont largement inférieurs au nôtres; ces même auteurs ont aussi constaté que les deux algues brunes *Fucus Senatus* et *Fucus vesiculosus* présentent des teneurs en polyphénols totaux de 12±0.09 mg Eq AG/g et 10.45 mg EAG/g d'extrait respectivement qui sont presque similaires aux résultat d'extraction classique par rapport à nos algue brune, mais son test considérablement inférieurs aux résultats de la PLE cette différence pourrait être dû à la méthode d'extraction utilisé qui assure une meilleur solubilité et contact entre le solvant et l'analyte à extraire et ce grâce à la haute température et pression, améliorant ainsi le rendement d'extraction **ibànez et al.,(2012)**

Des études portant sur les composée phénolique ont montrés que les teneurs en ces composés pouvaient varier d'une espèce à l'autre et que les algues brunes sont généralement les plus riches. **Connanet al., (2004) ; Stiger et al.,(2004)**

III. Activité antimicrobienne

L'objectif de ces tests est d'évaluer et de comparer la capacité des différentes algues marines de la cote de Bejaia à produire des composés bioactifs présentant un intérêt antimicrobien potentiel. La production de l'activité antimicrobienne est considérée comme un indicateur de la capacité des algues de synthétiser des métabolites secondaires bioactifs **Gonzalez del Val et al., (2001); Shanmughapriya et al., (2008).**

III.1. Antibiogrammes

Dans la présente étude, les extraits des six algues marines sont testés vis-à-vis d'une bactérie Gram positif, une Gram négatif et une levure. Les résultats sont exprimés selon trois niveaux d'activité : Résistant : $D < 8$ mm, intermédiaire : $15 \text{ mm} \geq D \geq 8$ mm et sensible : $D > 15$ mm **Bansemir et al., (2006).** Les résultats d'activité antimicrobienne des différents extraits d'extraction classique et la PLE vis-à-vis de *SARM*, *E. coli* et *Candida albicans* sont représentés dans les figures 13, à 17.

III.1.1. Activité antimicrobienne à l'égard de *SARM*.

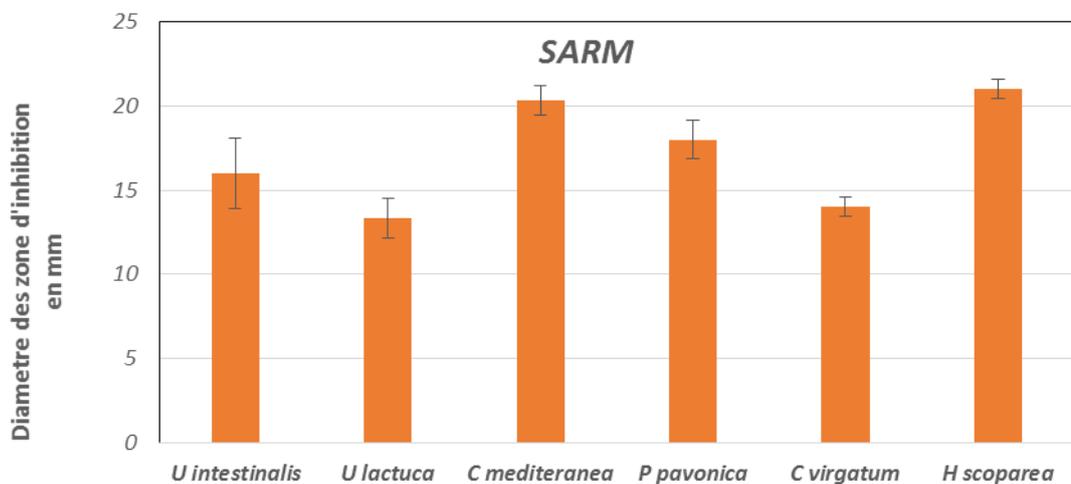


Figure 13: Activité antimicrobienne des différents extraits obtenu par extraction classique vis-à-vis de *SARM*

Résultats et discussion

Les extraits éthanoliques d'*Halopteris scoparia* et *Cystoseira mediterranea*, ont montré une bonne activité antimicrobiennes vis-à-vis *SARM* par les deux méthodes (spot et disque)

La plus large zone d'inhibition est de 21mmrévélée par l'extrait éthanolique de *Halopteris scoparia*, suivi par une zone d'inhibition de 20.33mm révélée par l'extrait éthanolique *Cystoseira mediterranea*, avec une différence significative ($p < 0.05$) entre les extraits de ces deux algues.

L'étude statistique a montré une différence significative ($p < 0.05$) entre les extraits méthanolique d'*Ulva intestinalis*, *Ulva lactuca* et *Ceramium virgatum* avec des zone d'inhibition de $7,66 \pm 0,33$; $6,66 \pm 1.20$; $8 \pm 0,33$ respectivement.

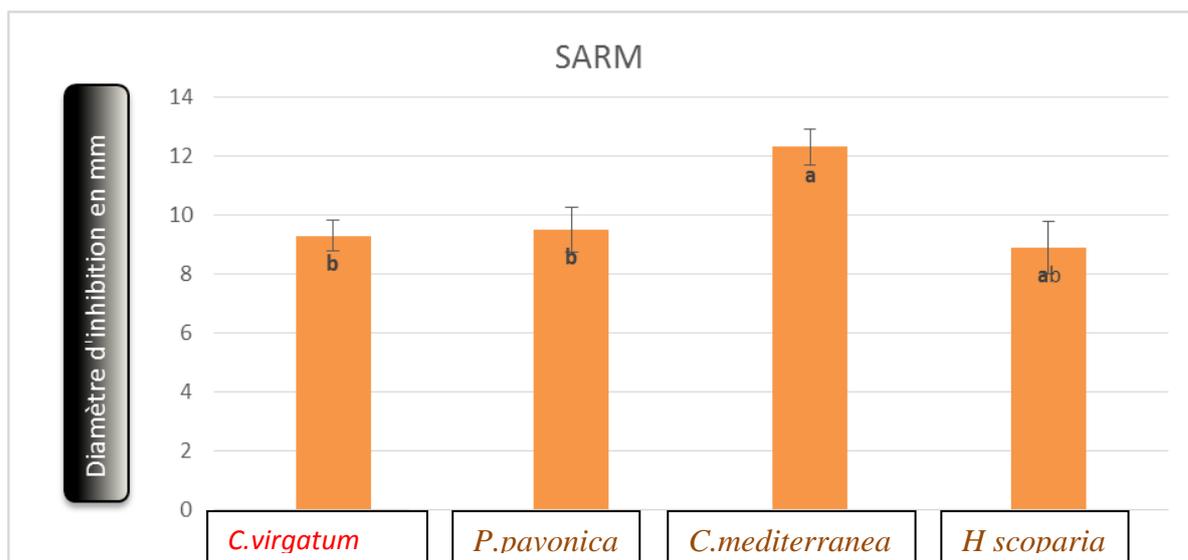


Figure 14 : activité antibactérienne des différents extraits de la PLE vis-à-vis de *SARM*

La figure 14 indique que les extraits de différentes algues, ont un effet inhibiteur sur *SARM*. Des zones d'inhibition de 9.3 mm à 12.3 mm ont été observées, la zone d'inhibition la plus élevée a été obtenus avec *Cystoseira mediterranea*, qui diffère significativement des autres extraits, avec un diamètre égale à 12.3 ± 0.6 mm .nous avons constaté une zone d'inhibition la plus faible avec *Halopteris scoparia* est de 9.3 mm.

Aucune zone d'inhibition n'est observée pour l'extrait aqueux de l'algue verte (*Ulva intestinalis*) et des algues brunes (*Cystoseira mediterranea* et *Padina pavonica*) envers *SARM* avec les deux méthodes d'extraction (PLE et extraction classique).

Nous avons obtenus des zones d'inhibition supérieure avec l'extraction classique par rapport à l'extraction par PLE pour les extraits des algues étudié, cette différence peut être expliqué par la différence entre le procédé d'extraction, et par le type de solvant utilisé **Kandhassamy et al., (2008)**.

Taskin et al., (2007) ont observé des zones d'inhibition des extraits méthanoliques de deux algues *Cystoseira barbata* (12,66±0,57mm) et *Halopteris filicina* (11±1,00 mm) par extraction classique vis-à-vis *SARM*, ces zones d'inhibition sont inférieures à celles que nous avons obtenu avec *Halopteris scoparia* et *Cystoseira mediterranea*, cette différence pourrait s'expliqué par la richesse de nos extraits en composés bioactifs.

Nos résultats obtenus pour l'algue verte *Ulva lactuca* et l'algue rouge *Ceramium virgatum* vis-à-vis *SARM* sont inférieurs à ceux obtenus par **Farid et al., (2010)**, qui ont trouvé que les extraits des algues vertes *U. intestinalis* et *U. lactuca*, et l'algue rouge *Ceramium humilis* ont présenté un diamètre d'inhibition supérieur à 10 mm.

Oumaskour et ses collègues (2012) ont testé l'activité de l'extrait éthanolique de l'algue verte *Ulva intestinalis* vis-à-vis de *S.aureus* et n'ont observé aucune activité ceci est en contradiction avec nos résultats obtenus pour les deux algues *Ulva lactuca* et *Ulva intestinalis*.

III.1.2. Activité antimicrobienne à l'égard d'*E. coli*

Dans cette étude, deux méthodes de diffusion sur milieu solide sont utilisées pour étudier l'activité antimicrobienne des extraits de six espèces d'algues marines. Les résultats d'activité antimicrobienne sont représentés dans les figures 15 et 16 :

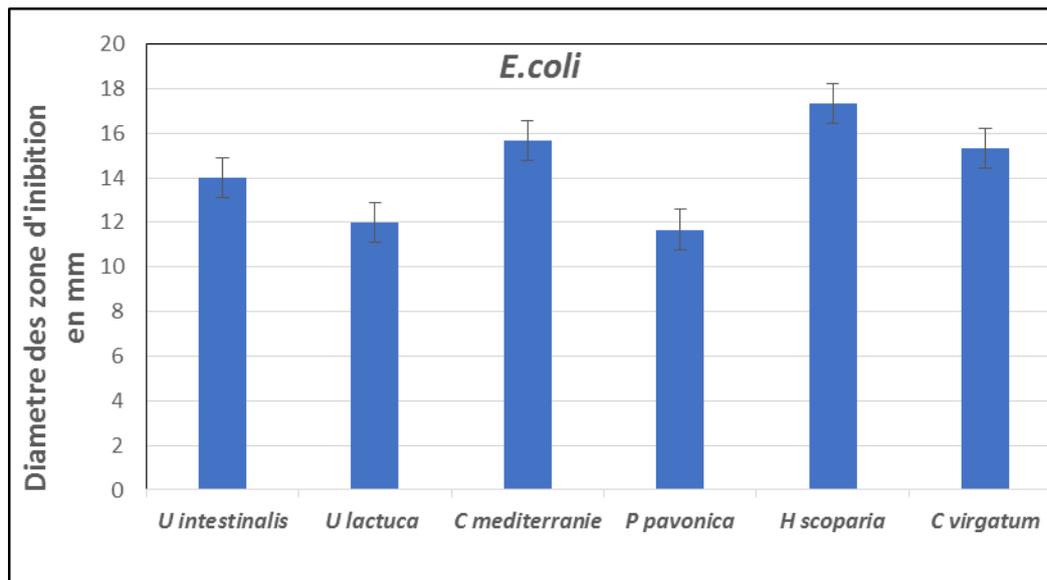


Figure 15 : activité antibactérienne des extraits d'extraction classique vis-à-vis *E. coli*

Les résultats illustrés dans la figure 15 montrent que :

les extraits éthanoliques de *Halopteris scoparia* et *Cystoseira mediterranea* ont une bonne activité antimicrobienne vis-à-vis *E. coli* avec un diamètre de zone d'inhibition de 17,33mm et 15,66mm respectivement (méthode de spots); *E. coli* montre une sensibilité intermédiaire vis-à-vis les algues brunes (*Padina pavonica*, *Halopteris scoparia* et *Cystoseira mediterranea* avec une zone d'inhibition de $11,66 \pm 0,33$ mm (méthode des disques), nous avons enregistré des faibles zones pour *Ulva intestinalis* et *Ceramium virgatum* (6,66 mm) (méthode des disques) et une zone d'inhibition de 5mm présentée par *padina pavonica* (méthode des disques) avec une différence significative ($p < 0,05$).

Les extraits méthanoliques de *Halopteris scoparia* et *Cystoseira mediterranea*, ont montré une bonne activité antimicrobienne envers *E. coli*, la plus large zone d'inhibition est de 16,66mm (méthode de disque) et 15,66 mm (méthode de spots). Avec une différence significative ($p < 0,05$) entre les extraits de ces deux algues. Les plus faibles valeurs sont révélées par *Ceramium virgatum* (4mm) et *Ulva intestinalis* (2,66 mm) avec la méthode des disques.

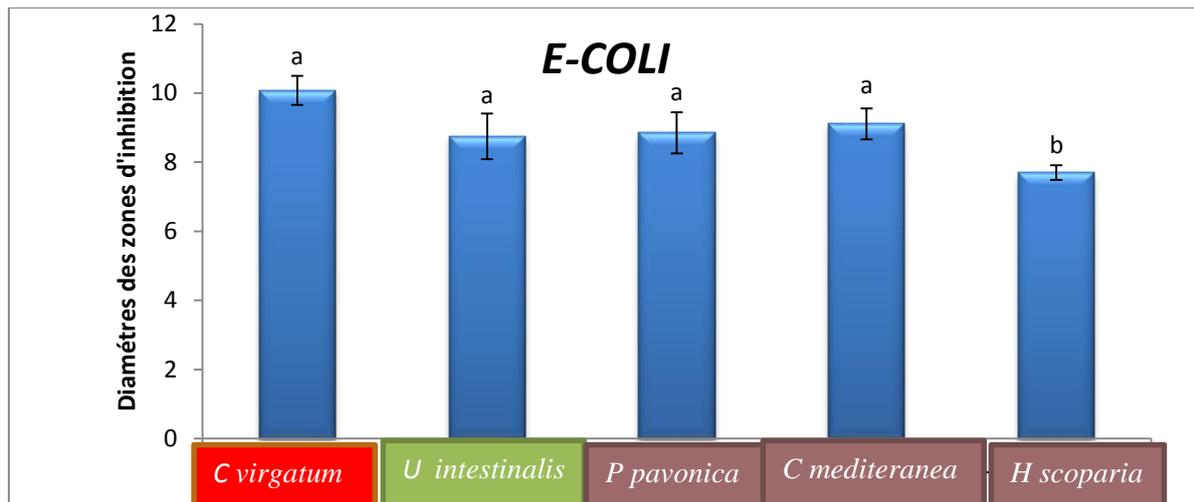


Figure 16 : activité antibactérienne des différents extraits de la PLE vis-à-vis d *E. coli*

L'étude statistique a révélé une légère différence d'activité antibactérienne vis-à-vis de *E. coli*, le diamètre d'inhibition le plus élevé est observé pour l'extrait de l'algue rouge *Ceramium virgatum* avec 10,08mm suivi de *Cystoseira mediterranea* avec 9,11mm puis *Ulva intestinalis* avec 8,75 et enfin 8,85mm pour *Padina pavonica*. La plus faible zone d'inhibition est obtenue par *Halopteris scoparia*, qui diffère significativement des autres extraits, avec un diamètre d'inhibition égal à $7,7 \pm 0,21$ mm.

Nous constatons qu'aucune zone d'inhibition n'a été observée pour les extraits aqueux pour les deux méthodes d'extraction à savoir l'extraction classique et la PLE vis-à-vis d'*E. coli*.

Pour les extraits éthanoliques de *Halopteris scoparia* obtenus par les deux méthodes d'extraction nous avons enregistré une bonne zone d'inhibition, cela peut être expliqué par le fait que les composés bioactifs de *Halopteris scoparia* extraits par deux méthodes différentes ont un même effet vis-à-vis *E. coli*.

Dans notre étude, l'algue brune *Halopteris scoparia* s'est révélée active vis-à-vis *E. coli* contrairement à **Taskin et al., (2007)** qui ont constaté que l'algue brune *Halopteris filicina* n'a révélé aucune activité à l'égard de *E. coli* ; ces auteurs ont aussi étudié l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique de *Cystoseira barbata*, ils ont trouvé une zone d'inhibition de 12mm vis-à-vis *E. coli* nos résultats sont supérieurs à ces résultats obtenus

par extraction classique et inférieur à ces résultats par la PLE pour *Halopteris scoparia* et *Cystoseira mediterranea*.

Nous avons constaté que le méthanol est le meilleur solvant pour l'extraction des molécules douées d'une activité antibactérienne. L'effet inhibiteur de cet extrait est probablement dû aux composés phénoliques, dont les algues brunes contiennent des teneurs élevées ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Tahiriet al., (2003)** et **Chbani et al.,(2011)** qui ont obtenu quasiment les même diamètres de zones d'inhibition.

Zbakh et al.,(2012) ont révélé que la souche *E. coli* est sensible vis-à-vis des extraits d'*Ulva intestinalis* avec un intervalle des zones d'inhibition se situant entre 10mm et 15 mm, ces résultats sont moyennement similaire avec ceux que nous avons obtenus par extraction classique et meilleur avec ceux que nous avons obtenu avec l'extraction par fluide pressurisé

nos résultats sont similaire à ceux de **Al-Saif et al., (2014)** qui ont trouvé aucune zone d'inhibition vis-à-vis *SARM* et *E. coli* pour les extraits aqueux des algues marines.

II.1.3. Activité antimicrobienne à l'égard de *Candida Albicans*

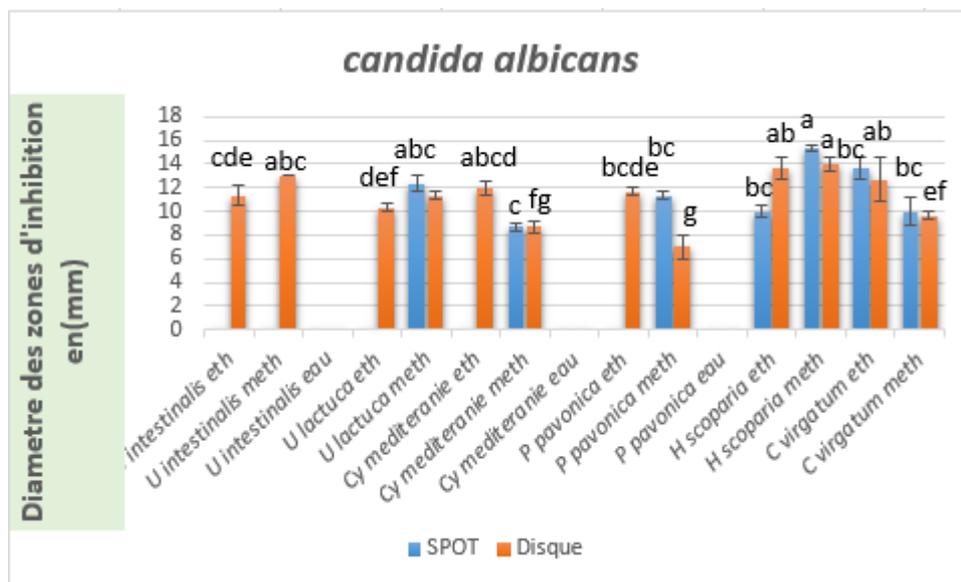


Figure 17: activité antibactérienne des différents extraits d'extraction classique vis-à-vis de *Candida albicans*

Les extraits méthanoliques d'*Halopteris scoparia* ont donné un meilleur effet inhibiteur vis à vis de *Candida Albicans* qui a présenté la plus grande sensibilité avec une zones d'inhibition de 15.33 ± 0.33 mm (méthode de spot) et de 14 ± 0.57 mm (méthode des disques).

L'étude statistique a montré une différence significative ($p < 0.05$) pour les extraits éthanoliques et méthanoliques d'*Halopteris scoparia* vis-à-vis les deux méthodes (spot et disque) et *Ceramium virgatum* (méthode des disques) avec des zones d'inhibition de 15,3, 14 et 12,66 mm respectivement.

Aucune zone d'inhibition n'est observée pour l'extrait aqueux d'extraction classique contrairement aux résultats de **Plaza et al., (2009)** qui montrent que les extraits aqueux obtenus avec la PLE ont un effet inhibiteur vis-à-vis *Candida albicans*, cette différence de résultats peut être due à la quantité de solvant utilisé, la durée et la température d'extraction.

Le diamètre des zones d'inhibition des extraits des algues vertes *Ulva lactuca* et *Ulva intestinalis* sont inférieurs aux diamètres des zones d'inhibition de *Ulva lactuca* et *Ulva reticulata* présentés par **kolanjinathan et stella (2011)** vis-à-vis *Candida Albicans*.

Les extraits éthanoliques des algues brunes d'extraction classique ont un effet antimicrobien supérieur aux résultats de **Santoyo et al., (2009)** qui ont montré que l'extrait éthanolique de *Haematococcus pluvialis* obtenu par PLE a une zone d'inhibition de $5,2 \pm 0,6$ mm vis-à-vis *Candida albicans*.

Plaza et al., (2009) ont rapporté que l'extrait éthanolique d'algue brune *Himanthalia elongata* a une zone d'inhibition de 8,5 mm vis-à-vis *Candida albicans* nos résultats sont supérieurs avec les extraits éthanoliques des algues brunes *Cystoseira mediterranea*, *Padina pavonica* et *Halopteris scoparia*.

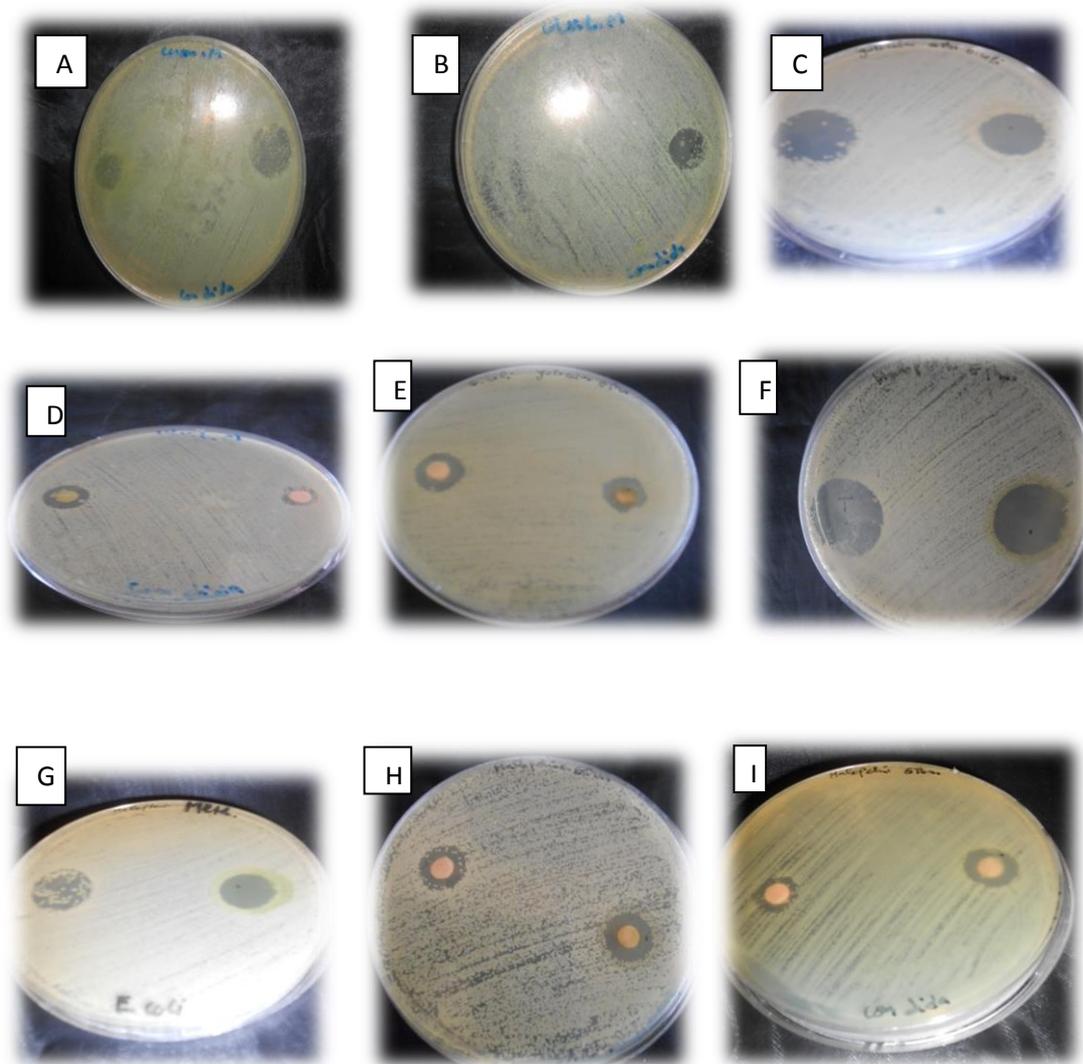


Figure 18 : photographies de quelques zones d'inhibitions

- A : l'extrait méthanolique de *Ceramium virgatum* vis-à-vis *Candida Albicans* (spot)
- B : l'extrait méthanolique d'*Ulva lactuca* vis-à-vis *Candida Albicans*
- C : l'extrait éthanolique de *Cystoseira mediterranea* vis-à-vis *E. coli*
- D : l'extrait méthanolique d'*Ulva lactuca* vis-à-vis *Candida Albicans*
- E : l'extrait éthanolique de *Cystoseira mediterranea* vis-à-vis *E. coli*
- F : l'extrait éthanolique de *Halopteris scoparia* vis-à-vis *SARM*
- H : l'extrait éthanolique de *Halopteris scoparia* vis-à-vis *SARM*
- I : l'extrait éthanolique de *Halopteris scoparia* vis-à-vis *Candida Albicans*
- G : l'extrait méthanolique de *Halopteris scoparia* vis-à-vis *E. coli*

III.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB)

Résultats et discussion

Les concentrations minimales inhibitrices des différents extraits des six espèces d'algues ont été déterminé en utilisant la méthode de microdilution sur bouillons Mueller Hinton, celle-ci permet un contact direct de l'extrait avec la souche cible améliorant ainsi sa diffusion. Les résultats obtenus sont représenté dans les tableaux III à VII.

Nous pouvons noter que les CMI les plus faibles sont enregistré pour les extraits éthanolique des algues vertes *Ulva lactuca* et *Ulva intestinalis* vis-à-vis *SARM* qui est de 0,5mg/ml et 2,5mg/ml respectivement; les CMI les plus élevées sont obtenus avec les extraits éthanoliques d'*Ulva intestinalis* vis-à-vis *E. Coli* et *Candida Albicans* 100mg/ml, ainsi qu'avec *Ceramium virgatum*, *Padina pavonica* et *Ulva lactuca* envers les 3 souches *SARM*, *E. coli* et *candida albicans* (80mg/ml).

Les CMI des extraits aqueux des espèces d'algues *Padina pavonica* et *Cystoseira mediterranea* enregistrées sont de 100mg/ml vis-à-vis *SARM* et *E. coli*, les plus faibles valeurs sont obtenus avec *Cystoseira mediterranea* et *Ulva intestinalis* avec une concentration de 20mg/ml envers *candida albicans*.

Pour la CMI des extraits méthanolique nous avons comme résultat 100mg/ml pour deux espèces d'algue *Ceramium virgatum* et *Ulva lactuca* vis-à-vis *Candida albicans* et *Cystoseira mediterranea* envers *SARM*; la CMI la plus faible est enregistrée avec *Ulva intestinalis* 5mg/ml à l'égard de *SARM*.

Tableau III : Concentrations minimal inhibitrice des différents extraits d'extraction classique vis-à-vis *SARM*

<i>SARM</i>	Ethanol	Méthanol	Eau
<i>Padina pavonica</i>	20mg/ml	/	60mg/ml
<i>Ceramium virgatum</i>	80mg/ml	100mg/ml	/
<i>Cystoseira mediterranea</i>	/	/	100mg/ml
<i>Ulva lactuca</i>	0.5mg/ml	100mg/ml	/
<i>Ulva intestinalis</i>	2.5mg/ml	5mg/ml	40mg/ml
<i>Halopteris scoparia</i>	60mg/ml	/	/

Tableau IV : Concentrations minimal inhibitrice des différents extraits d'extraction classique vis-à-vis *E.oli*

Résultats et discussion

<i>E. coli</i>	Ethanol	Méthanol	Eau
<i>Padina pavonica</i>	80mg/ml	/	100mg/ml
<i>Ceramium virgatum</i>	40mg/ml	20mg/ml	/
<i>Ulva lactuca</i>	40mg/ml	60mg/ml	/
<i>Ulva intestinalis</i>	100mg/ml	80mg/ml	/

Tableau V : Concentrations minimal inhibitrice des différents extraits d'extraction classique vis-à-vis *Candida albicans*

<i>Candida albicans</i>	Ethanol	Méthanol	Eau
<i>Padina pavonica</i>	80mg/ml	/	60mg/ml
<i>Ceramium virgatum</i>	80mg/ml	100mg/ml	/
<i>Cystoseira mediterranea</i>	/	/	20mg/ml
<i>Ulva lactuca</i>	80mg/ml	100mg/ml	/
<i>Ulva intestinalis</i>	100mg/ml	40mg/ml	20mg/ml

Les résultats de la CMI obtenus par la PLE sont représentés dans les tableaux VII et VIII. On peut noter que les CMI les plus faibles sont enregistrées pour l'extrait éthanolique de *Padina pavonica* vis-à-vis d'*E.coli* (2,5 mg/ml) et l'extrait éthanolique de *Ceramium virgatum* envers *SARM* (2,5mg/ml), les CMI les plus élevés sont obtenus pour les extraits aqueux de *Ceramium virgatum* envers *E. coli* (20 mg/ml).

Tableau VI: Concentrations minimal inhibitrice des différents extraits de la PLE vis-à-vis d'*E. coli*

<i>E.coli</i>	L'espèce d'algue	Concentration
Extraits éthanoliques	<i>Ceramium virgatum</i>	7,5mg/ml
	<i>Ulva intestinalis</i>	5mg/ml
	<i>Padina pavonica</i>	2,5mg/ml
	<i>Halopteris scoparia</i>	5mg/ml
	<i>Cystoseira mediterranea</i>	/
Extraits aqueux	<i>Ceramium virgatum</i>	20mg/ml

Tableau VII : Concentrations minimal inhibitrice des différents extraits de la PLE vis-à-vis de *SARM*

<i>SARM</i>	L'espèce d'algue	Concentration
Extraits éthanoliques	<i>Ceramium virgatum</i>	2.5mg/ml
	<i>Ulva intestinalis</i>	/
	<i>Padina pavonica</i>	5mg/ml
	<i>Halopteris scoparia</i>	7.5mg/ml
	<i>Cystoseira mediterranea</i>	/
	<i>Ceramium virgatum</i>	Négatif
Extraits Aqueux	<i>Halopteris scoparia</i>	/
	<i>Padina pavonica</i>	/

Résultats et discussion

Nous avons enregistré une même CMI (2,5 mg/ml) vis-à-vis *SARM* pour l'extrait éthanolique de *Ulva intestinalis obtenus* par extraction classique et l'extrait de *Ceramium virgatum* obtenus par la PLE ; les CMI des extraits aqueux de la PLE sont inférieurs à la CMI des extraits aqueux d'extraction simple envers *SARM* et *E. coli*.

Santoyo et al. (2009) ont déterminé les différentes concentrations minimales inhibitrices de l'extrait d'algue *Haematococcus pluvialis* obtenus par la même méthode d'extraction (PLE), et en utilisant la même méthode de microdillution sur bouillon Mueller Hinton, et vis-à-vis de *E. coli* et *S.aureus*, les CMI de l'extrait éthanolique est de 2.5mg/ml envers *E-coli* et *S.aureus* ceci s'accorde avec les résultats de l'effet inhibiteur de *Padina pavonica* vis-à-vis de *E.coli* et de l'extrait éthanolique de *Ceramium virgatum* vis-à-vis de *SARM*.

Selon l'étude de **Plaza et al. (2010)** les CMI de l'extrait éthanolique et aqueux de *Himantalia elongata* vis-à-vis de *SARM*, *E. coli* et *candida albicans* sont inférieurs à celles que nous avons obtenus pour les mêmes solvants et les deux méthodes d'extraction vis-à-vis les mêmes espèces microbienne. la différence dans les résultats peut être liée aux conditions et à la méthode d'extraction.

La CMB des différents extraits d'algues étudiés vis-à-vis *SARM*, *E. coli* et *candida albicans* possède un effet bactériostatique.

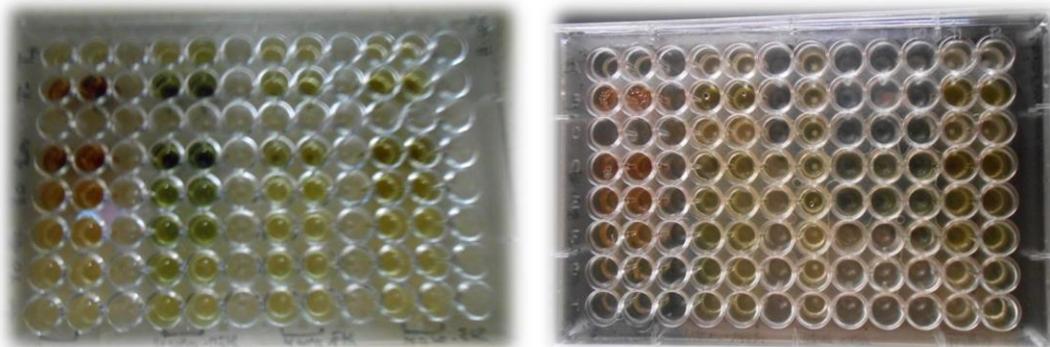


Figure 19: photographies des résultats de la CMI sur microplaques

Résultats et discussion

Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre le taux de composés phénoliques et l'activité antimicrobienne, en effet ce n'est pas les extraits les plus riches en composés phénoliques à savoir les extraits de PLE qui possèdent une activité antimicrobienne la plus élevée, contrairement au extraits obtenus par l'extraction classique qui sont moins riche en composés phénoliques mais possèdent une grande activité antimicrobienne, on en conclu donc que cette activité n'est pas due aux composés phénoliques seulement, elle peut être due également au caroténoïdes notamment la fucoxanthine donc les algues sont riches .

Conclusion

Dans la présente étude nous nous sommes intéressés à l'étude comparative de l'activité antimicrobienne des extraits d'algues marines à savoir *Cystoseira mediterranea*, *Padina pavonica*, *Halopteris scoparia*, *Ulva intestinalis* et *Ulva lactuca*, obtenus par extraction fluides pressurisés et par extraction classique vis-à-vis de bactéries Gram positif, Gram négatif et d'une levure.

Les résultats des taux d'extraction des espèces étudiées sont montrés que l'extraction classique a permis d'obtenir le taux le plus élevé avec 14,81% et cela pour l'algue brune *Padina pavonica*.

Concernant l'étude comparative entre les deux méthodes d'extraction nous avons trouvé que les meilleures teneurs en composés phénoliques ont été enregistrées par les extraits de fluides pressurisés, les deux algues brunes (*Padina pavonica* et *Halopteris scoparia*) se sont distinguées par des taux relativement élevés (42,97 et 29,79 mg EAG/g d'extrait) respectivement.

L'évaluation de l'effet antimicrobien montre que les extraits obtenus par extraction classique sont plus actifs que les extraits obtenus par PLE, et que cette activité est plus élevée vis-à-vis de la bactérie Gram positif. Les meilleures zones d'inhibition ont été obtenues par les extraits l'algue brune *Halopteris scoparia* vis-à-vis de toutes les souches testées. La CMI la plus faible (0.5 mg/ml) a été enregistrée par l'extraction classique pour l'extrait éthanolique d'*Ulva lactuca* vis-à-vis de *SARM*.

Les résultats de la présente étude donnent un aperçu générale sur le potentiel antimicrobiennes de quelques extraits d'algue marine obtenue par deux différences types d'extraction à savoir, l'extraction par fluide pressurisés et l'extraction classique. Nos perspectives de recherche à venir s'axeront sur :

- Extraction par autres méthodes ;
- Recherche d'autres activités des extraits d'algue d'extraction par fluides pressurisés ;

- Procéder à une séparation de ces composés, afin de les tester séparément et identifier ceux, parmi eux qui sont actifs ;
- Elargir la gamme des microorganismes cibles ;
- Réaliser des tests de cytotoxicité pour, éventuellement, éviter les doses toxiques en thérapeutique.
- Réaliser des tests in vivo pour évaluer certaines activités thérapeutiques (activités antidiabétique, anti-hypertensive, anti-inflammatoire, antitumorale, etc).

Références bibliographique

A

Al saif SA, Nevein AR, El-Wazanani HA, Aref IA. (2014). Antibacterial substances from marine algae isolated from Jeddahcoast of Redsea, SaudiArabia .Saudi Journal of Biological Sciences 21, 57-64.

B

Bahorun T. (1997). Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Food Agric.Supp : 83-95.

Ben Abdellah R ,Hamadi F , Imed J and Belghith K. (2013). Etude in vitro de l'activité antioxydante de quelques espèces algales au niveau des cotes de la chebba Rapp. Comm. int. Mer Médit, 40p.

Billing J and Sherman PW. (1998).AntimicrobialFunctions of Spices:WhySomeLikeit Hot. *RevBiol.* 73: 3-49.

Blunt JW, Copp RB, Hu WP, Munro MH, Northcote PT andPrinsep MR. (2009). Marinenaturalproducts. *NaturalsProducts Reports.* 26: 170-244.

Bouakaz A,Tran TA,Roger S, Leguennec YG,Tranquart F, (2006). On the mechanisms of cell membrane permeabilization with ultra sound and microbbles. *Ultra sound in medicine of biology.* Volume 32,ISSP :5,90p.

Bravo L. (1998).Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism,a nd nutritional significance. *Nutrition Reviews.* 56 (11) : 317-333.

Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Editions médicales internationales, Tec et Doc Lavoisier .paris, 1120 p.

C

Cabioc'h J, Floc'h JY, Le Toquin A, Boudouresque CF, Meinesz A et Verlaque M (1992). Guide des algues des mers d'Europe. Ed. Delachaux et Niestlé. France, P : 231.

Chbani A, Mawlawi H, Etahiri S. (2011). Activité antibactérienne des extraits d'une algue brune *Padina pavonica* de la côte méditerranéenne au Liban : Phytothérapie. 9:283-286.

Calliste C.A., Trouillas P., Allais D.P., Simon A. and Duroux J.L.(2001). Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B 16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(7) :3321-3327.

Chiheb I, Riadi H, Martinez-Lopez J, Dominguez F, Gomez Vidal A, Bouziane H and Kadiri M. (2009). Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco. *African Journal of Biotechnology*, 8 (7) : 1258-1262.

Chouikhi A. (2013). Potential applications of marine seaweeds and pharmacological activities of their metabolites: A review *Institute of Marine Sciences & Technology*. Algeria, 19-21.

Connan S, Goulard F, Stiger V, Deslandes E, and Ar Gall E.(2004). Interspecific and temporal variation in phlorotannin levels in an assemblage of brown algae. *Botanica Marina* 47(5) :410-416.

Cowan MM. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *American Society for Microbiology*, (4) :12-14.7.

Cox S, Abu-Ghannam N and Gupta S. (2010). An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. *International Food Research Journal*, 17: 205-220.

Crozier A, Jaganath I B and Clifford MN. (2006). Phenols, Polyphenols and Tannins : An Overview In *Plant secondary metabolites occurrence, structure and role in the human diet*. Ed. Ltd. Singapore, P : 1-24.

D

Davis TA, Volesky B, Mucci A. (2003). A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research*, 37(18) :4311-4330.

Devi KP, Suganthi N, Kesika P and Pandian SK. (2008). Bioprotective properties of seaweeds: In vitro evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity against food borne bacteria in relation to polyphenolic content. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 38 (8) : 1472-6882.

Donadiou Y. Et Basire J. (1985). Les algues : thérapeutiques naturelles .Edition Maloine .P.36-40.

E

Etahiri S, Bultel-Ponce V, Elkouri A. (2003). Antibacterial activities of marine algae from the Atlantic Coast of Morocco. *Marine life* 13(1-2) : 3-9.

F

Farvin S and Jacobsen C. (2012). Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food chemistry*.138,1670-1681.

Favier A. (2003). Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*,108-115.

G

Gayral P. (1975). Les algues : Morphologie cytologie reproduction écologie. Ed. Doin. Paris, P: 166.

Glombitza KW, Hoppe HA, Leving T and Tanaka Y. (1979). Antibiotics from algae Marine algae in pharmaceutical. *Science*, 303-42.

Gonzalez del Val A, Platas G, Basilio A, Cabello A, Gorrochategui J, Suay I, Vicente F, Portillo E, Jiménez del Rio M, Reina GG and Pelaez F. (2001). Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Island, Spain). *International Microbial*, 4: 35-40.

Guiraud JP. (1998). Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod. Paris, 652p.

H

Häkkinen S. (2000). Flavonols and phenolic acids in berries and berry products. Ed. Medical Sciences. Kuopio, 92p.

Hagerman AE, Rice ME and Ritchard NT (1998). Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin (4f8) catechin (procyanidin). Journal of Agriculture and Food chemistry, 46: 2590-2595.

Hart T et Shears P.(2006). Microbiologie. Edition Medicine Sciences Flammarion ,Atlas de poche, 314p.

Havesteen BH. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids, pharmacol ther, 96(2-3) :67-202.

Hayouni E, Abedrabba M, Bouix M and Hamdi H. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. Food Chemistry. 105 (3): 1126-1134.

Heim KE, Tagliaferro AR and Bobilya DJ. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Journal of Nutritional Biochemistry, 13: 572-584.

Hennebelle T, Sahpaz S et Bailleul F. (2005). Pharmacologie : polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. Phytothérapie, (1): 3-6.

Hervé B. (2012). Ulves Valorisation Nutrition Santé. Gen2Bio Lorient, 1-38.

J

Institut National de Cartographie et de Télédétection (INCT). (2000).

J

Julie P, Danielle L, Daniel M. (2010). Algues, filières du futur Livre Turquoise. adebioihec: 163.

K

Kandhasamy M and Arunachalam KD. (2008). Evaluation of in vitro antibacterial property of seaweeds of southeast coast of India. *African Journal of Biotechnology*, 7(12).ISSN : 1684-5315.

Karabay-Yavasoglu N.U., Sukatar A., Ozdemir G. and Horzum Z. (2007). Antimicrobial Activity of Volatile Components and Various Extracts of the Red Alga *Janiarubens*. *Phytotherapy research*, 21: 153-156.

Karou D., Dicko M.H., Simpore J. and Traore A.S. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of polyphénols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*, 4 (8) : 823-828.

Koivikko R, Lojonen J, Eranen JK et Jormalainen V. (2008). Variation of phlorotannins among three populations of *Fucus vesiculosus* as revealed by HPLC and colorimetric quantification. *Journal of Chemical Ecology*. 34, 57-64.

Kolanjinathan K and Stella D. (2011). Comparative Studies on Antimicrobial Activity of *Ulva reticulata* and *Ulva lactuca* against Human Pathogens. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 2(6) :1738-1744.

Kong CS, Kim JA, Yoon and Kim SK. (2009). Induction of apoptosis by phloroglucinol derivative from *Ecklonia Cava* in MCF-7 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 47(7) :1653-1658.

Kuda T, Tsunekawa M, Goto H and Araki Y. (2005). Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18: 625-633.

L

Leyral G et Joffin (1998). *Microbiologie technique-tome 2 documentation technique*. Edition :Canopé-CRDP de Bordeaux,12p.

Liu RH. (2007). Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, 46: 207-219.

Lugasi A, Hóvári J, Sági KV and Bíró L. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta biologias zegediensis*, 47 (1-4): 119-125.

M

Manivannan K, Karthikaidevi G, Anantharaman P, Balasubramanian T. (2011). Antimicrobial potential of selected brown seaweeds from vedalai coastal waters (gulf of mannar) : Southeastcoast of india. *Middle-East. Journal of Scientific Research*, 4(2) :72-77.

Maréchal JP ,Culioli G , Helligo C, Thomas-Guyon H, Callow ME , Clare AS et Ortalomagné A. (2004). Seasonal variation in antifouling activity of crude extracts of the brown alga *Bifurcaria bifurcata* (Cystoseiraceae) against cyprids of *Balanus Amphitrite* and the marine bacteria *Cobetia marina* and *pseudoalteromonas haloplanktis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 313 :47-62.

Marfaing H, Lerat Y. (2007). Des ressources marines : Les algues ont-elles une place en nutrition ? *Phytothérapie*, 5(1) :2-5.

Maschek JA and Baker BJ. (2008). The chemistry of algal secondary metabolism In *Algal chemical ecology*. Ed. Birmingham. USA, 322 p.

Memory T. (2006). *Biologie Module 1, Diversité des algues et des plantes*, 45 p.

Michel C. (2000). *Algues-Operon. Biologie Module 1, Diversité des algues et des plantes*, 20p.

Mohamed A, Khalil AA and El-Beltagi HES. (2009). Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of kaffmaryam (*Anastatica hierochuntica*) and doum palm (*Hyphaenethebaica*) cultivated in Egypt. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 2 (2) : 71-79.

Mukhopadhyay S, Luthria DL and Robbins RJ.(2006). Optimization of extraction process for phenolic acids from black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) by pressurized liquid extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(1), 156-162.

Murugan K et Iyes VV.(2012). Antioxidant and Antiproliferative activities of marine algae, *Gracilaria edulis* and *Enteromorpha lin gulata*, from Chennai coast. *International Journal of Cancer Research*. 8 Suppl 1 : 15-56.

N

Naegelé E et Naegelé A. (1967). Les algues. Ed. Presses universitaire de France. Paris, P: 127.

Namasivayam S, Chidambaram K, Ramar T, Veeraperumal S, Ganapathy K, Palani G, and Ramasamy R. (2013). Further studies and biological activities of macro molecular protein R-Phycoerythrin from *Portia riahorne manni*; *International Journal of Biological Macromolecules*. 62; 107–116.

O

Oumaskour K, Boujaber N, Etahiris and Assobhei O. (2012). Screening of Sidi Bouzid (El Jadida, Morocco). *African Journal of Biotechnology*. 11 Suppl 104 :16831-16837.

Owen PI and Johns (1999). Xantine oxidase inhibitory of northeastern North American plants remedies used for goot. *Journals of ethnopharmacology* .43 (1), pp.41-46.

P

Paul VJ and Fenical W. (1987). Natural products chemistry and chemical defence in tropical marine algae of the Phylum chlorophyta. *Bioorganism Mar Chem*, 1: 1-29.

Pinelo M, DelFabbro P, Manzocco L, JoséNunez M and Nicoli MC. (2005). Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chemistry*, 92: 109-117.

Plaza M, Santoyo S, Jaime L, Garcia-Blairsy RG, Herrero M, Senorans FJ and Ibanez E. (2010) .Screening for bioactive compounds from algae, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* ,51 450–455.

R

Rajeev KJ and Xu Z. (2004). Biomedical compounds from marine organisms. *Marine Drug* 2: 123-146.

Ribéreau-Gayon P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod. Paris, P: 173-201.

S

Santoyo S, Rodriguez-Meizoso I, Cifuentes A, Jaime L, Garcia-BlairsyReina G, Senorans FJ and Ibanez E. (2009). Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potent antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae *LWT - Food Science and Technology*. 42, 1213–1218.

Singleton P and Sainsbury Y. (1984). Bactériologie Introduction To bacteria for students in the biological sciences Edition massonprint book paris.158 p.

Smit AJ. (2004). Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products. *Journal AppliPhycoogiel*, 16: 254-62.

Spigno G, Tarmelli L and De Faveri D.M. (2007). Effect of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81 (1) : 200-208.

Steinberg PD, Schneider Kjelleberg S. (1997). Chemical defences of seaweeds against microbial colonization. *Bio degradation*, 8: 211-20.

T

Taskin E, Ozturk M and Kurt O. (2007). Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). *African journal of biotechnology*, 6 (24): 2746-2751.

Tüney I,Çadirci BH, Ünal D andSukatar A. (2006). Antimicrobial Activities of the Extracts of Marine Algae from the Coast of Urla (Izmir, Turkey). *Turk J Biol*, 30: 171-175.

Turkmen N, Sari FY et Velioglu S.(2006). Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black mate tea polyphenols determined by ferrous tartate and Folin-Ciocalteu methods. *Food chemistry*.99,835-841.

V

Vermerris W and Nicholson R. (2006). Phenolic compound biochemistry. Ed. Springer. USA, P: 267.

W

Wang Y, Xu Z, Bach SJ and McAllister TA. (2008). Effects of phlorotannins from *Ascophyllum nodosum* (brown seaweed) on in vitro ruminal digestion of mixed forage or barley grain. *Animal Feed Science and Technology*, 145: 375-395.

Werner J.bauerRB ,alainetournaud JL .(2010). Science et technologie des aliments principes de chimie des constituants et de technologie des procédés, 476p.

Y

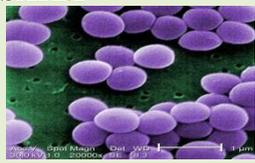
YounesF, chennaoui M,Assobhei O, Etahiri S.(2012). Evaluation de l'effet du lieu de recolte des algues Marines des côtes atlantiques marocaines sur l'activité antibacterienne et anti-inflammatoire. *Revue de Microbiologie Industrielle Sanitaire et Environnementale* .6(1) : 54-66.

Younes F, Etahiri S et Assobhei O .(2009). Activité antimicrobienne des algues marines de la lagune d'oualidia(Maroc) : Criblage et optimisation de la période de la récolte *.Journal of Applied Biosciences* .24 :1543-1552.

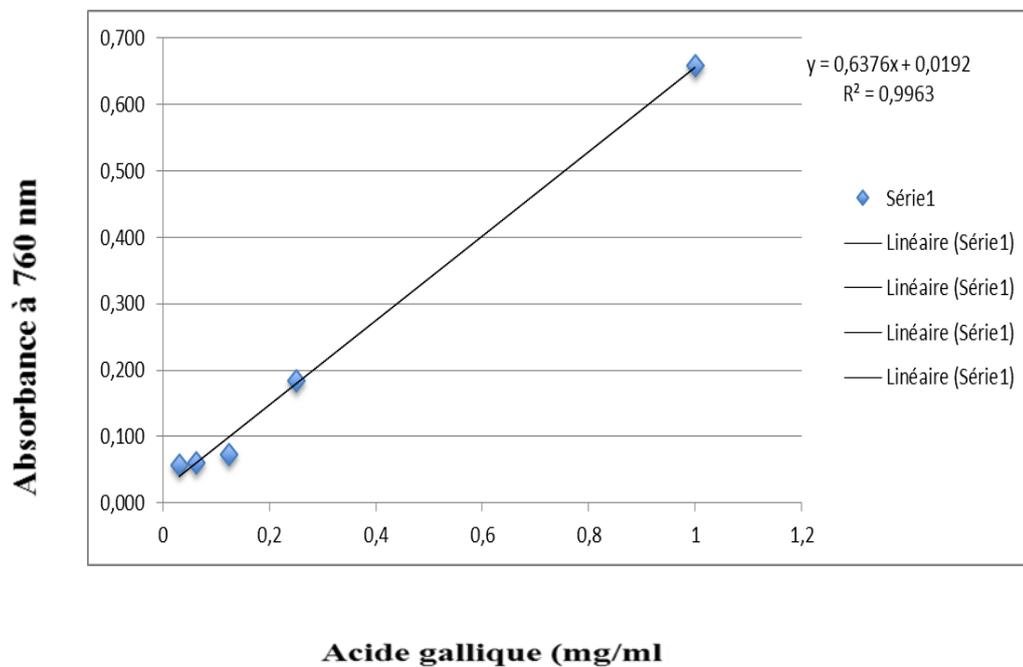
Z

Zbakh H, Chiheb H, Bouziane B, Sanchez VM and Riadi H.(2012). Antibacterial activity of benthic marine algae extracts from the mediterranean coast of Morocco.*Journal of Microbiology Biotechnologiy and Food Sciences*.2 Suppl 1 : 219-228.

Annexe I : Caractères bactériologiques, biochimiques, et pouvoir pathogène des souches bactériennes et fongique testées

SOUCHES	Caractères morphologiques	Caractères biochimiques	Pouvoir pathogène	Références
<p><i>Escherichia coli</i></p> 	<p>Bacille, Gram (-), Asporulé, habituellement mobile</p>	<p>Lactose (+), glucose (+), indol(+), H₂S(-), uréase (+)</p>	<p>Hôte naturel du tube digestif de l'homme, à raison de 10⁷10⁹UFC/m de selles, provoque des Infections urinaires, infections abdominales, infections intestinales.</p>	<p>Hart et shears, 2006</p>
<p>SARM</p> 	<p>Coque, Gram(+), formant un amas, immobile, non sporulé, pigment caroténoïde</p>	<p>Coagulasse (+), DNase (+), catalase (-), mannitol(+), uréase (+), nitrate reductase(+)</p>	<p>Provoque plusieurs infections dont celle de la peau, des muqueuses, ainsi que des septicémies, et des toxi-infections alimentaires</p>	<p>Singleton et sainsburry, 1984</p>
<p><i>Candida albicans</i></p> 	<p>Levures de forme variable rondes à allongées. Pseudomycélium Parfois présence de vrai mycélium. Non pigmentées.</p>	<p>Lactose (-) Saccharose(-) Glucose(+), galactose (+), maltose(+), uréase(-).</p>	<p>Microorganisme commensal, retrouvée dans la flore normale du tractus gastro-intestinal et de la peau. colonise aussi la cavité buccale, provoque des candidoses.</p>	<p>Leyral et Joffin ,1998</p>

Annexe II : Courbe d'étalonnage



Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux

Annexe III : Matériels et produits utilisés

1. Appareillage

Autoclave.

Bain-marie.

Balance de précision RADWAG.

Broyeur.

Centrifugeuse (NUVE NF 200).

Etuve BINDR WTB et Etuve de 37°C.

PH mètre HANNA (Microprocessor PH mètre.

Plaque agitatrice VELP.

Plaque chauffante agitatrice VELP.

Spectrophotomètre WPA Light Wave II.

Tamiseur RETCH.

Vortex.

2. Produits chimiques

Acide gallique($C_7H_6O_5$)

Carbonate de sodium(Na_2CO_3)

Ethanol :(C_2H_6O) ,96%, MM=46.07g/mol, d=0.81(PROLABO).

Eau physiologique (9g NaCl dans un litre d'eau distillée).

Folin-Ciocalteu 2N

Méthanol : CH_3OH ,99.9%, MM=32.04 g/mol, d=0.79(PROLABO)

Tween 20

Annexe IV : Composition des milieux de culture utilisés

(Guiraud, 1998)

Bouillon Muller Hinton

Peptone acide caséine 17.50g

Infusion de viande bœuf 20g

Amidon 1.5g

Ph 7.4 -0.2

Bouillon nutritif

Peptone 10g Extrait de viande 5 g

Chlorure de sodium 5g

Ph 7.2

Gélose Chapman

Extrait de viande 1 g

Peptone 10g

Chlorure de sodium 5g

Mannitol 10g

Rouge de phénol 25g

Ph 7.4

Gélose EMB

Peptone 10 g

Lactose 10g

Eosine 0.4g

Bleu de méthylène 0.0625g

Hydrogénophosphate de potassium 2g

Agar 15g

Ph 8

Gélose Mueller Hinton

Extrait de viande 2g

Hydrolysate acide de caséine 17.5g

Amidon 1.5g

Agar 10g

Ph 7.4

Gélose nutritif

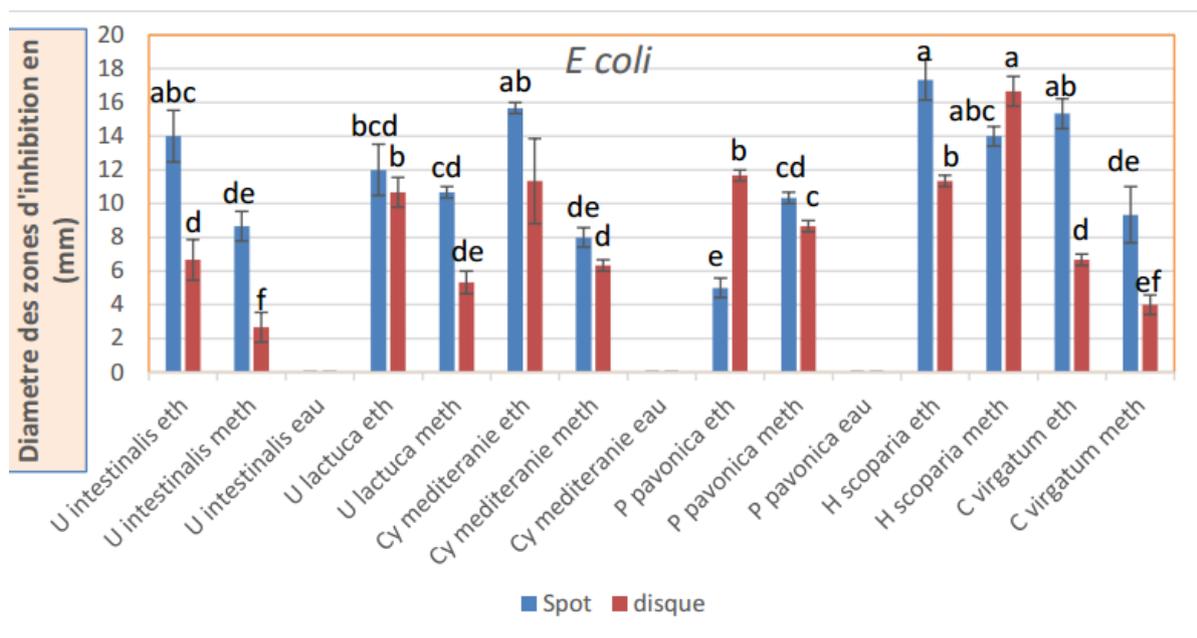
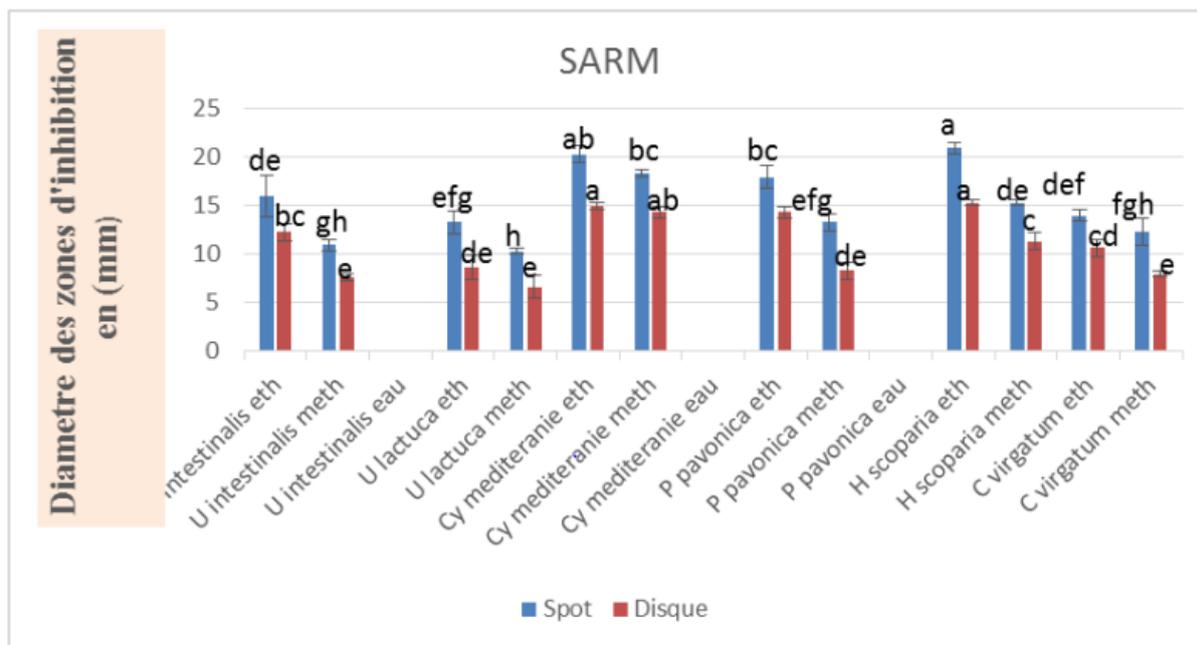
Peptone 5g

Extrait de viande 3g

Agar 13g

Ph 6.8 ±0.2 à 25°C

Annexe V : activité antimicrobienne des extraits d'extraction classique vis-à-vis *SARM* et *E.coli*



Annexe VI : Les résultats de l'antibiogramme des extraits des six algues

- Résultats de l'activité antimicrobienne par la méthode des spots.

	Diamètre des zones d'inhibition en mm			
	solvants	<i>E. coli</i>	<i>SARM</i>	<i>Candida Albicans</i>
<i>Ulva intestinalis</i>	Ethanol	14±1,52	16±2,08	0±0,00
	Méthanol	8,66±0,88	11±0,57	0±0,00
	Eau	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<i>Ulva lactuca</i>	Ethanol	12±1,52	13,33±1,20	0±0,00
	Méthanol	10,66±0,33	10,33±0,33	12,33±0,66
<i>Padina pavonica</i>	Ethanol	5±0,57	18±1,15	0±0,00
	Méthanol	10,33±0,33	13,33±0,88	11,33±0,33
	Eau	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<i>Cystoseira mediterranea</i>	Ethanol	15,66±0,33	20,33±0,88	0±0,00
	Méthanol	8±0,57	18,33±0,33	8,66±0,33
	Eau	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<i>Halopteris scoparia</i>	Ethanol	17,33±1,20	21±0,57	10±0,57
	Méthanol	14±0,57	15,33±0,33	15,33±0,33
<i>Ceramium virgatum</i>	Ethanol	15,33±0,88	14±0,57	13,66±0,88
	Méthanol	9,33±1,66	12,33±1,33	10±1,15

- Résultats de l'activité antimicrobienne par la méthode des disques.

	Diamètre des zones d'inhibition en mm			
	solvants	<i>E. coli</i>	<i>SARM</i>	<i>Candida Albicans</i>
<i>Ulva intestinalis</i>	Ethanol	6,66±1,20	12,33±0,88	11,33±0,88
	Méthanol	2,66±0,88	7,66±0,33	13±0,00
	Eau	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<i>Ulva lactuca</i>	Ethanol	10,66±0,88	8,66±1,20	10,33±0,33
	Méthanol	5,33±0,66	6,66±1,20	11,33±0,33
<i>Padina pavonica</i>	Ethanol	11,66±0,33	14,33±0,57	11,66±0,33
	Méthanol	8,66±0,33	8,33±0,88	7±1
	Eau	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<i>Cystoseira mediterranea</i>	Ethanol	11,33±2,51	15±0,33	12±0,57
	Méthanol	6,33±0,33	14,33±0,57	8,66±0,57
	Eau	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<i>Halopteris scoparia</i>	Ethanol	11,33±0,33	15,33±0,33	13,66±0,88
	Méthanol	16,66±0,88	11,33±0,88	14±0,57
<i>Ceramium virgatum</i>	Ethanol	6,66±0,33	10,66±0,88	12,66±1,85
	Méthanol	4±0,57	8±0,33	9,66±0,33

Glossaire

Anti cancéreux : une substance ou une action destinée a combattre le cancer.

Antifongique : qui s'oppose au développement des champignons.

Anti inflammatoire : Substances chimiques ayant le pouvoir de réduire la réaction inflammatoire de l'organisme.

Bactéricide : qui détruit les bactéries.

Bactériostatique : qui suspend la division microbienne, provoquant vieillissement et mort des bactéries a doses suffisantes.

Cardiovasculaire : qui concerne le cœur et les vaisseaux .les maladies Cardiovasculaire.

Esters : composé résultant de l'action d'un acide carboxylique sur un alcool ou phénol avec élimination d'eau .les esters sont utilisés comme solvants ou comme matières premières dans l'industrie des parfums et en pharmacie.

Glycosides : sont des molécules nées de la condensation d'un sucre et d'une substance non glucidique. Ces deux éléments sont réunis par une liaison dite glycosidique dont le type définit une classification du glycoside.

Imputrescible : qui ne peut pourrir, se putréfier.

Macération : préparation liquide qui requiert un trempage a froid plus ou mois long (de quelques heures a plusieurs semaines) de certaines substances dans l'eau, le vin, alcool, l'huile.

Ophthalmique : anatomie des yeux.

Peroxydation : réaction chimique formant un peroxyde au sens vrai, c'est-à-dire une dérive de l'eau oxygénée.

Résumé

L'objectif de ce présent travail est de mettre en évidence *in vitro*, les propriétés antimicrobiennes de quelques extraits d'algues marines obtenus par deux différents types d'extraction à savoir extraction classique solide liquide et extraction par fluides pressurisés. Les teneurs les plus élevées en composés phénoliques sont obtenus par PLE pour les deux algues brune à savoir *Padina pavonica* (42,97 mg Eq AG/g d'extrait) ; *Halopteris scoparia* (29,79 mg Eq AG/g d'extrait). L'activité antimicrobienne des extraits d'algues montre que la plus part des souches testées sont plus sensible aux extraits obtenus par extraction classique. Une activité antimicrobienne importante est noté pour l'algue brune *Halopteris scoparia* qui est active à l'égard de toutes les souches testées avec un diamètre de 21 mm vis-à-vis SARM. les six algues étudiés possèdent un effet bactériostatique vis-à-vis de toutes les souches testés.

Mots-clés : Activité antimicrobienne, algues marines, composés phénoliques, extraction classique, PLE

Abstract

The aim of the present work is to demonstrate, the *in vitro* antimicrobial properties of some seaweed extracts obtained by two different extraction methods namely conventional liquid solid extraction and pressurized liquid extraction (PLE). The highest levels of phenolic compounds are obtained by PLE for both brown algae *Padina pavonica* (42.97 mg GAE /g of extract) and *Halopteris scoparia* (29.79 mg GAE/g extract). The antimicrobial activity tests of algae extracts shows that most of the tested strains are more sensitive to the conventional extracts. A significant antimicrobial activity is noted for the brown algae *Halopteris scoparia* that is active against all strains tested with a diameter of 21 mm for *MRSA*. the six algae studied are a bacteriostatic effect against all tested strains.

Key-words: antimicrobial activity, seaweeds, phenolic compounds, conventional extraction, PLE