

MA-540-145-1

F.S.D.....N° D'ordre :

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université BLIDA 1
Faculté des Sciences
Département de Chimie



Mémoire présenté par
BADRANI Nadjia



En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière
Filière : Chimie
Option : **Chimie des produits Naturels**

Titre

Préparation, caractérisation et test d'activité antimicrobienne d'une nanoémulsion à base de la fraction volatile de *Dictyopteris membranacea*

Soutenu publiquement le 4 juillet 2017 devant le jury composé de :

M.El Hattab	Pr	Président	Université Blida 1
Y. Daghbouche	Pr	Examinatrice	Université Blida 1
M.R. Zahi	MCB	Promoteur	Université Blida 1

Promotion 2016-2017

MA-540-145-1



REMERCIEMENT

*Je tenons en premier lieu à remercier le bon DIEU « الله » de nous avoir facilité la tâche et nous avoir accordé beaucoup de chance, et donné la force et le courage pour réaliser ce travail .
قاللهم لك الحمد كما ينبغي لجلال وجهك و عظيم سلطانك .*

*Je remercie vont prioritairement à mon promotor **M. Réda ZAH** maitre de conférence à l'université de Blida 1, qui à travers ses conseils et ses orientations, sa disponibilité et la confiance qu'il m'accordé, j'ai conforté dans mes efforts et ma permis d'avancer à pas constants et à accomplir ce modeste travail.*

*Je veux exprimer ici ma vive reconnaissance à Monsieur le professeur **Mr M. ELHATTAB** pour son dévouement incomparable, et pour la confiance qu'il m'a accordé pour mener à bien ce projet dans son laboratoire « Chimie de Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSN-BioM) » de l'Université de Blida 1. J'ai pu constamment bénéficier de ses suggestions et de ses encouragements.*

*Je remercie le docteur **M^{me} Touafek Ouassila**, le responsable de master de chimie des produits naturels.*

J'adresse aussi mes sincères remerciements à tous les professeurs et les enseignants à la faculté des sciences université de Blida 1 pour leurs efforts et encouragement le long de ce master.

Je remerciements vont également aux membres de jury qui ont accepté de juger ce travail, que trouveront, ici ; l'expression de nos considération et de notre respect.

*Un grand merci au l'ingénieur du laboratoire de recherche « Chimie de Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSN-BioM) » de l'Université de Blida 1 **M^{elle} MEBAREK Leyrat**, pour sa disponibilité et son aide précieux dans la réalisation de mon travail expérimentale.*

*Je remercie chaleureusement **M^{elle} Riad Nacera**, pour leurs disponibilités, sa gentillesse, sa patience et leurs aides précieuses.*

Je tiens à remercier toutes les doctorants de laboratoires pour leur gentillesse et leur soutien.

Je n'oublie surement pas mes collègues et amies qui ont contribué par leur soutien et amitié.

Je ne pouvais finir sans remercier très fortement mes parents, pour leurs aides, leur soutien moral et leurs encouragements. Je leurs exprime toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude

Enfin, je tiens à exprimer ses sincères remerciements à tous ceux qui ont aidés de près ou de loin à réaliser ce travail surtout mes amis de l'étude.



DÉDICACE

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...
Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect,
A ceux qui me sont les plus chers, a ceux qui m'ont toujours encouragé
Aussi, c'est tout simplement que...*

Du profond de mon cœur, Je dédie ce travail à tous ceux qui sont chers,

A ma chère maman, A mon cher papa

*Qui sont les meilleurs parents dans ce monde. Aucune dédicace ne saurait exprimer
mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous
avez consenti pour mon instruction et mon bien être*

*Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon
enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours avec moi.*

*Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formules, le fruit de vos
innombrables sacrifices puisse dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et
longue vie*

***Ames très chers sœurs pour leur affection et leur soutien
Elles me sont très chères***

***Ames très chers frères
pour leur aide,
leur générosité
et leur disponibilité***

A mes très chères amies

*Je dédie ce travail à toute notre préparation, les jours et les nuits blanches, nos
larmes et nos fous rires, nos déceptions et nos éclats de joie. A notre belle amitié.*

*Je dédie ce modeste travaille à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à
réaliser ce travail.*

Nadjia

ملخص

يهدف عملنا لتقييم الدراسة الكيميائية بواسطة كروماتوغرافيا الطور الغازي مقرونة بمطيافية (GC / MS) ونشاط مضادات الميكروبات للجزء المتبخر والزيت العطرية للطحلب البني ديكتيوبتيريس مومبرناسي *Dictyopteris membranaceae*. كان حصاد الطحالب في منطقة كورن دور في تبيزة (في أكتوبر 2016). أنه يطيل أيضا تأثير nanoémulsion من نشاط مضادات الميكروبات من D-الليمونين.

تم الحصول على الجزء المتبخر والزيت العطرية عن طريق التقطير بالبخار فكان المرود حوالي 8% و10.77% لكل من الجزء المتبخر والزيت العطرية على التوالي. مكن التحليل الكيميائي عن طريق GC / MS من الكشف عن 6 مركبات للجزء المتبخر و6 للزيت العطرية وبعض من المنتجات مجهولة الهوية. وكانت المركبات الرئيسية للجزء المتبخر والزيت العطرية منتجات الكبريت،

تم تحديد نشاط مضادات البكتيريا من خلال طريقة microdilution في الوسط السائل ضد اثنين من سلالات البكتيريا ايجابية وسلالة واحدة من البكتيريا سالبة. وقد أظهرت نتائج الاختبارات أن الجزء المتبخر لديه نشاط أقل من الزيت العطرية مع CMI حوالي 15 ميكرو لتر/مل ضد سلالات ستافيلوكوكيس اوغيبس، و 15 ميكرو لتر/مل ضد سلالة باسيليس سيغييس. عكس الزيت العطري الذي لديه CMI حوالي 1.875، 3.35، 3.35 ميكرو لتر/مل ضد سلالات ستافيلوكوكيس اوغيبس، باسيليس سيغييس، وايشيريشيا كولي على التوالي. وعلاوة على ذلك لم يظهر D-الليمونين وD-الليمونين nanoémulsion أي تأثير ضد السلالات التي تم اختبارها.

الكلمات المفتاحية: ديكتيوبتيريس مومبرناسي ، *Dictyopteris membranaceae* ، كروماتوغرافيا الطور الغازي مقرونة بمطيافية (GC / MS) ، الجزء المتبخر ، الزيت العطرية ، نشاط مضادات البكتيريا ، microdilution ، D-الليمونين nanoémulsion.

Résumé

Notre travail vise à évaluer l'étude chimique par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) et l'activité antimicrobienne de la fraction volatile et l'huile essentielle de l'algue brune *Dictyopteris membranacea*. L'algue était récoltée au niveau de la Corne d'Or à Tipaza (en mois d'octobre 2016). Elle s'allonge aussi sur l'effet de la nanoémulsion sur l'activité antimicrobienne du D-limonène.

Une fraction volatile et une l'huile essentielle ont été extraits par entraînement à la vapeur avec un rendement de 8% et 10.77% en fraction volatile et en huile essentielle respectivement. La CG/SM a permis de détecter 12 composés de la fraction volatile et 12 de l'huile essentielle et quelques produits non-identifiés. Les composés majoritaires de la fraction volatile et l'huile essentielle étaient des produits soufrés,

L'activité antibactérienne a été déterminée par le procédé de micro-dilution en milieu liquide contre deux souches de Gram-positives et une souche de bactérie à Gram-négative. Les résultats de ce teste ont montrés d'une part que la fraction volatile est dotée d'une activité inférieure à celle de l'huile essentielle avec des CMI de l'ordre de 15 µl/mL contre les souches *Staphylococcus aureus*, et 15 µl/mL contre la souche *Bacillus cereus*. Par contre l'huile essentielle à donner des CMI de l'ordre de 1.875, 3.35, 3.35 µl/mL contre les souches *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Escherichia coli* respectivement. D'autre part le D-limonène et sa nanoémulsion n'ont montré aucun effet vis-à-vis aux souches testées.

Mots clés : *Dictyopteris membranacea*, Fraction volatile, Huile essentielle, CG/SM, Activité antibactérienne, D-limonène, Nanoémulsion, D-limonène nanoémulsion.

Abstract

The overall objective of this work is to evaluate the chemical composition by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC / MS) and the antimicrobial activity of the volatile fraction and the essential oil of the brown alga *Dictyopteris membranacea*. The seaweed was harvested at the Golden Horn at Tipaza (in October 2016). It also extends to the effect of nanoemulsion on the antimicrobial activity of D-limonene.

A volatile fraction and an essential oil were extracted by steam distillation yielding 8% and 10.77% of the volatile fraction and the essential oil respectively. GC / MS has detected 6 compounds of the volatile fraction and 6 of the essential oil and some unidentified products. The major components of the volatile fraction and the essential oil were sulfur-containing products.

The antibacterial activity was determined by the micro-dilution method in liquid medium against two Gram-positive strains and Gram-negative bacteria. The results of this test showed that the volatile fraction is provided with an activity lower than that of the essential oil with MICs of of 15 μl / ml against *Staphylococcus aureus* and 15 μl / ml against *Bacillus cereus*. On the other hand, the essential oil has shown MICs of 1.875, 3.35, 3.35 μl / ml against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* respectively. On the other hand, D-limonene and its nanoemulsion showed no effect against the tested strains.

Keywords : *Dictyopteris membranacea*, volatile Fraction, essential oil, GC/MS, Antibacterial activity, D-limonene, Nanoemulsion, D-limonène nanoemulsion.

Liste des abréviations

A:

ATCC : American Type Culture Collection

C:

°C : Degré Celsius.

CMI : Concentrations Minimales Inhibitrices.

CG/DM : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

E:

ES : Émulsification Spontanée.

F:

FE : Faction Volatile.

FPP : Farnésyl Pyrophosphate

Fig : Figure

G:

GFPP : Géranylfarnésyl Pyrophosphate

GPP : Géranyl Pirophosphate.

GGPP : Géranylgéranyl Pirophosphate.

H:

HE : Huile Essentielle.

h : Heure

I:

ISP2 : International Streptomyces Project.

IPP : Isopenténul-pyrophosphate.

M:

MBC : Concentrations Minimales Bactéricides.

M : Molaire.

mim : Minute

N:

nm : nanomètre.

P:

PH : Potentiel Hydrogène

µm : micromètre

Liste des tableaux

Tableau I.1 :	Classification pigmentaire des algues	5
Tableau I.2 :	Position systématique de l'espèce <i>Dictyopteris membranacea</i>	10
Tableau II.1 :	Souches utilisées dans le test antimicrobien.	29
Tableau II.2 :	La gamme de concentration des échantillons.	30
Tableau II.3 :	Propriétés organoleptiques de l'extrait brut de <i>Dictyopteris membranacea</i> .	32
Tableau II.4 :	Propriétés organoleptiques de fraction volatile et l'huile essentielle de <i>Dictyopteris membranacea</i>	33
Tableau II.5 :	Composition chimique de fraction volatile de l'algue brune <i>Dictyopteris membranacea</i> .	34
Tableau II.6 :	Composition chimique de l'huile essentielle de l'algue brune <i>Dictyopteris membranacea</i> .	35
Tableau II.7 :	Propriétés organoleptiques de D-limonène nanoémulsion.	44
Tableau II.5 :	les Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des échantillons testés.	45

Liste des figures

Figure I.1 :	Représentation schématique de la morphologie d'une algue	3
Figure I.2 :	Description des différentes classe de terpène (IPP= Isopenténylpyrophosphate)	8
Figure I.3 :	L'algue brune <i>Dictyopteris membranacea</i> .	11
Figure I.4 :	Représentation de la méthode de diffusion de disque.	16
Figure I.5 :	Représentation de la méthode de dilution en bouillon.	17
Figure I.6 :	Représentation de la méthode de dilution en gélose.	17
Figure II.1 :	Localisation géographique du site de la récolte de <i>Dictyopteris membranacea</i>	21
Figure II.2 :	Photo de l'algue brune <i>Dictyopteris membranacea</i> .	22
Figure II.3 :	Entrainement à la vapeur d'eau de l'extrait brut à l'aide du montage de Dean-Starck.	23
Figure II.4 :	Flacons de fraction volatile de <i>Dictyopteris membranacea</i>	23
Figure II.5 :	Dispositif expérimental d'entraînement à la vapeur d'eau de l'HE.	24
Figure II.6 :	Flacons de-huile essentielle de <i>Dictyopteris membranacea</i>	25
Figure II.7 :	Méthodologie expérimentale du travail.	26
Figure II.8 :	Flacons de D-limonène nanoémulsion (6% Tween 80).	28
Figure II.9 :	Flacons de D-limonène nanoémulsion (10% Tween 80).	28
Figure II.10 :	Préparation de milieu de culture.	29
Figure II.11 :	solutions des pré-cultures.	30
Figure II.12 :	Représentation graphique de la méthode de microdilution échantillons testés	31

Figure II.13 :	Profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle de <i>Dictyopteris membranacea</i>	38
Figure II.14 :	Agrandissement des pics du chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Dictyopteris membranacea</i> (partie A).	39
Figure II.15 :	Agrandissement des pics du chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Dictyopteris membranacea</i> (Partie B).	39
Figure II.16 :	Agrandissement des pics du chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Dictyopteris membranacea</i> (Partie C).	40
Figure II.17	Agrandissement des pics du chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Dictyopteris membranacea</i> (Partie D).	40
Figure II.18 :	Profil chromatographique d'analyse de fraction volatile de <i>Dictyopteris membranacea</i> .	41
Figure II.19 :	Agrandissement des pics du chromatogramme de fraction volatil de <i>Dictyopteris membranacea</i> (Partie A).	42
Figure II.20 :	Agrandissement des pics du chromatogramme de fraction volatile de <i>Dictyopteris membranacea</i> (Partie B).	42
Figure II.21 :	Agrandissement des pics du chromatogramme de fraction volatile de <i>Dictyopteris membranacea</i> (Partie C).	43
Figure II.22 :	Agrandissement des pics du chromatogramme de fraction volatile de <i>Dictyopteris membranacea</i> (Partie D).	43

Liste des planches

Planche I.1 :	Polènes odorants en C11 des espèces hawaïennes du genre <i>Dictyopteris</i> .	48
Planche I.2 :	Sesquiterpènes de <i>Dictyopteris divaricata</i>	48
Planche I.3 :	Polyène en C 11 et dérivés de <i>Dictyopteris</i> .	49
Planche I.4 :	Produits soufrés identifiés dans le genre <i>Dictyopteris</i> .	49
Planche II.1 :	Le résultat après 24h d'incubation de FV contre <i>Staphylococcus aureus</i> .	50
Planche II.2 :	Le résultat après 24h d'incubation de FV contre <i>Bacillus cereus</i>	50
Planche II.3 :	Le résultat après 24h d'incubation de l'HE contre <i>Staphylococcus aureus</i>	51
Planche II.4 :	Le résultat après 24h d'incubation de l'HE contre <i>Bacillus cereus</i> .	51
Planche II.5 :	Le résultat après 24h d'incubation de l'HE contre <i>Escherichia coli</i> .	52
Planche II.6 :	Le résultat après 24h d'incubation de D-limonène contre <i>Staphylococcus aureus</i> .	52
Planche II.7 :	Le résultat après 24h d'incubation de D-limonène contre <i>Bacillus cereus</i> .	53
Planche II.8 :	Le résultat après 24h d'incubation de D-limonène contre <i>Escherichia coli</i> .	53
Planche II.9 :	Le résultat après 24h d'incubation de D-limonène nanoémulsion contre <i>Staphylococcus aureus</i> .	54
Planche II.10 :	Le résultat après 24h d'incubation de D-limonène nanoémulsion contre <i>Bacillus cereus</i> .	54
Planche II.11 :	Le résultat après 24h d'incubation de D-limonène nanoémulsion contre <i>Escherichia coli</i> .	55

SOMMAIRE

Remerciement	I
Dédicaces	III
ملخص	IV
Résumé	V
Abstract	VI
Liste des abréviations	VII
Liste des tableaux	VIII
Liste des figures	IX
Liste des planches	XI
Introduction générale	1
<u>Chapitre I : Synthèse bibliographique</u>	
I.1 Généralités sur les algues	3
I.1.1 Morphologie des algues	3
I.1.2 Classification des algues	3
I.1.2.1 La pigmentation	4
I.1.3 Facteurs de répartition des algues	6
I.1.4 Reproduction des algues	6
I.1.5 Utilisation des algues	6
I.2 Biologie des algues brunes du genre <i>Dictyopteris</i>.	7
I.2.1 Présentation de la famille des <i>Dictyotacées</i> .	7
I.2.2 Métabolites secondaires des Dictyotaceae	7
I.2.3 Composés volatiles des algues brunes	9
I.2.4 Composition chimique des espèces du genre <i>Dictyopteris</i>	9
I.2.5 Hydrocarbures soufrés du genre <i>Dictyopteris</i>	9
I.3 Présentation de l'espèce <i>Dictyopteris membranacea</i>	10
I.3.1 Etude taxonomique et systématique de l'espèce	10
I.3.2 Description morphologique	10

I.3.3 Le développent et la reproduction de l'algue	11
I.3.4 Informations complémentaires	11
I.3.5 Saisonnalité et distribution	11
I.4 Activité antimicrobienne	12
I.4.1 Généralités	12
I.4.2 Culture des bactéries	12
I.4.3 Les principaux agents antimicrobien	12
I.4.3.1 Les antibiotiques	12
I.4.3.2 Les composés phénoliques	13
I.4.3.3 Huiles essentielles	13
I.4.4 Description de quelques bactéries	14
I.4.4.1 <i>Escherichia Coli</i>	14
I.4.4.2 <i>Staphylococcus Aureus</i>	14
I.4.4.3 <i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	14
I.4.4.4 <i>Candida Albicans</i>	15
I.4.4.5 <i>Aspergillus Sp</i>	15
I.4.5 Méthodologie des tests antibactériens	15
I.4.5.1 Méthode de diffusion de disques	16
I.4.5.2 Technique de microdilution en milieu liquide	16
I.4.6 Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de <i>Dictyopteris membranacea</i>	17
I.5 Définition des nanoémulsions	18
I.5.1 Avantages et inconvénients des nanoémulsions	19
I.5.2 Techniques de préparation des nanoémulsions	19
I.5.3 Application de la nanoémulsion	19
I.6 L'effet des nanoémulsion sur l'activité antimicrobienne	20

Chapitre II. Parie expérimentale

II.1 Récolte et traitement de l'algue	21
II.2 Extraction de la fraction volatile et de l'huile essentielle de <i>Dictyopteris membranacea</i>	22
II.2.1 Extraction de la fraction volatile à partir de l'extrait brut	24

II.2.2 Préparation de l'huile essentielle de <i>Dictyopteris membranacea</i>	24
II.3 Analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse de la fraction volatile et de l'huile essentielle de <i>Dictyopteris membranacea</i>	27
II.4 Préparation de D-limonène nanoémulsion	27
II.5 Evaluation de de l'activité antibactérienne	28
II.5.1 Détermination de la concentration minimale inhibitrice	28
II.5.1.1 Microorganismes utilisés	28
II.5.1.2 Repiquage des souches	29
II.5.1.3 Préparation et composition des milieux de culture	29
II.5.1.4 Préparation de l'inoculum (pré-culture)	30
II.5.1.5 préparation des déférentes concentrations des échantillons testés	30
II.5.1.6 Lecture des résultats	31
II.6 Résultats et discussion	32
II.6.1 Caractéristiques organoleptiques et rendement de l'extrait brut de <i>Dictyopteris membranacea</i>	32
II.6.2 Caractéristiques organoleptiques de fraction volatile et de l'huile essentielle de <i>Dictyopteris membranacea</i>	33
II.6.3 Analyse de la fraction volatile et huile essentielle par CG/SM	34
II.6.4 Caractéristiques organoleptiques de D-limonène nanoémulsion	44
II.6.5 Détermination de la concentration minimale inhibitrice des échantillons testés	45
Conclusion générale	46
Les planches	47
Références bibliographiques	56
ANNEXE	

Introduction générale

Introduction générale

Les océans et les mers constituent près des trois-quarts de la surface du globe. Le milieu marin est apparu il y a environ 3,8 milliards d'années alors que les premières espèces terrestres remontent, quant à elles, à 400 millions d'années [1]. Cette différence se traduit aujourd'hui par une grande diversité dans le milieu marin, plus de 500 000 espèces marines ont été répertoriées à ce jour [2]. De plus, l'Algérie, est un pays profondément influencé par la mer, ce qui implique l'existence de milliers d'espèces marines particulièrement les algues qui présentent une biomasse très importantes.

Il a été décrit près de 80% des produits naturels d'origine marins sont extraits à partir d'algues comme *Chlorophycota*, *Rhodophycota*, *Chromophycota* et *Cyanophycota*. Ces derniers ont une place importante dans le milieu marin avec plus de 1200 espèces.

Les produits naturels isolés des algues se caractérisent souvent par la présence d'éléments chimiques ou de nouvelles structures, rarement observées, voire inconnues en milieu terrestre, dont beaucoup d'entre elles ont des activités biologiques intéressantes [3].

Les macro-algues connues à la fois pour produire un grand nombre de métabolites secondaires, constituent des cibles de choix pour développer une telle approche. Dans ce cadre, les premiers travaux portant sur la recherche de substances naturelles actives en antifouling ont été menés principalement sur des extraits bruts ou des fractions. Cependant, au cours de ces dernières années, une attention plus particulière a été accordée à la caractérisation de composés purs, car les mélanges peuvent rendre complexe de telles études du fait de l'existence de possibles effets antagonistes ou synergiques [4,5]. Au sein des macro-algues, les algues brunes, et plus particulièrement celles appartenant à la famille des *Dictyotacées*, font partie des espèces dont la composition chimique a été la plus étudiée pour la description d'activités biologiques des molécules isolées, mais également pour la détermination de leurs fonctions écologiques.

Les Rhodophycées d'algues brunes, genre *Dictyopteris* ont fait l'objet de plusieurs études pour leurs potentialités biotechnologiques. De ce fait nous avons opté à faire une étude sur l'espèce *Dictyopteris membranacea*.

L'objectif principal de ce projet était l'étude chimique de la fraction volatile de l'espèce *Dictyopteris membranacea* (récoltée en octobre 2016), l'encapsulation de cette fraction dans une nano-émulsion et tests d'activité antimicrobiens de la fraction volatile avant et après encapsulation. Malheureusement, au cours de l'évolution des manipulations on s'est rendu

compte que la quantité obtenue de la fraction volatile était insuffisante afin de poursuivre les expériences concernant la préparation des nanoémulsions à base de cette fraction volatile. Pour pallier à cette situation critique, on a décidé d'utiliser le D-limonène comme un modèle qui remplacera notre fraction volatile.

Ce travail est subdivisé en trois parties :

- ✓ **La première** est un aperçu général sur les algues notamment les algues brunes du genre *Dictyopteris membranacea*.
- ✓ **La deuxième** est réservée à une étude expérimentale sur la composition chimique et l'évaluation du pouvoir antibactérien de la fraction volatile et l'huile essentielle de *Dictyopteris membranacea*.
- ✓ **La troisième** est consacrée à la préparation d'une nanoémulsion à base du D-limonène et l'étude de l'effet de la nano-émulsion sur l'activité antibactérienne.

Chapitre I :
Synthèse
bibliographique

I. Synthèse bibliographique

I.1 Généralités sur les algues

Les algues regroupent un ensemble de végétaux photosynthétiques divers et dont l'appareil végétatif relativement simple est appelé « thalle », elles ont des formes et des dimensions très diversifiées. Certaines sont microscopiques et d'autres mesurent plusieurs mètres de longueur, mais elles ont toutes des caractères communs. Elles sont trouvées essentiellement dans les eaux douces ou marines, et certaines vivent sur la neige ou la glace des régions polaires et des hautes montagnes. D'autres au contraire supportent les eaux des sources thermales des températures élevées (algues thermophiles). Elles comprennent 20 000 à 30 000 espèces dans le monde, soit 18% du règne végétal [6, 7].

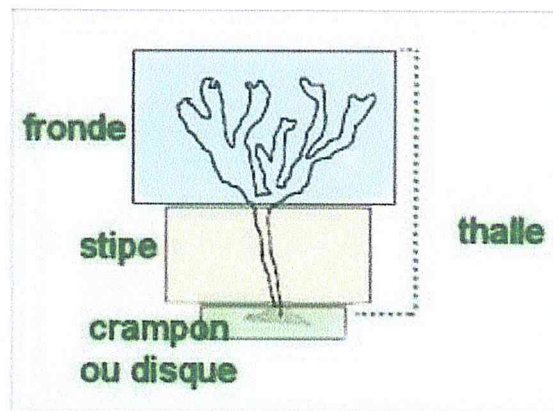


Figure I.1 : Représentation schématique de la morphologie d'une algue.

I.1.1 Morphologie des algues

Dans plusieurs embranchement presque toutes les espèces sont unicellulaires, elles sont sphériques, ou en forme de bâtonnet, de massue ou de fuseau. Elles peuvent être mobiles ou non, peuvent former des colonies multicellulaires, ou sous forme d'agrégat de cellules isolées, identiques qui restent liés après la division. D'autres sont composées de différentes cellules qui sont spécialisées pour remplir des fonctions particulières. Les autres algues sont multicellulaires possédant une morphologie plutôt complexe [8 -13].

I.1.2 Classification des algues

De nombreux critères écologiques, physiologiques ou biochimiques interviennent dans la phylogénie des algues comme les structures cellulaires, le mode de nutrition. L'habitat ou même la nature et la localisation des pigments et glucanes de réserve. Malgré cette importante diversité et complexité structurale, une dizaine d'embranchements permettent de classer ces végétaux [14]. Différents critères rentrent en considération, à savoir

leurs compositions pigmentaires, leurs caractéristiques structurales, leurs modes de reproduction ainsi que leurs polysaccharides de réserve [14, 15].

I.1.2.1 La pigmentation

La nature et la localisation des pigments permettent de définir plusieurs grands groupes d'algues [15-17]. Selon la nature des pigments surnuméraires associés à la chlorophylle, la couleur des plastes des algues permet de distinguer les algues brunes (ou *Phéophycées*), les algues rouges (ou *Rhodophycées*) et les algues vertes (ou *Chlorophycées*) et des bleues (ou *Cyanophycées*) [18, 19]. Les différentes classes d'algues sont résumées dans le Tableau I.1.

a. Les Chlorophytes

Les Chlorophytes sont des algues vertes dont le thalle est de couleur typiquement verte en raison des chlorophylles a et b dominant dans les chloroplastes. Toutefois, l'exposition prolongée aux fortes intensités lumineuses provoque la synthèse de pigments photo protectants (caroténoïdes), qui confèrent aux thalles des couleurs orangées à jaunâtres. Ce groupe d'algues est peu localisées dans les eaux tempérées est au contraire riche en espèces dans les eaux tropicales. Les algues vertes sont présentes dans tous les systèmes aquatiques depuis les milieux marins jusqu'aux eaux douces [20].

b. Les Chromophytes

Au sein des Chromophytes, les algues brunes sont regroupées dans la classe des *Fucophycées* appelées autrefois les *Péophycées*. Ce sont des algues presque exclusivement marines. Leur couleur est due à l'abondance des pigments bruns, la fucoxanthine, qui masque les chlorophylles a et c. Les *Phéophycées* montrent une grande diversité morphologique depuis les formes filamenteuses relativement simples aux grandes algues brunes dont l'organisation morphologique complexe évoque les tiges feuillées des végétaux supérieurs. Les algues brunes se sont principalement diversifiées dans les mers froides et tempérées où elles forment les grandes forêts sous-marines. Dans les eaux tropicales, elles sont moins nombreuses en espèces, mais représentent les plus grands thalles et forment les populations les plus denses [20].

c. Les Rhodophytes

Les Rhodophytes ce sont des algues rouges, elles montrent une originalité particulière avec leur pigments surnuméraires rouges (Phycoérythrines) et bleus (Phycocyanines) qui viennent masquer la chlorophylle. Les proportions relatives entre les

différents pigments, conjuguées avec la forme du thalle, donnent à la lumière du jour toutes les couleurs imaginables depuis le brun noirâtre jusqu'au rose très clair en passant par les rouges pourpres et les orangés. De plus, pour une même espèce, la couleur varie en fonction de l'exposition aux rayons lumineux : souvent les individus qui se développent aux forts éclaircissements montrent des couleurs délavées, où dominant les jaunes orangés en raison de la forte concentration en pigments caroténoïdes photo protecteurs [20].

d. Les Cyanobactéries

Les cyanobactéries ou les algues bleues sont constituées des colonies de taille, de forme et de couleur très variables. Comme les algues rouges, elles possèdent des pigments surnuméraires bleus (Phycocyanines) et rouges (Phycoérythrines) qui masquent la chlorophylle a. En dépit de leur nom ancien d'algues bleues, elles sont rarement bleues mais plus souvent rouges, vertes avec des reflets bleutés, violets, bruns, jaunes ou orangés. La plupart d'entre elles ont une consistance gélatineuse voire gluante en raison des mucilages qu'elles sécrètent [20].

Tableau I.1 : Classification pigmentaire des algues [21, 22].

Embranchement	Nom commun	Pigments		
		Chlorophylles	Phycobilines (phycobiliprotéines)	Caroténoïdes
Chlorophytes	Algues vertes	a, b	Phycocyanine Phycoérythrine Allophycocyanine	-
Chromophytes	algues brunes	a, c	-	β -carotène \pm a-xanthophylles
Rhodophytes	algues rouges	a, rarement d	-	β -carotène Fucoxanthine Xanthophylles
Cyanobactéries	algues bleues	a	Phycocyanine C Allophycocyanine Phycoérythrine	Xanthophylles (β -carotène Zéaxanthine \pm a-carotène)

I.1.3 Facteurs de répartition des algues

Les algues sont liées à l'eau et peuvent donc s'installer dans tous les types d'habitat suffisamment humides et éclairés. On peut les retrouver en eau douce, en mer, sur sol humide et même sur la neige. Etant photosynthétiques, elles sont dépendantes de la présence de la lumière. Aussi, elles nécessitent d'être fixées à un substrat, par conséquent, la texture, le degré de cohésion et la nature chimique du substrat ont une importance sur la répartition spatiale des espèces [23].

I.1.4 Reproduction des algues

Dans de très nombreux cas, la reproduction des algues s'effectue par multiplication végétative. Il s'agit d'une multiplication sexuée qui consiste en la division d'une cellule isolée (cas des algues bleues), soit en une fragmentation de thalle aboutissant à la formation de plusieurs organismes identiques. Elle est souvent réalisée par la formation de cellules spécialisées : les spores. Les algues eucaryotes réalisent en plus une reproduction sexuée au cours de laquelle l'union de deux cellules reproductrices, ou gamètes, produit un œuf, ou zygote. La reproduction des algues se déroule ainsi selon une alternance de phases de reproduction asexuée assurée par les thalles (sporophytes), et de phases de reproduction sexuée, assurée par des thalles producteurs de gamètes (gamétophytes) [24].

I.1.5 Utilisation des algues

Les algues ont été utilisées depuis longtemps : au début dans l'alimentation des populations des rivages asiatiques, ou comme engrais en Europe ou encore pour le bétail. Depuis le XVIII^{ème} siècle l'iode est extrait industriellement des algues au Japon.

Les algues ont été et sont encore utilisées dans :

- ❖ Agro-alimentaire : Gélose et alginates utilisées comme agents émulsifiants, épaississants, stabilisants, gélifiants (additifs d'E400 à E408), excipients [25]
- ❖ Agriculture : utilisées comme engrais (goémon) ou amendement (maërl).
- ❖ Dentisterie : pâtes pour les empreintes dentaires.
- ❖ Industries chimiques les frustules (enveloppes externes des diatomées) siliceux, sont utilisés comme abrasifs, ou isolants phoniques ou thermiques. Les colles, peintures, résines, caoutchoucs, savons utilisent des produits d'algues [26]
- ❖ Médecine : en thalassothérapie, dans les bains d'algue (algotérapie) pour traiter les rhumatismes ou certaines affections de l'appareil locomoteur; en chirurgie ou

en gynécologie, dans des stipes de laminaires (pour leur propriété à retenir l'eau tout en se dilatant) pour débrider une plaie ou dilater une voie naturelle [27]

- ❖ Pharmacie : dans les propriétés laxatives ou vermifuges (*Hypnea Carragheen*),
- ❖ Anticoagulantes (*Phyllophora*) [27, 28].

I.2 Biologie des algues brunes du genre *Dictyopteris*

I.2.1 Présentation de la famille des *Dictyotacées*

Les algues brunes, ou *Phéophycées*, forment une classe d'organismes photosynthétiques presque exclusivement marins qui appartiennent au phylum des *Hétérokontes*, ou *Straménopiles*. Elles sont communes dans le monde entier : elles se développent essentiellement dans les eaux tempérées profondes mais également dans les eaux tropicales chaudes. Une diversité très importante de la taille et de la forme des thalles est observée au sein de cette classe. La coloration brune de ces organismes est attribuée à la prédominance de pigments orangés, tels que les carotènes et les xanthophylles, par rapport aux chlorophylles.

Avec 239 espèces connues, les *Dictyotales* représentent le troisième ordre le plus important parmi les algues brunes en termes de nombre d'espèces (après les *Ectocarpales* et les *Fucales*). Les espèces issues de cet ordre sont caractérisées par des thalles aplatis parenchymateux et des poils regroupés sous forme de petites touffes à la surface des frondes.

Leur croissance est apicale et leur cycle de vie est diplohaplontique isomorphe. L'ordre des *Dictyotales* se compose d'une large famille « *Dictyotaceae* », ainsi d'une famille peu commune, celle de « *Scoresbyellaceae* ». La famille des *Dictyotaceae* se subdivise en deux tribus, les « *Dictyoteae* » et les « *Zonarieae* » sur la base du nombre de cellules méristématiques aux sommets des thalles [29].

I.2.2 Métabolites secondaires des *Dictyotaceae*

D'un point de vue chimique, les espèces issues de la famille des *Dictyotaceae* se distinguent par une production riche en métabolites secondaires : avec plus de 500 molécules, elles représentent en effet près d'un tiers des composés décrits dans cette classe d'organismes [30]. Ces métabolites sont majoritairement des terpènes qui peuvent être classés en deux groupes :

- a) les terpènes "*sensu stricto*" désignant des composés dont la formule générale découle de $(C_5H_8)_n$, et qui sont constitués d'une ou plusieurs unités isopréniques. Ces

substances sont obtenues à partir du métabolisme des précurseurs bien définis. En fonction du nombre de ces unités, on note [31] :

- ✓ les monoterpènes (C10) dérivant du géranyl pyrophosphate (GPP).
- ✓ les sesquiterpènes (C15) provenant du farnésyl pyrophosphate (FPP).
- ✓ les diterpènes (C20) ayant comme précurseur le géranylgeranyl diphosphate (GGPP).
- ✓ les sesterpènes (C25) dérivant du géranylfarnésyl pyrophosphate (GFPP).
- ✓ les triterpènes (C30), les tétraterpènes et caroténoïdes (C40).

b) les terpènes à biogenèse mixte dites "méroterpènes" comprenant un noyau méthylhydroquinonique plus ou moins substitué sur lequel est fixée une chaîne latérale terpénique souvent oxygénée. Dans cette classe, on distingue pour les *Dictyotaceae* les méroditerpènes et les mérosesquiterpènes. Ces composés pouvant être linéaires (chaîne latérale terpénique linéaire), cyclisés (chaîne latérale contenant un ou plusieurs cycles carbonés).

Les algues brunes peuvent renfermer des structures terpéniques halogénées du fait de la présence d'halopéroxydase (enzyme impliquée dans les réactions d'halogénéation) [32-36].

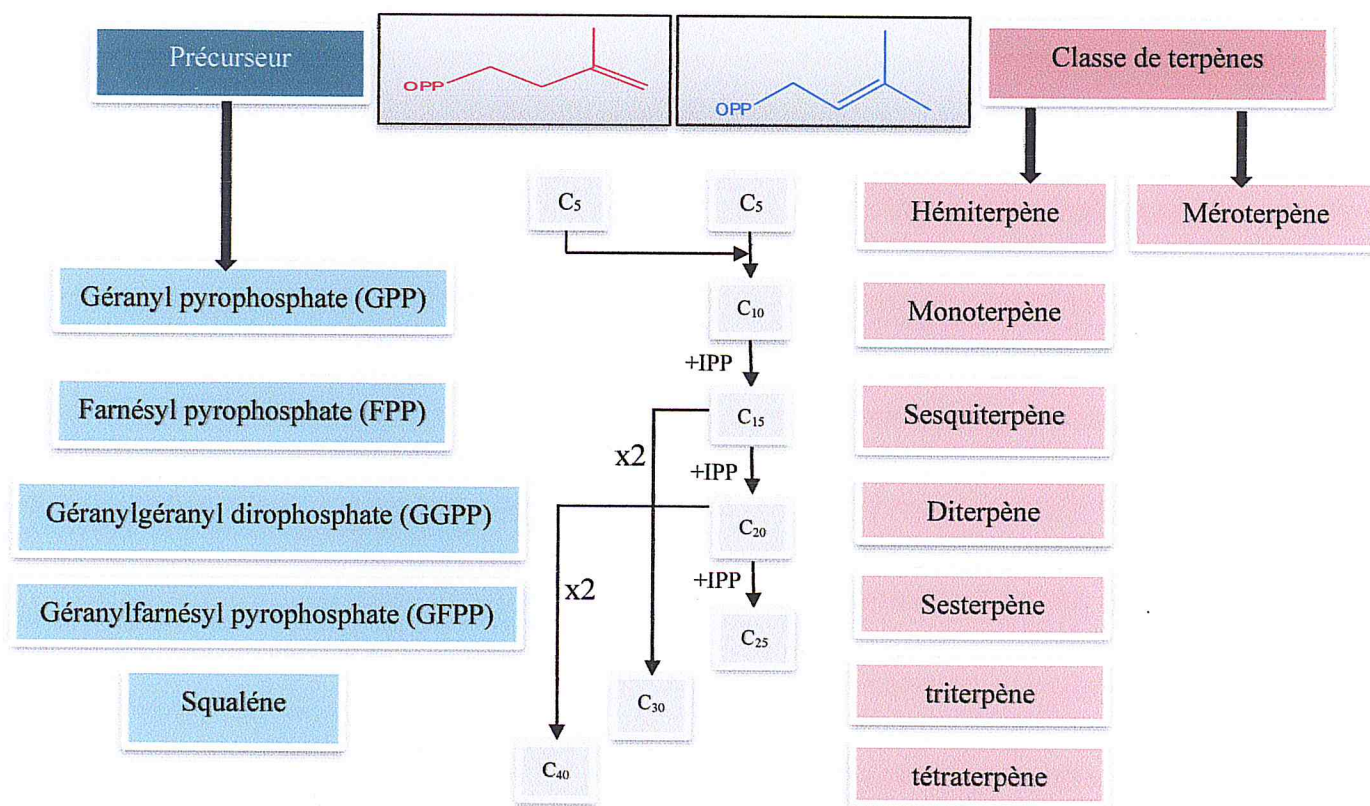


Figure I.2 : Description des différentes classes de terpène (IPP= Isopentényl-pyrophosphate).

I.2.3 Composés volatiles des algues brunes

Les algues brunes produisent des dérivés volatils dont la nature chimique et la fonction biologique sont différentes de celles des algues rouges [37]. Ce sont des hydrocarbures à 11 atomes de carbone sans halogènes qui sont classés selon leur structure chimique en quatre groupes :

- a) dérivés du cyclopropane.
- b) dérivés du cyclopentène.
- c) dérivés du cycloheptadiène.
- d) les oléfines acycliques [38].

Le seul hydrocarbure volatile à huit atomes de carbone identifié dans les algues brunes est le fucoserratene [39]. Ces produits sont connus chez toutes les espèces des phéophycées qui ne sont pas spécifiques d'un ordre ou d'une famille.

I.2.4 Composition chimique des espèces du genre *Dictyopteris*

En 1966, Moore [40] a découvert la seule substance volatile qui est le sulfure de diméthyle d'une l'algue brune *Dictyopteris plagiogramma* de Hawaii, ou il a isolé des composés non-isoprénoïdes à onze atomes de carbones. Il s'agit des dictyopterènes A, B, C' (dictyotene), D' (ectocarpene), ainsi qu'en plus faible quantité des isomères de l'undéca-1, 3,5-triène et de l'undéca-1, 3, 5,8-tétraène (planche 1). Soulignons que les undécatriènes sont très appréciés en parfumerie pour leur odeur 'verte' caractéristique. Ce sont les constituants majeurs de l'essence de *galbanum*, qui par ses propriétés olfactives est à l'origine des parfums actuels à note verte [41].

I. Flament (1984) [42], à rapporter que la *Dictyopteris divaricata* du Japon, renferme un mélange intéressant des sesquiterpènes du type cadinène (Planche 2).

Une étude plus récente de l'espèce *Dictyopteris membranacea* récoltée sur les côtes méditerranéennes Françaises (Ville-Franche sur mer) a montré que l'extrait obtenu par un mélange de solvants méthanol-chloroforme (1/1, v/v) contient les polyènes et acides gras, et une grande quantité d'un produit soufré, la 3-hexyl-4,5- dithia-cycloheptanone [43] (planche 3).

I.2.5 Hydrocarbures soufrés du genre *Dictyopteris*

Les espèces du genre *Dictyopteris* renferment une grande quantité d'hydrocarbures soufrés en C-11 (planche 4) [44, 45], l'espèce *Dictyopteris membranacea* de la méditerranée

renferme jusqu'à 0,1 % de produits soufrés par masse d'algue sèche. La biosynthèse des hydrocarbures soufrés utilise, l'acide arachidonique comme précurseur.

I.3 Présentation de l'espèce *Dictyopteris membranacea*

I.3.1 Etude taxonomique et systématique de l'espèce

Cette algue est souvent répertoriée dans les guides sous le nom de *Dictyopteris membranacea* (Stackhouse) Batters 1902 [45,46].

D'autres appellations ont été aussi utilisées dans des travaux antérieurs, on note :

Fucus membranaceus Stackhouse 1795 [47,48].

Ulva polypodioides A.P. de Candolle 1805 [49].

Fucus ambiguus Clemente 1807 [50].

Polypodoidea membranacea Stackhouse 1809 [51].

Haliseris polypodioides (A.P. de Candolle) C. Agardh 1820 [52].

Dictyopteris punctata Noda 1973 [53].

Dictyopteris ambigua (Clemente) Cremades 1990 [54].

Dictyopteris polypodioides Lamouroux [47,48].

Tableau I.2 : Position systématique de l'espèce *Dictyopteris membranacea*.

Classement	Nom
Embranchement	<i>Phaeophycophyta</i> (<i>Chromophytes</i>)
Classe	<i>Phéophycées ou Fucophycées,</i>
Ordre	<i>Dictyotales.</i>
Famille	<i>Dictyotacées.</i>
Genre	<i>Dictyopteris.</i>
Espèce	<i>membranacea Batters.</i>

I.3.2 Description morphologique

Les espèces appartenant au genre *Dictyopteris* présentent une grande diversité morphologique même si pour la plupart d'entre-eux un thalle long, aplati (rubané) en forme de lanières est observé, ayant une couleur brun verdâtre plus ou moins translucide, à division pseudodichotomiques, Il peut atteindre 30 cm de longueur et 3 à 20 cm d'envergure. Il se ramifie en rubans (ou lanières) de 2 à 10 mm de large, formés d'une nervure membraneuse polystromatique (à plusieurs couches de cellules, ici 2 à 3).

Cette algue est fixée au substrat par un disque basal épais formé par de petits filaments allongés (rhizoïdes) enchevêtrés. A sa base, juste au-dessus du disque de fixation, le thalle est souvent réduit à la nervure centrale épaissie (figure 3).

Dès l'arrivée de l'été, cette algue change d'apparence, avec des fondes qui s'amenuisent autour de leur nervure centrale, avec une membraneuse et fragile. Cette algue dégage une forte odeur caractéristique quand elle est hors de l'eau [46,55].



Figure I.3 : L'algue brune *Dictyopteris membranacea* [56].

I.3.3 Le développement et la reproduction de l'algue

La *Dictyopteris membranacea* se développe à travers une rangée de cellules apicales trouvées au sommet de chaque branche. Les branches sont constituées de 2-3 couches de cellules bien que, près de la veine, un plus grand nombre de couches soit visible. Les organes reproducteurs se développent également près de la veine, mais les individus fertiles sont difficiles à trouver. La génération sexuelle et la génération asexuée ont une forme similaire.

I.3.4 Informations complémentaires

Cette algue est récoltée à la main. Elle est utilisée comme aliment. Son action antibiotique est démontrée et elle constitue aussi un médicament populaire dans les pays méditerranéens (traitement de maladies respiratoires) [57].

I.3.5 Saisonnalité et distribution

La *Dictyopteris membranacea* est assez fréquente pendant les mois d'hiver et d'été, mais elle devient plus rare pendant l'automne. La distribution mondiale de l'espèce comprend la Méditerranée, l'océan Atlantique, l'océan Indien et l'océan Pacifique.

I.4 Activité antimicrobienne

I.4.1 Généralités

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car elles ne possèdent pas de membrane nucléaire. Ce caractère les distingue des autres organismes unicellulaires classés parmi les eucaryotes (champignons, algues, protozoaires). Elles sont divisées en bactéries proprement dites (*Bacteria*) et bactéries primitives (*Archaea*). Toutes les bactéries rencontrées en pathologie appartiennent aux *Bacteria*.

Elles ont généralement un diamètre inférieur à 1µm. On peut les voir au microscope optique, à l'état frais ou après coloration. Leur forme peut être sphérique (cocci), en bâtonnet (bacilles), incurvée (vibrions) ou spiralée (spirochètes). Les détails de leur structure ne sont visibles qu'en microscopie électronique [58].

I.4.2 Culture des bactéries

On utilise habituellement pour cultiver les bactéries des milieux complexes à base d'extraits ou d'hydrolysats enzymatiques de viandes. Ces milieux peuvent être liquides (bouillons) ou solides. La solidification des milieux est obtenue par l'addition de l'agar, un extrait d'algues qui a la propriété de fondre à l'ébullition et se solidifier à des températures inférieures à 40 °C.

En milieu liquide, les bactéries se dispersent librement et leur multiplication se traduit par un trouble, le plus souvent homogène. Sur un milieu solide, lorsque la quantité de bactéries est faible, chaque bactérie va pouvoir se multiplier sur place jusqu'à formation d'un amas de bactéries visible à l'œil nu, que l'on appelle colonie (Si la densité bactérienne est trop élevée dans l'échantillon ensemencé, les colonies sont confluentes et forment une nappe.). L'emploi de milieu solide permet ainsi le dénombrement des bactéries viables dans un échantillon [58].

I.4.3 Les principaux agents antimicrobien

I.4.3.1 Les antibiotiques

L'élimination des microorganismes pathogènes fait appel à des substances dites : antibiotiques. Ces derniers sont synthétisés par des microorganismes (le plus souvent des champignons). Ils ont la capacité soit de détruire les bactéries (effet bactéricide), ou d'inhiber leur croissance (effet bactériostatique) [59].

a) Classification des antibiotiques

Il existe plusieurs classifications des antibiotiques, elles sont basées sur le spectre d'action, la cible, ou la famille chimique. Cette dernière est la plus fréquemment rencontrée. Les principales familles chimiques des antibiotiques sont :

- ❖ **Bêta-lactamines** : pénicilline et céphalosporines.
- ❖ **Aminosides** : streptomycine, gentamycine ; chloramphénicol et thiamphénicol.
- ❖ **Cyclines** : tétracyclines, doxycycline.
- ❖ **Macrolides et apparentés** : érythromycine, oléandomycine [60].

I.4.3.2 Les composés phénoliques

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont été focalisées sur l'évaluation des propriétés antimicrobienne des polyphénols. A l'heure actuelle, cet effet est certain et démontré par de nombreuses recherches expérimentaux. Les études du pouvoir inhibiteur des flavonoïdes sur la croissance bactérienne ont démontré que de nombreux composés flavonoïques (apigénine, kaempférol et d'autres) sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram négatif (*Escherichia Coli*) et Gram positif (*Staphylococcus Aureus*) [61].

A titre d'exemple, une flavone et une flavanone, respectivement isolés des fruits de *Terminalia Bellerica* et de l'arbuste *Eysenhardtia Texana* ont montré une activité contre le microbe pathogène opportuniste *Candida Albicans* [62]. Deux autres flavones isolés de la plante *Artemisia Girdaldi* ont exhibé une activité contre l'espèce *Aspergillus Flavus* une espèce de mycète qui cause la maladie envahissante chez les patients immunosuppresseifs [63].

I.4.3.3 Les huiles essentielles

Depuis l'Antiquité, les extraits aromatiques des plantes ont été utilisés dans différentes formulations, comme pour les médicaments et la parfumerie [64]. Les huiles essentielles ont été considérées comme les agents antimicrobiens les plus efficaces par rapport aux extraits lipidiques.

L'activité antimicrobienne des HE a fait l'objet d'un grand nombre de publications à l'échelle mondiale. Cependant, la majorité des travaux cités dans ces publications s'arrêtent au niveau de la mise en évidence de leur activité antimicrobienne. Les études sur les mécanismes d'action de cette activité sont en nombre négligeable. Jusqu'à présent, il n'existe pas d'étude pouvant nous donner une idée claire et précise sur le mode d'action des HE. Etant donné la complexité de leur composition chimique, laisse à penser que ce mode

d'action est assez difficile à cerner du point de vue moléculaire. Il est très probable que chacun des constituants des HE(s) ait son propre mécanisme d'action.

D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases :

- Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie [65].

I.4.4 Description de quelques bactéries

I.4.4.1 *Escherichia Coli*

Escherichia Coli est un bacille à Gram négatif [66], de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 μm , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 μm [67].

Ces bactéries constituent la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Certaines souches sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'homme ou chez certaines espèces animales des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore des méningites néonatales. D'autres souches appartiennent à la flore commensale peuvent être responsables d'infections opportunistes variées, surtout chez les sujets aux défenses immunitaires affaiblies [66].

I.4.4.2 *Staphylococcus Aureus*

Les espèces *Staphylococcus Aureus* sont des cocci à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1 μm . Elles sont regroupées en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Ce type de bactéries sont immobiles, sporulés, habituellement sans capsule. De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* produisent un pigment jaune doré [66]. Cette bactérie est la cause de plusieurs maladies comme la méningite, l'ostéomyélite et la diarrhée [68].

I.4.4.3 *Pseudomonas Aeruginosa*

Les espèces *Pseudomonas Aeruginosa* sont des bacilles à Gram négatif, ces bactéries fines sont de 1.5 à 3 μm de long et 0.5 à 0.8 μm de largeur. Elles sont mobiles grâce à une ciliature de type polaire monotriche, ce type de bactéries possède un aspect de « vol moucheron ».

Ces bactéries ne forme ni spores ni sphéropastes. Elles sont responsables de 10 % de l'ensemble des infections nosocomiales, occupant le troisième rang après *E. Coli* et *S. Aureus*, mais le premier rang pour les infections pulmonaires basses et le troisième rang pour les infections urinaires [69].

I.4.4.4 *Candida Albicans*

Actuellement, le genre *Candida* comprend 81 espèces de champignons levuri formes. Cette levure est la plus souvent l'origine de la plupart des manifestations pathologiques chez l'homme. On la rencontre habituellement, à l'état saprophytique, dans le tube digestif de l'homme et, par contiguïté, elle peut être retrouvée au niveau de la muqueuse vulvo-vaginal, (ou de la bouche). Mais exceptionnellement pas au niveau de la peau. Cette espèce est responsable de plus de 80 % des infections connues sous le terme de candidose, comme les infections superficielles cutanées, infections superficielles muco-cutanées [70].

I.4.4.5 *Aspergillus Sp*

Ce Sont des espèces fongiques les plus communes qui sont capables de produire des mycotoxines dans les produits alimentaires. Les mycotoxines sont connues pour être une cause puissante capable de produire un cancer hépatique chez les animaux et les humains. La présence et la croissance des champignons peuvent entraîner la détérioration et la réduction de la qualité et la quantité des aliments [71].

Dans différentes parties du monde, il y a une inquiétude croissante au sujet de la contamination des aliments, l'exposition environnementale et professionnelle aux spores fongiques de différentes espèces, en particulier à l'aflatoxine produit par ces espèces fongiques comme le cas d'*A. flavus* et *A. niger* [72] ; qui sont des *ascomycète* filamenteux ayant une distribution ubiquitaire dans l'environnement. Ils sont connus par leur implication dans les infections opportunistes humaines. Le mode de la transmission principal aux humains est par l'inhalation des conidies [72]. En plus de l'inhalation, une voie secondaire de transmission a été rapportée soit par contact avec la peau ou à travers une blessure [73].

I.4.5 Méthodologie des tests antibactériens

Pour évaluer cette activité, deux différentes méthodes sont généralement utilisés :

- La méthode de diffusion de disque.
- La méthode de microdilution en milieu liquide pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI).

I.4.5.1 Méthode de diffusion de disques

Cette méthode est aussi appelée méthode de l'aromatogramme, ou technique de L'antibioaromatogramme [74]. Bien qu'elle soit reconnue comme fiable et reproductible, elle est surtout utilisée en étape préliminaire à des études plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs. Elle consiste à utiliser des disques de papier imprégné des différentes substances à tester. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Chaque antibiotique ou substance diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine une zone d'inhibition en fonction de la concentration de l'antibiotique ou de la substance. Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'antibiotique suffisante pour inhiber leur croissance. On observe ainsi autour des disques une zone circulaire indemne de colonies, appelée zone d'inhibition (Fig I.4).

Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'antibiotique. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante.

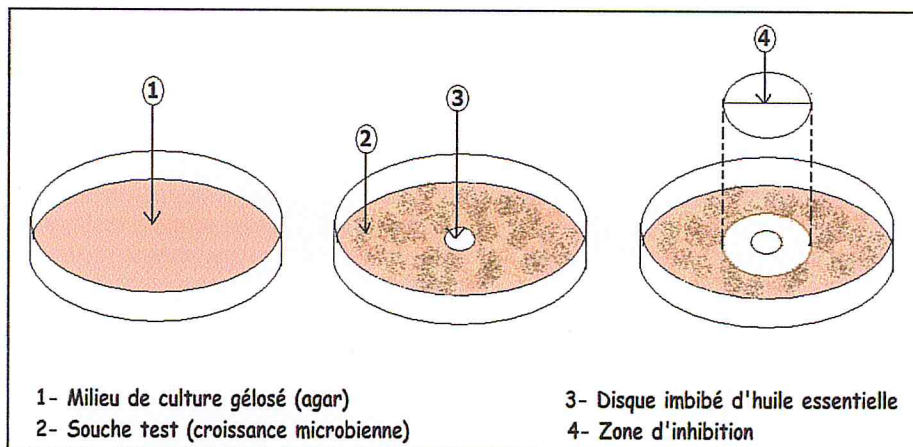


Figure I.4 : Représentation de la méthode de diffusion de disque [75].

I.4.4.2 Technique de micro-dilution en milieu liquide

Le but des méthodes de dilution en bouillon et en gélose est de déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien qui inhibe la croissance de la bactérie testée.

a) Dilution en bouillon

La dilution en bouillon est une technique dans laquelle une suspension bactérienne (à une concentration optimale ou appropriée prédéterminée) est testée contre des concentrations variables d'un agent antimicrobien dans un milieu liquide. La méthode de dilution en bouillon peut être effectuée dans des tubes contenant un volume minimum de 2

mL (macro-dilution) ou dans de plus petits volumes à l'aide de plaques de micro-titration (micro-dilution) [76].

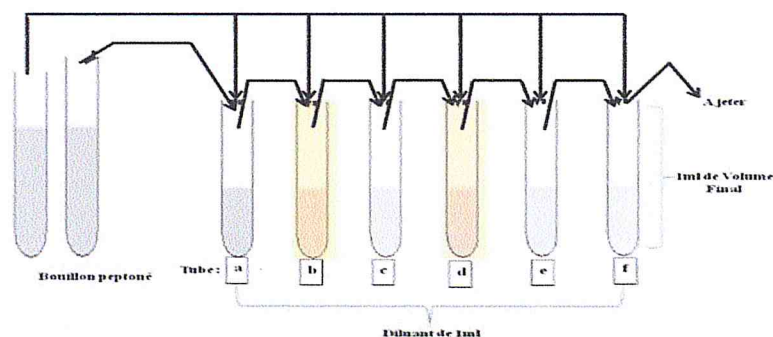


Figure I.5 : Représentation de la méthode de dilution en bouillon [77].

b) Dilution en gélose

La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antimicrobien dans un milieu gélosé à des concentrations variables, en général une dilution en série de 2 en 2, suivie de l'ensemencement d'un *inoculum* bactérien défini à la surface de la gélose de la boîte [78].

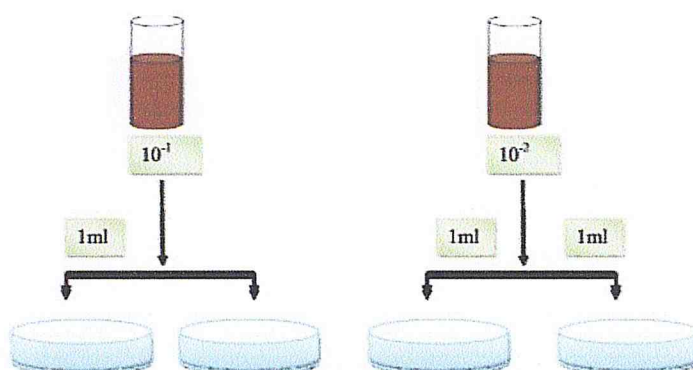


Figure I.6 : Représentation de la méthode de dilution en gélose [79].

I.4.6 Activité antimicrobienne de l'huile essentielle et extrait lipidique de *Dictyopteris membranacea*

Le milieu marin et les organismes qui l'habitent constituent une source infinie de molécules bioactives [80,81]. Ces composés sont synthétisés par des différentes voies métaboliques de celles observées en milieu terrestre. Parmi les organismes marins, les algues, qui sont habituellement attachées à un substrat, développent des mécanismes de défense chimique pour prévenir la colonisation par d'autres espèces, y compris les

microorganismes [82,83]. Egalement, de nombreux travaux [84] ont montré l'activité biologique des extraits de métabolites dérivés de macroalgues. En effet, l'utilisation des algues marines à des fins thérapeutiques est loin d'être un phénomène nouveau, leur utilisation ancestrale est répertoriée dans de nombreux travaux [85].

Des travaux antérieurs sur l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Dictyopteris membranacea*, sur un certain nombre de souches avec une concentration de 0.015 µg/disk, a montré une absence d'activité contre toutes les souches à l'exception de la *Pseudomonas aeruginosa* [86]. Deplus, les extraits de chloroforme et d'acétate d'éthyle ont montré un spectre plus large d'activité antimicrobienne contre des souches bactériennes et fongiques par rapport à l'extrait aqueux, qui était actif uniquement contre les bactéries. En générale, les bactéries à Gram-positives étaient plus sensibles que les Gram négative vis-à-vis de l'extrait aqueux de *D. membranacea* [87]. Les extraits d'algues brunes marines ont été signalés comme présentant une activité antibactérienne [88,89] et activité antimicrobienne [90-92].

Etahiri et al. (2001)[92] ont rapporté que les extraits ou les substances dérivées des algues ont une activité antibactérienne contre les souches de *Staphylococcus aureus*. En outre, les chercheurs ont signalé que les terpènes à très faibles concentrations isolées des algues brunes ont une activité importante contre *S. aureus* [93].

D'autre travaux sur l'activité antifongique de l'extrait de *Dictyopteris membranacea* ainsi que ceux de deux autres espèces (*Cystoseira mediterranea* et *Cystoseira myrica*) d'algues brunes ont montré l'absence d'activité antifongique [89].

I.5 Définition des nanoémulsions

Les nanoémulsions sont une sous-classe d'émulsions dont le diamètre est compris dans une gamme « nanométrique ». Cependant, il n'y a pas encore de consensus dans la littérature pour définir précisément cette gamme, qui peut varier fortement : 10 à 100 nm [94, 95], 20 à 200 nm [95-98] ou encore 100 à 1000 nm [99]. Nous retiendrons ici la définition de Solans *et al.* [96], soit un diamètre compris entre 20 et 200 nm. Ce sont des systèmes thermodynamiquement instables.

Elles sont quasiment transparentes [95]. Mais les solutions dont le diamètre de gouttelettes est proche de 100 nm sont troubles, et plus le diamètre augmente plus les solutions deviennent opaques. Cette caractéristique optique permet donc d'évaluer la stabilité des nano-émulsions par un simple contrôle visuel.

I.5.1 Avantages et inconvénients des nanoémulsions

a- Les avantages

- Aide à la dissolution du médicament lipophile.
- Fournit une forme galénique aqueuse pour des médicaments insolubles dans l'eau.
- Augmente la biodisponibilité.
- Pénétration rapide et efficace du fragment de médicament.
- L'utilisation de Nano-émulsion comme systèmes de délivrance peut améliorer l'efficacité d'un médicament, Ce qui permet de réduire la dose totale et donc de minimiser les effets secondaires.
- Le faible diamètre des nanoémulsions rend possible une stérilisation des solutions par filtration sur des membranes dont les pores font 0,22 µm. Une telle taille de pores permet d'éliminer toute contamination de la solution par des microorganismes [100]. Cette technique est plus simple à mettre en œuvre que l'irradiation et moins déstabilisante que la stérilisation par la chaleur.

b- Les inconvénients

- Utilisation d'une concentration importante de tensioactif et de Co-tensioactif est nécessaire pour leur stabilisation.
- Capacité de solubilisation limitée pour les substances à haut point de fusion.
- La stabilité de la nano-émulsion est influencée par des paramètres environnementaux tels que la température et le pH.

I.5.2 Techniques de préparation des nanoémulsions

Les techniques permettant d'obtenir des nanoémulsions sont peu nombreuses. Elles peuvent être classées en deux catégories : les techniques à basse énergie et les techniques à haute énergie (Annexe 1).

I.5.3 Application de la nanoémulsion

- ❖ Industrie cosmétique : comme les crèmes, les shampooings, les déodorants.
- ❖ Dans l'agroalimentaire pour augmenter l'onctuosité de certains produits, permettant ainsi d'obtenir une texture particulière. Les principaux émulsifiants utilisés dans l'industrie agro-alimentaire sont :
 - La lécithine naturelle, notamment en chocolaterie.
 - les mono et di-glycérides d'acides gras alimentaires que l'on retrouve en particulier dans les glaces et les brioches industrielles.

- ❖ L'industrie pharmaceutique : pour l'encapsulation des principes actifs, grâce aux émulsions doubles eau-huile-eau, permettant par exemple de délivrer des substances, avec une grande précision spatiale. Facilitant ainsi la distribution de certains médicaments dans l'organisme (ex : pour diminuer la toxicité rénale de l'Amphotéricine B).

I.6 L'effet des nanoémulsions sur l'activité antimicrobienne

Il est bien connu que les agents antimicrobiens naturels comme (Les huiles essentielles ou leurs Composés) sont largement utilisées pour la conservation d'une large gamme de produits. Cependant la majorité d'entre eux sont hydrophobe (i.e. insoluble dans l'eau), ce qui nécessite l'application de concentration plus élevée de ces composés afin d'avoir un bon effet antimicrobien. On opérant avec des concentrations élevée ça revient couteux, et peut donner un effet sensoriel négatif sur l'aliment dans le cas où le produit est utilisé comme un conservateur alimentaire. Pour remédier à ce problème, une large gamme d'agents antimicrobiens hydrophobes a été encapsulée dans des nano-émulsions et les chercheurs ont découvert qu'après l'encapsulation, cet effet a augmenté par rapport aux produits non encapsulés [101].

Donsi et al [102], ont préparé des nano-émulsions à base de D-limonène, et un mélange de terpènes par la méthode d'homogénéisation à haute pression. Ils ont rapporté que l'activité antimicrobienne sur *Echerichia Coli*, *Lactobacillus Delbrueckii* et *Saccharomyces Cerevisiae* des produits à augmenter après l'encapsulation. La CMI et MBC des deux nanoémulsions étaient plus faibles que les huiles essentielles non encapsulées, et cette augmentation était directement liée aux fines tailles des gouttelettes.

Chapitre II :

Partie expérimentale

Les algues fraîchement récoltées, ont été soumises à un tri manuel afin d'éliminer les différents épiphytes (organismes capables de contaminer la nature chimique des extraits) qui consistent souvent en des algues ou d'autres organismes animaux. Elles ont été séchées dans un endroit sec et aéré et à l'abri du soleil, et conservée à l'état sec dans des sacs propres.



Figure II.2 : Photo de l'algue brune *Dictyopteris membranacea*.

II.2 Extraction de la fraction volatile et de l'huile essentielle de *Dictyopteris membranacea*

II.2.1 Extraction de la fraction volatile à partir de l'extrait brut

a. Préparation de l'extrait brut.

L'extrait a été préparé par macération dans l'éther diéthylique à une température ambiante pendant deux semaines. L'algue a été extraite deux fois afin de l'épuiser au maximum, les miscellas (solvant + extrait) ont été regroupés. L'extraction a été suivie d'une filtration et évaporation du solvant à une température de 40°C.

L'extrait obtenu été pesé, afin de calculer le rendement, ensuite stocké à l'obscurité à 4°C.

b. Extraction de la fraction volatile

L'extraction consiste à faire subir à une masse d'extrait un entraînement à la vapeur d'eau avec un montage de Dean-Stark modifié. Ce dernier est placé dans un ballon d'1l rempli à 2/3 d'eau et chauffé à ébullition. La vapeur formée pénètre à travers la tubulure du système de Dean-Stark modifié (contenant l'extrait brut) et provoque l'entraînement à la vapeur d'eau de la fraction volatile sous forme d'un mélange d'hétéroazéotrope. Les vapeurs chargées en composées volatile sont condensées dans le réfrigèrent et le mélange eau-fraction volatile (hydrolat) est récupéré dans un bécher (Fig II.3).

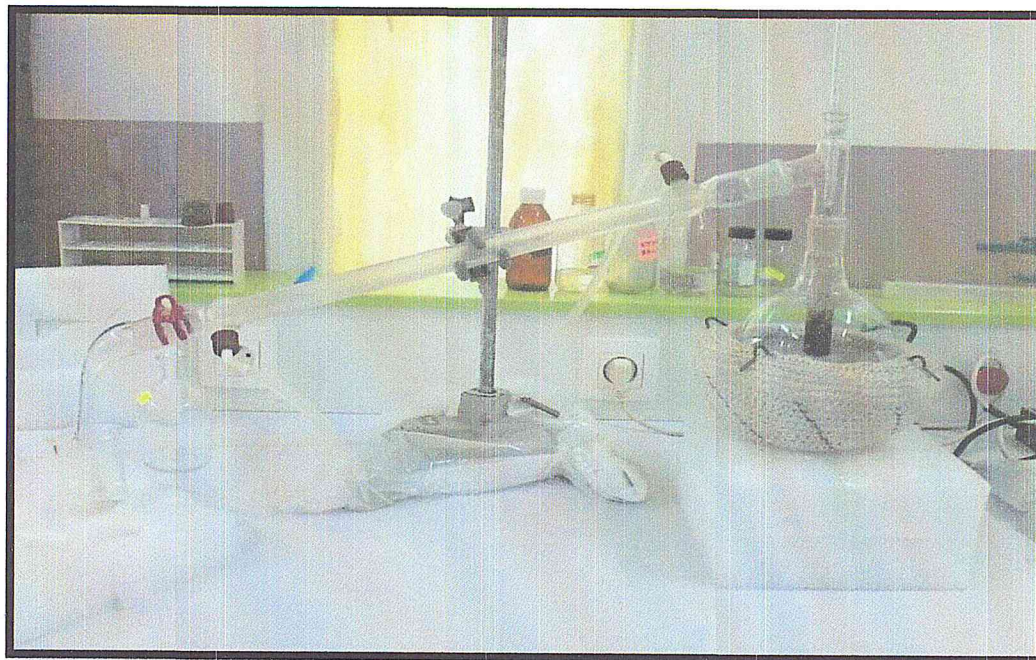


Figure II.3 : Entraînement à la vapeur d'eau de l'extrait brut à l'aide du montage de Dean-Starck.

L'hydrolat ainsi obtenu est soumis à une extraction liquide-liquide avec l'éther diéthylique afin de récupérer la fraction volatile. En effet, deux phases sont obtenues : une phase étherée supérieure contenant la fraction volatile et une phase aqueuse inférieure contenant l'eau et produits hydrosolubles.

La phase aqueuse est extraite deux à trois fois avec l'éther afin d'épuiser complètement la fraction volatile, les phases étherées récupérées sont regroupées et filtrée puis séchée sur du sulfate de magnésium ($MgSO_4$) pour éliminer toute traces d'eau et enfin distillées à $40^\circ C$.

La fraction volatile ainsi obtenue est mise dans un flacon propre hermétiquement fermé et conservée à $4^\circ C$ pour des analyses ultérieures.



Figure II.4 : Flacons de fraction volatile de *Dictyopteris membranacea*.

II.2.2 Préparation de l'huile essentielle de *Dictyopteris membranacea*

L'extraction de l'huile essentielle de *Dictyopteris membranacea* a été réalisée par entraînement à la vapeur d'eau avec un montage à l'échelle du laboratoire (Fig II.5), comprenant un ballon rempli au deux tiers d'eau et surmonté d'une ampoule à décanter (jouant le rôle d'alambic) contenant une masse de 200 g d'algue. Cet ensemble est porté à ébullition pendant 3 heures, les vapeurs formées traversent la matière végétale et font éclater les cellules ce qui engendre la libération de l'huile essentielle. Cette dernière est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange (eau + huile essentielle). La vapeur chargée de produits aromatiques se condense à son arrivée au niveau du réfrigérant, elle retombe se forme de gouttelettes dans l'erlenmeyer (Mélange HE/Eau).



Figure II.5 : Dispositif expérimental d'entraînement à la vapeur d'eau de l'HE.

Le mélange immiscible eau-huile essentielle est traité par l'éther diéthylique en utilisant une ampoule à décanter. Le mélange se sépare en deux phases distinctes :

- Une phase organique contenant l'huile essentielle solubilisée dans l'éther diéthylique en haut
- Une phase aqueuse formée d'eau et de quelques traces d'huile essentielle soluble dans l'eau, la phase aqueuse a subi une deuxième extraction avec l'éther diéthylique distillé pour épuiser au maximum l'huile essentielle.

Les phases organiques obtenues ont été regroupées et filtrées sur le sulfate de magnésium ($Mg SO_4$).

Enfin, on procède à l'évaporation de l'éther en utilisant l'évaporateur rotatif à 40 °C.

L'huile essentielle ainsi obtenue a été mise dans un flacon propre hermétiquement fermé et conservé au frais à 4 °C.



Figure II.6 : Flacons de-huile essentielle de *Dictyopteris membranacea*.

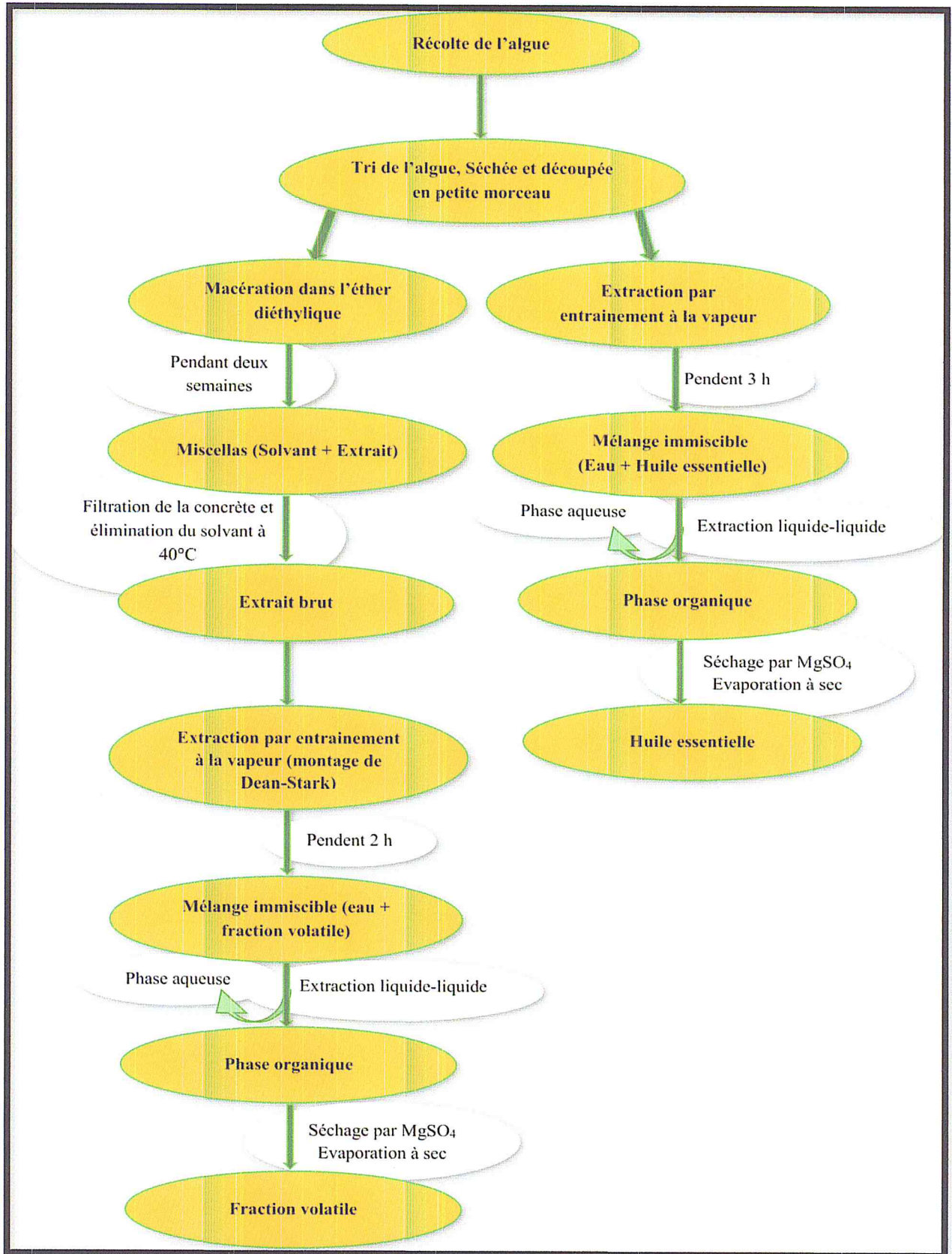


Figure II.7 : Méthodologie expérimentale du travail.

II.3 Analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse de la fraction volatile et de l'huile essentielle de *Dictyopteris membranacea*

a. Description de l'appareil

L'analyse qualitative de la fraction volatile et l'huile essentielle été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse « CG-SM ». L'identification des différents composés est effectuée en se basant sur les banques de données spectrales (Wiley 7n et NBS 75k.1). Avec un taux de similitude supérieure ou égal à 90 %.

b. Conditions opératoires

L'analyse est effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse HP 6800 couplée à un spectromètre de masse de type HP MSD 5973, dans les conditions suivantes :

✚ Injection

T injecteur = 250 °C.

Mode d'injection : Splitless (avec division) = 1/50.

Volume injecté = 1 µl.

✚ Colonne

HP5- MS30 m x 0.25 mm (Diamètre interne) x 0.25 µm (épaisseur du film).

T_{four} : 90(5') – 3°C/min-250(10°).

Débit du gaz vecteur = 5 ml/min.

✚ Détecteur de masse

Mode d'analyse : Scan (34 à 450 amu).

T_{interface} = 280 °C.

Type d'ionisation = Impact électronique (IE).

Type d'analyseur : Quadripôle.

T_{Quadripôle} = 250 °C.

T_{Source} = 230°C.

II.4 Préparation du D-limonène nanoémulsion

L'émulsification spontanée (ES) est une méthode à faible énergie qui est peu coûteuse et économe en énergie. La nano-émulsion a été préparée à partir d'un mélange d'une phase huileuse (D-limonène 4%) et de Tween 80 (6% ou 10%) et une phase aqueuse contenant de l'eau distillée et le propylène glycol dans un rapport de masse 2: 1. La phase huileuse a été ajoutée lentement à la phase aqueuse à l'aide d'une pipette pasteur avec une agitation douce. L'addition de la phase huileuse a été maintenue constante jusqu'à la formation de la nano-

émulsion, à la fin l'agitation a été maintenue pendant environ 2h afin de s'assurer que les deux phases se sont bien mélangées.

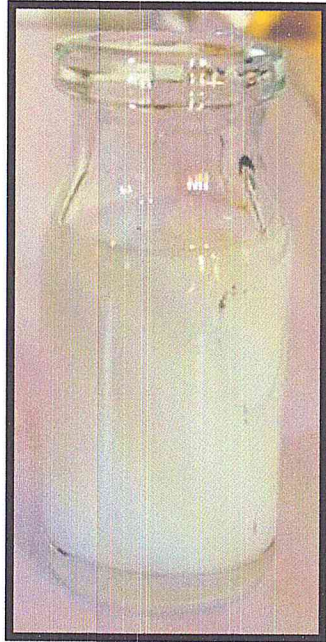


Figure II.8 : Flacons de D-limonène nanoémulsion (6% Tween 80).



Figure II.9 : Flacons de D-limonène nanoémulsion (10% Tween 80).

II.5 Evaluation de l'activité antibactérienne

II.5.1 Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice ou CMI est la plus petite concentration de l'agent bactérien ayant l'habilité d'inhiber la croissance des bactéries testés.

Cependant, la CMI ne représente pas toujours une valeur absolue. La « véritable » CMI est un point entre la plus basse concentration qui empêche la croissance de la bactérie et la concentration inférieure immédiate.

II.5.1.1 Microorganismes utilisés

Les souches de références utilisées pour les tests bactériens sont :

- ✓ Bactéries Gram (+) : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*.
- ✓ Bactéries Gram (-) : *Escherichia coli*.

Ces souches sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance.

Tableau II.1 : Souches utilisées dans le test antibactérien.

Souches	Gram	Références (ATCC)
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	ATCC 6538P™
<i>Bacillus cereus</i>	+	ATCC 14579™
<i>Escherichia coli</i>	-	ATCC 10536™

II.5.1.2 Repiquage des souches

Les souches bactériennes utilisées ont été ensemencés à l'aide d'une pipette pasteur sur des boites de Pétri de 90 mm contenant respectivement le milieu Mueller-Hinton solide. Ces boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 h.

II.5.1.3 Préparation et composition des milieux de culture

La plupart des bactéries peuvent être cultivées sur des milieux artificiels liquides ou solides. Les conditions permettant la croissance varient beaucoup selon la nature des bactéries. Il n'existe pas une condition de culture standard permettant la croissance de toutes les bactéries que l'on peut rencontrer en pathologie.

Le milieu de culture utilisé est International Streptomyces Project (ISP2) liquide. Il est préconisé par Shirling et Gottlieb [103], sa composition chimique est constituée de 4 g de glucose, 10 g d'extrait de malt, 4 g d'extrait de levure. Le tout est solubilisé dans 1000 ml d'eau distillée (Fig II.7).

Le pH du milieu est ajusté avant la stérilisation à 7.2 par la solution de NaOH 1M. La stérilisation du milieu est réalisée à l'autoclave pendant 20 min à 120 °C.

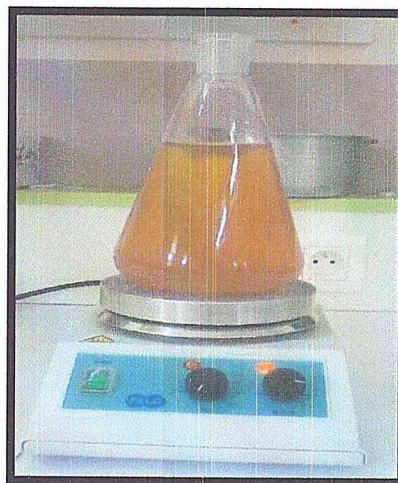


Figure II.10 : Préparation du milieu de culture.

II.5.1.4 Préparation de l'inoculum (pré-culture)

A l'aide d'une pipette pasteur quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes sont raclées et déchargées dans 100 ml de milieu de culture stérile, puis agiter quelques minutes et incuber dans un bain marie pendant 24 h à 37 °C.



Figure II.11 : solutions des pré-cultures.

II.5.1.5 Préparation des différentes concentrations des échantillons testés

Une série de sept tubes à hémolyse avec le milieu de culture liquide a été préparé. Le premier tube contenant 4 ml et les six autres 2 ml de la solution de culture.

Plusieurs échantillons (A, B, C, D) ont été testés, et une série de dilution a été réalisée pour chaque échantillon (Tableau II.2).

Tableaux II.2 : La gamme de concentration des échantillons.

Échantillons	Concentration $\mu\text{l/ml}$					
A, B et D	15	7.5	3.75	1.875	0.9375	0.46875
C	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3215

A : Fraction volatile, B : Huile essentielle, C : D-limonène, D : D-limonène nano-émulsion.

Il reste un tube témoin de croissance de la souche à tester. Enfin une quantité de la pré-culture (50 μ l/ml) est ajoutées dans chaque tube et incubée à 37 °C pendant 24 heures.

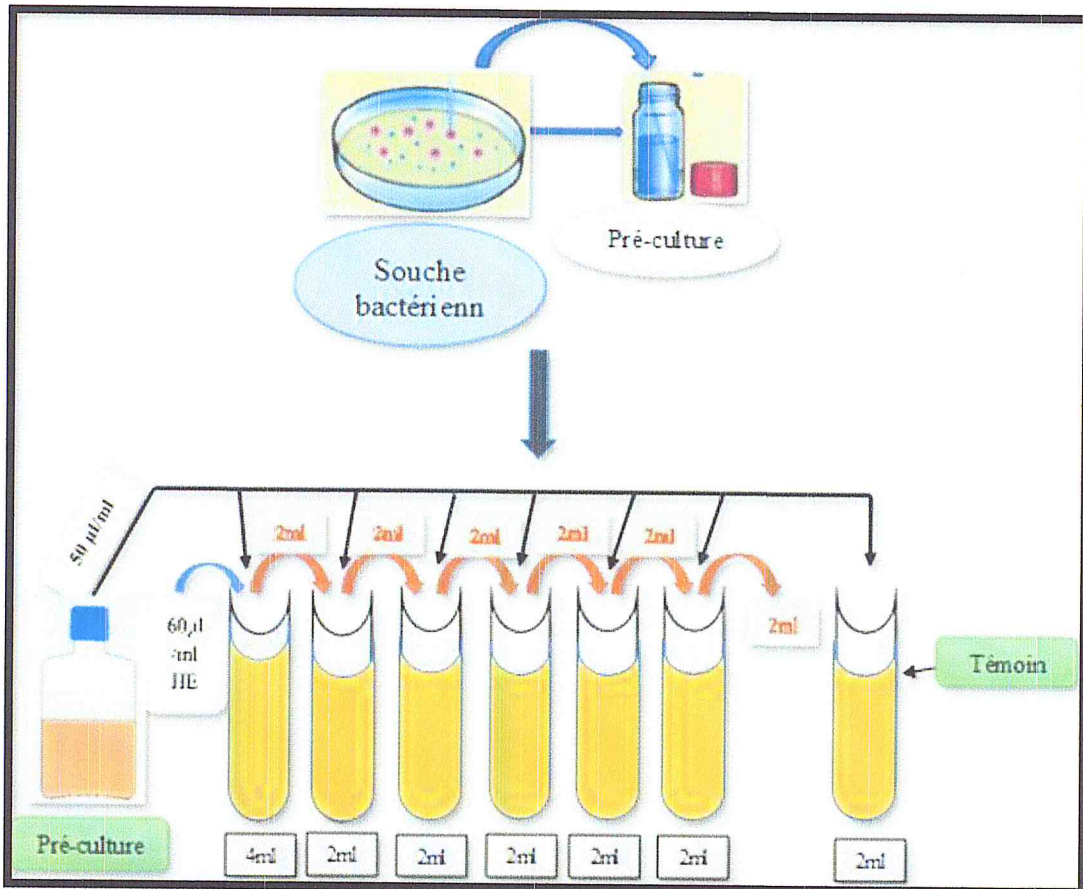


Figure II.12 : Représentation graphique de la méthode de microdilution des échantillons testés.

II.5.1.6 Lecture des résultats

Les résultats de la concentration minimale inhibitrice sont obtenus à partir des tubes pour lesquels il n'y a pas de croissance visible après 24 h d'incubation.

II.6 Résultats et discussion

II.6.1 Caractéristiques organoleptiques et rendement de l'extrait brut de *Dictyopteris membranacea*

Les propriétés organoleptiques constituent généralement une partie d'étude visant à analyser les facteurs qui affectent la qualité de l'huile essentielle et des extraits bruts. Les propriétés ont été effectuées en observant et en inhalant directement l'extrait brut, la fraction volatile et l'huile essentielle. Dans cette étude, trois critères ont été considérés pour évaluer la qualité organoleptique :

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

Les propriétés organoleptiques de l'extrait brut sont regroupées dans le tableau.

Tableau II.3 : Propriétés organoleptiques de l'extrait brut de *Dictyopteris membranacea*.

	Caractères organoleptiques		
	Aspect	Couleur	Odeur
Extrait brut	Pâteux	verdâtre	Caractéristique

Ces propriétés sont généralement celles de tous les extraits d'algues brunes. La couleur verte est liée à la présence de la chlorophylle qui masque la couleur jaune orange de la fucoxanthine [21].

❖ Rendement en extrait brut

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

$$R_{Ext}(\%) = (m_{Ext} / m_{MV}) \times 100$$

R_{Ext} : Rendement en extrait

m_{Ext} : Masse de l'extrait.

m_{MV} : Masse de l'algue sèche.

Le rendement en extrait obtenu dans cette étude est de 1%. Cette valeur représente la moyenne de deux manipulations.

La valeur du rendement est assez faible par rapport à d'autres algues brunes de la même famille bien que pour certaines espèces présentent des rendements similaires [104]. Les rendements d'extraits obtenus à partir de plantes terrestres sont dans la même gamme de valeurs [105].

II.6.2 Caractéristiques organoleptiques de fraction volatile et de l'huile essentielle de *Dictyopteris membranacea*

Les propriétés organoleptiques de la fraction volatile et l'huile essentielle sont regroupées dans le tableau II.4.

Tableau II.4 : Propriétés organoleptiques de fraction volatile et l'huile essentielle de *Dictyopteris membranacea*

	Caractères organoleptiques		
	Aspect	Couleur	Odeur
Fraction volatile	Liquide visqueux	Jaunâtre	Forte odeur Caractéristique
Huile essentielle	Huileux	Jaune-oronge	Forte odeur Caractéristique

❖ Rendement en fraction volatile et l'huile essentielle

Le rendement de fraction volatile ou l'huile essentielle est obtenu en utilisant la relation suivante :

$$R_{FV \text{ ou } HE}(\%) = (m_{FV \text{ ou } HE} / m_{MV}) \times 100$$

- $R_{FV \text{ ou } HE}(\%)$: Le rendement en fraction volatile ou huile essentielle en pourcentage.
- $m_{FV \text{ ou } HE}$: La masse de fraction volatile ou l'huile essentielle en gramme.
- m_{MV} : la masse de la matière végétale en gramme.

Au cours de cette étude le rendement moyen de la FV de *Dictyopteris membranacea* est de 8%. Et le rendement moyen de l'HE est de 10.77%. Cette dernière et plus importante en comparant avec la FV.

II.6.3 Analyse de la fraction volatile et huile essentielle par CG/SM

L'analyse par CG/SM dans les conditions citées auparavant (II.3) a permis l'identification des composés regroupés dans le tableau II.5 et le tableau II.6. Le profil chromatographique de la fraction volatile et l'huile essentielle sont présentées par les figures II.13 et II.18.

Tableau II.5 : Composition chimique de fraction volatile de l'algue brune
Dictyopteris membranacea.

N°	Tr (min)	Nom de produit	Formule chimique	% aire
1	8.74	Cyclopropane, 1-ethenyl-2-hexenyl-, [1.alpha.,2.beta.(E)] (Dictyoptérene A)	C ₁₁ H ₁₈	0.53
2	10.92	1-Decen-3-one	C ₁₀ H ₁₈ O	0.05
3	15.46	1-Hydroxyundecan-3-one	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	0.21
4	17.73	NI1	/	0.37
5	21.51	NI2	/	0.45
6	25.20	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl	C ₁₅ H ₂₄ O	0.69
7	26.00	2(4H)-Benzofuranone,5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	0.18
8	28.16	Globulol	C ₁₅ H ₂₆ O	0.08
9	28.51	Epiglobulol	C ₁₅ H ₂₆ O	0.18
10	29.14	Azulene,1,2,3,3a,4,5,6,7-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)	C ₁₅ H ₂₄	0.98
11	30.74	NI3	/	0.27
13	37.22	NI4	/	0.16
14	39.01	3-hexyl-4,5-dithia cycloheptanone	C ₁₆ H ₂₄ OS ₂	21.34
16	40.70	(3-oxo-undec-ènyl-) sulfure	C ₁₆ H ₂₄ OS	1.33
17	42.34	NI5	/	3.17
18	43.62	5,8,11,14-Eicosatétraénoic acid, ester méthylique	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	2.54
19	43.81	Eicosa-5,8,11,14,17-pentaénoate de méthyle	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	1.83

NI : non identifié

Tableau II.6 : Composition chimique de l'huile essentielle de l'algue brune
Dictyopteris membranacea.

N°	Tr (min)	Nom de produit	Formule chimique	% aire
1	8.75	Cyclopropane,1-ethenyl-2-hexenyl-, [1.alpha.,2.beta.(E)] (Dictyoptérene A)	C ₁₁ H ₁₈	0.84
2	10.92	6-Butyl-1,4-cycloheptadiene (Dictyoptérene C')	C ₁₁ H ₁₈	0.08
3	15.48	1-Hydroxyundecan-3-one	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	2.17
4	20.08	2-Allyl-1,3-dimethylbenzene	C ₁₁ H ₁₄	0.19
5	17.75	NI1	/	2.26
6	26.05	2(4H)-Benzofuranone,5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a- trimethyl-	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	1.49
7	28.57	Azulene,1,2,3,3a,4,5,6,7-octahydro-1,4-dimethyl-7- (1-methylethenyl	C ₁₅ H ₂₄	0.49
8	29.21	α-Cubébène	C ₁₅ H ₂₄	8.35
9	30.75	NI3	/	2.28
10	31.14	NI4	/	0.89
11	32.57	NI5	/	0.75
12	33.48	NI6	/	0.52
13	37.21	NI7		1.27
14	38.92	3 -hexyl -4,5 -dithia cycloheptanone	C ₁₆ H ₂₄ OS	39.03
15	39.00	(3-oxo-undec-ènyl-) sulfure	C ₁₆ H ₂₄ OS	1.81
16	40.70	NI7	/	5.93
17	43.55	5,8,11,14-Eicosatétraénoic acid, ester méthylique	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	1.02
18	43.74	Eicosa-5,8,11,14,17-pentaénoate de méthyle	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	0.73

NI : non identifié

Nous avons pu identifier avec exactitude 12 produits pour la fraction et 11 produits pour l'huile essentielle. Concernant les produits non identifiés, nous avons donné le rapport m/z ainsi que le pourcentage des principaux fragments de leur spectre de masse.

- Le rapport m/z des produits non identifiés et le pourcentage des principaux fragments de leur spectre de masse de fraction volatile :

NI1 : 41(35), 43(24), 55(100), 69(25), 83(26), 95(25), 109(14).

NI2 : 43(100), 55(20), 71(20), 83(15), 111(19), 126(20).

NI3 : 41(71), 86(100), 113(61), 198(29).

NI4 : 48(100), 57(28), 71(32), 169(24).

NI5 : 43(100), 55(81), 73(84), 129(32), 213(15), 256(15).

- Le rapport m/z des produits non identifiés et le pourcentage des principaux fragments de leur spectre de masse de l'huile essentielle :

NI1 : 41(33), 55(100), 69(25), 83(25), 95(25), 109(13), 139(11).

NI2 : 41(63), 58(53), 86(100), 113(64), 198(31).

NI3 : 41(211), 55(178), 71(212), 99(98), 114(100), 117(249), 198(130).

NI4 : 43(65), 55(100), 69(41), 139(84).

NI5 : 33(100), 55(90), 79(69), 91(65), 110(42), 122(51), 164(60), 206(42).

NI6 : 43(100), 57(26), 71(33), 141(16), 169(26).

NI7 : 41(44), 57(100), 67(40), 81(33), 95(34), 109(18), 234(31).

Le profil chromatographique de la fraction volatile et l'huile essentielle (Fig II.13 et II.18) révèle la présence de 19 pics de fraction volatile et 18 pics de l'huile essentielle. L'identification des différents composés est réalisée en se basant sur les banques de données spectrales ainsi que sur les données de la littérature [106]. Nous présentons dans le tableau II.5 et II.6 les produits identifiés avec l'ordre d'élution, le temps de rétention et la formule brute.

L'examen du tableau II.5 et II.6 montre que la composition chimique de fraction volatile et l'huile essentielle de *Dictyopteris membranacea* comporte quatre classes de produits qui sont successivement comme suite [107] :

Tr : 0 \longrightarrow 15min : Classe d'Hydrocarbure en C11.

15 \longrightarrow 30 min : Classe des Sesquiterpènes.

30 \longrightarrow 40 min : Classe de produits soufrés.

40 < : Classe des acide gras saturées et notamment insaturés.

Dans le présent travail, nous avons relevé que la fraction volatile ou l'huile essentielle est dominé par la classe des produite soufrés en termes de composés majeurs. Cette dernière (3-hexyl-4,5-dithia cycloheptanone) est largement majoritaire par rapport à tous les autres composés. La fraction en C11 est caractérisée par la présence des composés tels que dictyoptérène A, 1-Hydroxyundecan-3-one.

Cependant, nous avons noté la présence surprenante de la fraction des sesquiterpènes dans la fraction volatile et l'huile essentielle obtenue dans notre cas par entrainement à la vapeur en comparaison à un travail antérieur [106] effectué sur la même espèce qui était consacré à la comparaison de trois techniques d'extraction de la fraction volatile à partir de l'extrait éthéré : extraction par hydrodistillation, extraction par hydrodistillation assistée aux microondes et extraction aux fluides à l'état supercritique.

Nous avons notés la présence d'une fraction d'acide gras très caractéristique de la fraction volatile et l'huile essentielle des espèces du genre *Dictyopteris* [108].

Le nombre de composés non identifiés représente un pourcentage relativement élevé. Cet état de fait est dû notamment à la complexité de la composition chimique ou lié à des considérations écologiques marines.

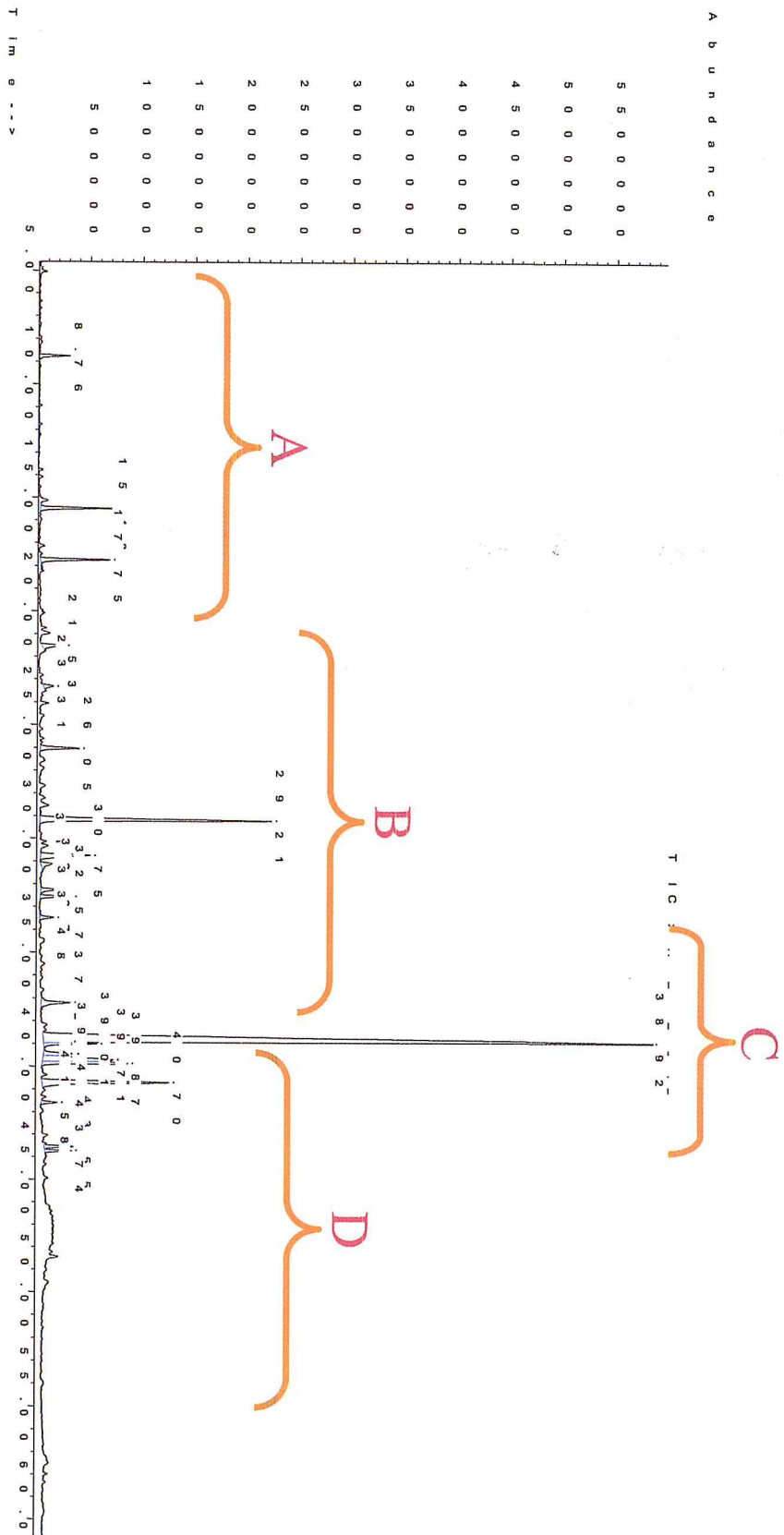


Figure II. 13 : Profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle de *Dictyopteris membranacea*

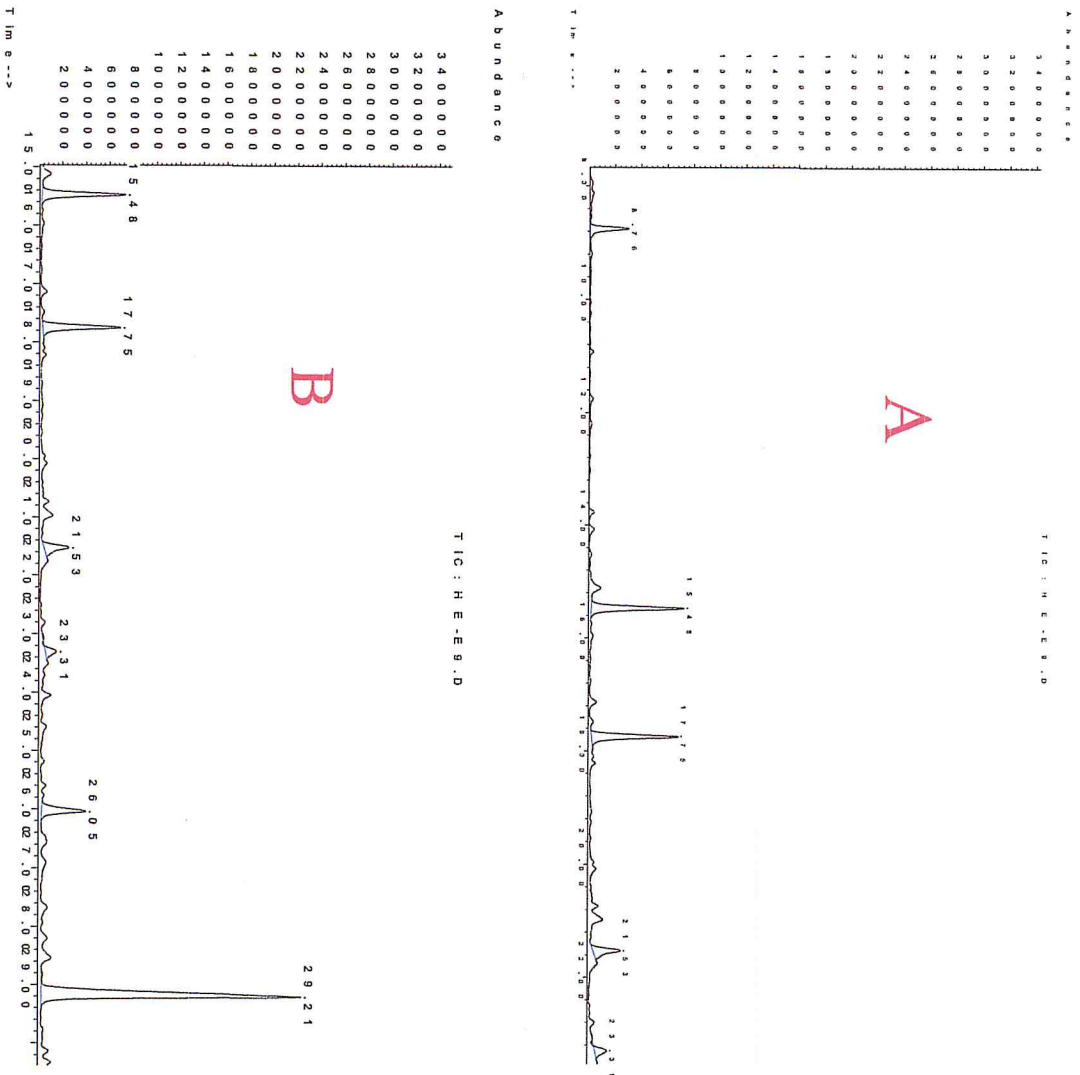


Figure II. 14 : Agrandissement des pics du chromatogramme de l'huile essentielle de *Diclyopteris membranacea* (partie A).

Figure II. 15 : Agrandissement des pics du chromatogramme de l'huile essentielle de *Diclyopteris membranacea* (Partie B).

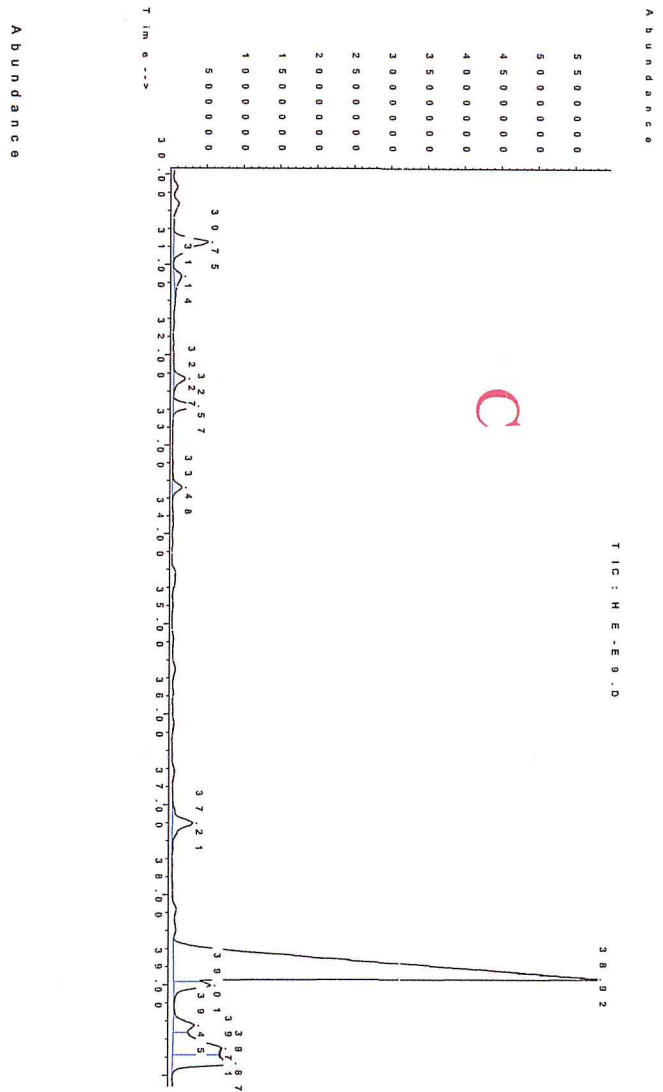


Figure II. 16 : Agrandissement des pics du chromatogramme de l'huile essentielle de *Dictyopteris membranacea* (Partie C).

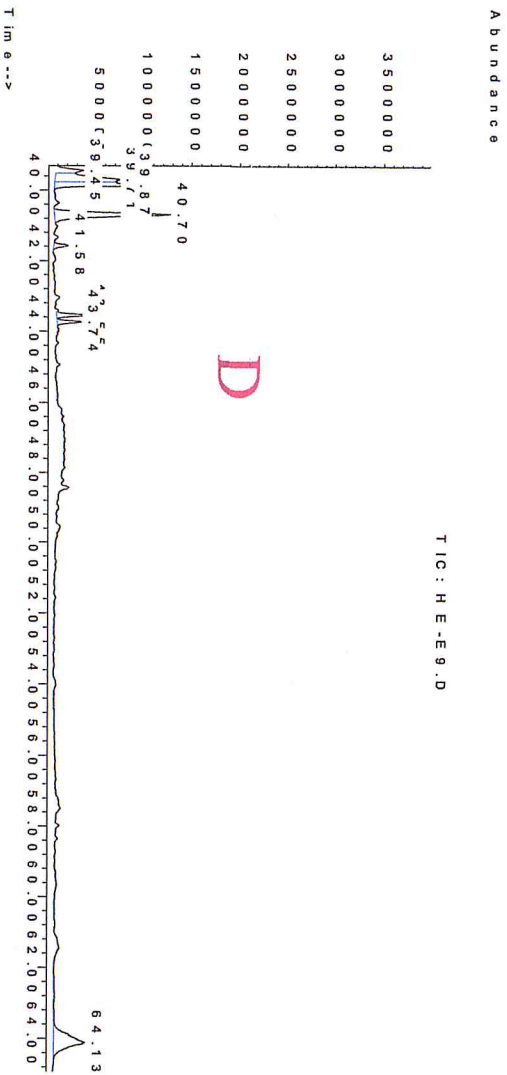


Figure II. 17 : Agrandissement des pics du chromatogramme de l'huile essentielle de *Dictyopteris membranacea* (Partie D).

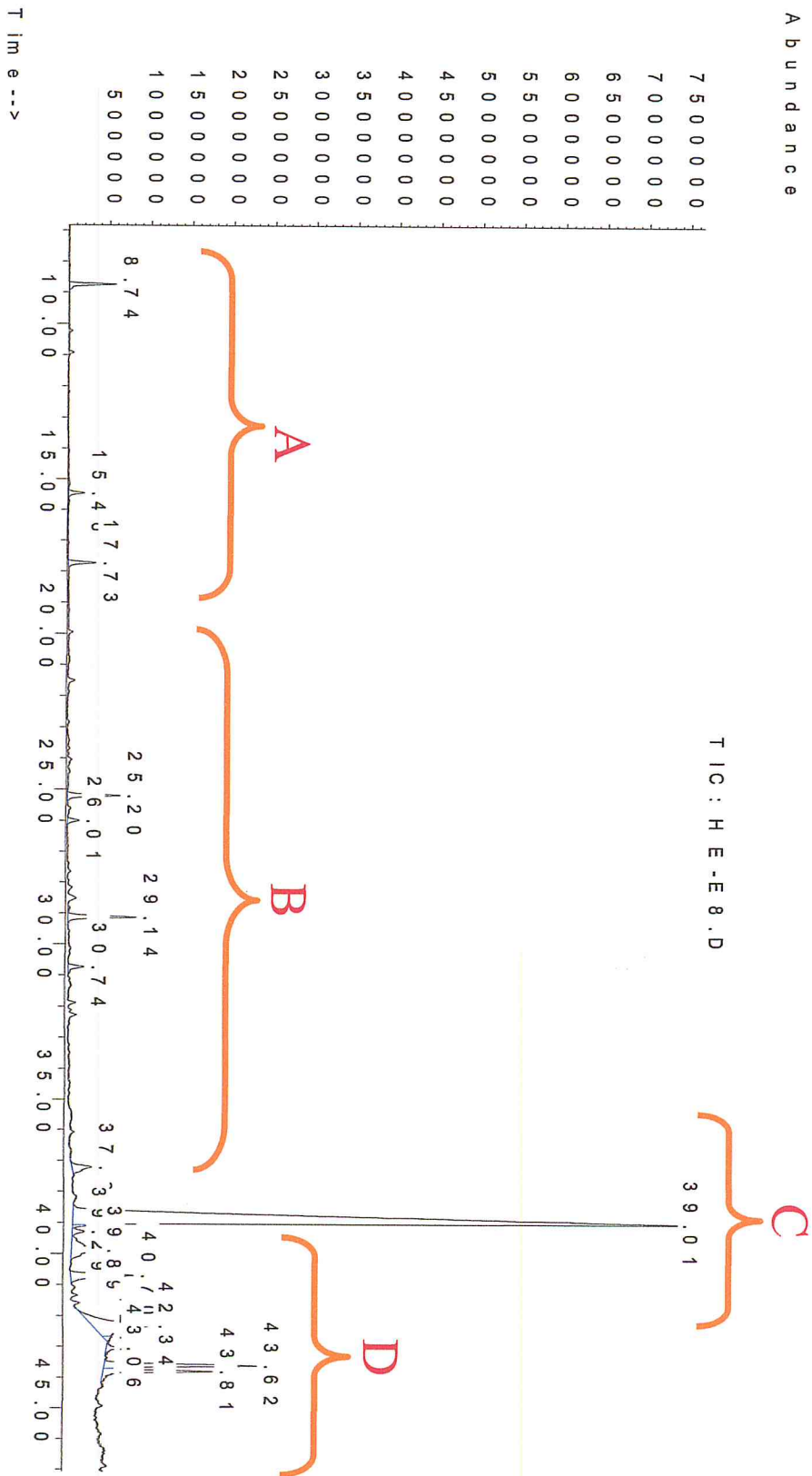


Figure II. 18 : Profil chromatographique d'analyse de fraction volatile de *Dictyopteris membranacea*

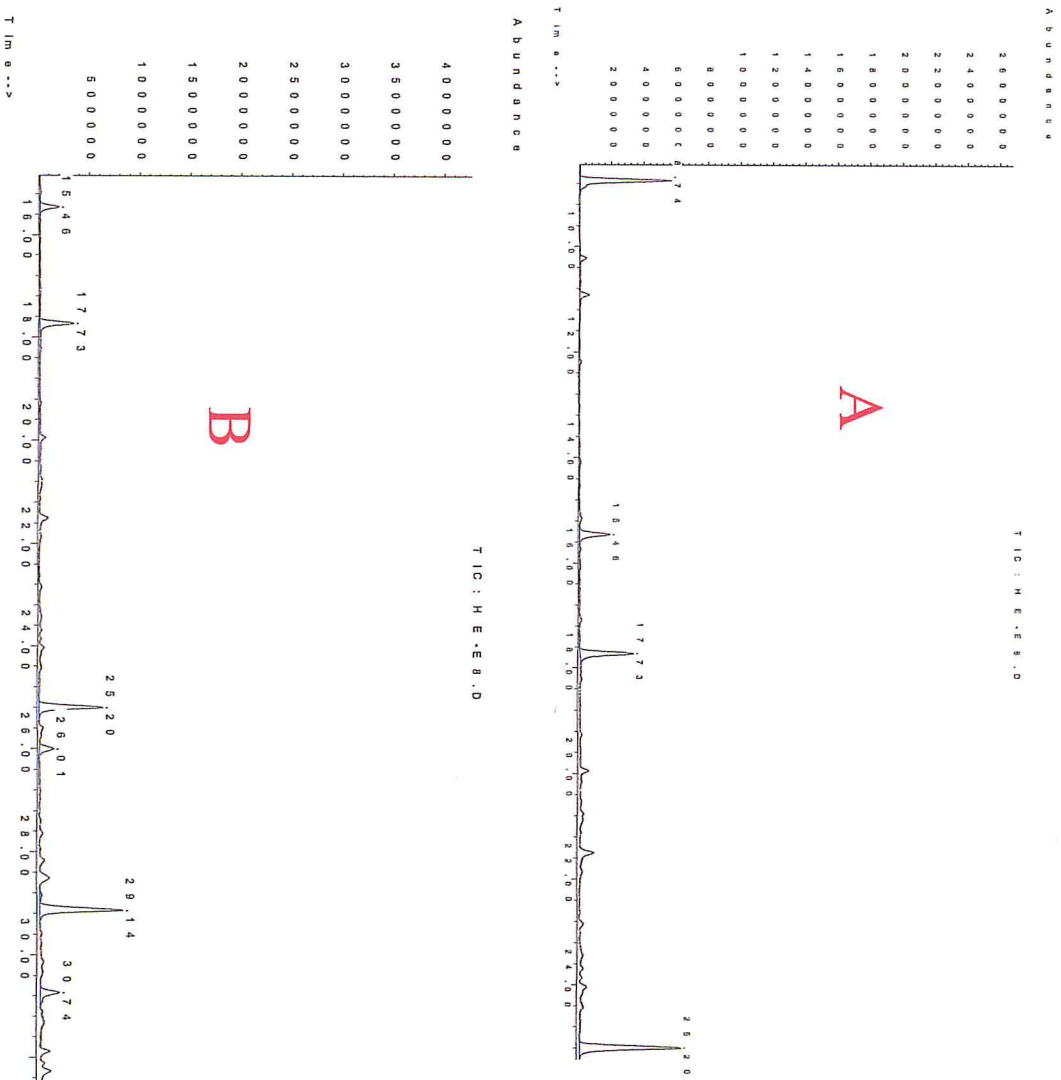


Figure II. 19 : Agrandissement des pics du chromatogramme de fraction volatile de *Dicyopteris membranacea* (Partie A).

Figure II. 20 : Agrandissement des pics du chromatogramme de fraction volatile de *Dicyopteris membranacea* (Partie B).

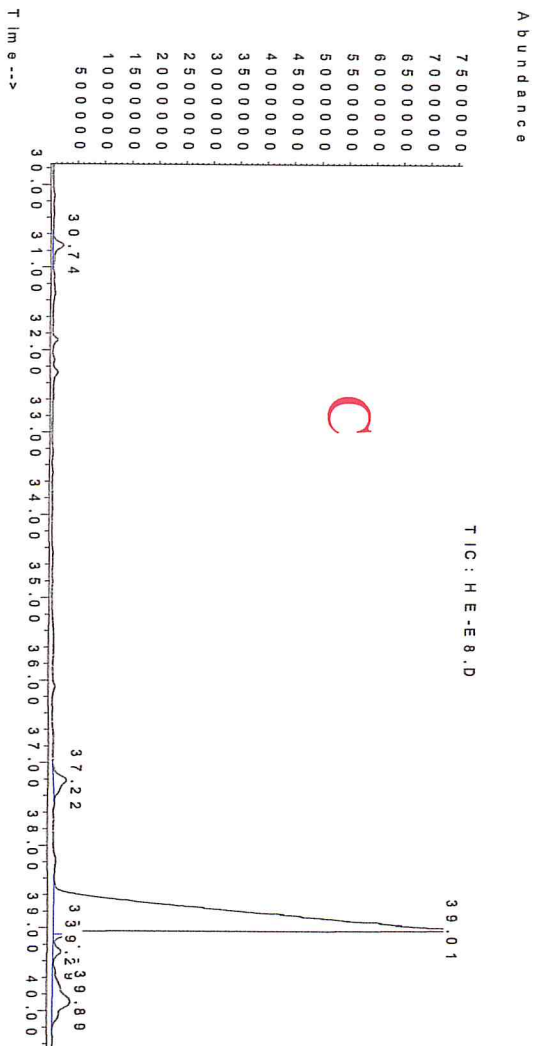


Figure II. 21 : Agrandissement des pics du chromatogramme de fraction volatile de *Dictyopteris membranacea* (Partie C).

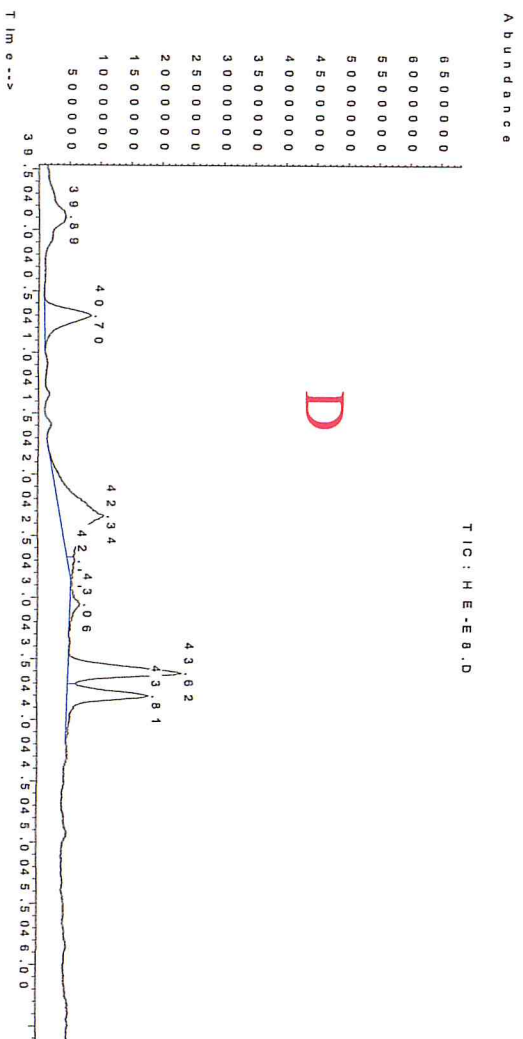


Figure II. 22 : Agrandissement des pics du chromatogramme de fraction volatile de *Dictyopteris membranacea* (Partie D).

II.6.4 Caractéristiques organoleptiques de D-limonène nanoémulsion

Les propriétés organoleptiques de D-limonène nanoémulsion sont regroupées dans le tableau II.7.

Tableau II.7 : Propriétés organoleptiques de D-limonène nanoémulsion.

	Caractères organoleptiques		
	Aspect	Couleur	Odeur
D-limonène nanoémulsion (6% Tween 80)	Liquide	Blanche bleuâtre	limonène
D-limonène nanoémulsion (10% Tween 80)	Liquide	laitière	limonène

❖ La formation de la nanoémulsion :

Dans le but de faire une investigation sur l'effet de la concentration du tensioactif sur la forme de la nanoémulsion deux concentrations du Tween 80 ont été utilisées une à 6% et l'autre à 10%. Les deux concentrations ont donné deux nanoémulsions avec différentes formes (Fig II.11, Fig II.12). D'après les résultats on remarque que la première formulation avec (Tween 80 6%) était plus turbide que la deuxième. Cela veut dire que la taille des particules est plus importante dans la première formulation et que le risque de séparation par le crémage ou la sédimentation est plus favorable. C'est pour cela la composition des formulations doit être optimisée soigneusement afin d'obtenir des nanoémulsions les moins turbides possible.

On utilisant une concentration de 10% de Tween 80 on a pu obtenir une bonne nanoémulsion à l'odeur caractéristique du limonène. Dans ce genre de formulation, il a été rapporté que lors du mélange, le tensioactif se déplace de la phase organique en phase aqueuse, ce qui crée une grande force turbulente à l'interface huile-eau. En outre, le mouvement rapide des composants miscibles à l'eau dans la phase aqueuse entraîne une forte augmentation de la surface interfaciale huile-eau, ce qui conduit à la formation spontanée de gouttelettes d'huile entourées par une phase aqueuse par un processus de bourgeonnement [109].

II.6.5 Détermination de la concentration minimale inhibitrice des échantillons testés

La valeur de la CMI correspond à la première concentration qui inhibe la croissance bactérienne. L'inhibition de croissance se traduit par un éclaircissement de la couleur du milieu.

Le tableau suivant montre les résultats obtenus sur les tubes à essais de l'activité antibactérienne des échantillons testés sur les bactéries après 24 h d'incubation.

Tableau II.8 : Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des échantillons testés.

Souches	Gam	CMI (µl/mL)			
		FV	HE	D-limonène	D-limonène nano-émulsion
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	15	1.875	/	/
<i>Bacillus cereus</i>	+	15	3.75	/	/
<i>Escherichia coli</i>	-	/	3.75	/	/

Les résultats de cette activité antibactérienne sont élucidés dans le tableau II.5. D'après le tableau, la fraction volatile de l'algue brune *Dictyopteris membranacea* a donné une CMI de 15 µl/mL contre les deux souches *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* (planche I.1 et I.2). Par contre l'huile essentielle a montré une forte activité antibactérienne ce qui est traduit par une CMI de l'ordre de 3.75 µl/mL vis-à-vis aux souches *Bacillus cereus*, et l'*Escherichia coli* et 1.875 µl/mL contre la *Staphylococcus aureus* (planche II.3, II.4 et II.5). A la lecture des résultats obtenus on remarque que l'huile essentielle était plus active que la fraction volatile. Et cela est probablement dû à la présence d'une variété de produits bioactives dans sa composition chimique par rapport à celle de la fraction volatile tel que le Dityoptèrene C', 2-Allyl-1,3-diméthylbenzene et le α-cubébéne, ça pourrait aussi être dû aux effets de synergismes entre les différents produits quand ils sont mélangés. On outre, D-limonène et sont nanoémulsion n'ont montré aucune activité inhibitrice vis-à-vis aux souches testées ce qui est traduit par la croissance des bactéries dans tous les tubes a essaies des trois souches testées (Planche II.6 - II.11). On générale l'encapsulation des agents bioactive dans des formulations comme les nanoémulsions joue un rôle très important dans l'amélioration de leurs actions inhibitrices sur les microorganismes.

L'amélioration de l'activité doit être due aux fines tailles des gouttelettes. Ces dernières peuvent fusionner avec les parois des cellules bactériennes, conduisant à la déstabilisation de l'enveloppe lipidique des pathogènes et initier leur perturbation [110]. Dans notre cas on n'a pas pu voir cette amélioration car toutes les souches testées étaient résistantes au D-limonene

dans la gamme de concentration utilisée, c'est pour cela on a obtenu une croissance des bactéries dans tous les tubes a essaie.

Conclusion Générale

Conclusion générale

Ce mémoire est consacré à l'étude de la composition chimique et l'activité antibactérienne de la fraction volatile et de l'huile essentielle de l'algue brune *Dictyopteris membranacea* et l'encapsulation de D-limonène comme un modèle dans une nanoémulsion et tests d'activité antimicrobiennes.

La fraction volatile et l'huile essentielle ont été obtenues par entraînement à la vapeur d'eau avec un rendement moyen de 8% pour la fraction volatile et 10.77% pour l'huile essentielle.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CG/SM) de la fraction volatile et l'huile essentielle a permis la séparation et l'identification des différents produits de la fraction volatile et de l'huile essentielle de *Dictyopteris membranacea*. La composition chimique obtenue est 19 composés pour la fraction et 19 pour l'huile essentielle.

La composition de la fraction volatile ou l'huile essentielle est dominée par le produit soufré, dont le produit majoritaire est le 3-hexyl-4,5-dithia cycloheptanone avec un pourcentage de 21.34% en fraction volatile et 39.03% de l'huile essentielle, elle se caractérise également par la présence de l'hydrocarbure en C11 comme dictyoptérène A, 1-Hydroxyundecan-3-one. La fraction volatile ou l'huile essentielle renferme aussi une classe des sesquiterpènes et une classe d'acides gras.

Les résultats des tests d'activité antimicrobienne contre deux souches de Gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) et une souche à Gram-négative (*Escherichia coli*) ont révélés que l'huile essentielle était plus active que la fraction volatile, à cause de la diversité de la composition chimique de l'huile essentielle par rapport à la fraction volatile. Par contre ni le D-limonène ni sa nanoémulsion n'ont montrées un effet inhibiteur sur les souches testées ce qui est peut-être à cause de la gamme de concentration utilisées qui pourrait être loin de la CMI du D-limonène contre ses souches.

Les planches

Les planches

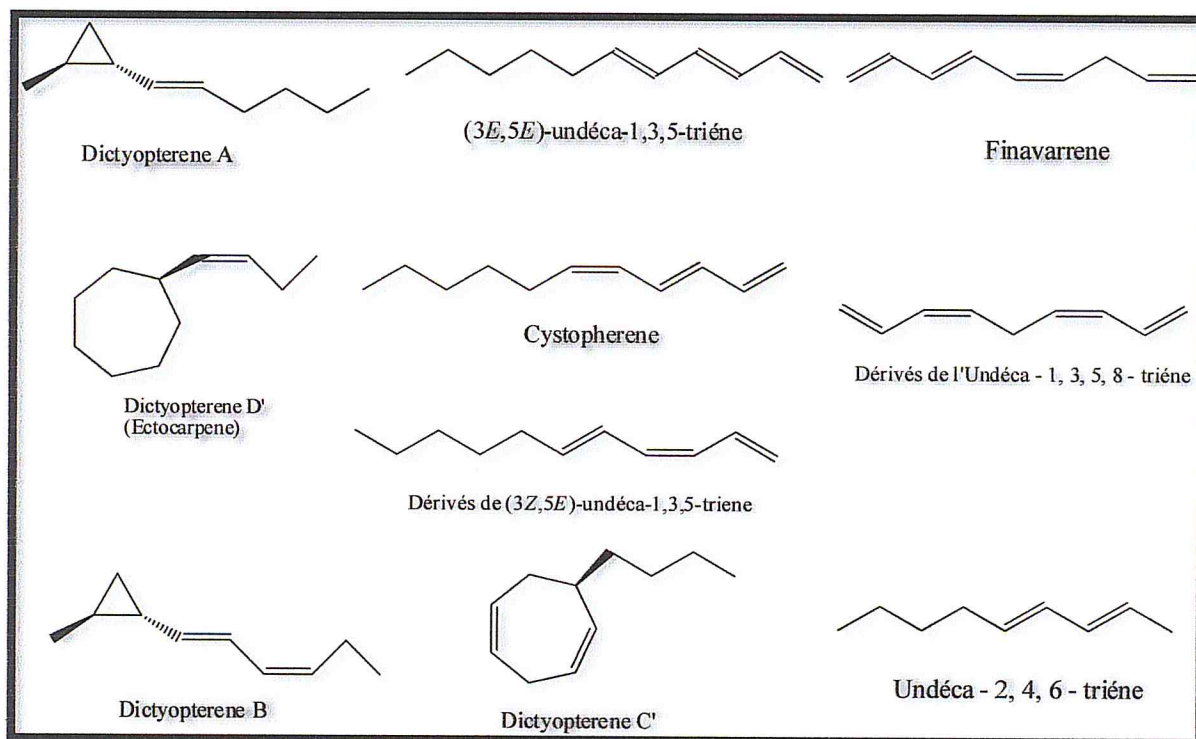


Planche I.1 : Polènes odorants en C11 des espèces hawaïennes du genre *Dictyopteris*.

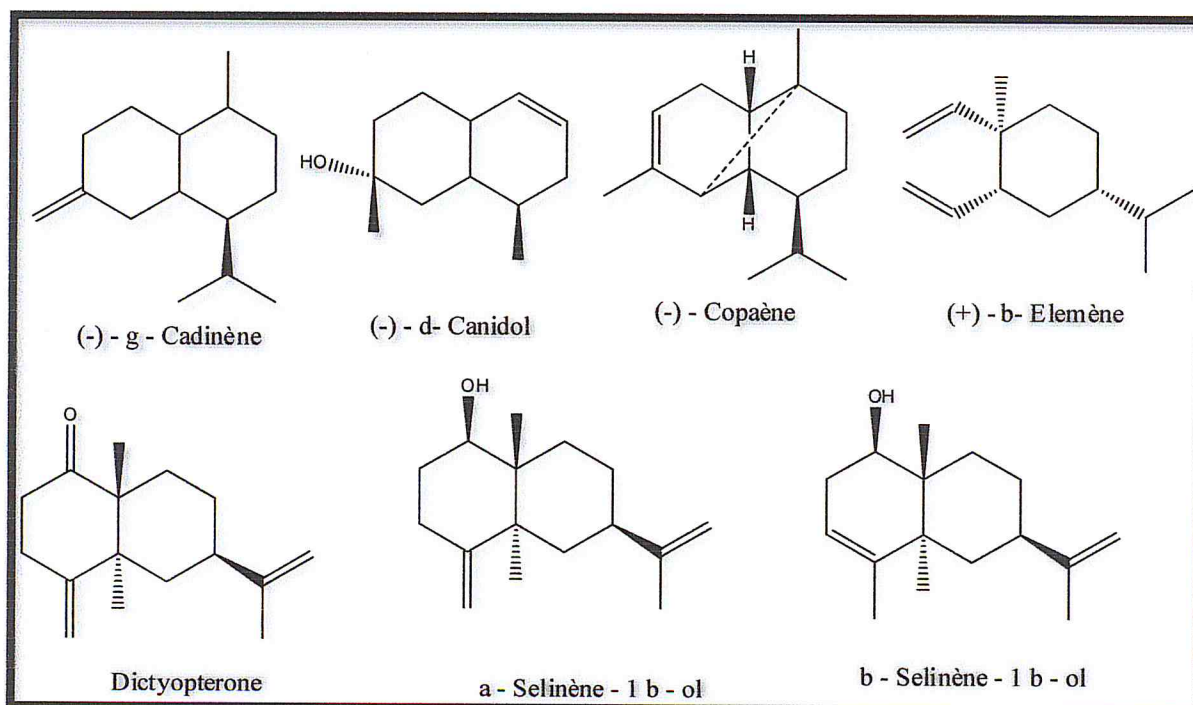


Planche I.2 : Sesquiterpènes de *Dictyopteris divaricata*.

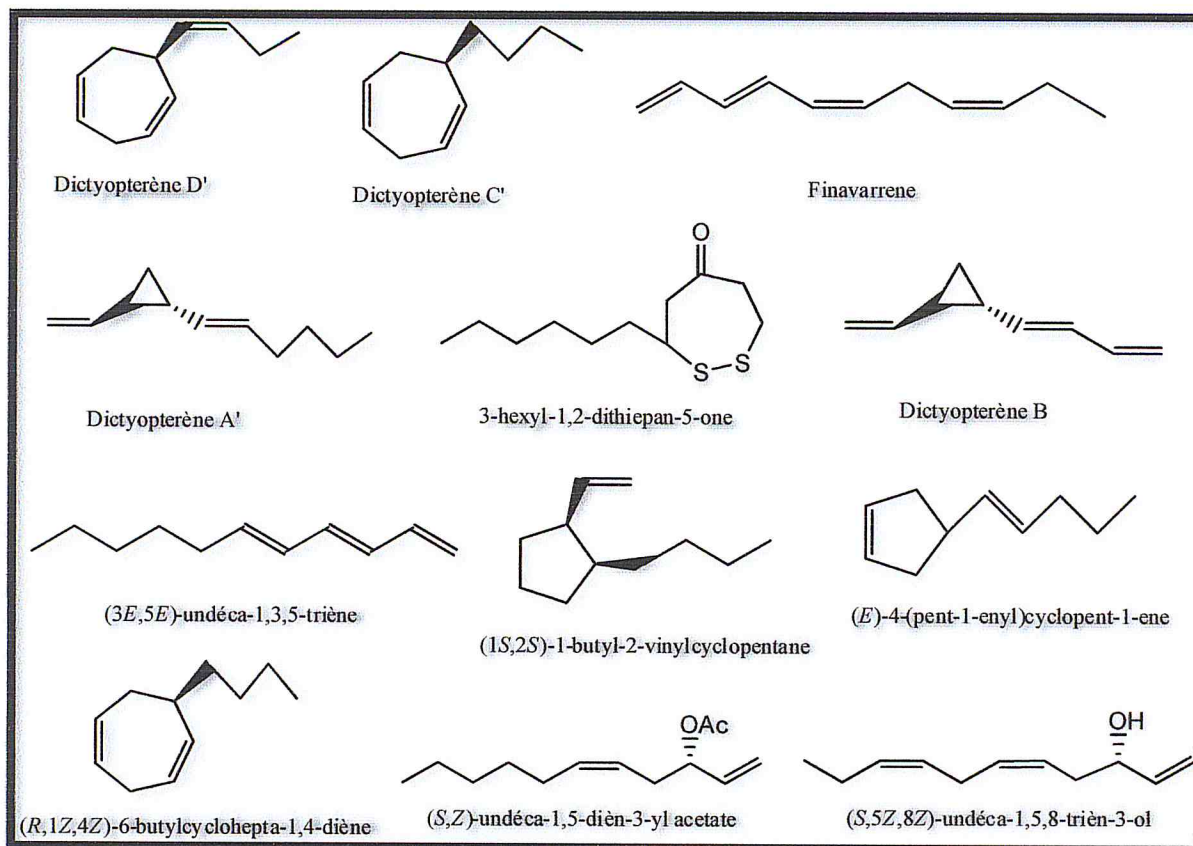


Planche I.3 : Polyène en C 11 et dérivés de *Dictyopteris*.

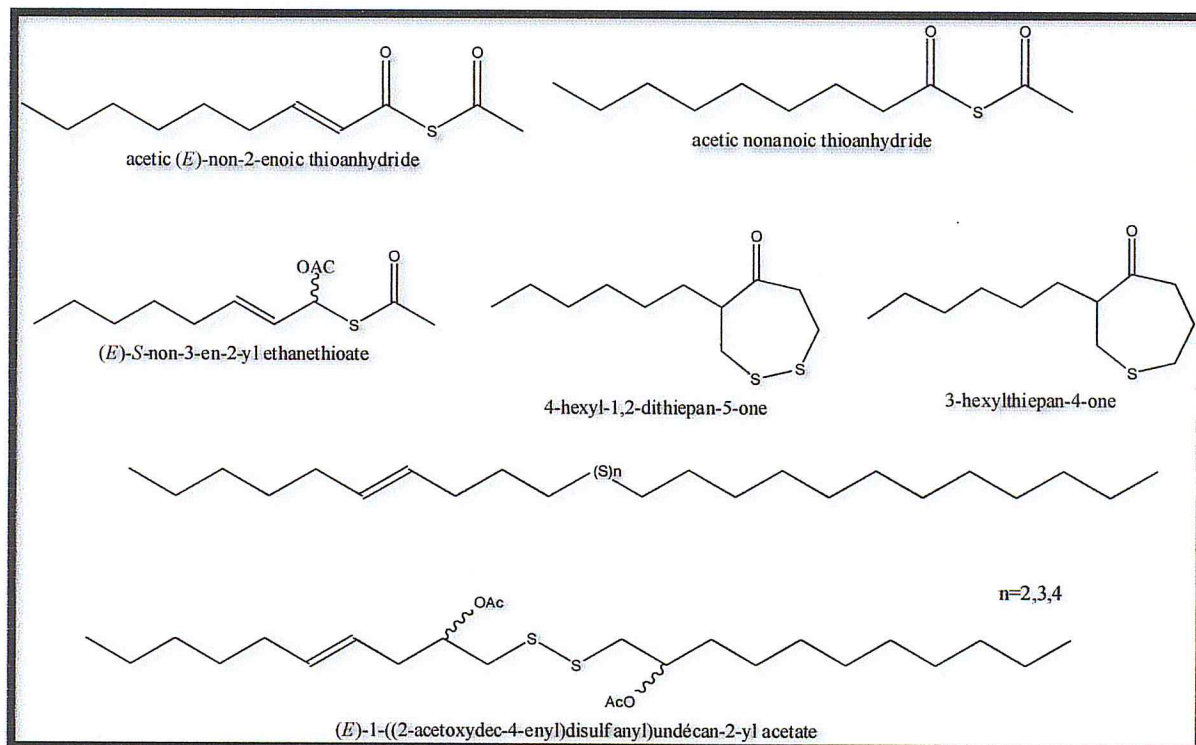


Planche I.4 : Produits soufrés identifiés dans le genre *Dictyopteris*.

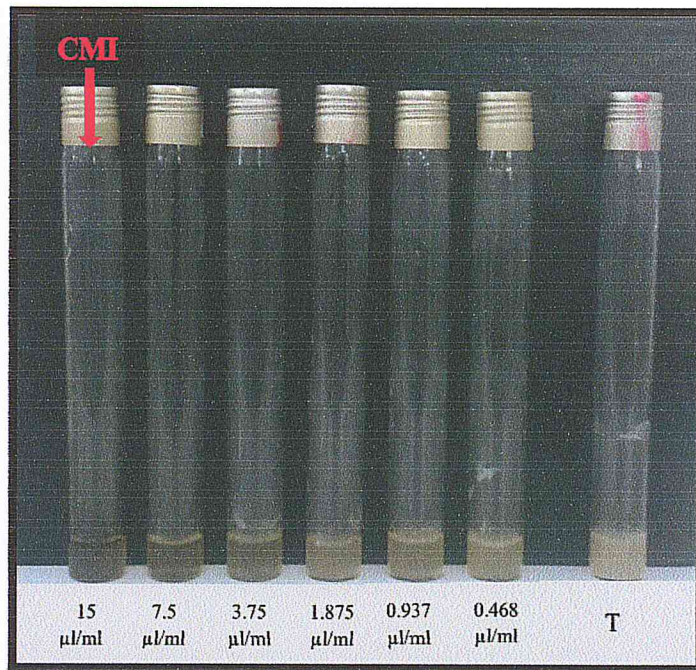


Planche II.1 : Le résultat après 24h d'incubation de FV contre *Staphylococcus aureus*.

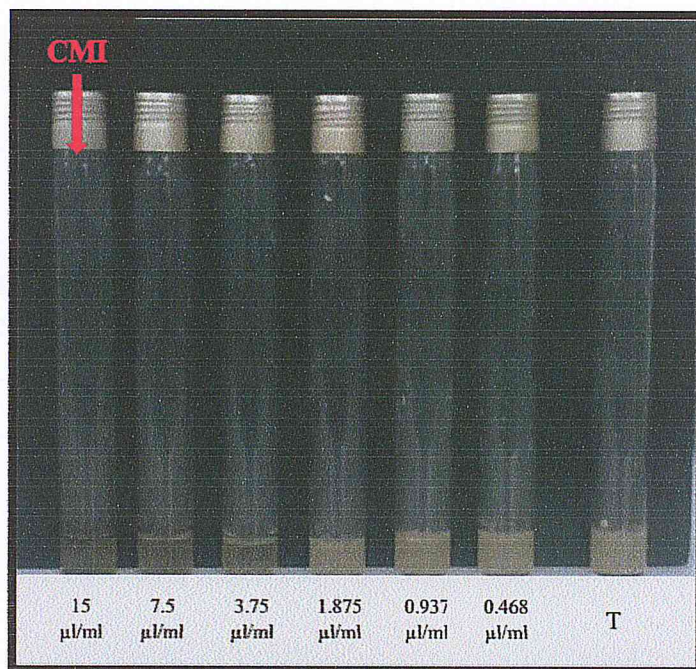


Planche II.2 : Le résultat après 24h d'incubation de FV contre *Bacillus cereus*.



Planche II.3 : Le résultat après 24h d'incubation de l'HE contre *Staphylococcus aureus*



Planche II.4 : Le résultat après 24h d'incubation de l'HE contre *Bacillus cereus*.



Planche II.5 : Le résultat après 24h d'incubation de l'HE contre *Escherichia coli*.

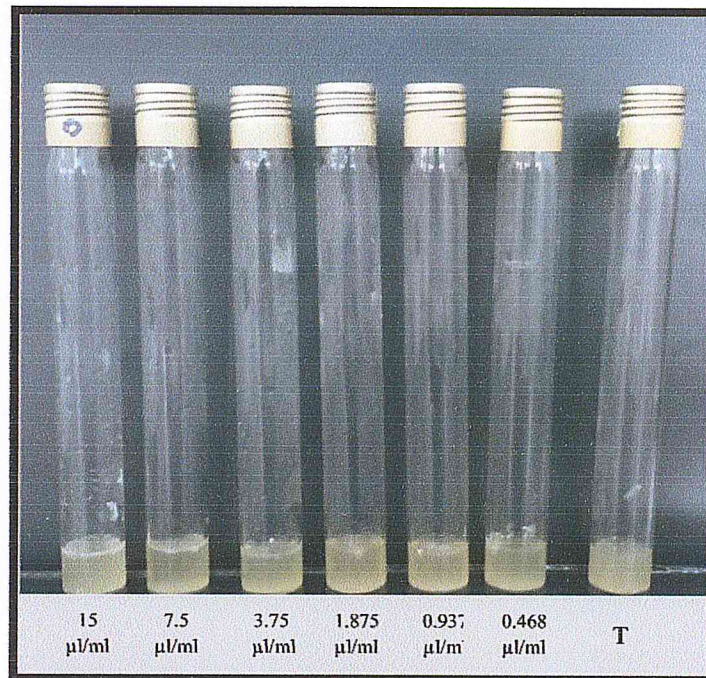


Planche II.6 : Le résultat après 24h d'incubation de D-limonène contre *Staphylococcus aureus*.

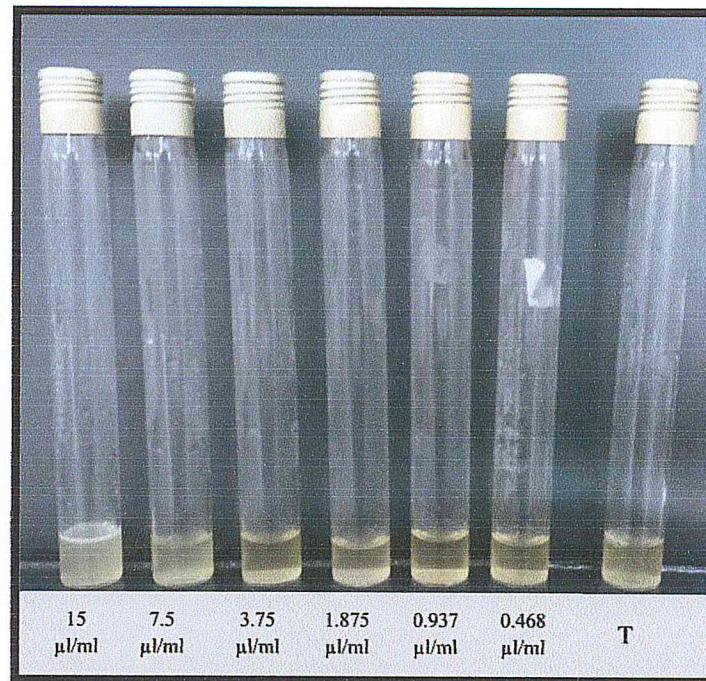


Planche II.7 : Le résultat après 24h d'incubation de D-limonène contre *Bacillus cereus*.

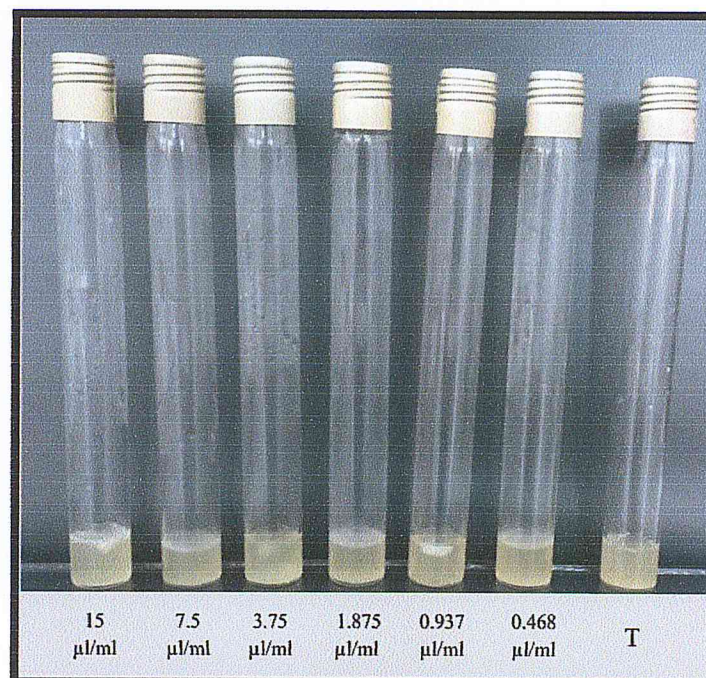


Planche II.8 : Le résultat après 24h d'incubation de D-limonène contre *Escherichia coli*.

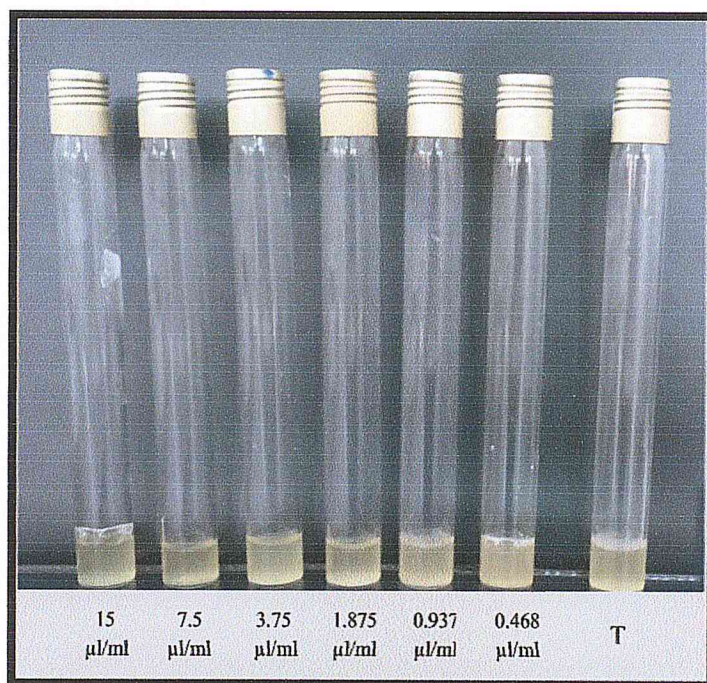


Planche II.9 : Le résultat après 24h d'incubation de D-limonène nanoémulsion contre *Staphylococcus aureus*.

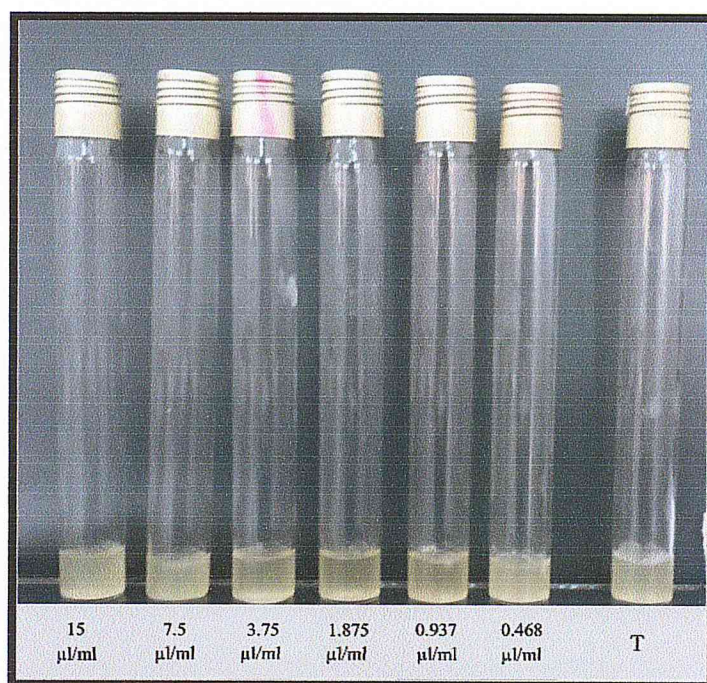


Planche II.10 : Le résultat après 24h d'incubation de D-limonène nanoémulsion contre *Bacillus cereus*.

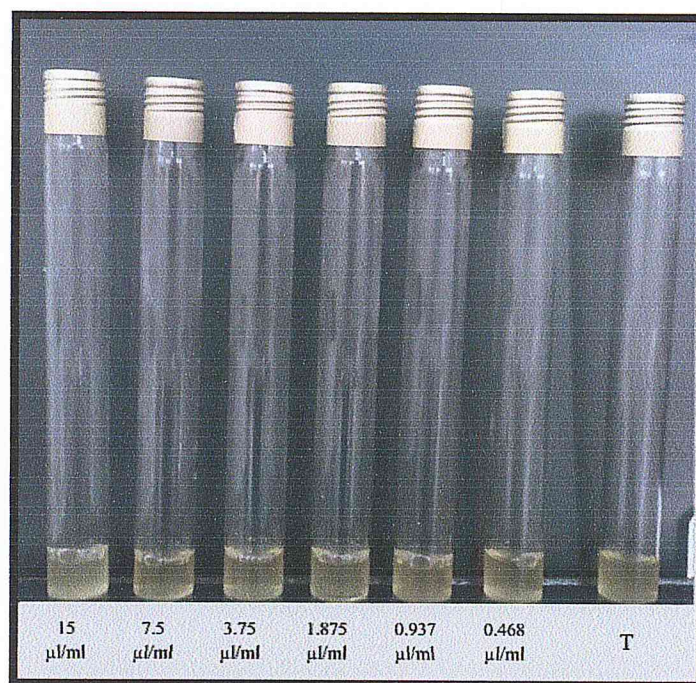


Planche II.11 : Le résultat après 24h d'incubation de D-limonène nanoémulsion contre *Escherichia coli*.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] : **F. Ramade, 2009.** ; "Éléments d'écologie appliquée". 4ème Ed. Dunod, 689, France
- [2] : **V. Dhargalka, N. Pereira, 2005.** ; "Seaweed: promising plant of the millennium". *Science and culture*, 71: 60-66.
- [3] : **J-K. Rajeev, R. Xuzi., 2004.** ;"Biomedical compounds form marine organismes ", journal of Marine Drug, 2, 123-146.
- [4] : **A. Tebbal, 2011.** ; "Composition chimique et minérale de quatre algues benthiques de la région de Kouali (Tipaza)". Mémoire de magister. Ecole nationale supérieure des sciences de la mer et de l'aménagement du littoral.
- [5] : **O. Benchabane, 1989.** ; "Etude de la fraction lipidique de *Cystoseira sedoides* : Algue brune endémique des cotes d'Algérie". Ann.Inst. Nat.Agro.El Harrach. 13, 659, 655.
- [6] : **J.L. Morère, R. Pujol, 2002.** ; "Dictionnaire raisonné de biologie", Editions Frison-Roche, pp 1222.
- [7] : **A. Ramade, 2009.** ;"Eléments d'écologie appliquée", 4ème édition, Edition Dunod, 689 p.
- [8] : **J. RIBIER, J.C. GODINEAUX, 1984** ; "Les algues : connaissances, utilisation, cultures". Flammarion.
- [9] : **C. CESEAU, F. Vallardi, 1964.** ; "Encyclopédie du monde végétal". Lidis.
- [10] : **A. NASON, P. GOLDSTEIN, 1971.** ; "Biologie, Animaux, Végétaux, écologie". Edition Inc.
- [11] : **P. GAYRAL, J. COSSON, 1979.** ; "Les algues". France.
- [12] : **W. CARMICHAEL, 1991.** ; "Blue-Green Algae".
- [13] : **H.K WILLAM GORDON, H. CRAIG HELLER, 1994.** ; "Le monde vivant, traité de Biologie". Flammarion.
- [14] : **R. Pérez, O. Barbaroux, 1997.** ; "Ces algues qui nous entourent : conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisations, culture". Ed. IFREMER in Plouzane, France, 272 p.

- [15] : **B. Reviere, 2002.** ; "Biologie et phylogénie des algues. Tome 1 : Biologie", Ed. Belin Sup., 352p.
- [16] : **J. Lamouroux, 1813.** ; "Essai sur les genres de la famille des Thalassiphytes non articulées. *In* : Dufour, C. (Eds.). France, Paris, Annales du Muséum d'Histoire naturelle, 84p.
- [17] : **F. Kiltzing, 1843 ;.** Phycologia generalis Oder anatomie, physiologie und systemkunde der tange. *In* : Brockhaus F.A. (Eds.). Germany, Leipzig, F.A. Brockhaus, 457 p.
- [18] : **B. Reviere, G. Bosquet, L. Blondel, C. Martin, 2003.** ; Biologie et phylogénie des algues. Tome 2, Belin Sup Sciences, 256.
- [19] : **J. Cabioch, J. Floch, A. Le Toquin, C. Boudouresque, A. Meinesz, M. Verlaque., 2006.** ; Guide des algues des mers d'Europe. Delachaux et Niestlé SA, Paris, p 272.
- [20] : **Tarik Ainane. 2011.** ; "Valorisation de la biomasse algale du Maroc : Potentialités pharmacologiques et Applications environnementales, cas des algues brunes *Cystoseira tamariscifolia* et *Bifurcaria bifurcata*". Autre. Facultés des Sciences Ben M'sik Université Hassan II Casablanca, Français.
- [21] : **L. Prescott, JP. Harley, DA. Klein, CM. Bacq-Calberg, J. Dusart, 2003 ;** " Microbiologie". 2e éd. Française
- [22] : **O. Ilbert, M. Salvato, E. Le Floch, H. Aussel, 2010 ;**" The Astrophysical *Journal* iopscience.iop.org".
- [23] : **F. Gévaert, 2001.** ; "Importance des facteurs de l'environnement et du phénomène de photoinhibition sur la production des grandes algues marines", Thèse de Doctorat, Université des sciences et technologies de Lille, France.
- [24] : **S. Garon-Lardiere, 2004.** ; "Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales)". Université De Bretagne Occidentale.
- [25] : **K. Hillier, M. Rakkar, 2008.** ; "Alginic Acid", xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference, pp1-3.

- [26] : **J.K. Kornprobst, 2005.** ; "Substances naturelles d'origine marine : chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologie", Lavoisier Librairie, pp 1800.
- [27] : **A.A. El Gamal, 2010.** ; "Biological importance of marine algae", Saudi Pharmaceutical Journal, Vol 18, pp 1–25.
- [28] : **R. Falshaw, R.H. Furneaux., E.D. Stevenson, 2005.** ; "Structural analysis of carrageenans from the red alga, *Callophyllis hombroniana* Mont. Kütz (Kallymeniaceae, Rhodophyta)", Carbohydrate Research, Vol 34, pp 1149-1158.
- [29] : **O. De Clerck, F. Leliaert, H. Verbruggen, CE. Lane, JC. De Paula, DA. Payo et E. Coppejans., 2006.** ; "A revised classification of the Dictyoteae (Dictyotales, Phaeophyceae) based on *rbc* and 26S ribosomal DNA sequences analyses". *Journal of Phycology* 42 (6) : 1271-1288.
- [30] : **MarinLit., 2013.** ; "Marin Lit Database", Version 17.3, Department of Chemistry, University of Canterbury, Christchurch, New Zealand.
<http://www.chem.canterbury.ac.nz/marinlit/marinlit.shtml>. Accessed 9 Aug 2013.
- [31] : **L. Ruzicka, 1959.** ; "History of the isoprene rule". *Proceedings of the Chemical Society* 341.
- [32] : **P. Potin, K. Bouarab, F. Küpper et B. Kloareg , 1999.** ; "Oligosaccharide recognition signals and defence reactions in marine plant-microbe interactions". *Current Opinion in Microbiology* 2 (3) : 276-283
- [33] : **P. Potin, K. Bouarab, J-P. Salaün, G. Pohnert, B. Kloareg , 2002.** ; "Biotic interactions of marine algae". *Current Opinion in Plant Biology* 5 (4) : 308-317
- [34] : **C. Colin, C. Leblanc, E. Wagner, L. Delage, E. Leize-Wagner, A. Van Dorsselaer, B. Kloareg et P. Potin, 2003.** ; "The brown algal kelp *Laminaria digitata* features distinct bromoperoxidase and Iodoperoxidase Activities". *Journal of Biological Chemistry* 278 (26): 23545-23552
- [35] : **F. Weinberger, B. Coquempot, S. Forner, P. Morin, B. Kloareg et P. Potin ; 2007** ; "Different regulation of haloperoxidation during agar oligosaccharide-activated defence mechanisms in two related red algae, *Gracilaria* sp. and *Gracilaria chilensis*". *Journal of Experimental Botany* 58 (15-16): 4365 - 4372

- [36] : **S. La Barre, P. Potin, C. Leblanc et L. Delage, 2010.** ; "The halogenated metabolism of brown algae (Phaeophyta), its biological importance and its environmental significance". *Marine Drugs* 8 (4) : 988-1010
- [37] : **I. Maier, D.G. Muller, 1986.** ; "Sexual phéromones in algae", *Biol. Bull.*, 170, 145-175.
- [38] : **W. Boland, 1995.** ; "The chemistry of gamete attraction : Chemical structures, biosynthesis, and abiotic degradation", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 37-43, 1995.
- [39] : **W. Boland, D.G. Muller, 1987** ; "On the odor marine seaweed *Dictyopterismembranacea*; new C11 hydrocarbons marine brown alga-III", *Tetrahedron Letters*, 28, 307-310.
- [40] : **Moore R.E., 1977.** Volatile compounds from marine algae. *Accts. chemistry research* vol 10 :40-47.
- [41] : **C. Neumann, W. Boland, 1990.** ; "Stereochemical on algal pheromone biosynthesis. A model study with the flowering plant *senecio isatideus* (Asteraceae)", *Eur. J. Biochem.*, 191,453-459.
- [42] : **I. Flament and G. Ohloff, 1984.** ;"Volatile constituents of algae". Odoriferous constituents of seaweeds and structure of nor-terpenoids identified in Asakusa-Nori
- [43] : **I. Schnitzler, W. Boland, M.E. Hay, 1998.** ; "Organic sulfur compounds from *Dictyopteris* spp. Deter feeding by an herbivorous amphipod (*Ampithoelongimana*) but not by an herbivorous sea urchin (*Arbacia punctulata*)", *J. Chemical Ecology.*, 24, 1715-1732.
- [44] : **P. AuK, Roller, R.E. Moore, 1971.** ; "Isolation of S-(3 oxoundecyl) Thioacetate, Bis-(3-oxoundecyl) Disulphide, (-)-3-Hexyl-4,5 dithiacycloheptanone, and S-(trans-3-Oxoundec-4-enyl) Thioacetate from *Dictyopteris*", *Chemical Communications*, 273, 503-504.
- [45] : **R.E. Moore, J. Mistysyn, J.A. Pettus, 1972.** ; "(-)-Bis-(3-acetoxyundec-5-enyl) Disulphide and S-(-)-3-Acetoxyundec-5-enyl Thioacetate, Possible Precursors to Undeca-1,3,5-trienes in *Dictyopteris*", *J. C. S. Chem. Comm.*, 2113, 326-327.

- [46] : **J. Ribier, J-C. Godineau., 1985.** ; "Les algues – Connaissance, utilisation, culture", Paris : Ed. Flammarion, 281p.
- [47] : **P. Gayral, J. Cosson, 1986.** ; "Connaître et reconnaître les algues marines", Ouest France : 1986, 222p.
- [48] : **C. Montagne, 1838.** ; "Cryptogames algériennes ou plantes recueillies par M. Roussel aux environs d'Alger", Ann. Sci. Nat., Fr., 2, Série 2, 10, 268-279.
- [49] : **J.B. Lamarck, A.P. Candolle, 1805.** ; "*Flore française*, ou descriptions succinctes de toutes les plants qui croissent naturellement en France, disposées selon une nouvelle méthode d'analyse, et précédées par un exposé des principes élémentaires de la botanique". Troisième Édition. Tome second. . pp. i-xii, 1-600, Paris.
- [50] : **S. Roxas Clemente y Rubio, 1807.** ; "*Ensayo sobre las variedades de la vid comun que vegetan en Andalucía, con un índice etimológico y tres listas de plantas en que se caracterizan varias especies nuevas, por Don Simon de Roxas Clemente y Rubio*". pp. [i]-xviii + [1]-324, 1 pl. Madrid : En la imprenta de Villalpando.
- [51] : **J. Stackhouse, 1809.** ; "Tentamen marino-cryptogamicum, ordinem novum; in genera et species distributum", *Mémoires de la Société Imperiale des Naturalistes de Moscou* 2: [50]-97.
- [52] : **J.G. Agardh, 1887.** ; "Till algernes systematic femteafd", *Lunds Univ. Arsskr., Sverige*, 23(2), 174p.
- [53] : **M. Noda, 1973.** ; "Some marine algae collected on the coast of Kashiwazaki Province facing the Japan Sea (2)". *Scientific Reports Niigata University, Ser. D. (Biol.)* 10: 1-10.
- [54] : **J. Cremades, J.L. Pérez-Cirera, 1990.** ; "Nuevas combinaciones de algas bentónicas marinas, como resultado del estudio del herbario de Simón de Rojas Clemente y Rubio (1777-1827)". *Anal. Jard. bot. Madr.* 47: 489-492, 1 fig.
- [55] : **J. Cabioc'h, J-Y. Floc'h, A. Le Toquin, C.F. Boudouresque, A. Meinesz, M. Verlaque, 1992.** ; "Guide des Algues des mers d'Europe, Manche/Atlantique", Paris : Delachaux et Nestlé, 231p.

- [56] : <https://www.renatureenvironnement.fr>
- [57] : LAMARE Véronique, WACQUANT Claude, VERLAQUE Marc *in* : DORIS, 22/11/2014 : "*Dictyopteris polypodioides* (A.P. De Candolle) J.V. Lamouroux," <http://doris.ffessm.fr/ref/specie/1281>
- [58] : C. Nauciel, J.L. Vildé, 2005. ; "Bactériologie médicale", 2èmeEd. Masson. Paris. pp : 5-10.
- [59] : J.L. Elghozi, D. Duval, 1992. ; Pharmacologie 2ème Ed : Médecine Flammarion. Paris. 289p.
- [60] : Y. Cohen, C. Jacquot, 2001. ; Pharmacologie. 5ème Ed. Masson. Paris. 350p.
- [61] : K. Ulanowska, A. Majchrzyk, M. Moskot, J. Jak__bkiewicz-Banecka, G. W_Âgrzyn, 2007. ; "Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures". *Biologia* ; 62: 132-135.
- [62] : G.A. Wachter, J.J. Hoffmann, T. Furbacher, M.E. Blake, B.N. Timmermann, 1999. ; "Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia Texana*. *Phytochemistry*". 52: 1469- 1471.
- [63] : R. Valsaraj, P. Pushpangadan, U.W. Smitt, *J. Nat. Prod.*, 1997. ; "New anti-HIV-1, Antimalarial, and antifungal compounds from *Terminalia bellerica*". *J. Nat. Prod.* 60: 739-742.
- [64] : H.B. Heath, 1981. ; "Source book of flavours." *Ed. Springer, 1st edition.*
- [65] : A. Garcia-Ruiz, B. Bartolomé, A.J. Martinez-Rodriguez, E. Pueyo, P.J. Martin-Alvarez, M.V. Moreno-Arribas, 2008. ; "Potential of phenolic compound for controlling lactic acid bacteria growth in wine". *Food Control.* 19: 835–841.
- [66] : Chaker EL KALAMOUNI., 2010. ; "Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées "., thèse de doctorat de l'université de toulouse.,
- [67] : B. Patrick, L. Jean, S. Michel, 1988. ; "Bactériologie : Les bactéries des infections humaines". 1er Ed Médecine –Sciences Flammarion. Paris. pp : 100-108-274.

- [68] : **P. Steven, C. Rachel, E. Martha, H. Paul, S. Jane, W.J. Peter, 2004.** ; "Microbiology of Waterborne Diseases". Ed Elsevier Academic Press. pp71-132.
- [69] : **C. Richard, M. Kiredjian, 1995.** ; "Méthodes de laboratoire pour l'identification des bacilles à gram négatif aérobies stricts : Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium, Acinetobacter, Brucelle, Bordetella". 2ème édition. Ed Institut Pasteur .Paris. pp42-43.
- [70] : **J. Delorme, A. Robert, 1997.** ; "Mycologie médicale". Ed. Centre collégial de développement de matériel didactique, [Mont-Royal Québec], pp. 184.
- [71] : **I. Rasooli, M.R. Abyaneh, 2004.** ; " Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*". *Food. Control.* ; 15: 479-4
- [72] : **H. Takahashi, H. Kamimura, M. Ichinoe, 2004.** ; "Distribution of Aflatoxin-Producing *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in Sugarcane Fields in the Southernmost Islands of Japan". *J. Food Prot.*; 67: 90-95.
- [73] : **M.R. Desai, S. Ghosh, 2003.** ; "Occupational exposure to airborne fungi among rice mill workers with special reference to aflatoxin producing *A. flavus* strains". *Ann. Agric. Environ. Med.* 10: 159-162.
- [74] : **S. Krishnan, E.K. Manavathu, P.H. Chandrasekar, 2009.** ; "Aspergillus flavus : an emerging non-fumigatus Aspergillus species of significance". *Mycoses* ; 52: 206-222.
- [75] : **M. Jacob, J. Pellecier, R. Tomei, 1979.** ; «Centre régional d'étude et de développement des plantes à usage pharmaceutique". *Rivista Italiana E.P.P.O.S.*, 11: 26-30.
- [76] : **LAURA L. ZAIKA., 1988.** ; "SPICES AND HERBS : THEIR ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND ITS DETERMINATION". *Journal of Food Safety*, Wiley Online Library
- [77] : **M. TOURE Daouda., 2015.** ; "ETUDES CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES DE QUATRE PLANTES AROMATIQUES MEDICINALES DE CÔTE D'IVOIRE". Thèse de Docteur de L'Université Félix HOUPHOUËT- BOIGNY En Biologie Humaine Tropicale.,
- [78] : <http://www.memoireonline.com/05/14/8874/Etude-de-sensibilite-de-streptococcus-mutans-aux-extraits-totaux-de-khaya-nyasica7.png>

- [79] : **K.W. Glombitza, H. Stoffelen, U. Murawiski, J. Bielaczek, H. Egge, 1974.** ; "Antibiotics from algae Bromophenols from Rhodomelaecea", *Planta Medica*, 25, 105-114, 57.
- [80] : **A.J. Smit, 2004.** ; "Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products", *J. Appl. Phycol.* , 16, 254-262.
- [81] : **V.J. Paul, W. Fenical, 1987.** ; "Natural products chemistry and chemical defense in tropical marine algae of the phylum chlorophyta", *Bioorganism Marina Chemistry*, 1-29.
- [82] : **P.D. Steinberg, S. Schneider Kjelleberg, 1997.** ; "Chemical defences of seaweeds against microbial colonization", *Biodegradation*, 8, 211–220.
- [83] : **D.J. Faulkner, 2002.** ; "Marine natural products", *Nat. Prod. Rep.*, 19, 1-48.
- [84] : **A. Chbani, H. Mawlawi, S. Etahiri, 2011.** ; "Évaluation de l'activité inhibitrice des extraits d'une algue brune, *Padina pavonica*, récoltée sur les côtes libanaises", *Afrique Science* 7(3), 91 – 96.
- [85] : **G. Ozdemir, Z. Horzum, A. Sukatar, N-U. Karabay-Yavasoglu, 2006.** ; "Antimicrobial Activities of Volatile Components and Various Extracts of *Dictyopteris membranacea* and *Cystoseira barbata* from the Coast of Izmir, Turkey", *Pharm Biol.*, 44, 183–188.
- [86] : **Zouhaier Ben Aoun¹, Rafik Ben Said, Farhat Farhat., 2010.** ; " Anti inflammatory, antioxidant and antimicrobial activities of aqueous and organic extracts from *Dictyopteris membranacea*", *Pharmacological activity of marine algae Botanica Marina*, v : 53, Issue 3, pp 263 :259–264, Berlin • New York.
- [87] : **I.H. Kim, D.G. Lee, S.H. Lee, J.M. Ha, B.J. Ha, S.K. Kim and H.J. Lee., 2007.** ; "Antibacterial activity of *Ulva lactuca* against methicilin- resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)". *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 12: 579–582.
- [88] : **Z. Kamenarska, J. Serkedjieva, H. Najdenski, K. Stefanov, I. Tsvetkova, S. Dimitrova-Konaklieva, S. Popov., 2009.** ; "Antibacterial, antiviral, and cytotoxic activities of some red and brown seaweeds from the Black Sea". *Bot. Mar.* 52: 80–86.
- [89] : **C. Tringali, 1997.** ; "Bioactive metabolites from marine algae : recent results". *Curr. Org. Chem.* 1: 375–394.

- [90] : **H. Funahashik, T. Imaik, T. Masek, M. Sekiyak, K. Yokoik, H.K. Hayashik., 2001.** ; Seaweed prevents breast cancer ? *Jpn. J. Cancer Res.* 92: 483–487.
- [91] : **H. Harada, U. Yamashita, E. Kurihara, E. Fukushi, J. Kowabata , Y. Kamei., 2002.** ; "Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substance in marine red algae". *Anticancer Res.* 22: 2587–2590.
- [92] : **S. Etahiri, V. Bultel-Ponce, C. Caux and M. Guyot., 2001.** ; "New bromoditerpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifoliu.* *J. Nat". Prod.* 64: 1024–1027.
- [93] : **T. Ainane, 2011.** ;" Valorisation de la biomasse algale du Maroc : potentialités pharmacologiques et Applications environnementales cas des algues brunes", thèse de Doctorat, Université Hassan II – Casablanca.
- [94] : **O. Sonnevile-Aubrun, J.T. Simonnet, and F. L'Alloret., 2004.** ; "Nanoemulsions : a new vehicle for skincare products. *Advances in Colloid and Interface Science*". 108-109 : p.145-149.
- [95] : **T.G. Mason, J.N. Wilking ; K. Meleson ; C.B. Chang ; S.M. Graves., 2006.** ; "Nanoemulsions : formation, structure, and physical properties". *Journal of Physics : Condensed Matter*,. 18(41) : p. R635-R666.
- [96] : **C. Solans, P. Izquierdo ; J. Nolla ; N. Azemar., 2005.** ; "Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*". 10(3-4) : p. 102-110.
- [97] : **L. Wang, G. Zhang ; J. Dong ; J. Eastoe., 2007.** ; "*Oil-in-water nanoemulsions for pesticide formulations*". *Journal of Colloid and Interface Science*,. 314(1) : p. 230-235.
- [98] : **T.K. Vyas, A. Shahiwala, and M.M. Amiji., 2008.** ; "Improved oral bioavailability and brain transport of Saquinavir upon administration in novel nanoemulsion formulations". *International Journal of Pharmaceutics.* 347(1-2) : p. 93-101.
- [99] : **S.M. Jafari, Y. He, and B. Bhandari., 2007.** ; "Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques". *Journal of Food Engineering.* 82(4) : p. 478-488.
- [100] : **S.K. Niazi, 2004.** ; *Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations : Sterile Products Vol. 6* : CRC.

- [101] : **J. Weiss, S. Gaysinsky, M. Davidson, J. McClements, 2009.** ; "Nanostructured encapsulation systems: food antimicrobials". In IUFoST world congress book: Global issues in food science and technology. pp. 425-479.
- [102] : **F. Donsi, M. Annunziata, M. Sessa, G. Ferrari, 2011.** ; "Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods". *LWT-Food Science and Technology*. 44(9), 1908-1914.
- [103] **E.B. Shirling., D. Gottlieb, 1966.** ; "Methods for characterization of *Streptomyces* species". *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16: 313~340.
- [104] : **M. El Hattab, 2005.** ; "contribution à l'étude des algues brunes méditerranéennes et de l'océan atlantique- Modélisation moléculaire ", thèse de doctorat d'état, Blida.
- [105] : **M. El Hattab, H. Sultan Saif Al Easa, A. Tabaries, L. Piovetti, J-M. Kornprobst, 2007.** ; "Volatile Components of the Phaeophyceae *Hormophysa unieiformis* Growing Along Qatar Coasts", *J. Essent. Oil Res.*, 19, 37–39.
- [106] **M. El Hattab, 2005.** ; «contribution à l'étude des algues brunes méditerranéennes et de l'océan atlantique- Modélisation moléculaire », thèse de doctorat d'état, Blida.
- [107] **RIAD Nacera, 2016.** ;"Étude chimique de la fraction volatile de l'algue brune *Dictyopteris membranaceae* : Détermination de l'activité antimicrobienne et de l'activité inhibitrice de la corrosion de l'Aluminium", Mémoire de master, Blida.
- [108] **I. Schnitzler, W. Boland, M. E. Hay, 1998.** ; "Organic Sulfur Compounds from *Dictyopteris* spp. Deter Feeding by an Herbivorous Amphipod (*Ampithoelongimana*) but Not by an Herbivorous Sea Urchin (*Arbacia punctulata*) ", *J. Chem .Ecol.*, 24 (10), 1715-1732.
- [109] : **D. J. McClements, 2011.** ; "Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance". *Soft Matter*, 7(6), 2297-2316).
- [110] : **Jr. Baker, J.R. Hamouda, T. Shih, A. Myc, 2003.** ; U.S. Patent No. 6,559,189.Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

ANNEXE

ANNEXE 1

Tableau 1 : Méthodes de préparation des nanoémulsions, avantages et inconvénients.

	Processus de nano-émulsion	Avantages	Désavantages
Haute énergie	Homogénéisation haute pression	Plus souple sur le choix du tensioactif et de la structure interne que sur le procédé à faible énergie ; Faible temps de traitement	Coût élevé ; Non recommandé pour les composés sensibles à la chaleur ou au cisaillement
	Micro-fluidisation	Gouttelettes de taille contrôlée ; Permet la préparation de plusieurs émulsions	Coût élevé ; Non recommandé pour la production à grande échelle
	L'émulsification ultrasonore	Moins cher que les autres équipements à haute énergie ; Plus flexible sur le choix du tensioactif et de la structure interne que le procédé à faible énergie	Limité aux petits lots
Basse énergie	Température d'inversion de phase	À bas prix ; Facile à mettre à l'échelle	Limité aux tensioactifs non ioniques ; Nécessite la présence de phases LC ou ME ; L'énergie thermique est nécessaire
	Méthode de phase à température constante	À bas prix ; Facile à mettre à l'échelle ; Pas besoin de chauffer	Nécessite l'ajout progressif d'une phase à une autre ; Nécessite la présence de cristaux liquides (LC) ou de microémulsions (ME) de milieu de gamme
	Emulsification spontanée	À bas prix ; Facile à mettre à l'échelle	Quantité limitée de phase huileuse ; Présence de solvant

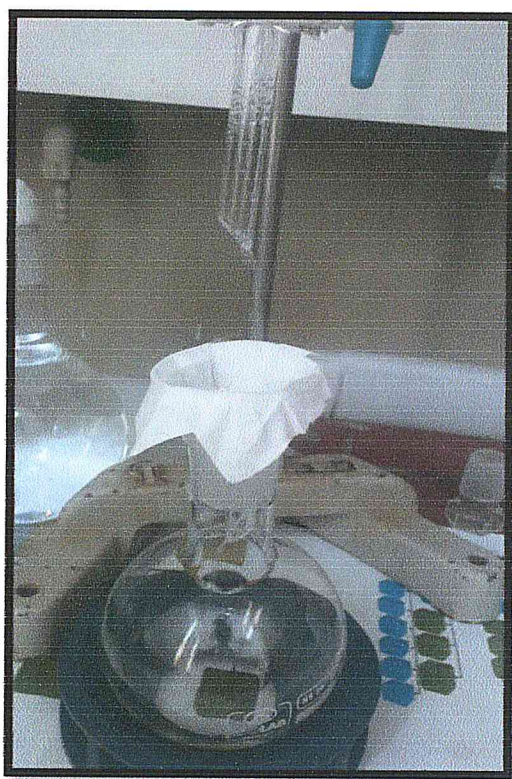
ANNEXE 2



Autoclave



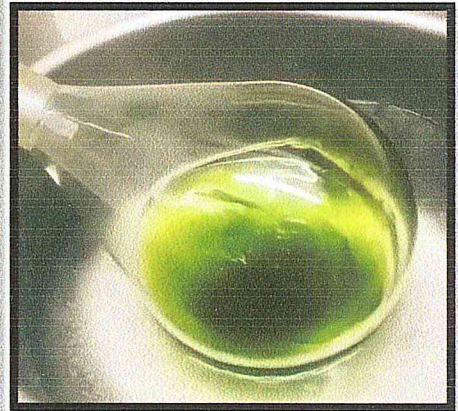
Mélange eau- fraction volatil (L'hydrolat)



Extraction liquide - liquide



Evaporation rotative



Extrait brut



La balance



Bain marie

