

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB DE BLIDA



Faculté des Sciences

Département de Chimie

Mémoire Présenté par

BOUBEKRI Selma

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine	Science de la matière
Filière	Chimie
Option	Chimie des substances naturelles

Titre

Etude chimique de l'algue rouge *Gigartina pistillata*
Etude de l'activité antimicrobienne de *Gigartina pistillata*,
Laurencia pinnatifida* et *Ulva lactuca

Encadré par : Pr M. EL HATTAB (Université de Blida)

Promotion 2011/2012

REMERCIEMENT

Ce travail a été réalisé principalement entre le laboratoire de Chimie des Substances Naturelles à l'université de Blida, l'unité bactériologique du laboratoire centrale de l'Etablissement Public Hospitalier de BOUFARIK et le Laboratoire MAPIEM de l'Université du Sud Toulon-Var (France). Nous tenons à saisir cette occasion et adresser nos sincères remerciements et nos profondes reconnaissances à :

Tout d'abord à Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

Mes remerciements s'adressent également au Professeur EL HATTAB Mohamed, mon encadrant, pour avoir accepté de m'encadrer, pour l'orientation, la confiance, la patience, les conseils, qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port. Qu'il trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité.

Mes vifs remerciements à Docteur LASSAS responsable du l'unité bactériologique du laboratoire centrale de l'Etablissement Public Hospitalier de BOUFARIK pour toute sa disponibilité et son aide.

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux membres de jury, pour l'honneur qu'ils me font de juger ce travail. Qu'ils soient assurés de mon entière reconnaissance.

DEDICACE

Je dédie ce mémoire de fin d'études

A

Ma très chère mère et mon très cher père

En témoignage de ma reconnaissance envers le soutien, les sacrifices et tous les efforts qu'ils ont fait pour mon éducation ainsi que ma formation.

A

Ma chère petite famille

Mon mari Mohamed, ma belle mère, ma sœur Wissam, mon frère Akram, mon beau frère et mon neveu Nazim.

Pour leur affection, compréhension et patience.

A

Toutes mes chères amies et toute la promo

Pour les bons moments passés ensemble.

A

Tous ceux qui ont une relation de proche ou de loin avec la réalisation du présent travail.

RESUME

Le présent travail est consacré à l'étude chimique de l'huile essentielle de l'algue rouge *Gigartina pistillata* récolté à Tipaza et à la détermination de son activité microbiologique. Il porte également sur l'étude de l'activité biologique de trois extraits lipidiques de *Gigartina pistillata*, *Laurencia pinnatifida* et *Ulva lactuca*. L'huile essentielle a été préparée par entraînement à la vapeur d'eau avec un rendement de 0,016 %. L'analyse de l'HE par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a permis de relever la présence de 20 constituants dont nous avons pu identifié exactement 14 produits près de 80% de la composition globale de l'HE. Les principaux produits identifiés sont le L-Limonène (21,850%), le Carvacrol (7,180%), le 2(4H)-benzofuranone,5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl (7,107%), l'éthylmethylmaleimide (4,007%) et le Myristate d'isopropyl (1,694%).

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été effectuée par la méthode de l'antibiogramme (diffusion des disques) et a montré une très faible activité de l'huile essentielle et des trois extraits contre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus ssp* et *Salmonella typhi*.

Mots-clés: *Rhodophycées*, *Chlorophycées*, *Gigartina pistillata*, *Laurencia pinnatifida*, *Ulva lactuca*, huile essentielle, extrait, terpènes, activité antimicrobienne.

ABSTRACT

The present work is devoted to a chemical study of essential oil of the red alga *Gigartina pistillata* collected at Tipaza and the determination of its microbiological activity. It also covers the study of the biological activity of three lipid extracts *Gigartina pistillata*, *Laurencia pinnatifida* and *Ulva lactuca*. The essential oil was prepared by steam distillation of water with a yield of 0.016%. Analysis of essential oil by gas chromatography coupled to mass spectrometry has identified the presence of 20 components which we have found 14 components nearly 80% of the overall composition of this essential oil. The main products identified were L-Limonene (21.850%), Carvacrol (7.180%), 2(4H)-benzofuranone,5,6,7,7 a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl (7.107%), ethylmethylemaleimide (4.007%) and isopropyl myristate (1,694%).

The evaluation of the antimicrobial activity was performed by the method of diffusion disks, and showed a very low activity of the essential oil and the three extracts against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus ssp* and *Salmonella typhi*.

Keywords: *Rhodophyceae*, *Chlorophyceae*, *Gigartina pistillata*, *Laurencia pinnatifida*, *Ulva lactuca*, essential oil, extract, terpenes, antimicrobial activity.

ملخص

هذا العمل يركز على التركيب الكيميائي للزيت الأساسي للطحلب الأحمر جيجارتينا بيستيلا المتحصل عليها من تبيزة مع تقييم نشاطها الميكروبيولوجي، و يركز أيضا على دراسة النشاط الميكروبيولوجي للمستخلصات الدهنية الثلاثة: جيجارتينا بيستيلا، لورانسيا بيناتيفيدا و أولفا لاكتوكا. للحصول على الزيت الأساسي إستعملنا طريقة التقطير بالبخار فكان المردود بقدر 0,016%، و قد تم تحليلها بواسطة الكروماتوغرافيا الطور الغازي مقرونة بمطيافية الكتلة فتحصلنا على 20 مركب حيث حدد منهم بدقة 14 مركب بنسبة 80% من التكوين الإجمالي. أهم المركبات التي تم تحديدها هي: الليمونين (21,850%)، الكارفاكول (7,180%)، (H4)- بنزوفورانون، 5،6،7،7-أ- تتراهيدرو-7،4،4-أ- تريميثيل (7,107%)، الإيثيلاليميد (4,007%) و الأيزوبروبيل ميريستات (1,694%).

تم تقييم النشاطات المضادة للميكروبات باستعمال طريقة الأنتيبيوغرام (لإنتشار القرص) ، فأظهرت وجود نشاط جد ضعيف للزيت الأساسي و المستخلصات الدهنية الثلاثة ضد ستافيلوكوكوس أوريوس، بسودوموناس أيروجينوزا، إيشيريشيا كولي، بروتئوس اس اس بي و سالمونيلا تيفي.

الكلمات المفتاحية: الطحالب الحمراء، الطحالب الخضراء، جيجارتينا بيستيلا، لورانسيا بيناتيفيدا، أولفا لاكتوكا، الزيت الأساسي، المستخلص، ترابان، النشاط المضاد للميكروبات.

LISTE DES TABLEAUX

P.20 - Tableau 1 : Position systématique de l'espèce *Gigartina pistillata*.

P.21 - Tableau 2 : Position systématique de l'espèce *Laurencia pinnatifida*.

P.22 - Tableau 3 : Position systématique de l'espèce *Ulva lactuca*.

P.31 - Tableau 4 : Variations structurelles des diterpénoides type labdane isolés à partir d'*Ulva fasciata*.

P.43 - Tableau 5 : Caractères organoleptiques et rendement de l'huile essentielle et des trois extraits.

P.44 - Tableau 6 : Produits identifiés dans l'huile essentielle de l'algue rouge *Gigartina pistillata* par CG/SM.

P.52 - Tableau 7 : les souches de références utilisées dans notre travail.

P.52 - Tableau 8 : les différents micro-organismes pathogènes utilisés dans notre étude.

P.57 - Tableau 9 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Gigartina pistillata*.

P.58 - Tableau 10 : Activité antibactériennes des trois extraits lipidiques.

LISTE DES PLANCHES

P.25 - Planche 1 : Squelettes sesquiterpéniques fréquents dans le genre *Laurencia*

P.26 - Planche 2 : Exemples de sesquiterpènes de type Laurane isolés de *Laurencia okumurai*

P.27 - Planche 3 : Exemples de sesquiterpènes isolés à partir de *Laurencia luzonensis*

P.28 - Planche 4 : Structures des composés isolés à partir de l'algue rouge *Laurencia saitoi*

P.30 - Planche 5 : Structures des sesquiterpénoides isolés à partir de l'algue verte *Ulva fasciata*

P.30 - Planche 6 : Structures des sept labdanes isolés à partir de l'algue verte *Ulva fasciata*

LISTE DES FIGURES

- P.20 - Figure 1 : *Gigartina pistillata*.
- P.21 - Figure 2 : *Laurencia pinnatifida*.
- P.22 - Figure 3 : *Ulva lactuca*.
- P.36 - Figure 4 : Photos personnelles des trois espèces. A : *Gigartina pistillata*, B : *Laurencia pinnatifida*, C : *Ulva lactuca*.
- P.37 - Figure 5 : Situation géographique de la région de récolte.
- P.38 - Figure 6 : Dispositif expérimental d'entraînement à la vapeur d'eau de l'HE.
- P.39 - Figure 7 : Extraction liquide-liquide de l'HE de la phase aqueuse.
- P.39 - Figure 8 : Flacons d'huile essentielle de *Gigartina pistillata*.
- P.40 - Figure 9 : Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectroscopie de masse.
- P.42 - Figure 10 : Exemple de préparation d'extrait de l'espèce *Laurencia pinnatifida*. A : flacon de macération. B : Extraction liquide-liquide. C : Filtration et séchage de la phase organique. D : Extrait étheré à distiller. E : Extrait brut de *Laurencia Pinnatifida*. F : Extrait de l'espèce *Gigartina pistillata*.
- P.47 - Figure 11 : Chromatogramme de l'huile essentielle de l'algue rouge *Gigartina pistillata*.
- P.48 - Figure 12 : Agrandissement de la zone du chromatogramme (24-30mn) de l'huile essentielle de *Gigartina pistillat*.
- P.50 - Figure 13 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Gigartina pistillata*.
- P.55 - Figure 14 : Illustration de la méthode de l'antibiogramme.

I.1.3	Systématique et taxonomie de l'espèce <i>Ulva lactuca</i>	22
I.1.3.1	Position systématique de l'espèce <i>Ulva lactuca</i>	22
I.2	Etude chimique des trois genres	23
I.2.1	Etude chimique du genre <i>Gigartina</i>	23
I.2.2	Etude chimique du genre <i>Laurencia</i>	24
I.2.2.1	Composition en terpènes	24
I.2.3	Etude chimique du genre <i>Ulva</i>	29
I.2.3.1	Terpènes isolés d'espèces du genre <i>Ulva</i>	29
I.2.3.2	Polysaccharides matriciels isolés d'espèces du genre <i>Ulva</i>	31
I.3.	Activités biologiques des trois espèces étudiées	32
I.3.1.	Activités des extraits et produits isolés des espèces du genre <i>Gigartina</i>	32
I.3.1.1.	Activité antivirale et virucide	32
I.3.1.2.	Activité anti herpétique et anticoagulante	32
I.3.2.	Activités des extraits et produits isolés des espèces du genre <i>Laurencia</i>	32
I.3.2.1.	Activité antiasthmatique.....	32
I.3.2.2.	Activité antibactérienne.....	33
I.3.3.	Activités des extraits et produits isolés des espèces du genre <i>Ulva</i>	33
I.3.3.1.	Activité antibactérienne et antifongique.....	33
I.3.3.2.	Activité anti-peroxidative et activité anti-hyperlipidémique	33

Partie expérimentale - Chapitre II : Etude chimique et analyse..... 34

Introduction.....	35
II.1 Matériel végétal.....	35
II.2 Lieu de récolte.....	36
II.3 Traitement des algues.....	37
II.4 Extraction et analyse de l'huile essentielle de <i>Gigartina pistillata</i>	37
II.4.1 Principe de l'extraction par entrainement à la vapeur d'eau.....	37
II.4.2 Extraction de l'huile essentielle de <i>Gigartina pistillata</i>	37
II.4.2.1 Traitement et récupération de l'huile essentielle par extraction liquide-liquide	38
II.5 Calcul du rendement	39
II.6 Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de l'algue rouge <i>Gigartina pistillata</i> par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	40
II.6.1 Conditions opératoires	40
II.7 Préparation des extraits des trois algues	41
II.7.1 Procédé utilisé	41
II.8 RESULTATS ET DISCUSSION.....	42
II.8.1 Propriétés caractéristique et rendement de l'huile essentielle de <i>Gigartina pistillata</i> et des trois extraits préparés.....	42

II.8.2 Identification de la composition de l'huile essentielle de l'algue rouge <i>Gigartina pistillata</i> par GC/SM.....	44
Chapitre III : Activités biologiques	51
III.1 Tests d'activités biologiques.....	52
III.1.1 Lieu de travail	52
III.1.2 Souches utilisées	52
III.1.2.1 Milieux de cultures	53
III.2 Etude qualitative de l'effet antibactérien et antifongique par la méthode de diffusion sur milieu solide (l'aromatogramme)	53
III.2.1 Principe	53
III.2.2 Technique de l'antibiogramme	54
III.3 Résultats et discussion des activités biologiques	56
CONCLUSION	61
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	62

Abréviations

GP : *Gigartina pistillata*

LP : *Laurencia pinnatifida*

UL : *Ulva lactuca*

HE : Huile essentielle

CG/SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse

Introduction générale

Le monde vivant comporte une grande variété d'espèces naturelles terrestres et/ou marines qui représente un réservoir inépuisable en produits pouvant être valorisés dans divers secteurs de l'industrie.

La chimie des substances naturelles s'est intéressée tout d'abord aux substances terrestres, pour des raisons culturelles et de commodité pratique. Cependant, l'étude chimique des espèces marines était complètement inconnue, ceci est dû principalement à la méconnaissance du milieu marin et à la difficulté d'y accéder. Nous avons noté que les premiers travaux d'études chimiques sur des espèces d'origine marine (algues et autres.....) datent du début du 20^{ème} siècle.

Le monde marin renferme une grande biodiversité avec 20 000 à 30 000 espèces d'**algues** [1] et 8000 espèces d'**éponges** [2]. Cette biodiversité que l'on retrouve dans les mers et les océans se traduit naturellement par une chimiodiversité tout aussi importante.

Les algues occupent la majeure partie du milieu aquatique, soit 18% du règne végétal, ceci explique le nombre important de travaux de recherche effectués sur ces espèces et ayant conduit à l'isolement de métabolites secondaires représentant près de 22% des composés isolés du milieu marin décrits à ce jour [3].

Les métabolites secondaires isolés à partir d'algues appartiennent à diverses classes chimiques, à savoir :

- ◆ les terpènes (monoterpènes, diterpènes, méroditerpènes,...etc.)
- ◆ les stéroïdes
- ◆ les composés volatils (terpènes, composés organiques halogénés,...), ce sont des produits présentant plusieurs activités biologiques (**antifongique, antibactérienne, antioxydant,...**) et jouent un rôle important dans les

algues, il s'agit en particulier de la reproduction sexuée et de la défense chimique contre les prédateurs.

Notre travail entre dans le cadre de la chimie des produits naturels marins et porte sur l'étude chimique et l'activité biologique de l'huile essentielle et l'extrait par solvant de l'algue rouge *Gigartina pistillata*. Il porte également sur les tests d'activités biologiques des extraits lipidiques de l'algue rouge *Laurencia pinnatifida* et de l'algue verte *Ulva lactuca*. Ce memoire est réparti en deux parties :

1. Une synthèse bibliographique.
2. Partie expérimentale portant sur :
 - L'étude chimique de l'huile essentielle de l'algue rouge *Gigartina pistillata*.
 - Les tests d'activités biologiques de l'huile essentielle de *Gigartina pistillata* et des extraits lipidiques de *Gigartina pistillata*, *Laurencia pinnatifida* et *Ulva lactuca*.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

Introduction

L'appellation "algue" est couramment utilisée pour désigner un végétal aquatique, par opposition aux végétaux terrestres ; or, la réalité biologique de ces organismes est beaucoup plus complexe [3].

On définit en tant qu'«algue» un végétal chlorophyllien dont l'appareil végétatif, appelé **thalle**, ne possède aucun organe spécifique (racine, tige, feuille), contrairement aux végétaux supérieurs. Ce terme (algue) rassemble des organismes provenant d'origines évolutives très différentes : les algues forment un groupe polyphylétique, c'est-à-dire que les espèces qui le composent n'ont pas d'ancêtre commun [3].

Ce groupe peut être divisé en trois classes principales :

- Les Chlorophycées (algues vertes)
- Les Rhodophycées (algues rouges)
- Les Chromophycées (comprenant entre autres les algues brunes), auxquelles s'ajoute une classe d'organismes procaryotes unicellulaires (à laquelle appartiennent les cyanobactéries).

Les **Rhodophytes** ou algues rouges forment un groupe très diversifié. Ces algues doivent leur couleur à la présence de plastes roses dans lesquels un pigment rouge, la phycoérythrine, est associé à plusieurs autres pigments dont les chlorophylles. La plupart de ces algues rouges sont pluricellulaires et marines, mais il existe quelques formes unicellulaires et quelques unes vivent également en eau douce. Les algues rouges sont divisées en deux groupes : celui des **Bangiophycées** (qualifiées de primitives) et celui des **Floridéophycées** (plus complexes). Elles se distinguent généralement par leur cycle de reproduction particulièrement complexe [1].

Les algues rouges sont rarement de grande taille, mais elles peuvent vivre aux plus grandes profondeurs connues pour des organismes chlorophylliens ; on a signalé en effet une algue rouge vivant à plus de 250 mètres dans les eaux claires de Bahamas (l'intensité de la lumière est de 0.001% de l'intensité à la surface). La plupart des Rhodophyceae marines sont pluricellulaires et benthiques. On estime à environ 4000 le nombre d'espèces d'algues rouges et à 98% le pourcentage des formes marines [4]. Parmi ces algues rouges nous avons retenus deux espèces différentes pour faire objet de notre étude, il s'agit de *Gigartina pistillata* et *Laurencia pinnatifida*.

Les Chlorophycés (algues vertes) sont les premiers organismes pluricellulaires apparus sur notre planète. Les algues vertes se sont ensuite adaptées aux eaux douces, puis se sont affranchies du milieu aquatique et ont colonisé le sol. Par la composition de leur équipement photosynthétique, les Chlorophycés nécessitent de la lumière ; elles ne se trouvent que très rarement au-dessous de 25 mètres de profondeur et se rencontrent le plus souvent dans les dix premiers mètres d'eau, mais on a observé quelques espèces au-delà de 50 mètres. On les trouve dans les eaux calmes et préfèrent en général les baies abritées et les zones du rivage protégées de la houle et des vagues du large [4].

Elles sont de formes très variées, uni- ou pluricellulaires. Leurs plastes sont colorés en vert par les chlorophylles **a** et **b**, auxquelles sont associés des carotènes et des xanthophylles. La photosynthèse permet la formation d'amidon, comme pour les plantes supérieures. La plupart des algues vertes vivent en eau douce ou en milieu marin, mais certaines espèces peuvent également se développer sur terre. Elles jouent un rôle important dans l'oxygénation des eaux, favorisant ainsi la vie animale [1]. L'algue verte *Ulva lactuca* a été choisie pour faire l'objet de notre étude expérimentale.

I.1 Systématique et taxonomie

I.1.1 Systématique et taxonomie de l'espèce *Gigartina pistillata*

Les algues rouges sont divisées en deux sous-classes: celui des **Bangiophycées** (qualifiées de primitives) et celui des **Floridéophycées** (plus complexes) [1]. Cette dernière contient environ 9 ordres et 44 familles. Parmi ces ordres, il y a l'ordre des Gigartinales, contenant la famille des Gigartinaceae dont appartient le genre *Gigartina*.



Figure 1 : *Gigartina pistillata*.

B. Description

Cette algue (figure 1) comporte un thalle formé par un groupe de filament sortant d'une plaque érigée basale d'environ 10 mm de diamètre. L'article cylindrique de tissu cartilagineux s'aplatit vers les parties supérieures, et peut mesurer environ 15 cm de long et 2 à 3 mm de diamètre.

I.1.1.1 Position systématique de l'espèce *Gigartina pistillata*

La position systématique est donnée dans le tableau 1 [5].

Tableau 1: Position systématique de l'espèce *Gigartina pistillata*

Classement	Nom
Phylum	Rhodophyta
Subphylum	Eurhodophytina
Classe	Florideophyceae
Sous-classe	Rhodymeniophycidae
Ordre	Gigartinales
Famille	Gigartinaceae
Genre	<i>Gigartina</i>
Espèce	<i>Pistillata</i>

I.1.2 Systématique et taxonomie de l'espèce *Laurencia pinnatifida*

Le genre *Laurencia* appartient à l'ordre des **Ceramiales** qui comporte 4 familles dont l'une est la famille des **Rhodomelaceae**, cette dernière contient le genre *Laurencia* [4].

Laurencia pinnatifida (Figure 2) est une algue rouge de couleur brun vert à rouge foncé, formant des touffes hautes de 3 à 10 cm de haut, issues d'un petit disque basal [6].

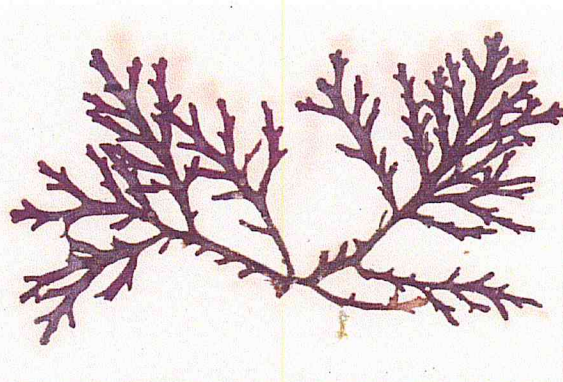


Figure 2 : *Laurencia pinnatifida*.

Laurencia pinnatifida appelée aussi *Laurencia pennée* trouvée en Atlantique et en Méditerranée, son thalle se divise en rameaux pennés dans un plan. Sa couleur rouge foncé est parfois altérée en vert sombre. On trouve cette algue jusqu'à la profondeur de 10 m, elle est bien développée en hiver et au printemps [6].

I.1.2.1 Position systématique de l'espèce *Laurencia pinnatifida*

La position systématique est donnée dans le tableau 2 [7]:

Tableau 2 : Position systématique de l'espèce *Laurencia pinnatifida*

Classement	Nom
Phylum	Rhodophyta
Subphylum	Eurhodophytina
Classe	Florideophycées
Subclasse	Rhodymeniophycidae
Ordre	Ceramiales
Famille	Rhodomelaceae
Genre	<i>Laurencia</i>
Espèce	<i>Pinnatifida</i>

I.1.3 Systématique et taxonomie de l'espèce *Ulva lactuca*

Le genre *Ulva* appartient à l'ordre des Ulvales qui comporte 5 familles dont l'une de ses principales familles est la famille des Ulvaceae, cette dernière renferme le genre *Ulva* [4].

Ulva lactuca (Figure 3) appelée aussi laitue de mer trouvée en Atlantique et en Méditerranée est une lame mince, constituée de deux couches de cellules accolées. Elle est large et souplement ondulée, d'un beau vert lumineux, d'une taille de 25 cm à une profondeur jusqu'à 10 m. La laitue de mer se reproduit toute l'année ; le maximum de développement a lieu en été [6].



Figure 3 : *Ulva lactuca*.

I.1.3.1 Position systématique de l'espèce *Ulva lactuca*

La position systématique est reportée par le tableau 3 [8]:

Tableau 3 : Position systématique de l'espèce *Ulva lactuca*.

Classement	Nom
Phylum	Chlorophyta
Subphylum	Tetraphytina
Classe	Ulvophycées
Ordre	Ulvales
Famille	Ulvaceae
Genre	<i>Ulva</i>
Espèce	<i>Lactuca</i>

I.2 Etude chimique des trois genres

I.2.1 Etude chimique du genre *Gigartina*

L'aspect le plus caractéristique de la chimie des métabolites secondaires des algues rouges est l'extrême abondance des dérivés halogénés, qui dérivent des acétogénines. Il est toutefois important de préciser que la présence d'halogènes sur des squelettes carbonés ne concerne en fait que trois ordres seulement, les **Ceramiales**, les **Gigartinales** et les **Némaliales**, et qu'ils totalisent à eux trois environ 800 structures différentes. Une deuxième caractéristique des métabolites secondaires des Rhodophycées est la précision des relations chimiotauxonomiques entre les ordres et la nature des métabolites qu'ils produisent. D'une manière générale, on constate que les structures chimiques varient peu à l'intérieur d'un ordre mais beaucoup d'un ordre à l'autre, et il n'y a guère d'exception à ces observations sur un peu de 1200 structures [4].

Notre synthèse bibliographique sur l'espèce *Gigartina pistillata* a révélé que les principaux métabolites isolés à partir de cette espèce sont des polysaccharides, il s'agit en particulier de **carraghénanes**.

Les carraghénanes sont des polysaccharides des parois cellulaires trouvés dans les algues rouges et en particulier dans les espèces appartenant au genre *Gigartina* [9]. Ce sont des galactanes sulfatés linéaires basés sur la répétition de séquences disaccharidiques nommés **carrabioses** [10- 11]. Les carraghénanes sont des polysaccharides très sulfatés extraits de la paroi cellulaire de la majorité des Gigartinales ; ils sont utilisés comme gélifiant et épaississant dans les industries agroalimentaires, médicales pharmaceutiques, et cosmétiques [12- 13]. La structure chimique des carraghénanes produites par les phases gamétophytique et tétrasporophyrique du cycle de vie de *Gigartina pistillata* a été déterminée par analyse spectroscopique IR et RMN 13C. Le tétrasporophyrique algue synthétise une galactane complexe sulfaté composé de λ -, ξ -, π -**carrabioses** [14]

I.2.2 Etude chimique du genre *Laurencia*

Les algues rouges du genre *Laurencia* (famille Rhodomelacés, ordre des Ceramiales) comprennent environ 135 espèces dans le monde, qui sont principalement réparties le long des côtes tropicales, subtropicales et tempérées [15]. La taxonomie des espèces du genre *Laurencia* a été largement étudiée et est souvent source de confusion en raison de la forte variabilité morphologique au sein des espèces individuelles. Les métabolites secondaires du genre *Laurencia*, qui ont fait l'objet d'étude depuis les années 1960, sont principalement composés de **sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes, et des C15-acétogénines** [16], ce sont des caractéristiques des espèces du genre *Laurencia* [15,17].

I.2.2.1 Composition en terpènes

Quatre squelettes sesquiterpéniques biogénétiquement apparentés sont fréquents dans le genre *Laurencia*. Le premier est celui du **chamigrane**, également présent dans certaines plantes terrestres, les trois autres : **cuparane, laurane** et **cyclolaurane** semblent beaucoup plus spécifiques du milieu marin. Ces quatre squelettes (**Planche 1**) ont de très nombreux représentants parmi les *Laurencia* et certains mollusques herbivores qui les consomment, en particulier les *Aplysia*. Ceci justifie les noms donnés à plusieurs de ces sesquiterpènes qui rappellent leurs origines végétale ou animale [4].

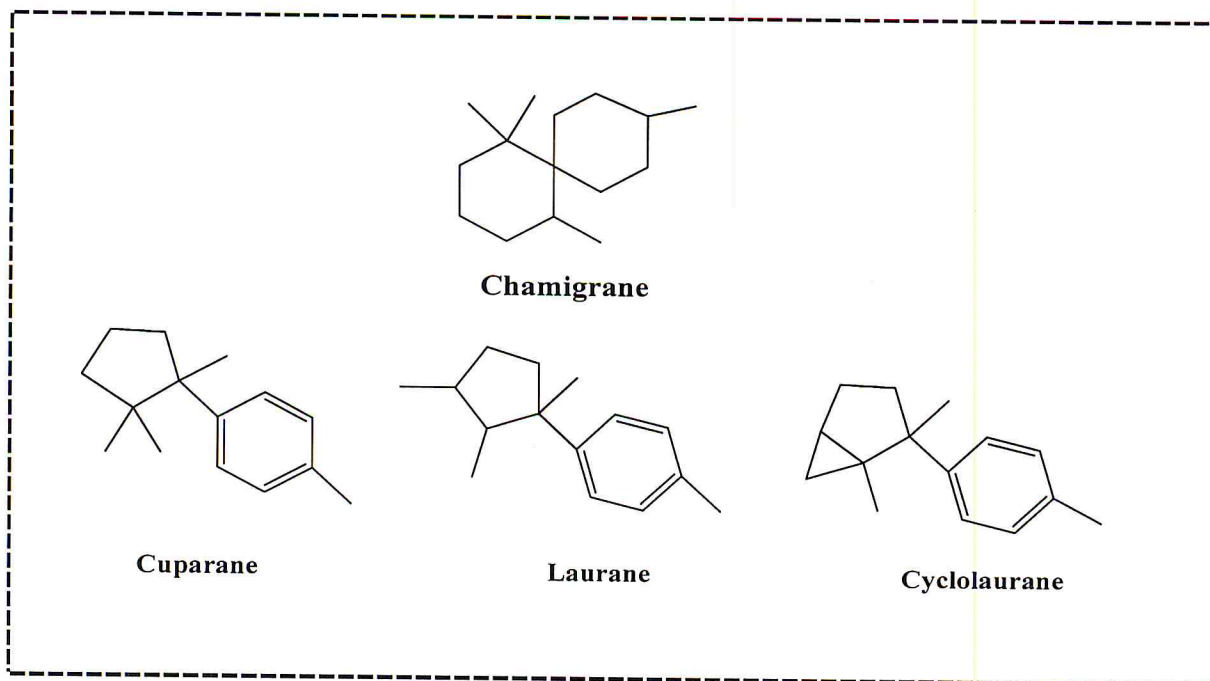


Planche 1 : Squelettes sesquiterpéniques fréquents dans le genre *Laurencia*

Le genre *Laurencia* renferme également d'autres classes de terpènes, il s'agit de diterpènes, triterpènes et d'acétogénines [16].

- **A. Exemples de structures apparentés au squelette Laurane**

Nous citons à titre d'illustration non exhaustive un exemple apparentés de squelette Laurane d'espèce du genre *Laurencia*.

Nous citons dans ce cadre les sesquiterpènes de type **Laurane** isolés de l'algue *Laurencia okumurai*, il s'agit de : 3a-hydroxyaplysin (**2**), et deux sesquiterpènes réarrangés, laurokamurenes (**3**) et B (**4**), conjointement avec trois composés connus, 3R-hydroxydebromoaplysin (**1**), debromoaplysin (**5**), et laurinterol (**6**). Leurs structures, y compris la stéréochimie relative, ont été déterminées sur la base de l'interprétation détaillée des spectres RMN 2D et la comparaison avec des composés apparentés connus [18]. Les structures isolées sont représentés sur la planche 2.

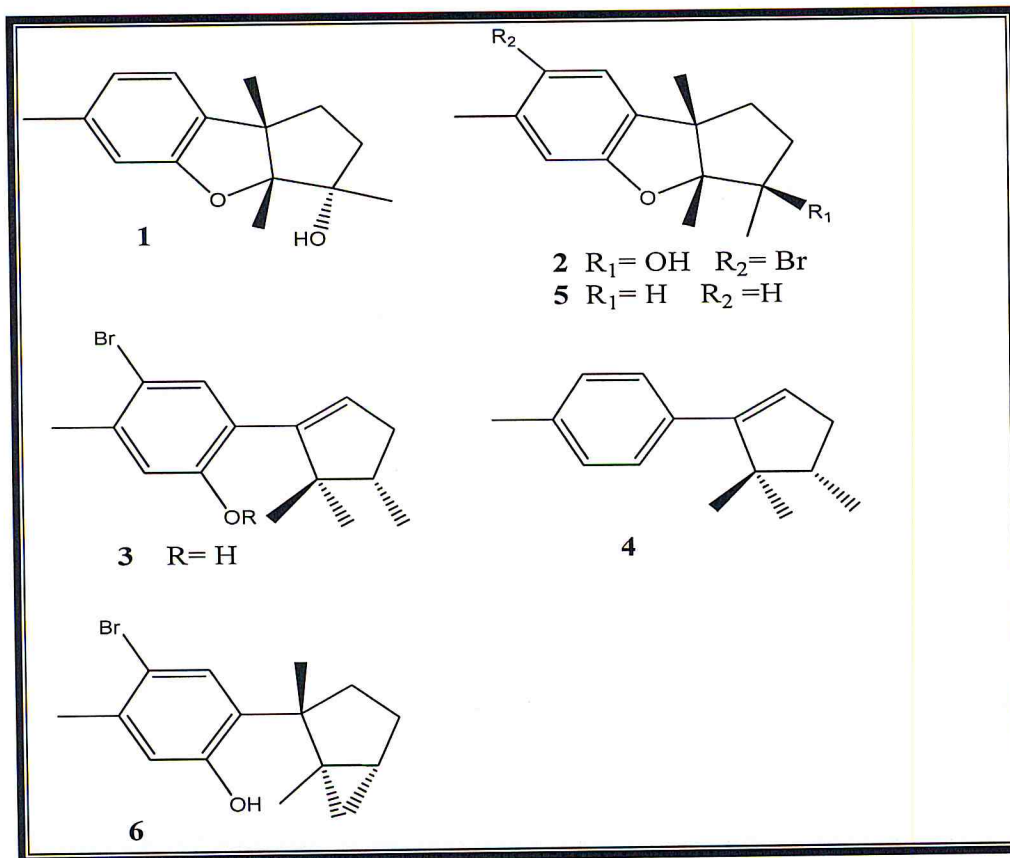


Planche 2 : Exemples de sesquiterpènes de type Laurane isolés de *Laurencia okumurai*

• **B. Autres sesquiterpènes isolés du genre *Laurencia***

Nous présentons d'autres exemples de sesquiterpènes isolés de l'algue rouge *Laurencia luzonensis*, il s'agit du : palisol (1), palisadin B (2), palisadin A (3), paciforgiol (4), et alypsistatin (5), ainsi que cinq autres bromosésquiterpènes, à savoir, l'isopalisol (6), le luzonensol (7), l'acétate de luzonensol (8), le luzonensin (9), et le (3Z, 6E) -1 bromo-2-hydroxy-3,7,11-triméthyl dodéca-3,6,10-triène (10). En outre, un bromoditerpène de structure particulière a été isolé, le 3-bromobarekoxide (11), possédant un cycle à sept chaînons condensé trans-décàline [19]. Ces structures sont représentées sur la planche 3.

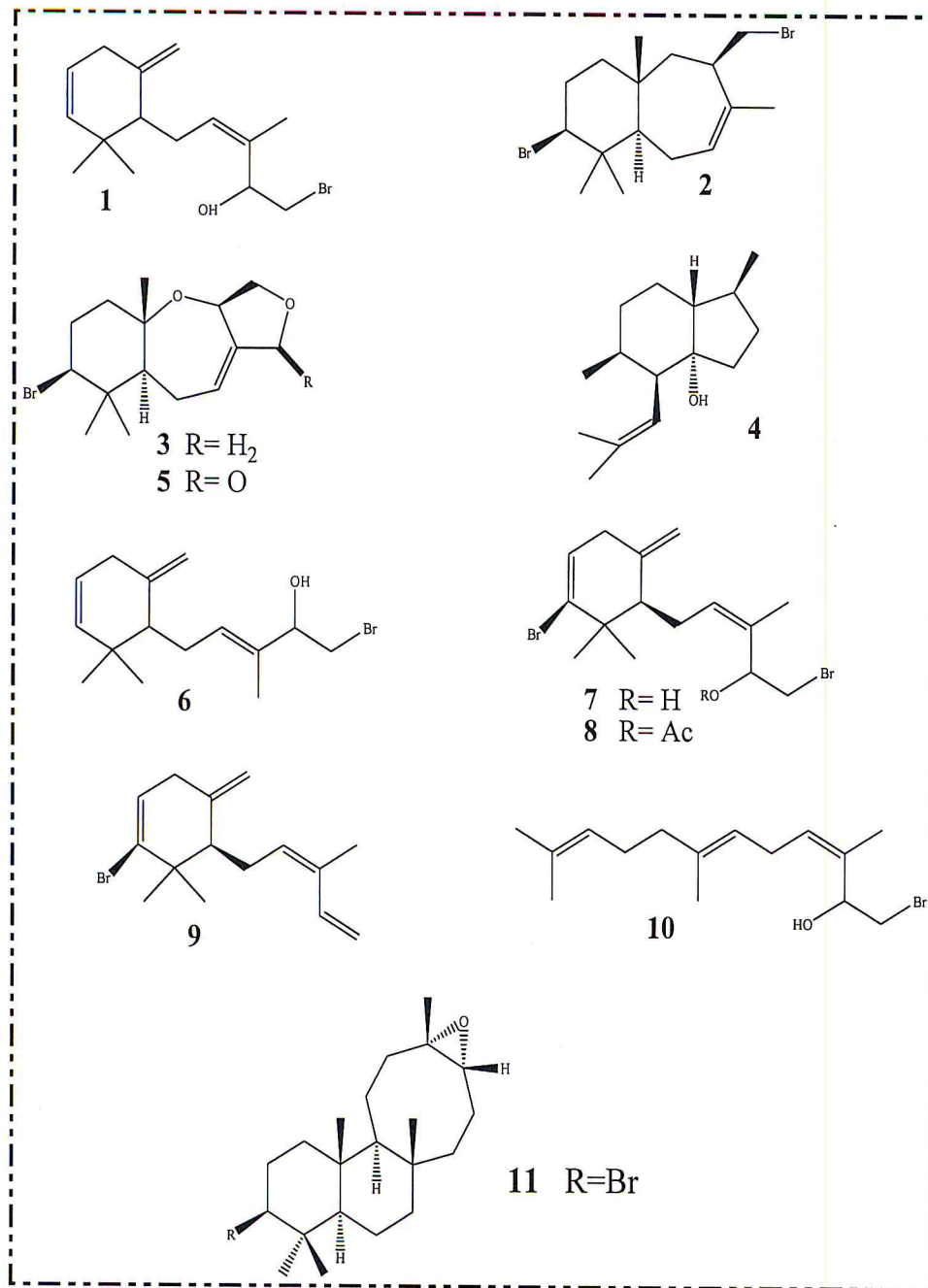


Planche 3 : Exemples de sesquiterpènes isolés à partir de *Laurencia luzonensis*

• **C. Exemple de diterpènes, triterpènes et C15-acétogénine isolés du genre *Laurencia***

Nous présentons des exemples de diterpènes et triterpènes isolés de l'algue rouge *Laurencia saitoi*, il s'agit de sept diterpènes parguerane : 15-bromo-2,7,19-triacetoxyparguer-9 (11)-en-16-ol (**1**), 15-bromo-2,7,16,19-tetraacetoxyparguer-9 (11)-ène (**2**), 15-bromo-2,19-diacetoxyparguer-9 (11)-én-7, 16 - diol (**3**), 15-bromo-2-,16,19 triacetoxyparguer-9 (11)-én-7-ol (**4**), 15-bromo-2,16-diacetoxyparguer-9 (11)-én-7-ol (**5**), 15-bromoparguer-9 (11)-en-16-ol (**6**), 15-bromoparguer-7-én-16-ol (**7**), et deux triterpènes polyéther: thyrseferol (**8**) et thyrseferyl 23-acétate (**9**), et un C15-acétogénine : neolaurallene (**10**). Leurs structures ont été établies par analyse RMN spectroscopique détaillée et la comparaison avec les données de la littérature [20]. Les structures isolées sont représentés sur la planche 4.

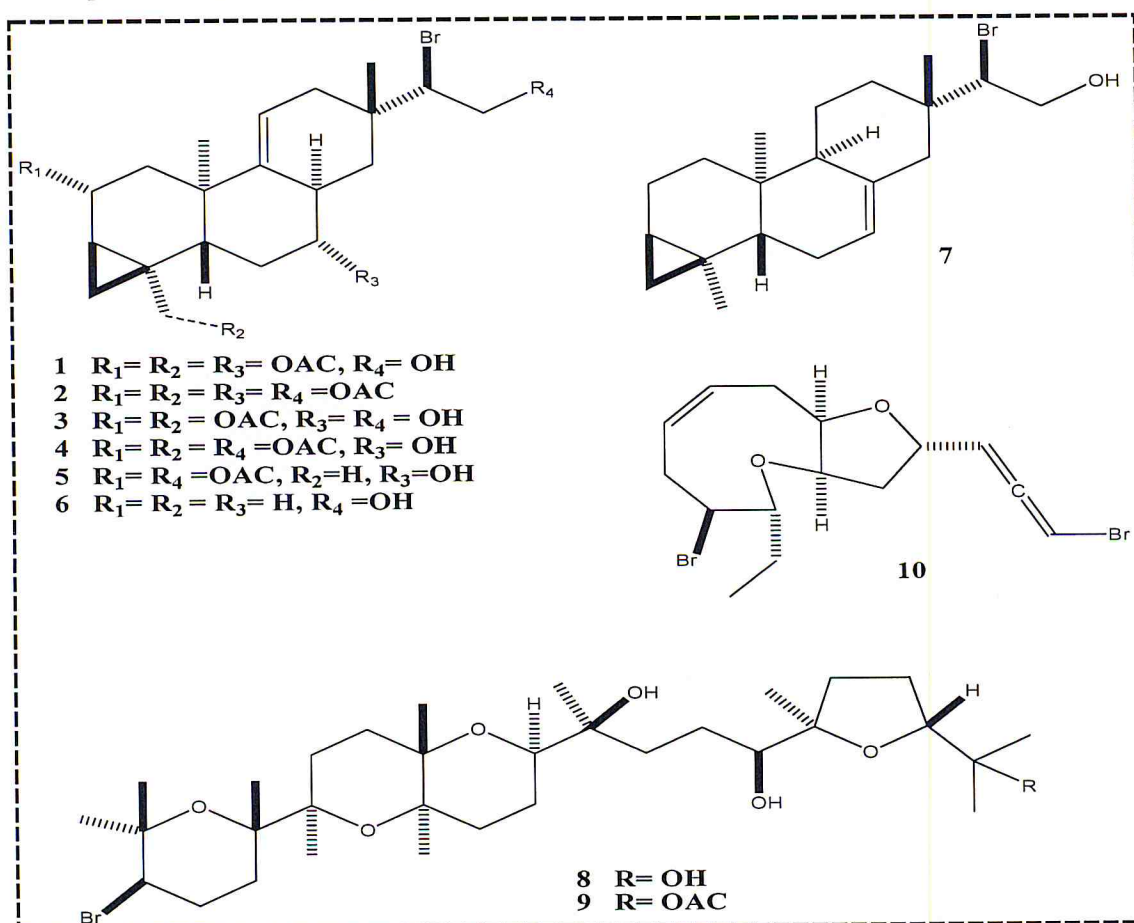


Planche 4 : Structures des composés isolés à partir de l'algue rouge *Laurencia saitoi*

I.2.3 Etude chimique du genre *Ulva*

Près de 400 molécules ont été isolées d'algues vertes parmi lesquelles 21% environ sont azotées. Cependant, ceci n'est probablement pas représentatif de l'ensemble des *Chlorophyceae* car la plupart des travaux chimiques sur ces algues ne concernent que deux ordres : les Ulvales (*Enteromorpha*, *Ulva*) et surtout les Bryopsidales [4].

Sur la base de notre recherche bibliographique nous avons constaté que l'essentiel des métabolites secondaires des algues vertes est constitué de **terpènes** et de **dérivés aromatiques**, souvent associés aux premiers dans des **mérotérpènes**. Cette catégorie de métabolites secondaires représente près de 50% des résultats publiés. Les **dérivés halogénés** sont peu fréquents, moins de 10% des structures, et il s'agit quasi exclusivement de **dérivés bromés**. Parmi les **dérivés soufrés**, il a été isolé quelques **alcools triterpéniques** apparentés au cycloatrénol et dont certains sont sulfatés [4]. Les polysaccharides des algues vertes ont fait également l'objet de beaucoup de travaux et ayant permis l'identification des hydrates de carbones appartenant à cette classe d'algues.

I.2.3.1 Terpènes isolés d'espèces du genre *Ulva*

Nous présentons dans cette partie des exemples de terpénoïdes isolés des espèces du genre *Ulva*. Nous avons noté deux dérivés de squelette guaine qui sont : guai-2-en-10 α -ol (**1**) et guai-2-en-10 α -méthanol (**2**). Ils ont été purifiés par chromatographie en tant que constituants majeurs de la fraction soluble d'*Ulva fasciata*. L'acétylation de produit (**2**) est un guai-2-en-10 α -méthyl méthanoate (**3**) avec un groupe acétyle en position C₁₁ [21]. Les composés terpéniques cités sont regroupés sur la planche 5.

I.3 Activités biologiques des trois espèces étudiées

I.3.1 Activités des extraits et produits isolés des espèces du genre *Gigartina*

I.3.1.1 Activité antivirale et virucide

Les polysaccharides sulfatés sont les responsables de ces deux activités, l'activité antivirale et l'activité virucide contre le virus herpès simplex de type 1 et 2 (HSV-1, HSV-2). Malgré les difficultés inhérentes à l'utilisation thérapeutique des polysaccharides sulfatés qui se rapportent à leurs propriétés pharmacologiques in vivo [24], on trouve de nombreux rapports de l'activité antivirale de ces polysaccharides d'algues dans des modèles animaux. Par exemple, un commercial lambda-carraghénane préparé à partir de deux espèces de *Gigartina*, *Gigartina aciculaire* et *Gigartina pistillata*, s'est avéré efficace dans la protection des souris contre une infection intra-vaginale par le HSV-2 [25]. Dans une étude similaire, le lambda-carraghénane (1T1) de *Gigartina skottsbergii* fourni une protection contre le HSV-2 lorsqu'il est administré avant l'infection et son activité était supérieure à un μ/η -carraghénane suggérant que l'activité virucide de la lambda-carraghénanes peuvent jouer un rôle important [26]. De même, l'administration intra péritonéale de μ/η -carraghénane de *Gigartina skottsbergii* semble protéger les souris contre les infections HSV-1 lorsqu'il est administré immédiatement après l'infection au VHS [27].

I.3.1.2 Activité anti herpétique et anticoagulante

Une activité anti herpétique et anti coagulante a été constatée chez les carraghénanes sulfatés extraits à partir d'algue rouge *Gigartina skottsbergii* [28].

I.3.2 Activités des extraits et produits isolés des espèces du genre *Laurencia*

I.3.2.1 Activité antiasthmatique

L'activité antiasthmatique a été constatée sur les extraits polyphenoliques de l'algue rouge *Laurencia undulata* [29].

I.3.2.2 Activité antibactérienne

L'activité anti-bactérienne des C₁₅ acétogénines isolés à partir de *Laurencia glandulifera* [30], a été effectuée sur un ensemble multi-résistant aux médicaments et résistantes à la méthicilline, des souches de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC 25923) et des souches résistantes à la tétracycline (XU212) qui possède la protéine tétracycline TetK efflux [31,32].

Et ils ont constaté aussi une activité antibactérienne de certains dérivés sesquiterpènes halogénés isolés à partir de l'algue rouge Malaisienne *Laurencia spp* [33].

I.3.3 Activités des extraits et produits isolés des espèces du genre *Ulva*

I.3.3.1 Activité antibactérienne et antifongique

Une étude a été faite sur un extrait d'algue verte *Ulva fasciata* récoltée de l'océan sud-ouest de la péninsule indienne a montré une très bonne activité antibactérienne, cette dernière est due à la présence des labdanes diterpénoides présent au sein de l'espèce [34]. Il a été également constaté une activité antifongique [35,36]. Cette algue présente aussi une **activité hémolytique** importante [36].

I.3.3.2. Activité anti-péroxydative et activité anti-hyperlipidémique

Ces deux activités ont été constatées chez les polysaccharides de l'algue verte *Ulva lactuca* sur la D-galactosamine hépatite induite chez le rat [37].

Partie expérimentale
Chapitre II
Etude chimique et analyse

Introduction

La partie expérimentale est consacrée à l'étude de la composition chimique et de l'activité biologique de l'huile essentielle de *Gigartina pistillata*(GP) ainsi qu'à l'évaluation de l'activité biologique des extraits lipidiques des trois espèces d'algues : *Gigartina pistillata*(GP), *Laurencia pinnatifida*(LP) et *Ulva lactuca*(UL).

L'étude expérimentale comporte trois chapitres :

1. Extraction de l'huile essentielle de *Gigartina pistillata*, et la préparation des trois extraits lipidiques de *Gigartina pistillata*, *Laurencia pinnatifida* et *Ulva lactuca*.
2. Etude de la composition chimique de l'huile essentielle de *Gigartina pistillata* par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
3. Etude de l'activité antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle(GP) et des trois extraits (GP, LP et UL).

L'extraction de l'huile essentielle et la préparation des extraits ont été réalisés au laboratoire du département de chimie de l'Université Saad Dahlab de Blida, l'analyse de l'huile essentielle par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a été effectuée au sein de laboratoire MAPIEM de l'Université du sud de Toulon Var. Les tests d'activité microbiologique ont été réalisés au sein de l'unité bactériologique du laboratoire centrale de l'Etablissement Public Hospitalier de BOUFARIK sur quelques germes pathogènes.

II.1 Matériel végétal

Nous avons sélectionné pour cette étude trois espèces d'algues, deux algues rouges : *Gigartina pistillata* et *Laurencia pinnatifida* et une algue verte : *Ulva lactuca*. Ces algues ont été identifiées par **Mme Seridi, Docteur au laboratoire de biologie marine à l'université USTHB (Beb Ezzouar, Alger)** et sont représentées par la figure 4.



A



B



C

Figure 4: Photos personnelles des trois espèces. A : *Gigartina pistillata*, B : *Laurencia pinnatifida*, C : *Ulva lactuca*.

II.2 Lieu de récolte

Les trois espèces d'algues ont été récoltées sur les côtes méditerranéennes algériennes, au niveau de la wilaya de TIPAZA (figure 5).

L'espèce *Gigartina pistillata* a été récoltée en juin 2011 au niveau du lieu dit « les carroubiers » à l'ouest de Tipaza. L'espèce *Laurencia pinnatifida* a été récolté respectivement en avril 2012 à El Beldj et en mai 2012 à la Corne d'Or, enfin *Ulva lactuca* a été récoltée en mai 2012 à l'est de la ville de Cherchell.



Figure 5 : Situation géographique de la région de récolte.

II.3 Traitement des algues

Les algues fraîchement récoltées, ont été soumises à un tri manuel afin d'éliminer les différents épiphytes (organismes capables de contaminer la nature chimique de l'huile essentielle et des extraits) qui consistent souvent en des algues ou d'autres organismes animal. Le séchage est effectué dans un endroit sec et aéré et à l'abri du soleil. A l'état sec, on conserve les algues dans des sacs propres.

II.4 Extraction et analyse de l'huile essentielle de *Gigartina pistillata*

II.4.1 Principe de l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau

La technique d'extraction de l'huile essentielle utilisée dans notre projet, repose sur le principe d'entraîner des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau. Cette technique est la plus fréquemment utilisée. La méthode est basée sur l'existence d'un hétéroazéotrope de température d'ébullition inférieure aux points d'ébullitions des deux composés, l'huile essentielle et l'eau, pris séparément. Ainsi, les composés volatils et l'eau distillent simultanément à une température inférieure à 100°C sous pression atmosphérique vont être entraîné par la vapeur d'eau sans subir d'altérations majeures [38].

II.4.2 Extraction de l'huile essentielle de *Gigartina pistillata*

L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par entraînement à la vapeur d'eau dans un montage à l'échelle laboratoire (Figure 6), comprenant un ballon remplis aux deux tiers d'eau et surmonté d'une ampoule à décanter contenant une

masse de 100g d'algue. L'eau est portée à ébullition, les vapeurs formées traversent la plante et font éclater les cellules, les poches et les poils sécréteurs entraînant avec elles l'huile essentielle. Le mélange vapeur eau-huile essentielle est condensé au niveau du réfrigérant placé en aval de l'ampoule à décanter. Le mélange immiscible eau-huile est récupéré dans un bécher, il est soumis par la suite à un traitement par extraction liq-liq pour récupérer l'huile essentielle. La durée de l'entraînement à la vapeur est de 3H.



Figure 6 : Dispositif expérimental d'entraînement à la vapeur d'eau de l'HE.

II.4.2.1 Traitement et récupération de l'huile essentielle par extraction liquide-liquide

L'hydrolat (eau et huile essentielle) recueilli de l'entraînement à la vapeur d'eau est traité par l'éther diéthylique en utilisant une ampoule à décanter. On observe que le mélange se sépare en deux phases distinctes : une phase organique contenant l'huile essentielle solubilisée dans l'éther diéthylique et une phase aqueuse qui est formée d'eau et de quelques traces d'huile essentielle soluble dans l'eau, cette

dernière subit à nouveau une extraction avec l'éther diéthylique afin d'épuiser au maximum l'huile essentielle. L'extraction liquide-liquide (Figure 7) est réalisée deux fois pour épuiser complètement notre hydrolat. Les phases organiques obtenues sont regroupées en une seule phase et filtrée sur le sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) utilisé alors comme desséchant. Enfin, on procède à l'évaporation du solvant en utilisant l'évaporateur rotatif. L'huile essentielle ainsi obtenue est mise dans un flacon propre hermétiquement fermé et conservé au frais, le flacon doit être pesé avant d'introduire l'huile essentielle afin de calculer le rendement en huile essentielle.

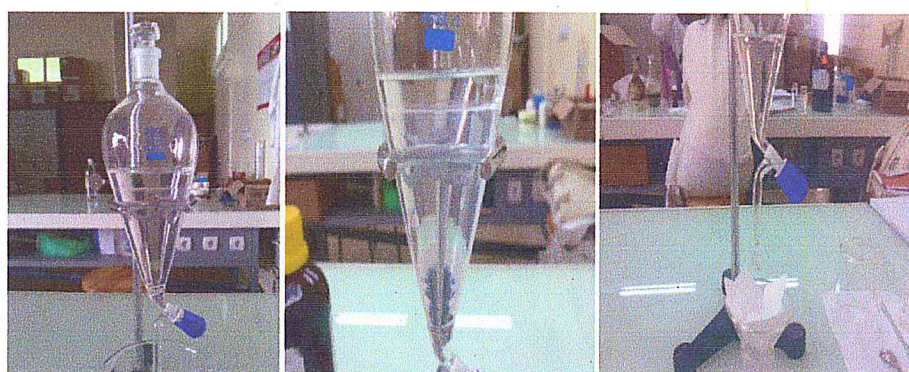


Figure 7 : Extraction liquide-liquide de l'HE de la phase aqueuse.



Figure 8 : Flacons d'huile essentielle de *Gigartina pistillata*.

II.5 Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est estimé comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle extraite et la masse de la matière végétale utilisée. Il est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = (m_{HE} / m_{MV}) \times 100$$

Considérons :

- m_{HE} : La masse de l'huile essentielle en gramme.
- m_{MV} : la masse de la matière végétale sèche en gramme.
- $R(\%)$: Le rendement en huile essentielle en pourcentage.

II.6 Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de l'algue rouge *Gigartina pistillata* par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

L'analyse qualitative de la composition chimique de l'huile essentielle extraite par entraînement à la vapeur a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse « CG-SM » (Figure 9). L'identification des différents composés est effectuée en se basant sur les banques de données spectrales wiley7n.l et nbs75k.l. (Comprenant, respectivement, des spectres de masse de 250000 et 75000 molécules), avec un taux de similitude supérieure ou égal à 90%.

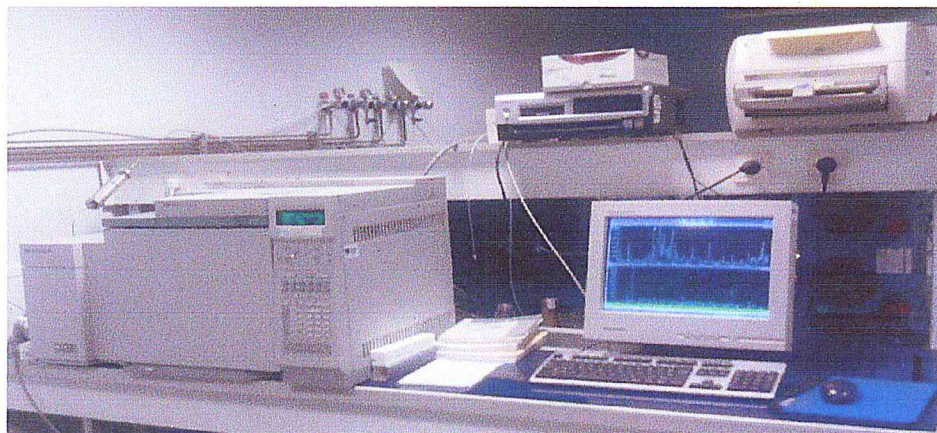


Figure 9: Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse.

II.6.1 Conditions opératoires

L'analyse est effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse HEWLETT-PACKARD-HP-6890 couplé à un spectromètre de masse HP 5972, dans les conditions suivantes :

- ✓ Une colonne capillaire de type VF-1ms (eq. DB-1 et/ou HP1) (polydiméthylesiloxane 100%), de longueur 30m, d'un diamètre interne de 0.25 mm et une épaisseur du film de 0.25 µm.
- ✓ Un gaz vecteur (hélium) d'un débit de 0.3 ml/mn.
- ✓ Un potentiel d'ionisation du spectromètre de masse égale a 70 eV.
- ✓ La programmation du four est : 80°C (5') - 3°/mn - 280°C (10').
- ✓ Injection d'une quantité de 2 µl en mode Split : 1/90.
- ✓ Les échantillons de l'huile essentielle sont dilués dans l'acétate d'éthyle à 1%.

II.7 Préparation des extraits des trois algues

II.7.1 Procédé utilisé

- a. Pour préparer nos extraits on a utilisé le procédé de la **macération**, qui consiste à laisser séjourner ou macérer la plante dans un solvant organique à froid pendant quelques jours pour extraire le maximum de principes actifs ou nutritifs de cette plante. Cette technique met en jeu un solvant organique qui est dans notre cas le **méthanol** et le **dichlorométhane** (à une proportion de 50/50) et la plante qui est l'algue.
- b. Après l'étape de macération on récupère notre solution par filtration avec un Büchner et un papier filtre, on obtient la plante qu'on a macéré et un filtrat qui est le **miscella** (solvant+extrait) contenant les composants de la plante dissout dans le solvant organique.
- c. On fait le traitement du miscella avec l'éther diéthylique sous forme d'extraction liquide-liquide. C'est la même extraction qu'on a fait précédemment avec l'huile essentielle, mais dans ce cas là le produit obtenu est **un extrait** (figure 10).

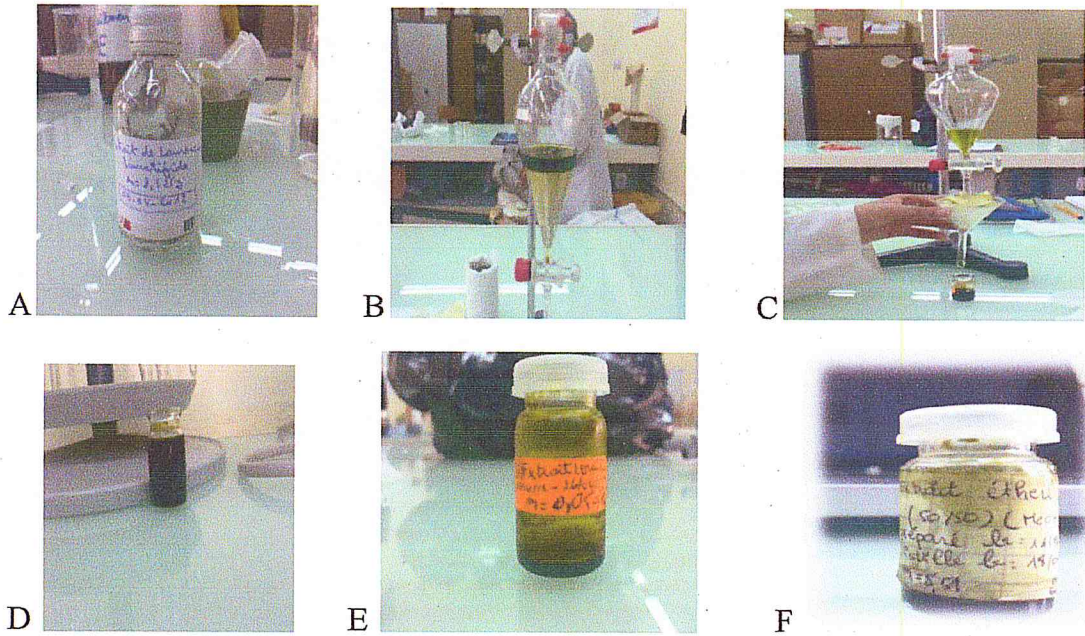


Figure 10 : Exemple de préparation d'extrait de l'espèce *Laurencia pinnatifida*. A : flacon de macération. B : Extraction liquide-liquide. C : Filtration et séchage de la phase organique. D : Extrait étheré à distiller. E : Extrait brut de *Laurencia Pinnatifida*. F : Extrait de l'espèce *Gigartina pistillata*.

II.8 RESULTATS ET DISCUSSION

II.8.1 Propriétés caractéristique et rendement de l'huile essentielle de *Gigartina pistillata* et des trois extraits préparés

Les propriétés organoleptiques constituent généralement une partie d'études visant à analyser les facteurs qui affectent la qualité de l'huile essentielle et des autres extraits. Notre analyse a été faite en observant et en inhalant directement l'huile essentielle et les extraits. Dans cette étude, 3 critères ont été considéré pour évaluer la qualité organoleptique :

- ✓ L'aspect.
- ✓ La couleur.
- ✓ L'odeur.

Les propriétés organoleptiques de l'huile essentielle et des trois extraits ainsi que leurs rendements d'extraction sont regroupés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Caractères organoleptiques et rendement de l'huile essentielle et des trois extraits

Caractères organoleptiques et rendement				
	Aspect	Couleur	Odeur	Rendement (%)
Huile essentielle de <i>Gigartina pistillata</i>	Liquide visqueux	Jaune claire	Forte odeur caractéristique	0,0163
Extrait de <i>Gigartina pistillata</i>	Liquide visqueux	Vert foncé	Forte odeur caractéristique	0,380
Extrait de <i>Laurencia pinnatifida</i>	Liquide visqueux	Vert foncé	Forte odeur caractéristique	0,710
Extrait d'<i>Ulva lactuca</i>	Liquide visqueux	Vert foncé	Odeur caractéristique	10,760

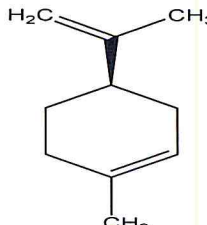
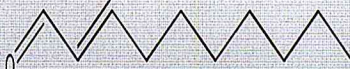
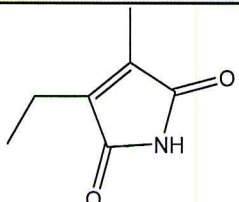
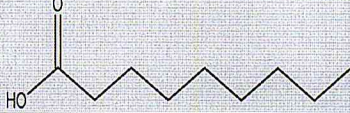
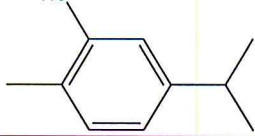

L'examen du tableau 5 montre que le rendement en huile essentielle de *Gigartina pistillata* est trop faible (0,0163%) en comparaison aux plantes terrestres où les rendements en huiles essentielles se situent au voisinage de 1% [39]. Nous obtenons un rendement trop faible en huile essentielle de *Gigartina pistillata*. Les valeurs de rendements obtenus se rapprochent de ceux reportés par Katayama (1962) [40] sur la distillation à la vapeur de différentes algues brunes comme : *Laminaria* (0,051%), *Hizikia* (0,053 %), *Undaria* (0,054 %), *Sargassum* (0,062 %).

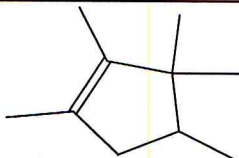
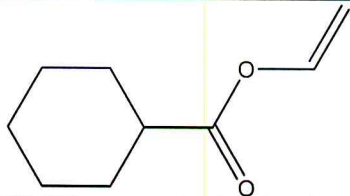
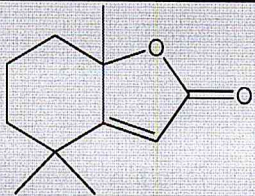



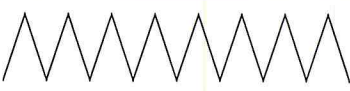
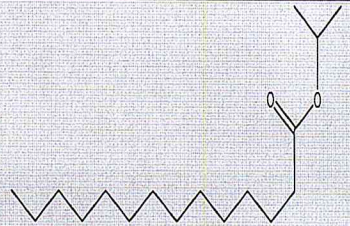
Concernant les extraits lipidiques, des rendements obtenus sont plus élevés que ceux de l'HE. Le rendement obtenu par *Ulva lactuca* (10,76%) est trop élevé en comparaison aux rendements d'extraits d'algues et de plantes terrestres [39].

II.8.2 Identification de la composition de l'huile essentielle de l'algue rouge *Gigartina pistillata* par CG/SM

L'analyse par CG/SM dans les conditions citées auparavant a permis l'identification des composés regroupés dans le tableau 6. Les profils chromatographiques sont présentés sur les figures 11 et 12.

Tableau 6 : Produits identifiés dans l'huile essentielle de l'algue rouge *Gigartina pistillata* par CG/SM.

Ordre d'élu-tion	Temps de rétention (minutes)	Composés	Formule chimique	Structures	Air du pic (%)
1	5,146	NI ₁	/	/	2,657
2	6,896	L-Limonène	C ₁₀ H ₁₆		21,850
3	11,158	(E)-2-decenal	C ₁₀ H ₁₈ O		2,056
4	13,875	Ethylmethylmal-imide	C ₇ H ₉ NO ₂		4,007
5	16,526	Acide nonanoïque	C ₉ H ₁₈ O ₂		3,311
6	17,443	Carvacrol	C ₁₀ H ₁₄ O		7,180
7	18,103	5-pentyl-2(5H)-furanone	C ₁₀ H ₁₈ O		4,165

8	24,668	1,2,3,3,4-Pentamethylcyclopentene	C ₁₀ H ₁₈		2,049
9	24,803	NI ₂	/	/	0,759
10	25,552	Vinyl cyclohexanecarboxylate	C ₉ H ₁₄ O ₂		13,841
11	25,653	2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-	C ₁₁ H ₁₆ O ₂		7,107
12	25,753	9-Octadecene, (E)-	C ₁₈ H ₃₆		4,209
13	25,910	NI ₃	/	/	4,347
14	26,156	Eicosane	C ₂₀ H ₄₂		2,045
15	27,677	NI ₄	/	/	6,868
16	29,948	NI ₅	/	/	1,406
17	33,448	Octadecanal	C ₁₈ H ₃₆ O		2,291
18	33,549	Heptadecane	C ₁₇ H ₃₆		4,183
19	37,419	Myristate d'isopropyl	C ₁₇ H ₃₄ O ₂		1,694
20	38,862	NI ₆	/	/	3,964

NI : Produits non identifiés.

Les données de spectre de masse des produits inconnus sont présentés sous forme de **m/z (abondance en %)** pour les principaux fragments.

NI₁ : 44(100), 41(17,58), 55(13,27), 57(55,53), 60(13,71)

NI₂ : 44(100), 40(55,04), 55(14,60), 177(27,58)

NI₃ : 44(100), 40(49,50), 55(86,23), 124(65,48), 137(48,16), 180(03,73)

NI₄ : 127(100), 41(10,25), 44(29,92), 55(14,69), 99(14,30)

NI₅ : 44(100), 41(22,92), 55(16,28), 57(28,91), 71(30,63)

NI₆ : 44(100), 55(23,06), 91(22,70), 105(13,98), 219(17,80)

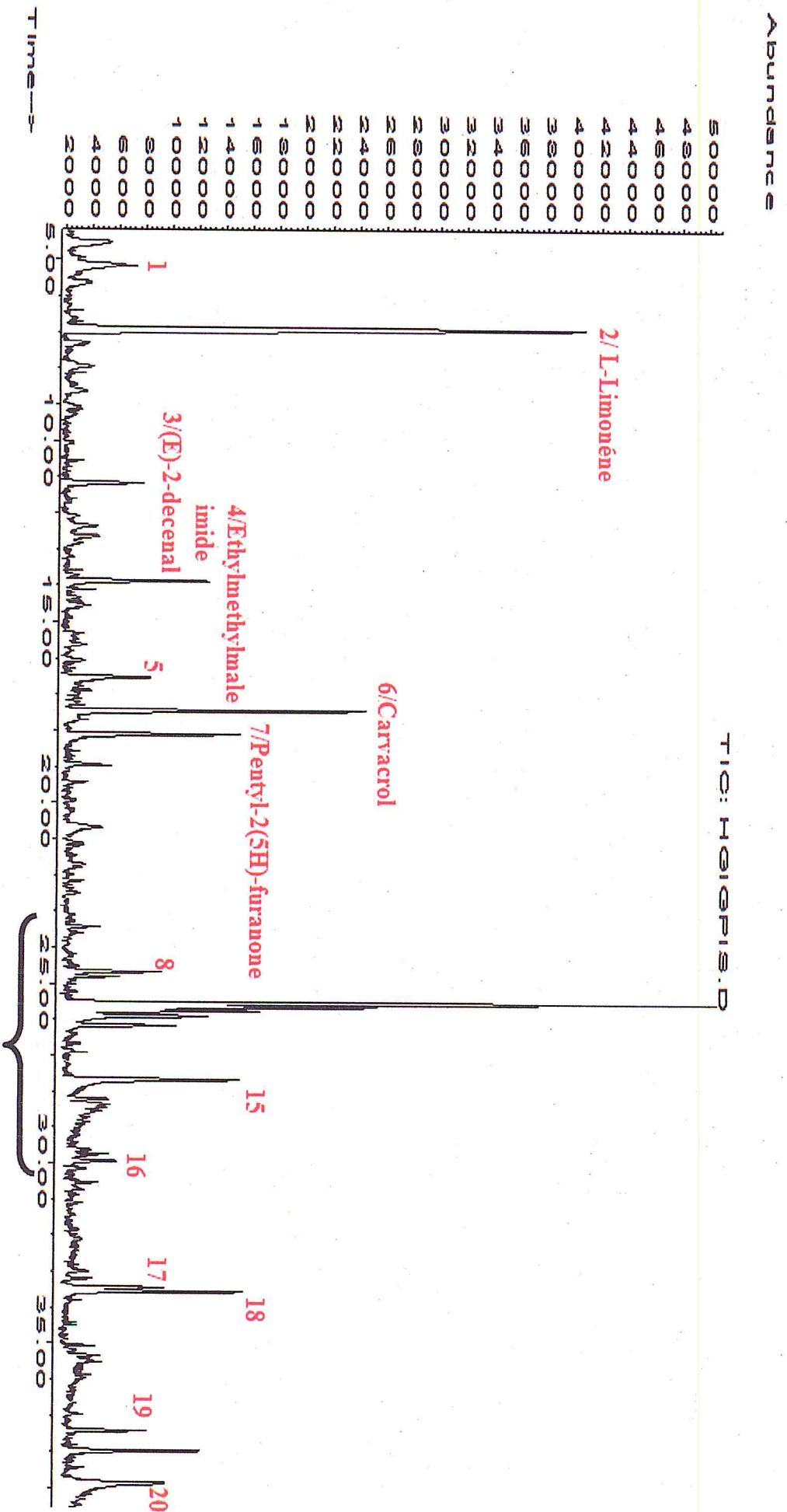


Figure 11 : Chromatogramme de l'huile essentielle de l'algue rouge *Gigartina pistillata*.

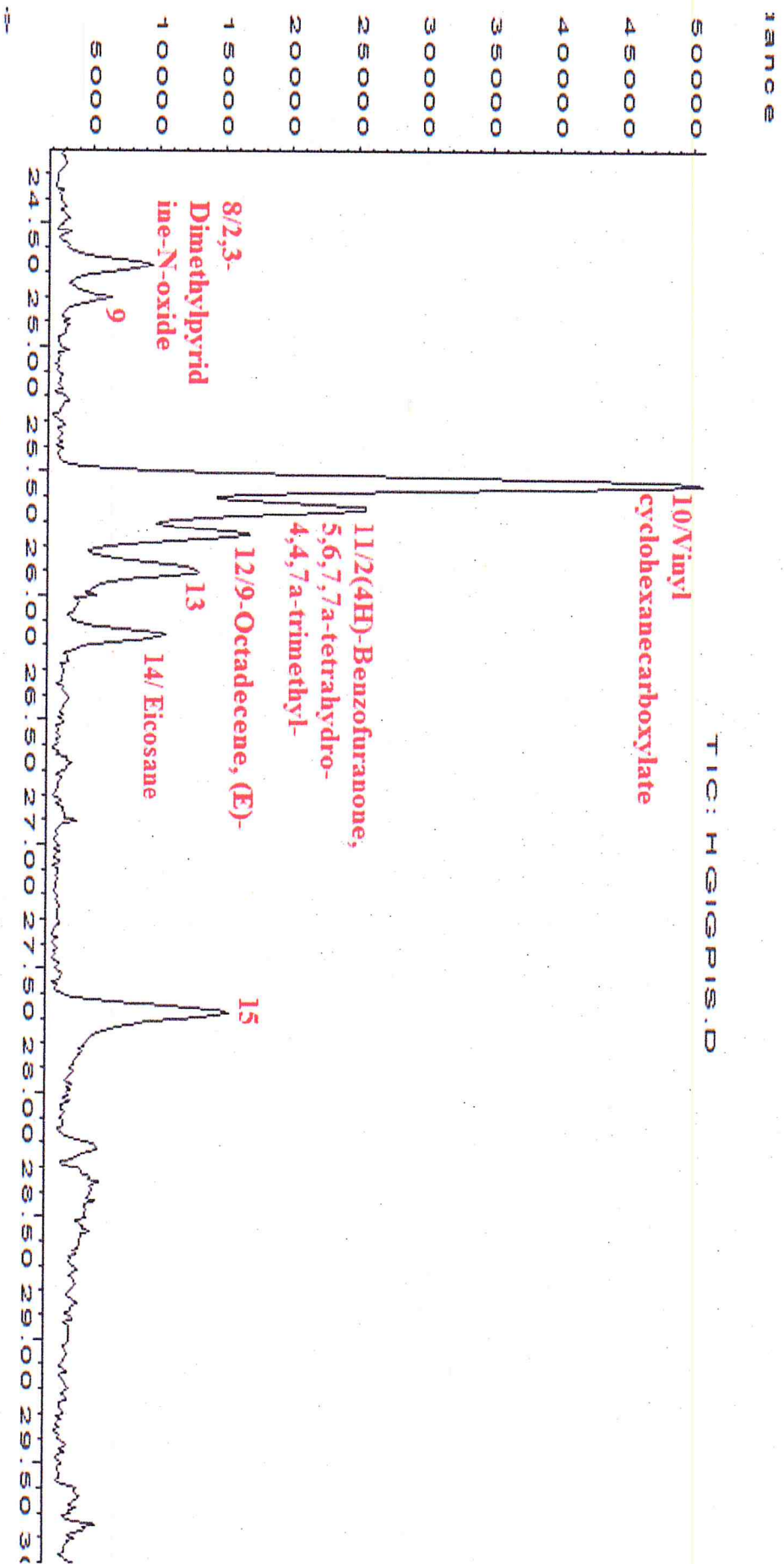


Figure 12 : Agrandissement de la zone du chromatogramme (24-30mn) de l'huile essentielle de *Gigartina pistillata*.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse de l'huile essentielle de *Gigartina pistillata* a permis de relever 20 constituants ayant une teneur supérieur à 0,5 %, d'autres constituants mineurs n'ont pas été pris en considération. En se basant sur la banque de données spectrales Wiley 7n et NBS 75k mais aussi sur les données de la littérature concernant les spectres de masse de produits purs. En se basant sur les deux banques de données, nous avons pu identifier avec exactitude 14 produits, ce qui représente 80% de la composition globale (figure 13). L'examen du tableau 6 montre que la composition chimique de l'huile essentielle de G.P. est dominée par la présence de monoterpènes : le L-Limonène (21,85 %) et le carvacrol (7,18 %).

Nous avons noté la présence de dérivés de produits oxygénés représentant une teneur de 38,472%. Il s'agit notamment du : (E)-2-decenal, Ethylmethylmaleimide, Acide nonanoïque, 5-pentyl-2(5H)-furanone, Vinyl cyclohexanecarboxylate, 2(4H)-Benzofuranone,5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl, Octadecanal et Myristate d'isopropyl. Nous avons constaté également la présence des hydrocarbures saturés (6,228%) et insaturés (6,632%) tels que : le 1,2,3,3,4-Pentamethyl-cyclopentene (2,049%), le 9-Octadecene,(E) (4,209%), le Eicosane (2,045%) et le Heptadecane (4,183%).

Il faut noter également que six produits n'ont pu être identifiés représentant 20% de la composition globale. Des analyses complémentaires doivent être effectuées sur l'huile essentielle. Nous avons présenté les principaux fragments avec l'abondance relative des différents produits inconnus.

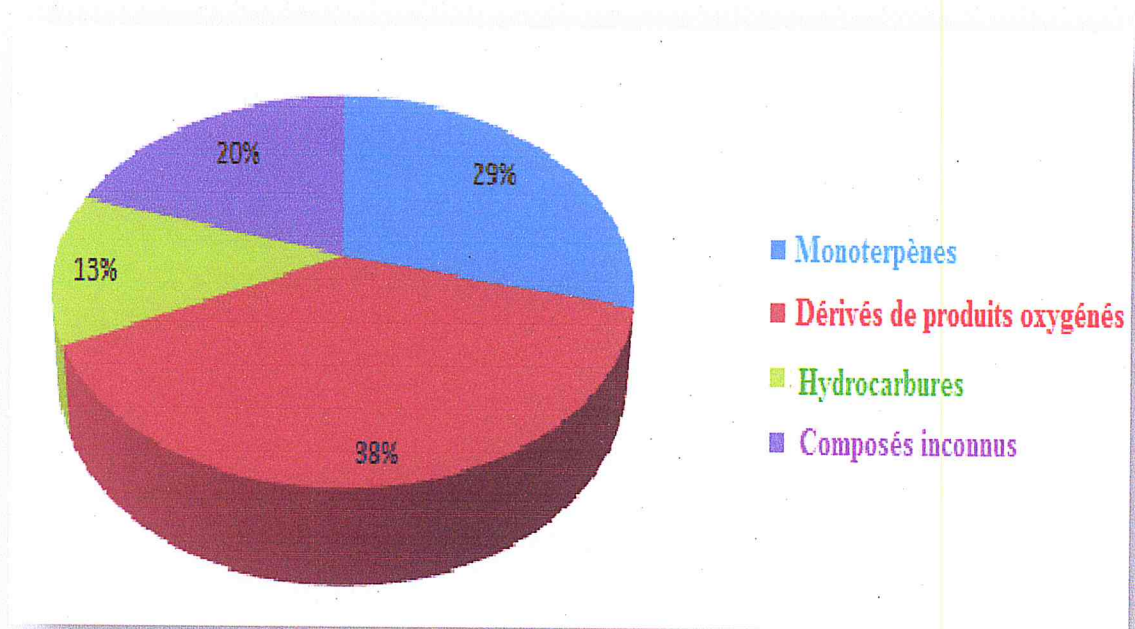


Figure 13 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Gigartina pistillata*.

Chapitre III
Activités biologiques

III.1 Tests d'activités biologiques

III.1.1 Lieu de travail

Le travail a été réalisé au sein de l'unité de bactériologie clinique de laboratoire centrale de l'Etablissement Public Hospitalier de BOUFARIK.

III.1.2 Souches utilisées

Des souches bactériennes de références (ATCC) et pathogènes ainsi que les levures ont fait l'objet de notre étude.

Nous avons utilisés des souches de références ATCC fournies par le laboratoire d'antibiothérapie et d'hygiène de l'institut Pasteur d'Alger agréé par l'OMS (Tableau 7).

Nous avons compléter nos analyses en utilisant des souches et une levure isolées à partir de produits pathogéniques au sein de l'unité de bactériologie clinique de laboratoire centrale de l'Etablissement Publique Hospitalier de BOUFARIK (Tableau 8).

Tableau 7 : les souches de références utilisées dans notre travail.

Souches	Gram	ATCC
<i>Escherichia coli</i>	-	ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	ATCC 25853
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	ATCC 25923

Tableau 8 : les différents micro-organismes pathogènes utilisés dans notre étude.

	Souches
Les Bactéries Gram -	<i>Proteus mirabilis</i>
	<i>Salmonella typhi</i>
	<i>Anterobacter ssp</i>
La Levure	<i>Candida albicans</i>

III.1.2.1 Milieux de cultures

Nous avons utilisé dans notre étude trois milieux de cultures différents :

- ◆ Gélose nutritive comme milieu de culture pour les bactéries.
- ◆ Milieu Sabouraud-choramphénicol comme milieu de culture pour les levures.
- ◆ Milieu de Muller Hinton, est le milieu utilisé pour les tests anti-bactériens et anti-fongiques.

III.2 Etude qualitative de l'effet antibactérien et antifongique par la méthode de diffusion sur milieu solide (l'aromatogramme)

III.2.1 Principe

L'aromatogramme est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles chémotypées. Différents types d'aromatogrammes, en milieu solide, liquide, sont exploitables. Cependant, en pratique quotidienne, c'est le milieu solide qui est le plus simple et le plus facilement reproductible [41]. L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée « antibiogramme » ou « méthode par diffusion en milieu gélosé » ou encore « méthode des disques ».

Cette méthode (Aromatogramme [42]) consiste à mettre en évidence une éventuelle activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Gigartina pistillata*, en la mettant en présence des germes testés. Placés dans une étuve à 37°C, dans des conditions optimales de culture, les germes pathogènes se développent rapidement sur le milieu nutritif. Sur ces colonies microbiennes, plusieurs séries de petits disques de papier buvard imprégné de différentes huiles essentielles à tester sont ensuite disposées. Après un temps de latence à 37,5 °C, le diamètre du halo d'inhibition (zone d'inhibition) entourant les disques est alors mesuré. Chaque halo, une zone claire, montre la destruction des germes pathogènes et donne une indication précise de l'activité antibactérienne des huiles utilisées. L'aromatogramme représente cependant un point de repère essentiel puisque sa technique est identique à celle utilisée pour mesurer l'activité bactéricide des antibiotiques (Figure 14) [42].

La méthode est validée par le fascicule de Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS fourni par NCCLS (National Comitee for Clinical Laboratory Standars). Son principe est tiré du titrage des antibiotiques (test d'antibiogramme).

III.2.2 Technique de l'antibiogramme

La méthode que nous avons utilisée est l'ensemencement par écouvillonnage préconisé [43] par NCCLS (National Comitee for Clinical Laboratory Standars) et recommandé par l'OMS.

Milieu

- Gélose Muller-Hinton (MH) (bactéries non exigeantes) ; coulée en boite de pétri sur une épaisseur de 4 mm.
- Les géloses sont séchées avant l'emploi.

Inoculum

- A partir d'une culture pure de 18h sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Bien décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être à 0,5 Mc Farland.
- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique s'il est trop fort.
- L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum.

Ensemencement

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries séries.

- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Dans le cas on l'on ensemence plusieurs boîtes de pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

Dépôts des disques

- A l'aide d'une pince stérile, prélever à chaque fois un disque stérile de 09 mm de diamètre. Ce dernier est imbibé avec l'huile essentielle de *Gigartina pistillata* ou bien avec les extraits qu'on veut tester, en mettant seulement en contact le bout du disque, celle-ci va être absorbée progressivement jusqu'à imprégnation totale du disque.
- Déposer les disques sur la surface de la gélose.
- Laisser diffuser sur paillasse pendant 30 min.

Incubation

- 24 heures à 37°C pour les bactéries.
- 48 heures à 25°C pour les levures.

Lecture

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée.
- Comparer ces résultats aux valeurs critiques des ATCC.
- Classer la bactérie dans l'une des catégories : Sensibles, Intermédiaire ou Résistante.

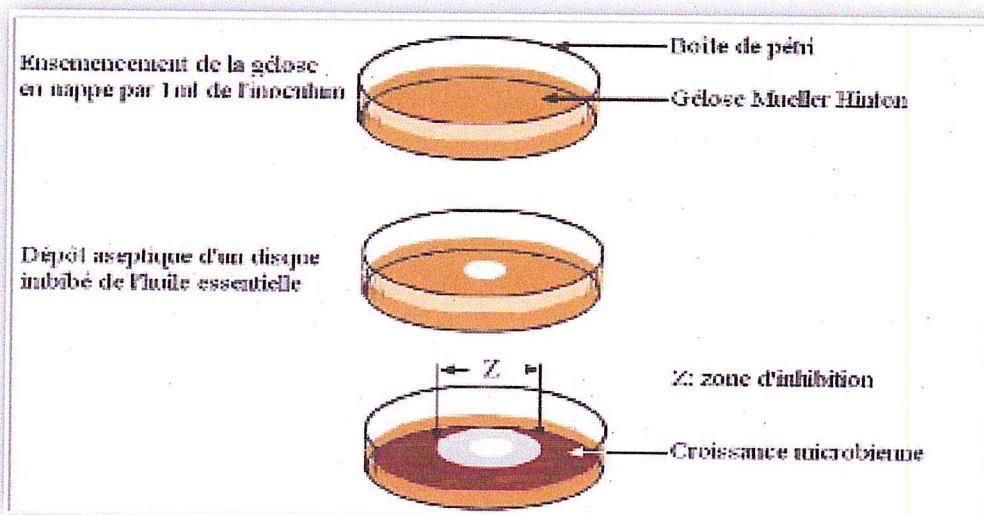


Figure 14 : Illustration de la méthode de l'antibiogramme.

Remarque : A cause de la petite quantité qu'on avait de l'huile essentielle de *Gigartina pistillata*, nous avons procédé à une dilution de notre huile essentielle dans le **myristate d'isopropyle** (une dilution de 2%). Le myristate d'isopropyle est un bon solvant pour les huiles essentielles et les extraits lipidiques, c'est un liquide huileux incolore, d'odeur neutre composé d'ester d'acide gras (myristique) et s'utilise surtout comme support de parfums pour dissoudre et diluer les matières premières aromatiques.

III.3 Résultats et discussion des activités biologiques

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et des extraits lipidiques est évaluée en fonction du diamètre (mm ou cm) des zones d'inhibitions de la croissance microbienne [44].

L'estimation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est basée sur une échelle de mesure mise en place par Meena et al. (1994) [45], ils ont classé le pouvoir antimicrobien, en fonction des diamètres des zones d'inhibitions de la croissance microbienne, en 04 classes :

- ◆ Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieure à 28 mm.
- ◆ Modérément inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition varie entre 16 et 28 mm.
- ◆ Légèrement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition varie entre 10 et 16 mm.
- ◆ Non inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est inférieure à 10 mm.

Les résultats qualitatifs de l'huile essentielle et des extraits lipidiques conventionnels sur les bactéries pathogènes sont donnés dans le tableau 9 et le tableau 10.

Tableau 9 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Gigartina pistillata*.

Souches	Gram	Diamètre d'inhibition (mm)
<i>Proteus mirabilis</i>	-	9
<i>Anterobacter ssp</i>	-	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	11
<i>Prteus ssp</i>	-	10

Un effet inhibiteur de l'huile essentielle sur le développement du Gram négatif *Anterobacter ssp* et *Pseudomonas aeruginosa* ont été constaté avec des diamètres d'inhibitions égaux respectivement à 12 mm et 11 mm.

Les résultats qualitatifs du pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de *Gigartina pistillata* sur les souches pathogènes étudiées sont représentés en photos par la figure 15.

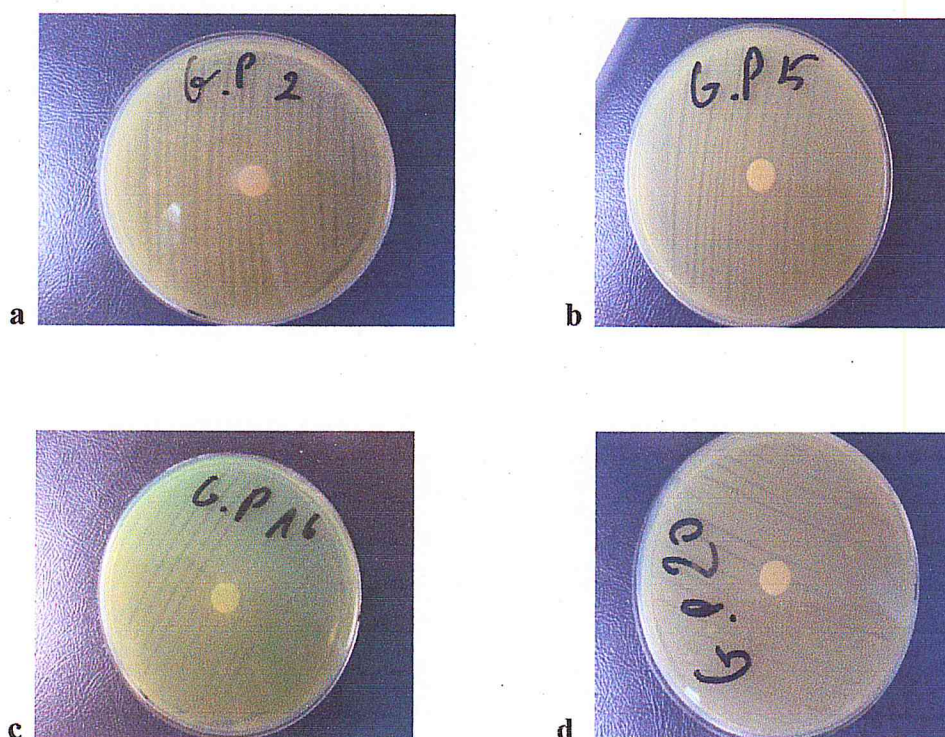


Figure 15 : Activité anti bactérienne de l'huile essentielle de *Gigartina pistillata* contre : a/ *Proteus mirabilis*, b/ *Anterobacter ssp*, c/ *Pseudomonas aeruginosa*, d/ *Proteus ssp*.

Tableau 10 : Activité antibactérienne des trois extraits lipidiques.

Extrait	Souches	Gram	Diamètre d'inhibition (mm)
<i>Gigartina pistillata</i>	<i>Escherichia coli</i>	-	résistante
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	12
	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	résistante
	<i>Salmonella typhi</i>	-	résistante
	<i>Proteus ssp</i>	-	résistante
<i>Laurencia pinnatifida</i>	<i>Escherichia coli</i>	-	10
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	13
	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	10
	<i>Salmonella typhi</i>	-	11
	<i>Proteus ssp</i>	-	10
<i>Ulva lactuca</i>	<i>Escherichia coli</i>	-	10
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	12
	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	13
	<i>Salmonella typhi</i>	-	11
	<i>Proteus ssp</i>	-	10

Remarque : La levure *Candida albicans* n'a donné aucun résultat positif dans tous les essais.

Pour l'extrait de *Gigartina pistillata*, on a constaté que seul « *Pseudomonas aeruginosa* » avait un effet inhibiteur d'un diamètre d'inhibition égal à 12 mm. Concernant les autres types de souches testées (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Proteus ssp*), on a remarqué l'absence de la zone d'inhibition. Cette absence de zone est probablement due à la résistance des souches vis-à-vis de l'extrait de *Gigartina pistillata*.

Pour les deux autres extraits (*Laurencia pinnatifida* et *Ulva lactuca*), on a remarqué des effets inhibiteurs sur l'ensemble des souches testées, mais le degré de sensibilité varie selon la résistance des souches vis-à-vis de l'extrait.

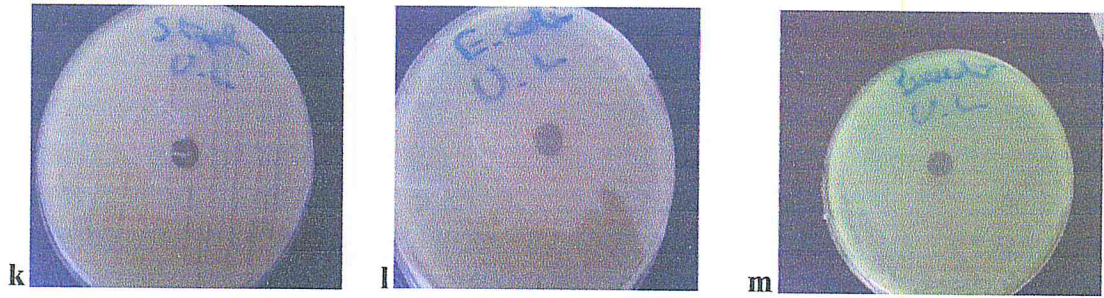


Figure 18 : Activité anti bactérienne de l'extrait lipidique de *Ulva lactuca* contre : k/*Staphylococcus aureus*, l/ *Pseudomonas aeruginosa*, m/ *Escherichia coli*.

CONCLUSION

Notre travail a porté sur l'étude de la composition chimique et de l'activité biologique de l'huile essentielle de *Gigartina pistillata* ainsi qu'à l'évaluation de l'activité biologique des extraits lipidiques des trois espèces d'algues : *Gigartina pistillata*, *Laurencia pinnatifida* et *Ulva lactuca*.

L'extraction de l'huile essentielle de *Gigartina pistillata* a été effectuée par entraînement à la vapeur d'eau et a mené à un rendement très faible de 0,016%. Cette valeur est assez faible comparativement à d'autres huiles essentielles. Les extraits lipidiques ont été préparés par macération avec des rendements de : 0,380% (*Gigartina pistillata*), 0,710% (*Laurencia pinnatifida*) et 10,760% (*Ulva lactuca*).

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CG/SM) a permis la séparation et l'identification de la composition chimique de l'huile essentielle de *Gigartina pistillata*. Cette dernière est constituée principalement de 29,03% de monoterpènes, il s'agit notamment du L-Limonène et du Carvacrol, et de composés oxygénés, le 2(4H)-benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-triméthyl (7,107%), l'éthylméthylmaleimide (4,007%), le Myristate d'isopropyl (1,694%) et d'autres composés.

Les tests d'activités antibactériennes effectués sur l'huile essentielle de *Gigartina pistillata* et les trois extraits (*Gigartina pistillata*, *Laurencia pinnatifida* et *Ulva lactuca*) ont montré que certains d'entre eux avaient des actions inhibitrices contre certaines souches telle que « *Pseudomonas aeruginosa* ». Par contre la bactérie *Escherichia coli* s'est révélée assez résistante.

En vue de la valorisation de ces espèces, il convient d'envisager une étude plus approfondie, tel que l'étude saisonnière et géographique et leur influence sur sa diversité chimique. Également, on peut envisager l'étude chimique des extraits lipidiques afin d'isoler des structures originales, éventuellement bioactives.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] S. Garon-Lardiere ; « Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *ASPARAGOPSIS ARAMATA* (Bonnemaisoniales) » ; Thèse de doctorat ; Université de Bretagne occidentale ; France ; Février 2004.
- [2] K. Patel ; « Extraction de métabolites bioactifs d'éponges marines du Pacifique Sud » ; Thèse de doctorat, Muséum national d'histoire naturelle; Ecole Doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme – Ed 227, Paris, France, Avril 2010.
- [3] Y. Viano ; « Recherche de molécules non toxiques actives en antifouling à partir d'organismes marins de méditerranée » ; Thèse de doctorat; Université du Sud Toulon-Var, France, Juin 2010.
- [4] J.-M. Kornprobst, « Substances naturelles d'origine marine », TEC&DOC, Lavoisier, Paris, France ; p598 ; 2005.
- [5] J. Stackhouse ; « Tentamen marino-cryptogamicum, ordinem novum; in genera et species distributum, in Classe XXIVta Linnaei sistens ». Mémoires de la Société Imperiale des Naturalistes de Moscou 2: [50]-97 ; 1809.- Site web: <http://www.algaebase.org>; *Gigartina pistillata* (S.G.Gmelin) Stackhouse 1809: 74. . (Base de données générale sur les algues marines et eau douce, préparé par M.D. Guiry et Nic Dgonncha).
- [6] A. Toulemont ; « Sous la mer, Faune et flore » ; Guide point vert ; Ed Hatier ; Paris ; France ; p123 ; 1982.
- [7] J.V.F. Lamouroux ; « Essai sur les genres de la famille des thalassiphytes non articulées ». Annales du Muséum d'Histoire Naturelle, Paris 20: 21-47, 115-139, 267-293, pls 7-13 ; 1813.- Site web: <http://www.algaebase.org>; *Gigartina pistillata* (S.G.Gmelin) Stackhouse 1809: 74. . (Base de données générale sur les algues marines et eau douce, préparé par M.D. Guiry et Nic Dgonncha).

- [8] R.F. Scagel; «An annotated list of the marine algae of British Columbia and northern Washington» (including keys to genera). Bulletin, National Museum of Canada 150: [i]-vi, 1-289, 1957.- Site web: <http://www.algaebase.org> . (Base de données générale sur les algues marines et eau douce, préparé par M.D. Guiry et Nic Dgonncha).
- [9] J.S. Craigie, «Cell walls »; Ed: K.M. Cole & R.G. Sheath; Biology of the Red Algae; Cambridge University Press: Cambridge, MA, pp221–257, 1990.
- [10] C. J. Lawson.; D.A. Rees; «An enzyme for the metabolic control of polysaccharide conformation and function»; Nature 227, 392–393, 1970.
- [11] J.S. Craigie.; C. Leigh.; J.A. Hellbust.; J.S. Craigie., «Carrageenens and agars». In Handbook of Phycological Methods: Physiological and Biochemical Methods; Ed J.R. HELLBUST., J.S. CRAIGIE.; Cambridge University Press: Cambridge; pp109–131; 1978.
- [12] D.J. McHugh; «A guid of the seaweed industry»; FAO Fisheries technical Paper. 441; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy; p118; 2003.
- [13] R. Perez. «Ces algues qui nous entourent, conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisations, culture. Aquaculture »; Ed IFREMER ; Nantes; France ; p272 ; 1997.
- [14] A. Amimi ; A. Mouradi ; T. Givernaud ; N. Chiadmi ; M. Lahaye.; «Structural analysis of *Gigartina pistillata* carrageenans (Gigartinaceae, Rhodophyta)»; Carbohydrate Research,333, 271–279 ; 2001.
- [15] M. Masuda.; T. Abe.; T. Suzuki.; M. Suzuki.; «Morphological and chemotaxonomic studies on *Laurencia composita* and *L. okamurae* (Ceramiales, Rhodophyta)»; *Phycologia*, 35, 550-562; 1996.

- [16] K.L. Erickson; «Constituents of *Laurencia*». In Marine Natural Products, Chemical and Biological Perspectives; Ed P.J. Scheuer; Academic Press: New York, USA; vol.5, pp131-257; 1983.
- [17] N.Y. Ji.; X.M. Li.; Y. Zhang.; B.G. Wang; «Two new halogenated chamigrane-type sesquiterpenes and other secondary metabolites from the marine red alga *Laurencia okamurai* and their chemotaxonomic significance»; Biochem. Syst. Ecol, 35, 627-630; 2007.
- [18] S.-C. Mao and Y.-W. Guo; «A Laurane Sesquiterpene and Rearranged Derivatives from the Chinese Red Alga *Laurencia okamurai* Yamada»; J. Nat. Prod;69; 1209-1211; 2006.
- [19] M. Kuniyoshi; M.S. Marma, T. Higa, G. Bernardinelli, and C.W. Jefford; «New Bromoterpenes from the Red Alga *Laurencia luzonensis*»; J. Nat. Prod; 64, 696-700; 2001.
- [20] N.-Y. Ji; X.-M. Li and B.-G. Wang.; «Halogenated Terpenes and a C15-Acetogenin from the Marine Red Alga *Laurencia saitoi*»; Molecules,13, 2894-2899; 2008.
- [21] K. Chakraborty, A.P. Lipton , R. Paulraj, R.D. Chakraborty; «Guaiane sesquiterpenes from seaweed *Ulva fasciata* Delile and their antibacterial properties»; European Journal of Medicinal Chemistry; 45, 2237–2244; 2010.
- [22] K. Chakraborty, A.P. Lipton , R. Paul Raj, K.K. Vijayan; «Antibacterial labdane diterpenoids of *Ulva fasciata* Delile from southwestern coast of the Indian Peninsula»; Food Chemistry, 119, 1399–1408; 2010.
- [23] M. Lahay., D. Jegou., A. Buleon; «Chemical characteristics of insoluble glucans from the cell wall of the marine green alga *Ulva lactuca* (L.) Thurret»; *carbohydr. Res*, 262; 115-125; 1994.

- [24] M. Lüscher-Mattli., «Polyanions-a lost chance in the fight againstHIV and other virus diseases»; *Antivir. Chem. Chemother*, 11; 249–259; 2000.
- [25] K.Z Bourne., N. Bourne., S.F. Reising., L.R. Stanberry; «Plant products as topical microbicide candidates: assessment of in vitro and in vivo activity against herpes simplex virus type 2»; *Antivir. Res.* 42; 219-226; 1999.
- [26] M.J. Carlucci., L.A. Scolaro., M.D. Nosedá., A.S. Cerezo., E.B. Damonte; «Protective effect of a natural carrageenan on genital herpes simplex virus infection in mice»; *Antivir. Res.*, 64; 137–141; 2004.
- [27] C.A. Pujol., L.A. Scolaro., M. Ciancia., M.C. Matulewicz., A.S. Cerezo., E.B. Damonte; «Antiviral activity of a carrageenan from *Gigartina skottsbergii* against intraperitoneal murine herpes simplex virus infection»; *Planta Med*, 72; 121–125; 2006.
- [28] M.J. Carlucci, C.A. Pujol, M. Ciancia, M.D. Nosedá, M.C. Matulewicz, E.B. Damonte, A.S. Cerezo; «Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity». *International Journal of Biological Macromolecules*, 20; 97-105; 1997.
- [29] W.-K. Jung, I. Choi, S. Oh, S.-G. Park, S.-K. Seo, S.-W. Lee, D.-S. Lee, S.-J. Heo, Y.-J. Jeon, J.-Y. Je, C.-B. Ahn, J.S. Kim, K.S. Oh , Y.-M. Kim , C. Moon, I.-W. Choi; «Anti-asthmatic effect of marine red alga (*Laurencia undulata*) polyphenolic extracts in a murine model of asthma»; *Food and Chemical Toxicology*, 47; 293–297; 2009.
- [30] M. Kladi, C. Vagias, M. Stavri, M.M. Rahman, S. Gibbons, V. Roussis; «C15 acetogenins with antistaphylococcal activity from the red alga *Laurencia glandulifera*».; *Phytochemistry Letters* 1; 31–36; 2008.

- [31] S. Gibbons., E.E. Udo; «The effect of reserpine, a modulator of multidrug efflux pumps, on the in vitro activity of tetracycline against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) possessing the tet(K) determinant».; *Phytotherapy Research*, 14; 139–140; 2000.
- [32] G.W. Kaatz., S.M. Seo., C.A. Ruble; «Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*»; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37; 1086–1094; 1993.
- [33] C.S. Vairappan, M. Suzuki, T. Ishii, T. Okino, T. Abe, M. Masuda; «Antibacterial activity of halogenated sesquiterpenes from Malaysian *Laurencia spp.*»; *Phytochemistry*, 69; 2490–2494; 2008.
- [34] K. Chakraborty, A.P. Lipton 1, R. Paul Raj, K.K. Vijayan.; «Antibacterial labdane diterpenoids of *Ulva fasciata* Delile from southwestern coast of the Indian Peninsula».; *Food Chemistry*, 119; 1399–1408; 2010.
- [35] H.A. El-masry, H.H. Fahmy, A.S.H. Abdelwahed; «Synthesis and antimicrobial activity of some new benzimidazole derivatives»; *Molecules*, 5; 1429-1438; 2000.
- [36] S. Priyadharshini, S. Bragadeeswaran, K. Prabhu, S. Sophia Ran; «Antimicrobial and hemolytic activity of seaweed extracts *Ulva fasciata* (Delile 1813) from Mandapam, Southeast coast of India»; *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, S38-S39; 2012.
- [37] A. Sathivel, H.R. Balaji Raghavendran, P. Srinivasan, T. Devaki. ; «Anti-peroxidative and anti-hyperlipidemic nature of *Ulva lactuca* crude polysaccharide on D-Galactosamine induced hepatitis in rats»; *Food and Chemical Toxicology*, 46; 3262–3267; 2008.

- [38] P. Franchomme., D.Pénoël., «L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles»; Ed Roger Jallois; Limoges, France ; p445; 1990.
- [39] Y. R. Naves; «Technologie et chimie des parfums naturels: essences concrètes, résinoïdes, huiles, et pommades aux fleurs»; Ed Masson ; Paris ; France ; p326 ; 1974.
- [40] T. Katayama ; «Volatile constituents». *Physiol. Biochem. Algae*. Ed. R.A. Lewln. Academic: 467-473 ; 1962.
- [41] M.C PIBIRI; «Assainissement microbiologiques de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles»; Thèse de Doctorat ; EPFL; Lausanne; Suisse ; 28-42 ; 2005.
- [42] A. ZHIRI.; «L'aromathérapie» ; *Nutranews* ; Ed: Fondation pour le libre choix; 2-16 ; 2006.
- [43] Anonyme, « Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale » ; 5ème édition avec la collaboration de l'OMS; p106; 2008.
- [44] Pharmacopée européenne, Direction de la qualité du médicament, Ed Council of Europe, p2623, 2002.
- [45] M.R. Meena, V. Sethi., «Antimicrobial activity of the essential oils from spices»; *Journal of Food Science and Technology Mysore*, 31(1); 68-70; 1994.