

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB DE BLIDA



Faculté des Sciences

Département de Chimie

Mémoire Présenté par

HADDOUCHE Selma

En vue d'obtenir le diplôme de Master

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

Titre

Contribution à l'étude chimique de l'huile essentielle de *Cystoseira stricta* et détermination de l'activité antimicrobienne

Soutenu en octobre 2012

Promoteur

Pr M. ELHATTAB

Promotion 2011/2012

REMERCIEMENTS

Je voudrai tout d'abord remercier Allah de m'avoir permis de terminer ce travail.

Je remercie infiniment mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. Je les remercie pour les sacrifices qu'ils ont toujours consentis à faire pour moi sans se plaindre afin que je réussisse dans la vie et dans les meilleures conditions. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

Je tiens à remercier tout particulièrement Mon promoteur Pr. ELHATTAB Mohamed, qu'il trouve dans ce travail l'expression de ma sincère et respectueuse gratitude, l'assurance de mon profond respect et le témoignage de ma sincère reconnaissance pour son accueil dans le master de « chimie des Substances Naturelles », ses encouragements incessants et pour tous les efforts qu'il n'a cessé d'employer pour notre bien. Je lui suis aussi reconnaissante pour son amabilité et pour tout l'intérêt dont il a fait témoignage au cours de ces années de master.

J'adresse également mes remerciements particuliers aux membres de jury de bien vouloir accepté de juger mon travail, je les remercie très vivement.

Mes remerciement vont également à toute l'équipe de mes enseignants de pour la qualité d'enseignement qui nous a été dispensé et de nous avoir incité à travailler en mettant à notre disposition leurs expériences notamment Mr AMZAL, Mr BOUTOUMI, Mme KASMI, Mme DEGHBUCHE, Mme BOUZIDI, Mr BADIS.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans une pensée pour AKROUR Ismail, je le remercie pour son aide et sa présence qui n'a pas cessée de m'encourager et qui a été déterminante pour ma réussite

Enfin je remercie tous mes amis(es) (ELHOUARI Karima, HABBECHÉ Zahida, Selma, Soumia, Nour, Khadidja, Naima K, Naima E, Naima A, Djamila, Meriem, Dalila, Hamida, DIDANE Soraya), et à toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement pour l'accomplissement de ce travail.

DEDICACES

Je dédie ce travail :

A mes très chers Parents

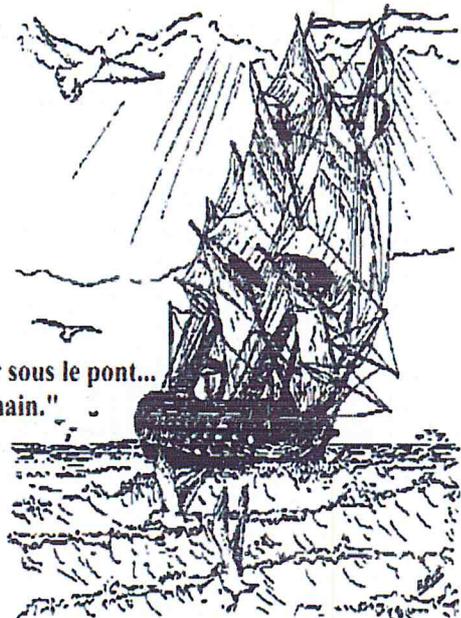
A mes frères : Abdelrahim et Abdeldjalil

A mes Amis(es)

A tous ceux qui me sont chers

J'avais trois jours devant moi, je dis :
« Tiens, je vais aller voir la mer »
Je prends le train, j'arrive là-bas
Je vois le portier de l'hôtel, je lui dis :
✓ Où est la mer ?
✓ La mer ... elle est démontée !
✓ Vous la remonter quand ?
✓ Question de temps.
✓ Moi, je suis ici pour trois jours...
✓ En trois jours, l'eau a le temps de couler sous le pont...
✓ Le pont ?... Merci... je vais attendre demain."
✓ ...

Raymond Devos



Résumé

Le présent travail porte sur l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de l'algue brune *Cystoseira stricta* ainsi qu'à la détermination des activités biologiques de l'huile essentielle et son extrait lipidique.

L'analyse de l'huile essentielle de *Cystoseira stricta* a été effectuée par CG/SM. La composition chimique est dominée par les acides gras avec 42,5% dont les principaux sont l'acide palmitique (19,069%) et l'acide 8-hexadécanoïque (15,434%). La composition chimique contient une fraction importante en terpènes (16,589%), les principaux terpenoïdes sont le Patchoulane (12,693%), le Limonène (0,485%) et le (Z,Z)-Alpha-Farnesène (0,939%).

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle a été évaluée sur quatre souches bactériennes et un champignon à l'aide de la méthode de diffusion des disques. Cependant l'activité antimicrobienne de l'extrait lipidique a été évaluée sur trois souches bactériennes. Les tests d'activités effectués ont montré que l'huile essentielle et l'extrait sont dotés de propriétés antibactériennes.

Mots clés : Huile essentielle, *Cystoseira stricta*, extrait lipidique, acide palmétique, acide 8-hexadécanoïque, Patchoulane, Limonène, (Z,Z)-Alpha-Farnesène, activité antimicrobienne.

Abstract:

The present work focuses on the study of the chemical composition of the essential oil of brown seaweed *Cystoseira stricta* and the determination of biological activities of essential oils and lipidic extract of even algae.

Analysis of the essential oil of *Cystoseira stricta* was carried out by GC/MS. The chemical composition is dominated by fatty acids (42,5%) with the "palmitic acid" and compound "8-hexadécanoïc acid " as the major product.

The essential oil of *Cystoseira stricta* has a significant fraction of terpenes accounting for about 16.589%, we can cite the Patchoulane (12.693%), the Limonene (0.485%) and (Z, Z)-Alpha-Farnesene (0.939%).

The antimicrobial activity of the essential oil was evaluated on four bacterial strains and fungi using the disc diffusion method. However, the antimicrobial activity of the lipid extract was evaluated on three bacterial strains. esting activities carried out have shown that the essential oil and extract are equipped with antibacterial properties.

Keywords: Essential oil, *Cystoseira stricta*, extract lipid, palmetic acid, 8-hexadécanoïc acid, Patchoulan, Limonene, (Z, Z)-Alpha-Farnesene, antimicrobial activity.

المخلص

العمل الحالي يركز على دراسة التركيبة الكيميائية للزيت الاساسي لسيتوزيرا ستريكتا كما تم تقييم نشاط مضادات الميكروبات .

أجري تحليل التركيب الكيميائي للزيت الاساسي لسيتوزيرا ستريكتا بواسطة اللوني للغاز الى جانب قياس الطيف الكتلي. و قد هيمنت على هذا الزيت الاساسي الاحماض بنسبة (42.5%) مع مركب " الحمض النخيلي " و " حمض هكزاديكانويك " كغالبية المنتجات. للزيت الاساسي لسيتوزيرا ستريكتا جزء كبير من التربينات, أنها تمثل حوالي 16، 589%.

تم تقييم نشاط مضادات الميكروبات للزيت الاساسي لسيتوزيرا ستريكتا على أربعة أنواع من البكتريا والفطريات باستخدام طريقة الانتشار القرص.

تم تقييم النشاط البكتيري للمستخلص الدهني على ثلاث سلالات البكتيريا.

كلمات البحث:

الزيت الاساسي، سيتوزيرا ستريكتا، الحمض النخيلي، للمستخلص الدهني، نشاط مضادات الميكروبات

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : <i>Cystoseira stricta</i>	16
Figure 2 : Dispositif d'entraînement à la vapeur d'eau	31
Figure 3 : Extraction liquide – liquide de l'huile essentielle	32
Figure 4 : Pycnomètre	34
Figure 5 : Réfractomètre	34
Figure 6 : Polarimètre	35
Figure 7 : Etapes de détermination de l'indice d'acide	36
Figure 8: Etapes de détermination de l'indice d'ester	37
Figure 9: Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse	39
Figure 10 : Illustration de la méthode des antibiogrammes	40
Figure 11: bactéries et levures vues sous microscope	42
Figure 12 : Evolution du rendement en HE en fonction du temps	45
Figure 13: profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle de <i>Cystoseira stricta</i>	51
Figure 14 : Agrandissement et numérotation des pics du chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Cystoseira stricta</i>	52
Figure 15 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des bactéries	54
Figure 16 : Zones d'inhibition de l'huile essentielle testée pour les quatre souches bactériennes	55
Figure 17 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des bactéries	56

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Espèces du genre <i>Cystoseira</i> issues de la méditerranée	14
Tableau 2 : Les souches de références utilisées dans notre travail	41
Tableau 3 : Les différents micro-organismes pathogènes utilisés dans notre étude	41
Tableau 4 : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de <i>Cystoseira stricta</i>	44
Tableau 5 : Rendement en HE obtenue lors des différentes expériences	44
Tableau 6 : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de <i>Cystoseira stricta</i>	46
Tableau 7 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Cystoseira stricta</i>	47
Tableau 8 : Données des spectres de masse des composés inconnus exprimées sous forme de m/z (abondance %) des principaux fragments	49

LISTE DES PLANCHES

Planche 1: Exemples de monoterpènes isolés des Algues brunes	18
Planche 2: Exemples de sesquiterpènes isolés des algues brunes	20
Planche 3 : Principale phéromones des Algues brunes	23
Planche 4: Précurseurs biologiques des phéromones sexuelles d'algues brunes...	26

TABLE DES MATIERES

Introduction	11
CHAPITRE 1 : Synthèse bibliographique	
I.1 Taxonomie et systématique du genre <i>Cystoseira</i>	13
I.2 Distribution phytogéographique mondiale	14
I.3 Position systématique de <i>Cystoseira stricta</i>	15
I.4 Etude chimique des huiles essentielles	17
I.4.1 Terpènes	17
I.4.1.1 Généralité	17
I.4.1.2 Monoterpènes	18
I.4.1.3 Sesquiterpènes	19
I.4.2 Les hydrocarbures poly-éthyléniques	21
I.5 Activité biologique des huiles essentielles des algues brunes	27
CHAPITRE 2 : Partie expérimentale	
II.1 Introduction	30
II.2 Récolte, traitement et conservation	30
II.3 Protocole expérimental d'extraction d'huile essentielle	30
II.3.1 Description du dispositif d'extraction	30
II.3.2 Extraction liquide-liquide de l'huile essentielle	31
II.3.3 Rendement en huile essentielle	32
II.4 Préparation de l'extrait lipidique de <i>Cystoseira stricta</i>	34
II.5 Analyse physico-chimiques de l'huile essentielle de <i>Cystoseira stricta</i> ...	34
II.5.1 Mesure des indices physiques	34
II.5.1.1 Détermination de la densité	34
II.5.1.2 Détermination de l'indice de réfraction	34
II.5.1.3 Détermination du pouvoir rotatoire.....	35
II.5.2 Mesure des indices chimiques	35
II.5.2.1 Détermination de l'indice d'acide	35
II.5.2.2 Détermination de l'indice d'ester.....	36
II. 6 Analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	38

II. 6. 1 Description de l'appareil	38
II. 6. 2 Condition opératoire	38
II.7 Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de <i>Cystoseira stricta</i>	
II. 7. 1 L'aromatogramme	39
II. 7. 2 : Les souches bactériennes choisies	41
II. 7. 3 Protocole expérimental	43
II. 8 Résultats et discussion	44
II. 8. 1 Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de <i>Cystoseira stricta</i>	
II. 8. 2 Rendement en huile essentielle de <i>Cystoseira stricta</i>	44
II. 8. 3 Rendement d'extrait par solvant	45
II. 8. 4 Etude de la cinétique d'extraction	45
II. 8. 5 Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de <i>Cystoseira stricta</i>	46
II. 8. 6 Etude analytique de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	46
II. 8. 7 L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de l'extrait lipidique de <i>Cystoseira stricta</i>	53
II. 8. 7.1 Activité antimicrobienne de l'huile essentielle	53
II. 8. 7. 2 Activité antimicrobienne de l'extrait lipidique	56
Conclusion	58

Introduction

La vie sur terre est apparue premièrement dans le milieu marin, et ce n'est qu'environ 400 millions d'années plus tard, que les premières espèces terrestres apparaissent ; ce qui explique que la biodiversité marine est beaucoup plus riche que la biodiversité terrestre. Néanmoins, les organismes marins ont été moins étudiés que leurs analogues terrestres, principalement à cause du manque de connaissance du milieu marin et des difficultés liées à la récolte des échantillons [1].

Ainsi, les premières recherches sur les produits naturels marins datent seulement de la fin des années 60, alors que les substances d'origine terrestre sont étudiées intensivement depuis déjà plus d'un siècle [1].

Actuellement, une attention toute particulière est portée sur les algues qui occupent une place très importante dans le milieu marin avec plus de 1200 espèces apparentes à tous les niveaux évolutifs [2, 5].

Les substances naturelles isolées des algues se caractérisent souvent par la présence d'éléments chimiques ou de structures nouvelles, rarement observées, voire inconnues en milieu terrestre, dont beaucoup d'entre elles ont une activité biologique intéressante [1, 5].

Les métabolites isolés à partir des algues représentent près de 22% des produits naturels marins décrits à ce jour [6], l'un des premiers produits isolés à partir des algues est l'acide kaïnique de l'algue rouge *Digenea simplex*, qui a montré une activité contre certains verts parasites [7].

Ces structures peuvent être des métabolites primaires (Sucres, acides nucléiques), ou des métabolites secondaires (terpènes, stéroïdes, alcaloïdes, ...) [1].

Sur le plan pharmacologique, la présence de différentes activités a été mise en évidence depuis longtemps chez plusieurs espèces d'algues marines [8]. L'activité antibactérienne [8,13], antivirale, antitumorale [13,17] et d'autres propriétés comme celle qui entre dans la régulation du taux du cholestérol sanguin ou dans la régulation du système immunitaire ont été également étudiées [18, 21].

Le présent travail est consacré à l'étude chimique de l'extrait lipidique et de l'huile essentielle d'algue brune *Cystoseira Stricta*. Il comporte trois parties :

- La première consiste en une synthèse bibliographique sur les espèces du genre *Cystoseira* en particulier l'espèce *Cystoseira stricta*.
- La deuxième partie est consacrée à l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de *Cystoseira stricta*
- La troisième partie est réservée à l'étude de l'activité biologique de l'huile essentielle et de l'extrait lipidique d'algue brune *Cystoseira stricta*.

Chapitre I
Synthèse
Bibliographique

Introduction :

Les algues brunes sont regroupées dans la classe des Fucophycées appelées autrefois les Phéophycées. Elles sont apparues 200 millions d'années après les vertes, un peu avant ou un peu après les algues rouges. Ce sont des algues presque exclusivement marines, et ne sont représentées en eaux douces que par cinq genres et cinq à six espèces fort rares [1].

Avec 99,7% d'espèces marines, environ 1500 – 2000, les algues brunes montrent une grande diversité morphologique, elles sont toujours visibles à l'œil nu, car elles sont souvent de grande taille et jamais unicellulaires.

Les algues brunes sont réparties en 11 ordres ; parmi ces derniers celui des Fucales qui se subdivise en six familles dont celle des *Cystoseiracées* qui a fait l'objet de plusieurs études.

Cette première partie consiste en une synthèse bibliographique sur les espèces du genre *Cystoseira* et porte sur :

- L'étude chimique préliminaire de leurs huiles essentielles en se basant sur les métabolites secondaires isolés (des terpènes, et des hydrocarbures poly-éthyléniques), c'est-à-dire des molécules qui, contrairement aux métabolites primaires, ne paraissent pas indispensables à la survie de l'organisme, mais qui jouent un rôle important en chimiotaxonomie ;
- L'étude des différentes activités biologiques de l'huile essentielle et des extraits lipidiques des espèces du genre *Cystoseira*.

I.1 Taxonomie et Systématique du genre *Cystoseira*

Les algues brunes de l'ordre des fucales se subdivisent en quatre familles dont celles des *Cystoseiracées*. Cette famille, qui a été établie en 1843 par Kützinger [22], comprenait alors sept genres, après diverses révisions, elle en inclut dix-huit [23]. Créée originalement par le phycologiste suédois Carl Adolph Agardh en 1820 [24], le taxon original *Cystoseira* comprenait alors trente espèces.

Au début du siècle, la situation était si confuse que C. Sauvageau [25,26] fut amené à réviser l'ensemble du genre. Il effectua une étude approfondie et constitua de nombreux groupes, incluant certaines espèces, que G. Hamel [27], plus tard, réduisit à six. Il y a une trentaine d'années M. Roberts [28,29], après un certain nombre de mise au point sur les espèces des côtes britanniques, a tenté de donner des diagnoses plus précises des espèces de ce genre en les regroupant selon des critères liés à la morphogénèse. A l'heure actuelle, cinquante-six espèces sont rattachées à ce genre [12].

I.2 Distribution phytogéographique mondiale

Les algues brunes se rencontrent dans toutes les mers du monde, mais d'avantage elles se sont principalement diversifiées dans les mers froides et tempérées où elles forment les grandes forêts sous marines (on les appelle séquoia des mers) [1].

Le genre *Cystoseira* montre une aire de répartition très large : océan Atlantique, océan Pacifique, océan Indien, mer Méditerranée mais fait défaut dans la zone Antarctique. La plupart vivent dans l'hémisphère nord et quelques rares espèces se trouvent dans l'hémisphère sud.

La majorité des espèces du genre *Cystoseira* se développent sur les côtes de la Méditerranée comme l'attestent de nombreux travaux taxonomiques [31], et c'est la raison pour la quelle on dénombre plusieurs espèces dans le catalogue des algues méditerranéennes. Le tableau 1 regroupe quelques exemples des espèces du genre *Cystoseira* issues de la méditerranée parmi lesquels *Cystoseira stricta* qui fait l'objet de notre travail.

Tableau 1: Espèces du genre *Cystoseira* issues de la méditerranée [30]

<i>C. abies-marina</i>	<i>C. jabukae</i>
<i>C. algeriensis</i>	<i>C. mauritanica</i>
<i>C. amentacea</i>	<i>C. meriditerranea</i>

<i>C. barbata</i>	<i>C. nodicaulis</i>
<i>C. barbatula</i>	<i>C. pelagosae</i>
<i>C. brachycarpa</i>	<i>C. sauvageauana</i>
<i>C. compressa</i>	<i>C. schiffneri</i>
<i>C. corniculata</i>	<i>C. sedoides</i>
<i>C. crinita</i>	<i>C. spinosa</i>
<i>C. crinitophylla</i>	<i>C. squarrosa</i>
<i>C. dubia</i>	<i>C. susanensis</i>
<i>C. elegans</i>	<i>C. tamariscifolia</i>
<i>C. foeniculacea</i>	<i>C. usneoides</i>
<i>C. humilis</i>	<i>C. zosteroides</i>
<i>C. hyblaea</i>	<i>C. stricta</i>

I.3 Position systématique de *Cystoseira Stricta*

I.3.1 Classification

L'espèce *Cystoseira Stricta* (figure 1) admet comme classification:

Régne : Eukariota

Embranchement : Ochrophytes (Hétérochontés)

Classe : Phaeophyceae

Ordre : Fucales

Famille : Cystoseiracées

Genre : *Cystoseira*

Espèce : *stricta*



Figure 1 : *Cystoseira stricta*

I.3.2 Description

Cystoseira stricta est une algue brune dont le thalle très ramifié brun à brun vert, a un port de bruyère; elle peut atteindre 40 cm de long. Plusieurs rameaux rigides, épineux sont fixés sur un disque basal. Les jeunes rameaux prennent une teinte verte bleue intense quand ils sont immergés; ils sont iridescents.

Biologiquement, c'est une espèce vivace, A la fin de l'été, elle régresse et perd une grande partie des rameaux et des feuilles ; il subsiste la base, quelques tiges gabres, jaunâtres ou moignons.

En écologie, elle peuple les rochers éclairés (espèce photophile) et battus de l'étage infralittoral en Méditerranée occidentale. Sa consistance dure et coriace lui permet de résister à l'arrachement et aux chocs des vagues. Très sensible à la pollution, on ne la trouve que dans les eaux claires et pures donc elle est un bon indicateur biologique.

Avec une cinquantaine d'espèces étudiées, plus d'une centaine d'articles publiés, et plus de 200 structures caractérisées, une bibliographie complète sur la chimiotaxonomie des algues brunes de la famille des *Cystoseiracées* a été établie par plusieurs chercheurs sur les extraits lipidiques [31,32], et sur les huiles essentielles [6, 33, 35].

Dans le cadre de ce travail, on se limite à exposer les travaux effectués sur les huiles essentielles des algues brunes.

I.4 Etude chimique des huiles essentielles du genre *Cystoseira*

Les principaux métabolites secondaires rencontrés dans les huiles essentielles des algues brunes sont des terpènes [31] et des hydrocarbures poly-éthyléniques [1].

I.4.1 terpènes

I.4.1.1 Généralités

On appelle terpène un ensemble d'hydrocarbures cycliques ou à chaîne ouverte composés de plusieurs unités isopréniques, de formule brute $(C_5H_8)_n$ où n peut prendre les valeurs :

- 2 : monoterpène
- 3 : sesquiterpène
- 4 : diterpènes
- 6 : triterpène
- 8 : tétraterpène

Le nom terpène a été forgé à partir de la térébenthine, matière de base de leur obtention et de la racine « ène » pour rappeler qu'il s'agit de composés insaturés.

➤ Biosynthèse des terpènes

Biogénétiquement, les terpènes ont pour précurseur l'acide mévalonique, obtenu par activation enzymatique d'une molécule d'acide acétique [37]. La phosphorylation et la décarboxylation qui suivent aboutissent à une unité de base : le pyrophosphate de 3-isoprényle (PPI-3). Cette unité est isomérisée en pyrophosphate de 2-isoprényle (PPI-2) qui joue le rôle d'agent alkylant envers d'autres groupes PPI-3. Selon le nombre d'unités isopréniques fixées, on obtient par le pyrophosphate de géranylgeranyle (PPGG), les terpènes (20 Carbones). Les composés issus de cette sous-classe peuvent, par diverses réactions enzymatiques (cyclisation, oxydation, etc.) aboutir à un très grand nombre de produits naturels [13].

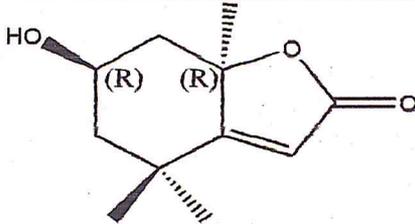
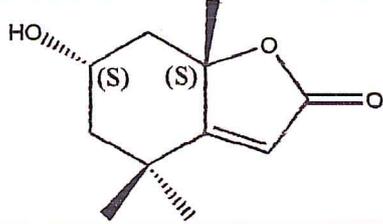
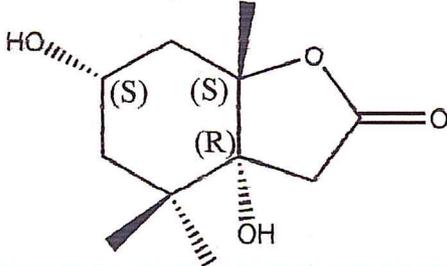
I.4.1.2 Monoterpènes

Aucun monoterpène vrai n'a encore été trouvé dans une algue brune [1]. Mais il convient de signaler la mise en évidence du loliolide, de l'épiloliolide et d'un dérivé déhydro dans les deux Dictyotales *Cystophora moniliformis* et *Padina crassa* ainsi que dans la Fucale *Sargassum crassifolium*. Il s'agit de monoterpènes (présentés dans la planche 1), mais le loliolide(planche1) étant connu pour être un produit de dégradation des xanthophylles, on peut raisonnablement supposer qu'il en est de même ici et qu'aucun monoterpène vrai n'a encore été trouvé dans une algue brune [1].

Quelques exemples des monoterpènes isolés des algues brunes sont présentés dans la planche 1.

Planche 1: Exemples de monoterpènes isolés des Algues brunes

Nom de l'espèce	Structure isolée	Ref
<i>Padina crassa</i>	 Loliolide	[38]

<i>Sargassum crassifolium</i>	 <p style="text-align: center;">Epiloliolide</p>	[39]
<i>Cystophora moniliformis</i>		[40]
<i>Undaria pinnatifida</i>		[41]

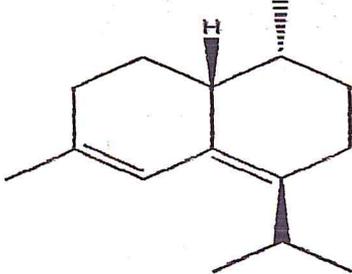
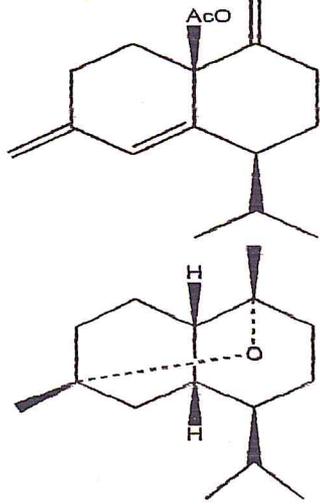
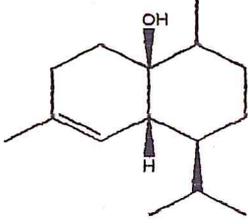
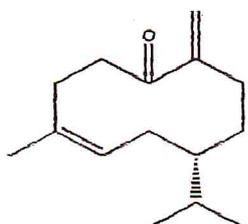
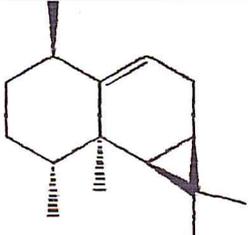
I.4.1.3 Sesquiterpènes

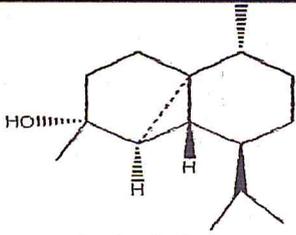
Les sesquiterpènes sont une classe de terpènes formés de 3 unités isopréniques et a comme formule moléculaire $C_{15}H_{24}$. Ils peuvent être acycliques ou contenir 1 a 2 cycles.

I.4.1.3 Sesquiterpènes des Dictyotales

Les sesquiterpènes des *dictyotales* peuvent être sous forme d'hydrocarbures, alcools, cétones, esters...pour la plupart déjà connus en milieu terrestre, à la stéréochimie près. Les hydrocarbures, ont en général une odeur forte qui contribue à « l'odeur de plage », et dont le rôle serait de repousser les prédateurs herbivores [1]. La planche 2 présente quelques exemples de sesquiterpènes isolés d'algues brunes.

Planche 2: Exemples de sesquiterpènes isolés des algues brunes

Nom de l'espèce	Structure isolée	Ref
<i>Dictyoptéris zonarioides</i>	 <p>Zonarène</p>	[42]
<i>Dilophus fasciola</i>	 <p>4,10-Epoxymuuroiane</p>	[43] [44]
<i>Dictyoptéris divaricata</i>	 	[45] [46]
<i>Dictyota sp.</i>		[47]

<i>Taonia aromaria</i>	 <p data-bbox="909 481 1061 510">Epicubébol</p>	[48]
------------------------	---	------

I.4.2 Les hydrocarbures poly-éthyléniques

Les algues brunes produisent des substances volatiles émises par toutes les espèces de Phaeophyceae et ne sont donc pas spécifiques d'un ordre ou d'une famille [1].

Concernant les structures, ces dérivés sont des hydrocarbures poly-éthyléniques presque toujours à 11 atomes de carbone, souvent cycliques (tailles des cycles : 3, 5, 6, 7, 8), et sans halogènes [1]. On a signalé quelques exemples de molécules contenant un époxyde ou un dihydrofurane.

Concernant le rôle biologique, il a été constaté que ces substances intervenaient de façons prépondérantes dans les mécanismes de reproduction des algues brunes car elles agissent comme des phéromones* sexuelles [1].

Ces hydrocarbures sont exclusivement émis par les gamètes femelles, et attirent les gamètes mâles de la même espèce, indépendamment du mode de déplacement des gamètes.

On a trois modes de reproduction des algues brunes :

- Isogamie : les deux gamètes sont mobiles et morphologiquement identiques.
- Anisogamie : les deux gamètes sont toujours mobiles mais le gamète femelle est de plus grande taille que le gamète mâle.
- Oogamie : seul le gamète mâle de petite taille est mobile et doit donc obéir à un signal émis par le gamète femelle.

* Les phéromones : sont des substances volatiles sécrétées par les êtres vivants et qui leur servent de signaux de communication.

Ce troisième mode de reproduction est le plus évolué et n'est observé que dans l'ordre des Fucales.

Dans ce mode, une des phéromones sexuelle est le fucoserratène (3Z, 5Z, -1, 3, 5- octatriène) qui est le seul exemple connu de phéromones à huit atomes de carbone.

La recherche et l'identification des phéromones sexuelles des algues brunes sont très délicates compte tenu des concentrations extrêmement faibles émises par les gamètes [1].

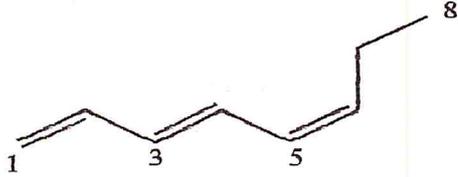
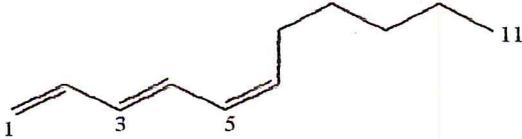
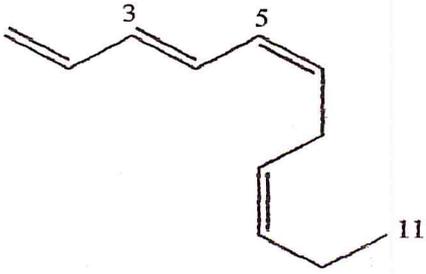
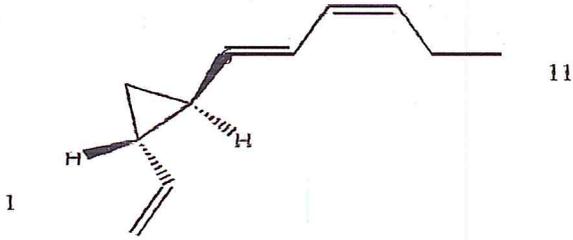
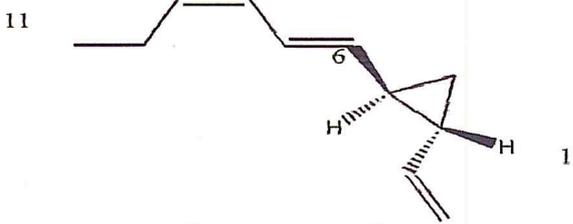
Ces recherches initiées dès les années 1970, bénéficient maintenant des avancées technologiques en matière de couplage entre la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse. Les dernières publications sur le sujet datent de 2002 [49, 57]. Les principales phéromones isolées d'algues brunes sont présentées dans la planche 3.

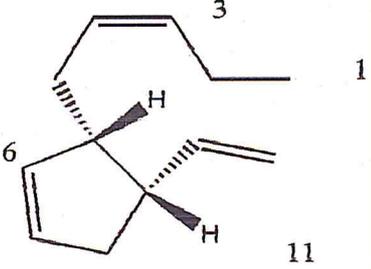
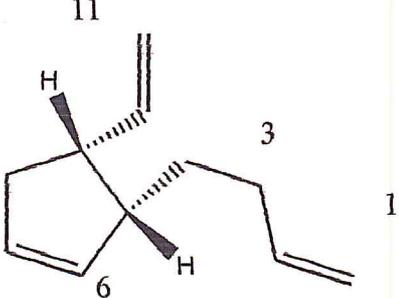
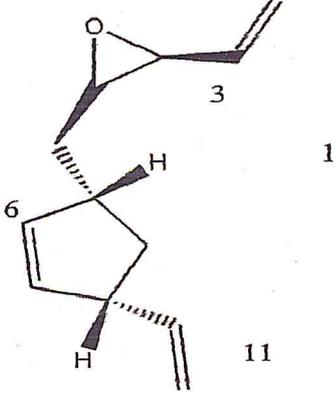
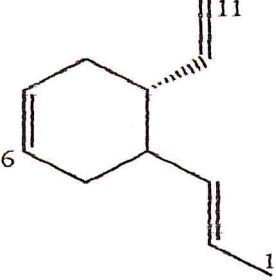
L'examen de la structure des hydrocarbures en C_{11} , permet de mettre en évidence des analogies structurales qui suggèrent une origine lipidique commune. Ces phéromones sont considérées comme des oxylipines** qui dérivent d'acides insaturés en C_{18} [50, 51, 58], ou de l'acide 3, 6,9-dodécatriénoïque qui provient lui-même de l'acide α -linoléique après trois β -oxydations successives [52,57].

Selon Moore, les trois acides insaturés en C_{18} : 9-18 :1 (oléïque), 9,12-18 :2 (linoléïque), et α -linoléique (9, 12,15-18 :3), se transformeraient en trois alcool en C_{11} . Les deux premiers seraient les précurseurs biologiques des hydrocarbures $C_{11}H_{18}$ et le troisième le précurseur des hydrocarbures $C_{11}H_{16}$ [50, 58]. Ces hypothèses sont résumées dans la planche 4.

** Oxylipines : sont globalement des dérivés de l'acide arachidonique (20 :4n6) et de l'acide stéaridonique (18 :4n3).

Planche3 : Principale phéromones des Algues brunes

<i>Espèces</i>	<i>Structures</i>	<i>Réf</i>
<p><i>Fucus serratus</i> <i>Fucus spiralis</i> <i>Fucus vesiculosus</i></p>	 <p>Fucoserratène</p>	<p>[59] [60] [61]</p>
<p><i>Cystophora silicosa</i></p>	 <p>Cystophotène</p>	<p>[62]</p>
<p><i>Dictyopteris australis</i> <i>Dictyoptéris plagiograma</i> <i>Dictyosiphon foenicullaceus</i></p>	 <p>Finnavarène (3E, 5Z, 8Z)</p>	<p>[63] [63] [64]</p>
<p><i>Harmosira blankssi</i> <i>Colpomenia peregrina</i></p>	 <p>Hormosirène</p>	<p>[62,65] [62]</p>
<p><i>Dictyoptéris australis</i> <i>Dictyoptéris plagiogramma</i></p>	 <p>Dictyoptérène B</p>	<p>[63] [63]</p>

<p><i>Cutleria multifida</i></p>	 <p>multifidène</p>	<p>[66]</p>
<p><i>Desmarestia aculeata</i> <i>Desmarestia viridi</i> <i>Syringoderma phinneyi</i></p>	 <p>viridiène</p>	<p>[65] [65] [66]</p>
<p><i>Perithalia caudata</i></p>	 <p>caudoxirène</p>	<p>[67]</p>
<p><i>Cutleria multifida</i></p>	 <p>Aucntène</p>	<p>[66]</p>

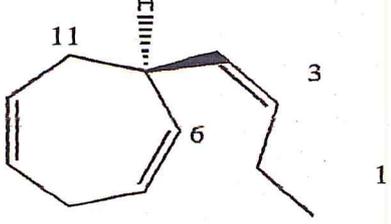
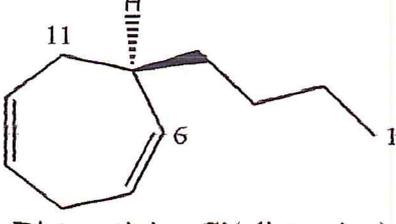
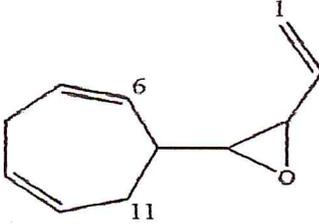
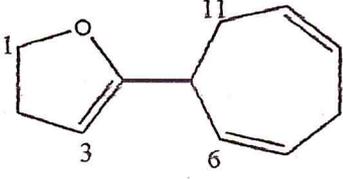
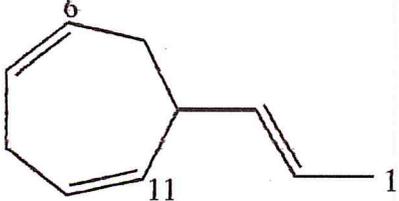
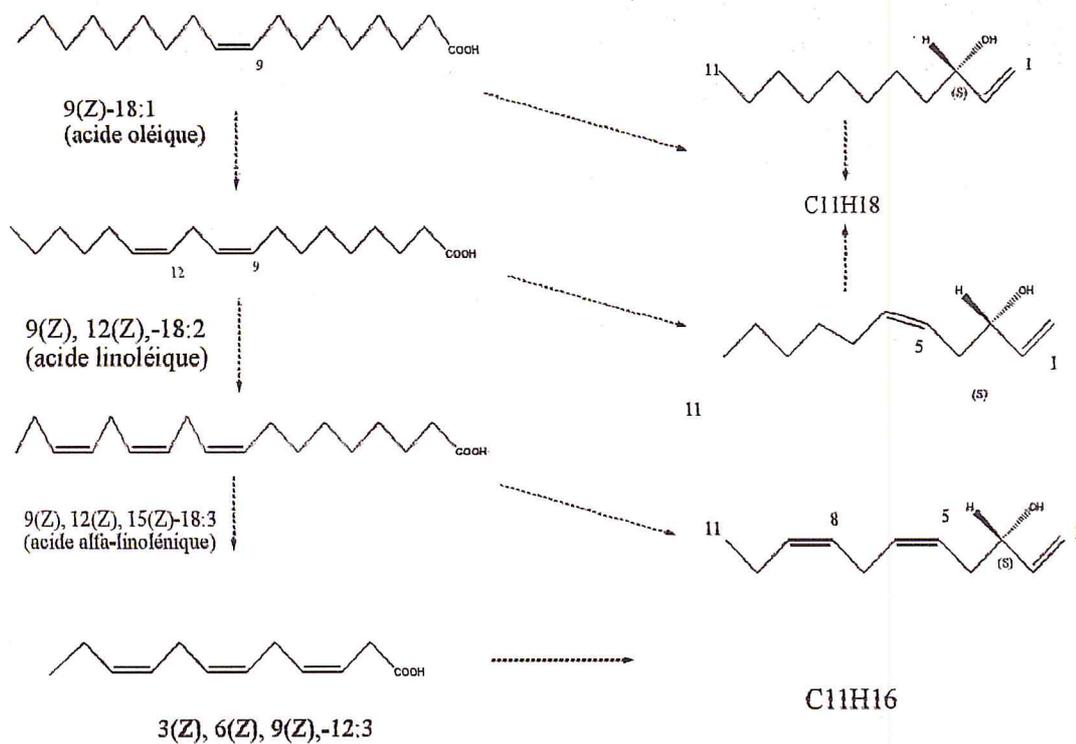
<i>Ectocarpus siliculosus</i>	 <p style="text-align: center;">ectocarpène</p>	[68]
<i>Dictyota dichotoma</i>	 <p style="text-align: center;">Dictyoptèrène C' (dictyotène)</p>	[69]
<i>Laminaria digitata</i> <i>Laminaria sp</i>	 <p style="text-align: center;">lamoxitène</p>	[70] [71]
<i>Laminaria digitata</i> <i>Laminaria hyperborea</i>		[72] [72]
<i>Cutleria multifida</i>		[66]

Planche 4 : Précurseurs biologiques des phéromones sexuelles d'algues brunes.
[30, 33, 48]



Les hypothèses précédentes n'ont été que partiellement vérifiées au cours d'expérience de marquage. Par la suite, les recherches effectuées sur *Dictyopteris prolifera* [49, 50] ont confirmé les hypothèses de Moore.

I.5 Activité biologique des huiles essentielles des Algues brunes

Actuellement, le besoin de nouveaux médicaments est grand, du fait de l'évolution des populations et des pathologies. Une des voies d'innovation repose sur la découverte de principes actifs originaux, qui peuvent provenir de la chimie de synthèse, de l'extraction à partir de sources biologiques, enfin, plus récemment, des biotechnologies fondées sur le génie génétique. En ce qui concerne l'extraction, les végétaux ont été et sont encore largement exploités, mais la tendance actuelle est d'évaluer la pertinence d'autres groupes du vivant, tels les insectes, les micro-organismes ou les organismes marins, comme source de molécules actives, avec pour idée que de nouveaux groupes livreront des contenus chimiques différents, et donc une plus grande variété exploitable [73].

Les macro- et micro-organismes marins occupent une place de choix dans ce domaine : très nombreux en termes d'espèces, soumis à un environnement spécifique très différent de celui des organismes terrestres, ils sont aussi facilement accessibles qu'au début de ces recherches. Par la suite, il a été révélé qu'un organisme marin fabriquait en grande quantité des produits que la chimie de synthèse peinait alors à élaborer. Ce fût le point de départ d'une aventure qui a livré jusqu'à ce jour plus de 15 000 produits originaux d'origine marine [73].

Les sources biologiques de plusieurs produits qui sont actuellement à usage thérapeutique sont majoritairement les algues, les spongiaires, les ascidies ou les mollusques [8,75].

L'activité antibactérienne [8,13], antivirale, antitumorale [13, 17], et d'autres propriétés comme celle qui entre dans la régulation du taux de cholestérol sanguin ou dans la régulation du système immunitaire ont été également étudiées [18, 21].

Les algues brunes présentent de différentes activités biologiques, leurs dérivés phénoliques interviennent comme antimicrobiens et antiappétents vis-à-vis des herbivores [74, 75].

Aussi, les phlorotannins surtout ceux de l'espèce *Ecklonia kurome*, sont fortement bactéricides pour 25 souches de bactéries résistantes à la *Méthicilline* comme le MRSA (Methicilline-Resistant Staphylococcus Aureus) [76].

La plupart des prénylquinones et hydroquinones et prénylées pourrait intervenir comme antioxydants et/ou antiradicalaires [77, 78].

On a découvert aussi des propriétés antifongiques pour la plupart des mérosesquiterpènes des algues brunes contre plusieurs espèces pathogènes comme *Phytophthora cinnamoni*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotirum* et *Sclerotium rolfsii* [79].

Récemment, il a été montré que les sesquiterpènes-quinones possédaient également des propriétés antitumorales [80], immunomodulatrices [81], et inhibitrices de la VIH-1 transcriptase inverse [82].

Les algues brunes contiennent aussi des dérivés spiraniques (des méroterpènes) citant comme exemple l'acide atomarique, isolé dès 1974 de *Taonia atomaria*, et récemment isolé de l'espèce *Styopodium zonale*, qui possèdent des dérivés cytotoxiques pour les cancers du poumon et du colon [38, 83].

Chapitre II
Etude
Expérimentale

II.1 Introduction

Ce chapitre est consacré à l'étude de la composition chimique et de l'activité biologique de l'huile essentielle d'algue brune *Cystoseira stricta*. Il comporte deux parties :

La première partie est consacrée à l'étude chimique, elle concerne l'extraction de l'huile essentielle de *Cystoseira stricta* par entraînement à la vapeur, l'analyse de sa composition chimique par CG/SM et la détermination des indices physico-chimiques. Elle porte également sur la préparation de l'extrait lipidique de *Cystoseira stricta*.

La deuxième partie est réservée à l'étude de l'activité biologique de l'huile essentielle et de l'extrait lipidique de *Cystoseira stricta*.

II.2 Récolte, traitement et conservation

Au cours de notre étude nous avons utilisé deux échantillons de *Cystoseira stricta*.

Le premier échantillon a été récolté en juin 2010 à la Corne d'Or à Tipaza.

Le deuxième échantillon a été récolté en Mai 2012 au niveau du site dit « Rocher Blanc » à l'ouest de Tipaza.

L'algue est ensuite triée manuellement pour éliminer toutes sortes d'épiphytes (organismes minuscules de nature animale ou végétale), elle est ensuite séchée à l'ombre, dans un endroit sec et aéré.

II.3 Protocole expérimental d'extraction d'huile essentielle

II.3.1 Description du dispositif d'extraction

On introduit la matière végétale dans une ampoule, placée au-dessus d'un ballon de distillation ($V=2l$) remplie au 2/3 d'eau. Après ébullition, les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau et condensés par la suite au niveau du réfrigérant pour donner un hydrolat. Ce dernier est constitué d'eau et d'huile essentielle à l'état liquide. L'opération dure 3 heures.

L'huile essentielle étant immiscible avec l'eau, l'hydrolat est un liquide légèrement trouble et sur lequel surnage une fine couche huileuse. Le dispositif d'extraction est représenté par la figure 2.

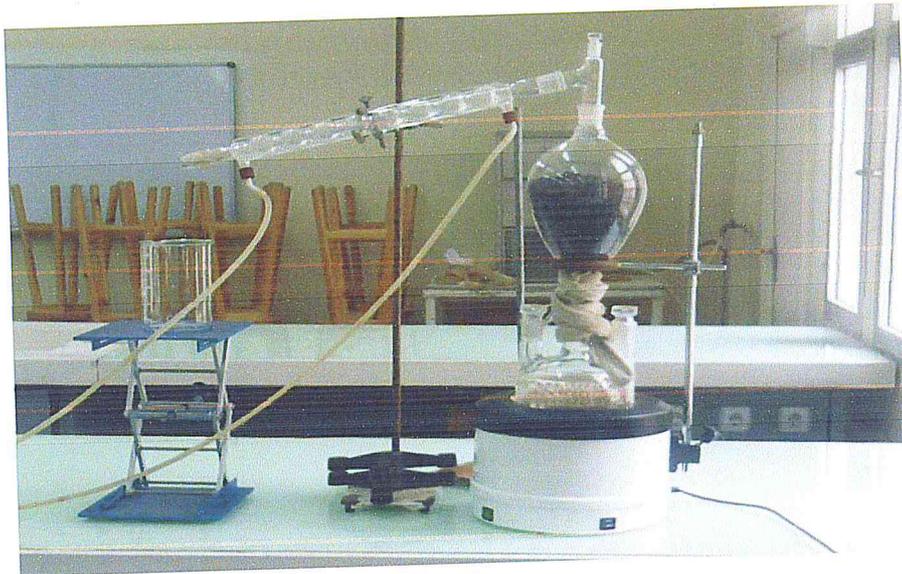


Figure 2 : Dispositif d'entraînement à la vapeur d'eau

II.3.2 Extraction liquide-liquide de l'huile essentielle

L'hydrolat recueilli est extrait avec l'éther diéthylique, on obtient alors deux phases : une phase organique contenant l'huile essentielle et une phase aqueuse. Les phases organiques obtenues de trois extractions successives sont regroupées et filtrées sur du sulfate de magnésium ($MgSO_4$) afin d'éliminer toutes traces d'eau (Figure 3). Ensuite on procède à l'évaporation du solvant à sa température d'ébullition normale.

L'huile essentielle ainsi obtenue, est conservée dans des flacons hermétiquement fermés et stockés dans un endroit sombre à $4^{\circ}C$.

La différence de poids des flacons vides et ceux remplis d'huile essentielle constitue la masse de l'huile essentielle. Les différentes étapes de cette opération sont illustrées par la figure 3.

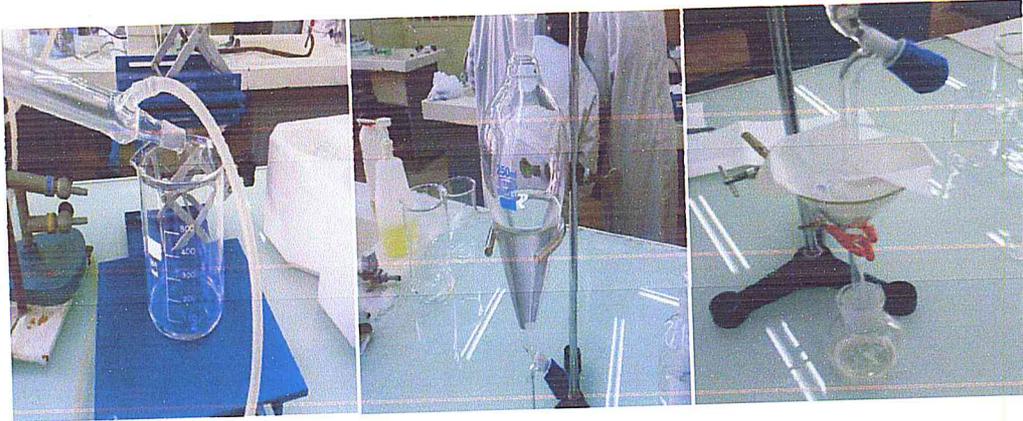


Figure 3 : Extraction liquide – liquide de l'huile essentielle

II.3.3 Rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle est estimé par le rapport de la masse d'huile essentielle et de la matière végétale utilisée. Il est exprimé en pour cent (%) et calculé par la formule suivant :

$$\eta (\%) = \frac{M_{HE}}{M_{MV}} * 100$$

η (%) : Rendement en huile essentielle (%)

M_{HE} : Masse de l'huile essentielle (g)

M_{MV} : Masse de la matière végétale utilisée (g)

Cinétique d'extraction

La cinétique d'extraction permet de suivre le processus d'entraînement à la vapeur en fonction de temps. L'objectif principal est d'optimiser le rendement d'extraction en fonction de temps. Elle permet également de comprendre le mécanisme de l'entraînement à la vapeur en se basant sur les quantités d'huile essentielle extraite.

D'une manière générale, la cinétique permet de:

- Optimiser le rendement ;
- Optimiser le temps d'extraction, ceci influence sur l'aspect économique de la production ;
- Comprendre le mécanisme d'extraction.

II.4 Préparation de l'extrait lipidique de *Cystoseira stricta*

Nous avons utilisé la méthode de la macération pour la préparation de l'extrait lipidique de *Cystoseira stricta*. Elle consiste à laisser séjourner ou macérer l'algue dans un solvant organique à froid pendant quelques jours pour extraire le maximum de principes actifs ou nutritifs. Dans notre cas, on a utilisé un mélange de méthanol et de dichlorométhane (à une proportion de 50/50).

Après la macération, on procède à une filtration pour récupérer le miscella (solvant+extrait) contenant les composants de la plante dissout dans le solvant organique. Le miscella récupéré est traité avec l'éther diéthylique, on obtient alors deux phases : une phase organique contenant l'extrait et une phase aqueuse.

La phase organique obtenue et filtrée sur du sulfate de magnésium ($MgSO_4$) afin d'éliminer toutes traces d'eau. Enfin, on procède à l'évaporation du solvant à sa température d'ébullition normale pour récupérer l'extrait.

II.5 Analyse physico-chimiques de l'huile essentielle de *Cystoseira stricta*

II.5.1 Mesure des indices physiques

II.5.1.1 Détermination de la densité

La densité est définie comme étant la masse volumique de l'huile essentielle rapportée à celle de l'eau pour une température donnée. Elle est mesurée à l'aide d'un pycnomètre d'un volume de 10 ml (Figure 4).

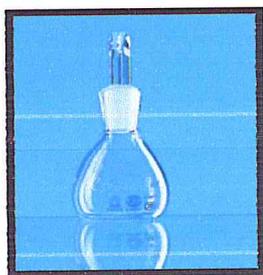


Figure 4 : Pycnomètre

II.5.1.2 Détermination de l'indice de réfraction (AFNOR NF T75-112 :1999)

[76]

C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante. La mesure a été effectuée en utilisant un réfractomètre (Figure 5).

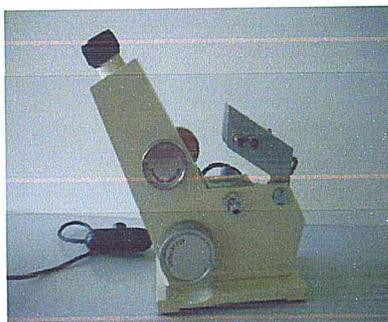


Figure 5 : Réfractomètre

II.5.1.3 Détermination du pouvoir rotatoire (AFNOR NF ISO 592 :1999)

C'est l'angle, exprimé en milliradians et/ou degrés d'angle, dont tourne le plan de polarisation d'une radiation lumineuse de longueur d'onde de $589.3 \text{ nm} \pm 0.3 \text{ nm}$, correspondant aux raies D du sodium, lorsque celle-ci traverse une épaisseur de 100 mm de l'huile essentielle dans des conditions déterminées de température. Le polarimètre utilisé pour la détermination du pouvoir rotatoire est illustré sur la figure 6.



Figure 6 : Polarimètre

II.5.2 Mesure des indices chimiques

II.5.2.1 Détermination de l'indice d'acide (AFNOR NF T75-103 :1999) [76]

C'est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'huile essentielle. Les acides libres sont neutralisés par une solution d'hydroxyde de potassium KOH éthanolique. La figure 7 montre les différentes étapes de la mesure.

L'indice d'acide (IA) est calculé par la relation :

$$IA = V \cdot C \cdot \frac{m}{56,11}$$

IA: Indice d'acide

V : est le volume, en ml, de solution de KOH utilisé pour le titrage ;

C : est la concentration exacte, en moles par litres, de la solution de KOH ;

m : est la masse, en gramme, de l'huile essentielle.

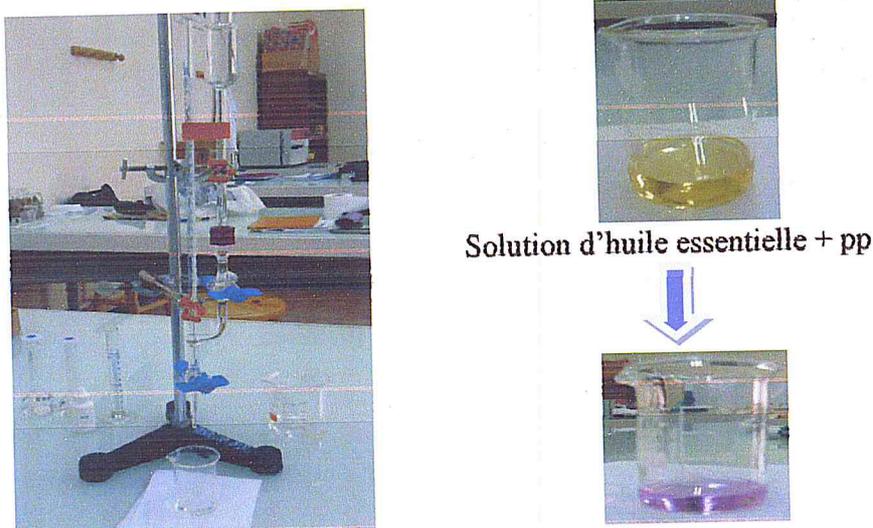


Figure 7 : Etapes de détermination de l'indice d'acide

II.5.2.2 Détermination de l'indice d'ester (AFNOR NF T 75-104 :1994) [76]

C'est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libérés par hydrolyse des esters contenus dans 1 g d'huile essentielle. L'hydrolyse des esters présents dans l'huile essentielle se fait par chauffage, dans des conditions définies, en présence d'une solution d'hydroxyde de potassium éthanolique et dosage en retour de l'excès d'alcali par une solution d'acide chlorhydrique HCl. La figure 8 illustre les différentes étapes de la détermination de l'indice d'ester.

L'indice d'ester (IE) est donné par la formule suivante :

$$IE = \frac{28,05}{m} (V_0 - V_1) - IA$$

Où :

IE : Indice d'ester ;

V_0 : est le volume, ml, de la solution HCl utilisé pour l'essai à blanc ;

V_1 : est le volume, ml, de la solution HCl utilisé pour la détermination ;

m : est la masse, en gramme, de l'huile essentielle ;

IA : est la valeur de l'indice d'acide déterminé selon la norme NF T 75-103.



Figure 8: Etapes de détermination de l'indice d'ester

II. 6 Analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

II. 6. 1 Description de l'appareil

L'analyse qualitative de la composition chimique de l'huile essentielle extraite par entraînement à la vapeur a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse « CG-SM ». L'identification des différents composés est effectuée en se basant sur les banques de données spectrales Wiley.7n et NBS75k.1 (comprenant, respectivement, des spectres de masse de 250000 et 75000 molécules), avec un taux de similitude supérieure ou égal à 90%.

II. 6. 2 Condition opératoire

L'analyse est effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse HEWLETT-PACKARD-HP-6890 couplé à un spectromètre de masse HP 5972 (Figure 9), dans les conditions suivantes :

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

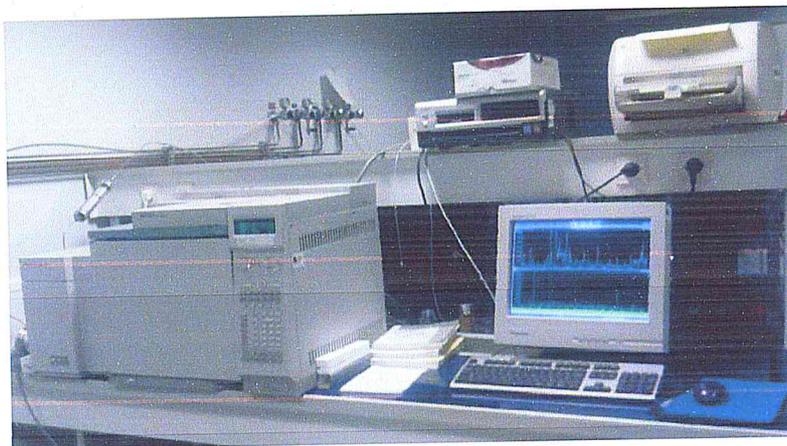


Figure 9: Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse

II.7 Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cystoseira stricta*

Cette partie consiste à mettre en évidence le pouvoir antiseptique de l'huile essentielle à l'aide d'une méthode qualitative, en procédant à des tests sur une sélection de souches de référence bactérienne et fongique connues et qualifiées comme étant dangereuses et pathogène pour l'homme et l'animal.

II. 7. 1 L'aromatogramme

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée « antibiogramme » ou « méthode par diffusion en milieu gélosé » ou encore « méthode des disques ».

Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des antibiotiques testés, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale [84].

Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar réalisé dans une boîte de pétri (in vitro). Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque absorbant sur lequel on dépose une quantité donnée d'huile essentielle.

➤ Principe :

La technique consiste à utiliser des disques de papier absorbants stériles (de 9 mm de diamètre) imprégnés d'une quantité d'huile essentielle pure ou diluée et déposés à la surface d'une gélose inoculée et uniformémentensemencée par la suspension bactérienne à étudier. La diffusion de l'HE à partir du disque au sein de la gélose détermine un gradient de concentration.

Les micro-organismes poussent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'huile essentielle suffisante pour inhiber leur croissance dont on observe après incubation tout autour des disques une zone circulaire claire indemne de colonies, appelée « zone d'inhibition » (Figure 10).

Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'huile essentielle. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante [84].

Cette méthode est tirée du principe du titrage des antibiotiques « pharmacopées européennes 2002 », et son application pour les huiles essentielles a été validée par plusieurs auteurs [85, 88].

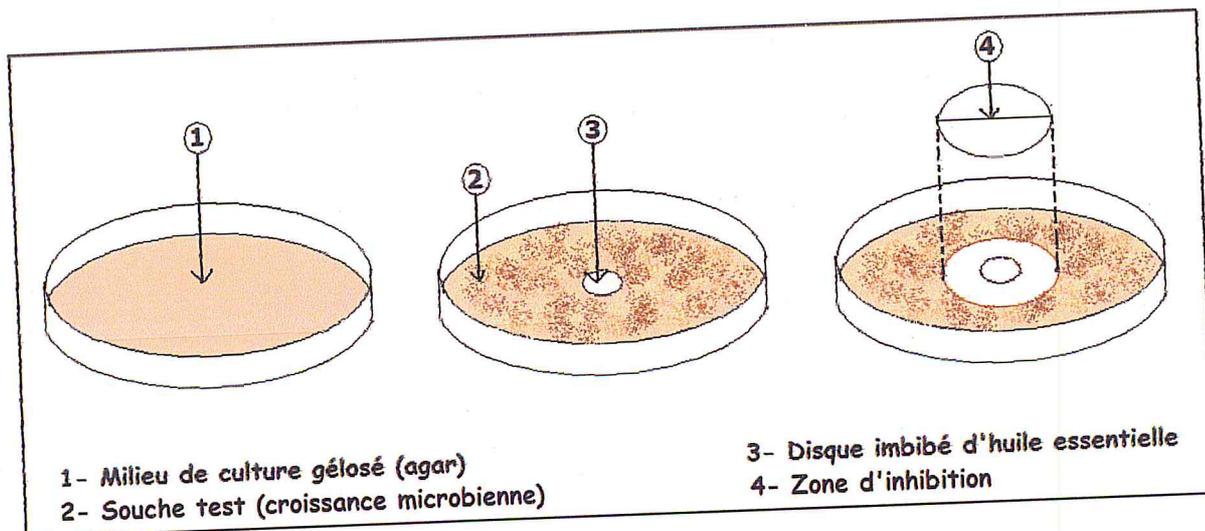


Figure 10 : Illustration de la méthode des antibiogrammes

II. 7. 2 : Les souches bactériennes choisies

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

Nous avons utilisés des souches de références ATCC fournies par le laboratoire d'antibiothérapie et d'hygiène de l'institut Pasteur d'Alger agréé par l'OMS (Tableau 2).

Nous avons compléter nos analyses en utilisant des souches et une levure isolées à partir de produits pathogéniques au sein de l'unité de bactériologie clinique de laboratoire centrale de l'Etablissement Publique Hospitalier de BOUFARIK (Tableau 3).

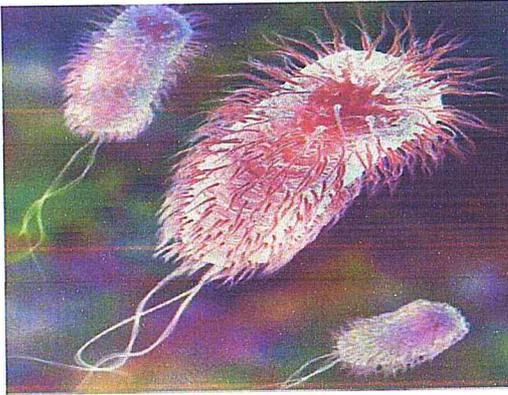
Les microorganismes testés vus sous microscope sont illustrés dans la figure 11.

Tableau 2 : les souches de références utilisées dans notre travail

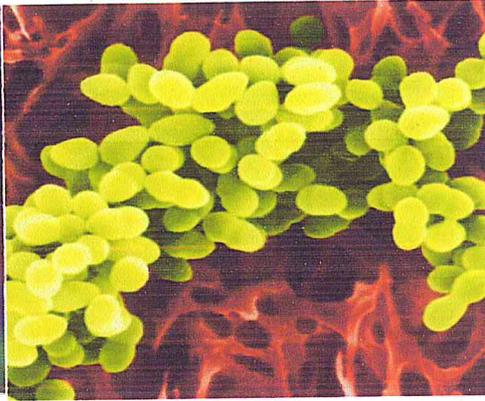
Souches	Gram	ATCC
<i>Escherichia coli</i>	-	ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	ATCC 25853
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	ATCC 25923

Tableau 3 : les différents micro-organismes pathogènes utilisés dans notre étude

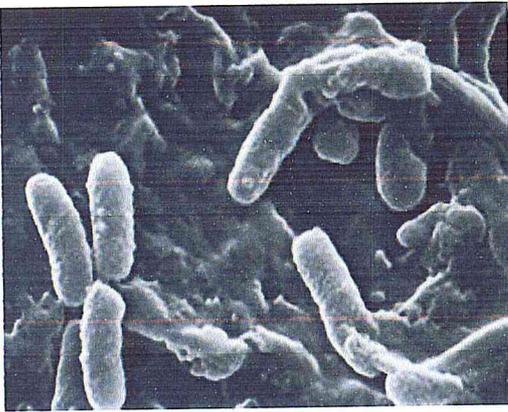
	Souches
Les Bactéries Gram -	<i>Proteus mirabilis</i>
	<i>Salmonella typhi</i>
	<i>Anterobacter ssp</i>
La Levure	<i>Candida albicans</i>



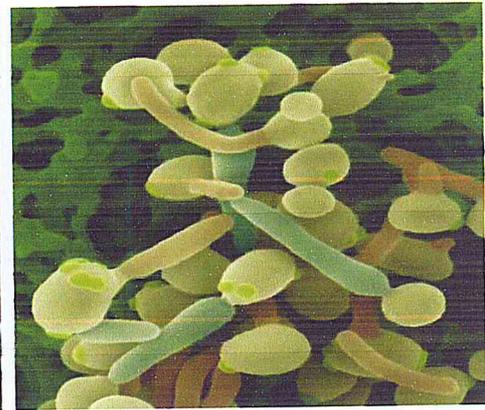
Escherichia coli



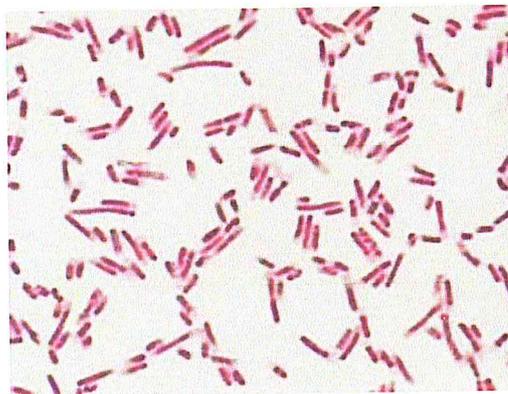
Staphylococcus aureus



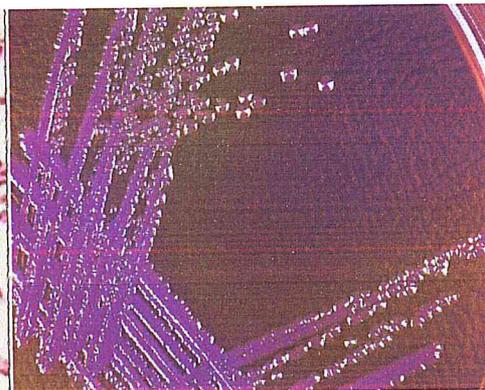
Pseudomonas aeruginosa



Candida albicans



Proteus mirabilis



Anterobacter ssp

Figure 11: bactéries et levures vues sous microscope

II. 7. 3 Protocole expérimental [81]

➤ Préparation de l'inoculum

Les suspensions bactériennes ont été réalisées par prélèvement de 3 à 5 colonies bien isolées et identiques d'une culture jeune de 18h pour les bactéries et 48h pour les levures, les mettre ensuite dans 9 ml d'eau physiologique stérile, puis agiter au vortex pendant quelques secondes.

La lecture de la densité optique est effectuée en utilisant un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620 nm ; et doit être comprise entre 0.22 et 0.32 pour les bactéries sauf pour *Staphylococcus aureus* qui doit être comprise entre 0.3 et 0.4 ; et entre 2 et 3 pour les levures, ce qui correspond à une concentration optimale de 10^7 à 10^8 germes/ml.

➤ Préparation des milieux de culture

Verser les milieux gélosés déjà liquéfiés dans un bain marie (Muller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures) sur des boîtes de pétri à raison de 15 ml par boîte.

➤ Préparation de la deuxième couche du milieu

- Remplir des flacons stériles avec 50 ml de Muller-Hinton pour les bactéries, et avec 50 ml de Sabouraud pour les levures, ceci pour chacune des souches,
- ensemencer les milieux de culture avec 200 μ L de chaque suspension,
- Transvaser rapidement 4 ml de chaque milieu inoculé en deuxième couche sur la surface des boîtes contenant déjà la première couche de gélose,
- Etaler rapidement la seconde couche en faisant pivoter la boîte sur elle-même pour avoir une surface uniforme et laisser solidifier sur la paillasse.

➤ Dépôt des disques

Les disques en cellulose stériles, imbibés d'une quantité d'huile essentielle, sont déposés sur la surface de la gélose, puis laisser diffuser sur la paillasse pendant 30 minutes. L'incubation s'effectue à 37°C pendant 24 H pour les bactéries et 25°C pendant 48 H pour les levures.

➤ Lecture :

Mesurer le diamètre des zones claires autour des disques (zone d'inhibition) à l'aide d'un pied à coulisse.

II. 8 Résultats et discussion

II. 8. 1 Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de *Cystoseira stricta*

L'huile essentielle de *Cystoseira stricta* obtenue par entraînement à la vapeur présente les caractéristiques organoleptiques regroupées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *Cystoseira stricta*

Aspect	Couleur	Odeur
Visqueux	Marron	Caractéristique

II. 8. 2 Rendement en huile essentielle de *Cystoseira stricta*

Nous avons effectué plusieurs manipulations d'entraînement à la vapeur (tableau 5), le rendement moyen en huile essentielle est de 0,0112%.

Cette valeur est faible en comparaison à celles obtenues pour les plantes terrestres [91]

Des extractions successives permettent d'épuiser la matière végétale et d'augmenter le rendement de l'extraction.

Tableau 5 : Rendement en HE obtenue lors des différentes expériences

Manipulation	Masse d'algue utilisée (g)	Quantité d'HE extraite (g)	Rendement en HE (%)
1	180,241	0,02	0,011
2	180	0,0183	0,01
3	180,353	0,0219	0,012
4	179,951	0,0215	0,012
5	180,1	0,0198	0,011

II. 8. 3 Rendement d'extrait par solvant

Une masse de 200 g d'algue a permis d'obtenir 6,6 g d'extrait brut soit un rendement de 3,3 %. Des extractions successives permettent d'épuiser la matière végétale et d'augmenter le rendement de l'extraction.

II. 8. 4 Etude de la cinétique d'extraction

La cinétique de l'entraînement à la vapeur de l'huile essentielle est représentée par la courbe donnée par la figure 12.

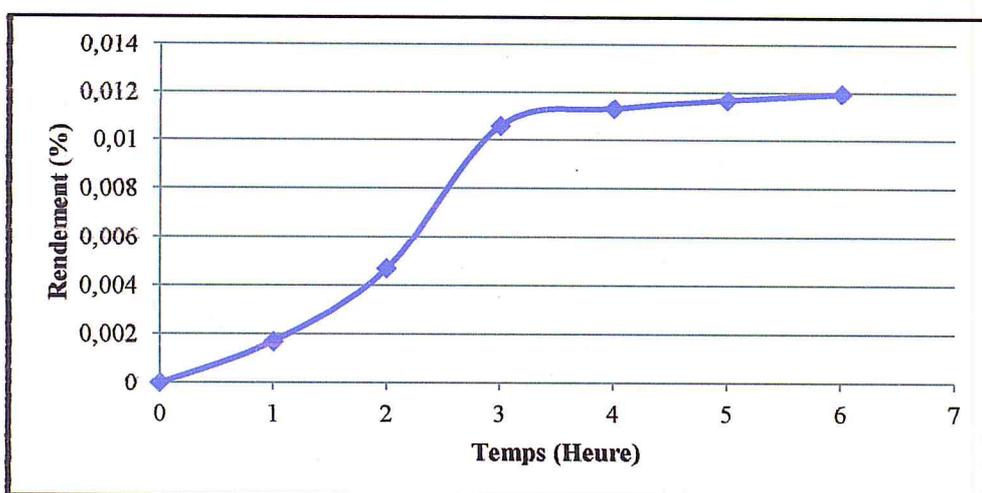


Figure 12 : Evolution du rendement en HE en fonction du temps

La cinétique d'entraînement à la vapeur de l'huile essentielle (figure 12) comprend deux étapes :

- La première étape dure 3 heures, on constate une augmentation croissante du rendement,
- La seconde étape commence à partir de 3 heures d'entraînement à la vapeur, elle consiste en un pallier avec un rendement relativement constant. Sur la base de cette constatation, on peut conclure qu'un temps d'extraction de 3 heures est relativement suffisant pour l'opération d'entraînement à la vapeur.

II. 8. 5 Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de *Cystoseira stricta*

L'huile essentielle de *Cystoseira stricta* obtenue par entraînement à la vapeur présente les caractéristiques physico-chimiques regroupées dans le tableau 6. Ces résultats sont en accord avec ceux des normes AFNOR.

Tableau 6 : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de *Cystoseira stricta*

Densité	0,79
Indice de réfraction	1,9448 à 21.1°C
Pouvoir rotatoire	-0.73
Indice d'acide	0,175
Indice d'ester	36,84
Indice de saponification	36,015

La densité des huiles essentielle est généralement inférieure à 1 (sauf pour quelques exceptions), ce qui est vérifié pour notre huile essentielle.

Pour les constantes chimiques, l'indice d'acide donne une idée sur le taux d'acides libres. Dans notre étude, cet indice est inférieur à 2, ce résultat est une preuve de bonne conservation d'huile essentielle (faible quantité d'acides libres), ce qui caractérise la pureté et la stabilité notre huile essentielle.

L'indice de réfraction des huiles essentielles est généralement élevé car il varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés qui sont des composants déviateurs de la lumière polarisée. Il est supérieur à ceux de l'eau à 20°C = 1,3356, et de l'huile d'olive à 20°C = 1,4684. D'après notre résultat, la composition chimique de notre huile essentielle contient une fraction importante en terpènes.

II. 8. 6 Etude analytique de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

L'analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse dans les conditions citées auparavant (§II.6.2) a permis l'identification des composés regroupés dans le tableau 7. Les données des spectres de masse des composés inconnus exprimées en m/z (abondance %) des principaux fragments sont regroupées dans le tableau 8.

Les profils chromatographiques sont présentés sur les figures 13 et 14.

Tableau 7 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Cystoseira stricta*

Ordre d'élution	Temps de rétention (mn)	Nom du composé	Formule moléculaire	% de l'aire
1	6,91	Limonene	C ₁₀ H ₁₆	0,485%
2	10,85	2-hexanamine	C ₇ H ₁₇ N	0,027%
3	11,94	Cyclobutanol	C ₄ H ₈ O	0,052%
4	13,89	1H-pyrrole-2,5-dione	C ₇ H ₉ NO ₂	0,278%
5	15,63	2,3-dihydro-5-H-1,4-dioxepine	C ₅ H ₈ O ₂	0,277%
6	16,276	I1		0,320%
7	17,238	Trans-4,4-dimethyl-2-hexane	C ₈ H ₁₆	0,456%
8	18,95	γ- Dodecalactone	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	0,095%
9	19,195	I2		0,281%
10	19,58	4-Octen-3-one	C ₈ H ₁₄ O	0,057%
11	20,19	5-acetyl-2-hydrazino-4-methylpyrimidine	C ₇ H ₁₀ N ₄ O	1,039%
12	22,82	Acide 1,2-decarboxybenzoïque	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	0,109%
13	23,44	4-(2-aminopropyl)-phenol	C ₉ H ₁₃ NO	0,206%
14	24,251	I3		0,547%
15	24,676	I4		0,745%
16	24,709	5,6-epoxy-beta-ionone	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	0,575%

17	24,821	Beta-ionone	C ₁₃ H ₂₀ O	0,602%
18	24,956	2-Methyloctadec-7-yn-9-one	C ₁₉ H ₃₄ O	0,416%
19	25,649	dihydroactinidiolide	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	1,295%
20	26,689	I5		0,534%
21	28,400	Acide dodécanoïque	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	1,201%
22	29,139	(Z,Z)-Alpha-Farnesene	C ₁₅ H ₂₄	0,939%
23	29,653	diphénylméthanone	C ₁₃ H ₁₀ O	0,359%
24	29,966	I6		0,334%
25	30,727	I7		0,296%
26	31,767	I8		0,372%
27	33,076	I9		0,386%
28	33,568	Heptacécane	C ₁₇ H ₃₆	1,515%
29	33,791	2-(2-furanyl)- 1,4-Dioxane	C ₈ H ₁₀ O ₃	0,636%
30	35,559	Acide tétradécanoïque	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	5,437%
31	38,179	I10		0,766%
32	38,220	I11		0,621%
33	38,310	I12		0,634%
34	38,556	I13		0,266%
35	39,126	7-methoxy-5-ethoxy-2,2-dimethyl-2H-chromene	C ₁₄ H ₁₈ O ₃	9,931%
36	39,182	Patchoulane	C ₁₅ H ₂₆	12,693%
37	39,451	7-(1,1-diméthylethyl)-4-méthyl-5-nitrobenzoxazole	C ₁₂ H ₂₄ N ₂ O ₃	21,289%
38	39,574	I14		2,497%
39	39,697	I15		1,044%
40	41,430	Acide 8-hexdécanoïque	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	15,434%
41	42,202	Acide palmétique	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	19,069%
42	44,383	I16		0,349%
43	44,551	I17		0,299%
44	44,674	I18		0,270%

45	47,045	Acide oléique	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	1,162%
46	56,955	Triacotane	C ₃₀ H ₆₂	0,423%
47	61,697	dotriacotane	C ₃₃ H ₆₆	0,598%

Tableau 8 : Données des spectres de masse des composés inconnus exprimées sous forme de m/z (abondance %) des principaux fragments

I _i	m/z (%)
I1	43(100%), 44(80%), 84(40%), 83(33%)°
I2	162(100%), 147(68%), 91(55%), 65(27%)
I3	44(100%), 43(83%), 81(46%), 41(43%)
I4	123(100%), 43(70%), 44(23%), 41(18%)
I5	27(100%), 40(62%), 113(34%), 177(33%)
I6	30(100%), 43(77%), 41(52%), 57(47%)
I7	31(100%), 44(80%), 41(34%), 55(32%)
I8	25(100%), 44(73%), 41(42%), 93(33%)
I9	33(100%), 44(58%), 41(14%), 150(13%)
I10	38(100%), 91(72%), 41(54%), 119(53%)
I11	38(100%), 91(60%), 105(51%), 119(51%)
I12	38(100%), 40(51%), 91(48%), 105(50%)
I13	39(100%), 44(50%), 123(22%), 41(16%)
I14	40(100%), 41 (67%), 79(63%), 105(60)
I15	40(100%), 71(97%), 41(60%), 44(44%)
I16	44(100%), 44(92%), 41(53%), 55(37%)
I17	45(100%), 41(73%), 79(67%), 55(55%)
I18	45(100%), 43(90%), 41(46%), 55(44%)

L'huile essentielle de *Cystoseira stricta* s'est révélée être très riche puisqu'elle contient plusieurs classes de composés chimiques. En effet, son analyse par GC/MS a permis de mettre en évidence 47 composés.

La composition globale est largement dominée par des acides gras avec 42,5% dont les principaux sont l'acide palmitique (19,069%), l'acide 8-hexadécanoïque (15,434%) et l'acide tétradécanoïque (5,437%).

La classe des terpènes occupe une fraction importante, puisqu'elle représente environ 16,589%. Les principaux terpénoïdes en termes de teneur sont : le Patchoulane (12,693%), le Limonène (0,485%) et le (Z,Z)-Alpha-Farnésène (0,939%).

On remarque aussi la présence d'un chromène organique qui est le 7-méthoxy-5-éthoxy-2,2-diméthyl-2H-chromène avec une teneur de 9,931%.

On note également la présence en faible proportion des cétones telles que la 4-Octène-3-one (0,057%) et la 2-Méthyl-octadéc-7-yn-9-one (0,416%).

L'huile essentielle renferme également des hydrocarbures linéaires tels que le Heptadécane (1,515%), le Triacotane (0,423%) et le dotriacontane (0,598%).

En se basant sur les banques de données spectrales, nous n'avons pas pu identifier certains composés. Des manipulations complémentaires de fractionnement de l'huile essentielle s'avèrent nécessaires.

Nous avons présenté les données du spectre de masse des composés inconnus par une éventuelle exploitation.

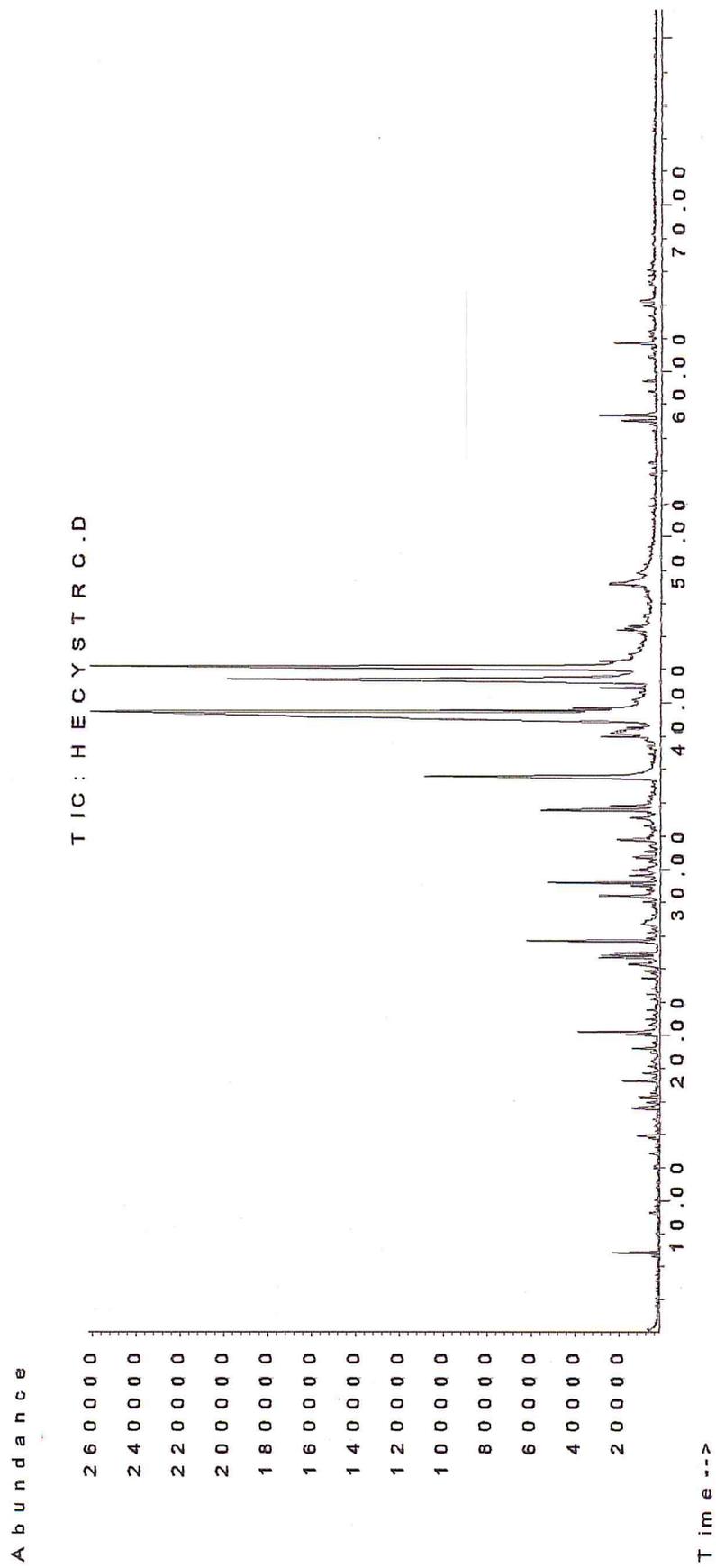


Figure 13: profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle de *Cystoseira stricta*

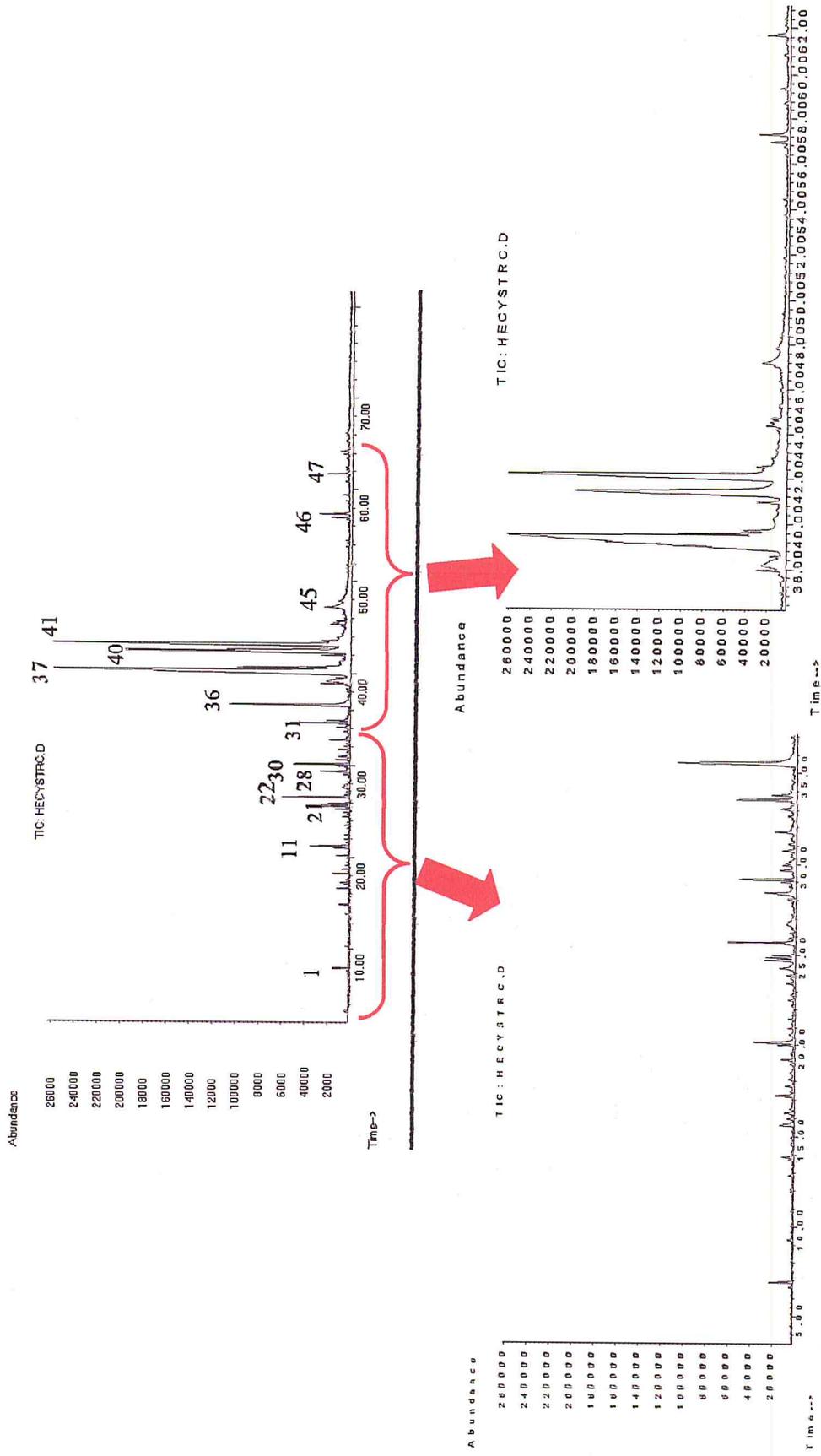


Figure 14 : Agrandissement et numérotation des pics du chromatogramme de l'huile essentielle de *Cystoseira stricta*

II. 8. 7 L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de l'extrait lipidique de *Cystoseira stricta*

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle est évaluée en fonction du diamètre (mm ou cm) des zones d'inhibition de la croissance microbienne [90].

L'estimation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est basée sur une échelle de mesure mise en place par Meena et al. (1994) [91], ils ont classé le pouvoir antimicrobien, en fonction des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne, en 04 classes :

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

II. 8. 7.1 Activité antimicrobienne de l'huile essentielle

➤ Détermination de l'activité antimicrobienne

En se basant sur l'échelle de mesure de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles [91], on peut déduire que l'huile essentielle de *Cystoseira stricta* a une action légèrement inhibitrice sur les bactéries *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Proteus ssp*, elle est non inhibitrice sur *Anterobacter ssp*.

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cystoseira stricta* obtenus par mesure des diamètres d'inhibition de la croissance des microorganismes sont illustrés graphiquement par la figure 15.

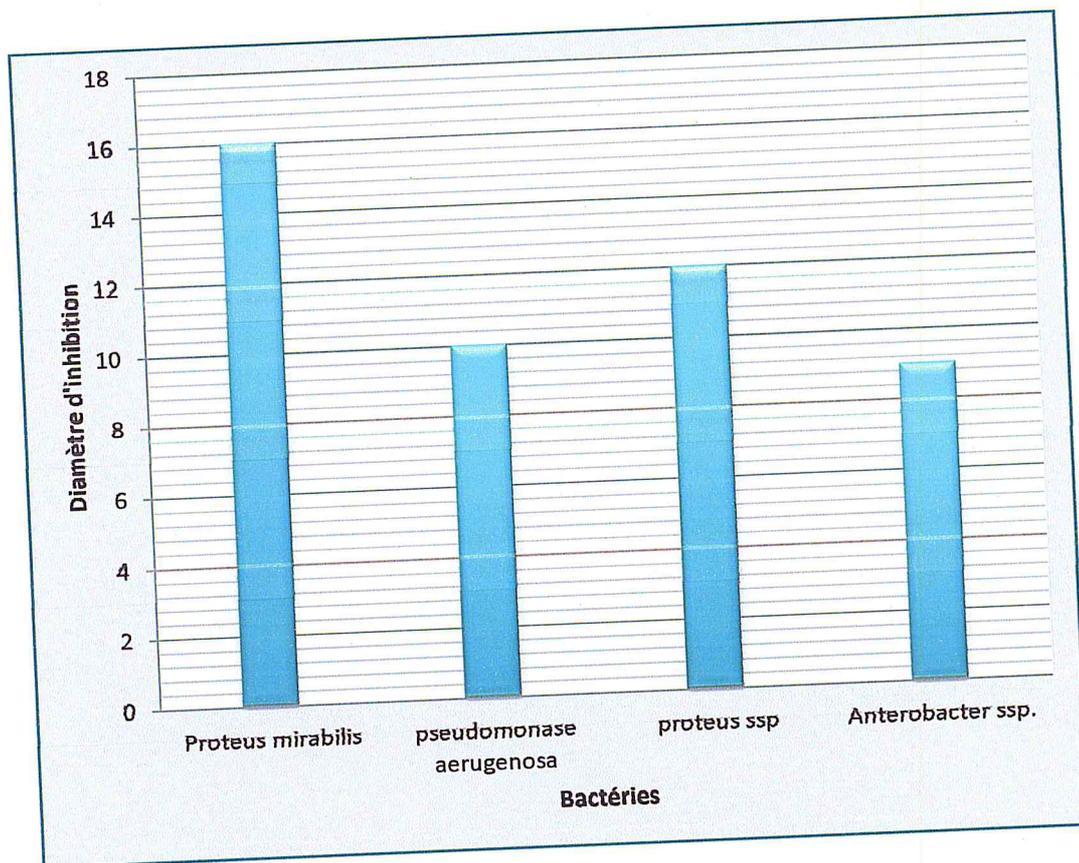
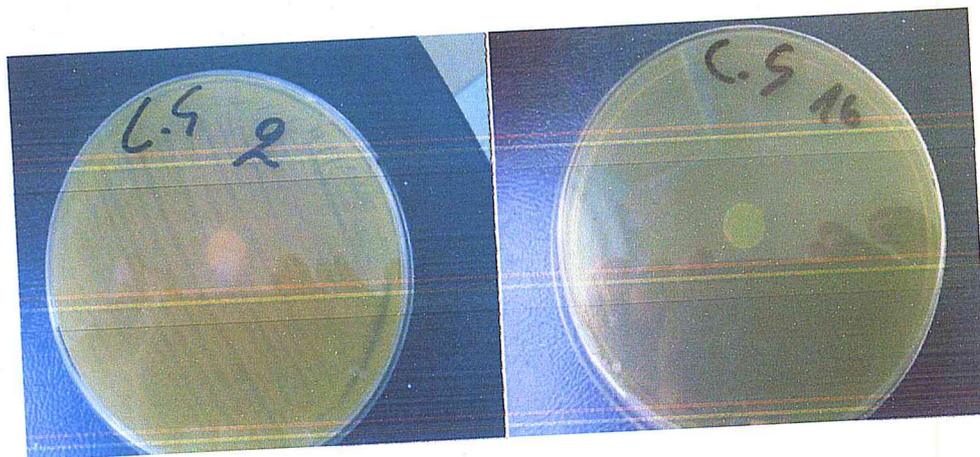


Figure 15 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des bactéries

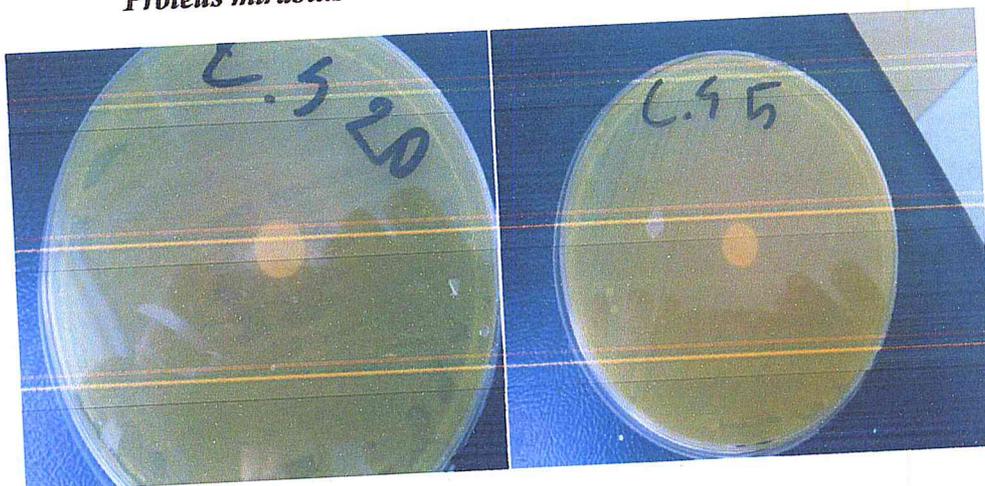
On peut constater d'après l'histogramme représenté par la figure 15 que parmi les bactéries testées, la souche *Proteus mirabilis* s'est révélée la plus sensible envers notre huile essentielle. Contrairement à *Pseudomonase aeruginosa* et *Proteus ssp* qui se sont avérées légèrement résistantes. Cependant la souche *Anterobacter ssp* s'est montrée résistante vis-à-vis de l'huile essentielle.

Les figure 16 présente les résultats obtenus de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle testée sur les bactéries après 24 h d'incubation sur les boites de Pétri.



Proteus mirabilis

Pseudomonase aeruginosa



Proteus ssp

Anterobacter ssp

Figure 16 : Zones d'inhibition de l'huile essentielle testée pour les quatre souches bactériennes

➤ **Détermination de l'activité antifongique :**

D'après les résultats obtenus, et en se référant toujours à l'échelle élaborée par Meena et Sethi, on peut conclure que l'huile essentielle de *Cystoseira stricta* n'a pas une action inhibitrice contre la levure *Candida albicans* car le diamètre d'inhibition est inférieur à 10 mm.

II. 8. 7. 2 Activité antimicrobienne de l'extrait lipidique

Selon l'échelle de mesure de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits lipidiques [91], on peut déduire que l'extrait lipidique de *Cystoseira stricta* a une action légèrement inhibitrice sur la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, et elle est non inhibitrice contre les bactéries *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait lipidique de *Cystoseira stricta* obtenus par mesure des diamètres d'inhibition de la croissance des microorganismes sont illustrés graphiquement par la figure 17.

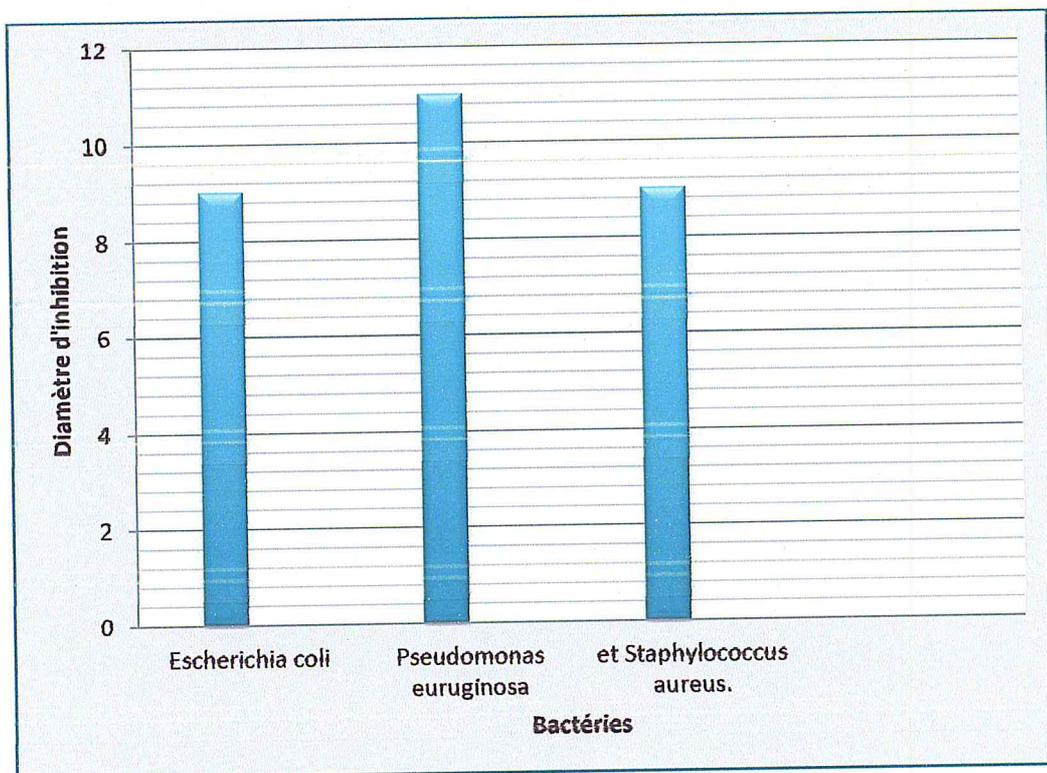


Figure 17 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des bactéries



Conclusion

Le présent travail comporte deux parties distinctes : une synthèse bibliographique et une partie expérimentale.

La synthèse bibliographique nous a permis d'entreprendre une discussion sur la systématique, l'étude chimique et l'activité biologique des espèces du genre *Cystoseira*.

La partie expérimentale a été consacrée à l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de *Cystoseira stricta* ainsi qu'à l'étude de l'activité biologique de l'huile essentielle et de l'extrait lipidique de la même espèce.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a relevé la présence de 47 composés. Les acides gras occupent la plus grande proportion (42,5%) suivi des terpènes (16,589%). Certains composés n'ont pas pu être identifiés en se basant uniquement sur le spectre de masse.

L'étude de l'activité antimicrobienne a été effectuée sur quatre souches et une levure. Nous avons constaté que l'huile essentielle est légèrement active vis-à-vis de trois souches, elle s'est montrée toutefois inefficace vis-à-vis à une souche et de la levure.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] J.M. KORNPORST, « Substances naturelles d'origine marine », Ed TEC & DOC, p598, 2005.
- [2] KJ. Rajeev; Z. Xu, "Biomedical compounds from marine organisms", *marine drug*, 2, 123-146, 2004
- [3] JW. Blunt; BR Copp; MH. Munro; PT. Northcote; MR. Prinsep, *Marine natural products, Naturals Products Reports*, 22, 15-61, 2006
- [4] JW. Blunt; BR Copp; WP Hu; MH Munro; PT Northcote; MR Prinsep, *Marine natural products, Naturals Products Reports*, 25, 35-94, 2008
- [5] JW. Blunt; BR. Copp; WP Hu; MH Munro; PT Northcote; MR Prinsep, *Marine natural products, Naturals Products Reports*, 26, 170-244, 2009
- [6] Y. VIANO, « Recherche de molécules non-toxiques actives en antifouling à partir d'organismes marins de Méditerranée », Thèse Doctorat, Université du Sud Toulon-Var, France, p 254, 2010
- [7] N.H. Ueno; J. Ueganagi; H. Morimoto; R Nakamori; T Matsuoka, « Studies on the active compounds of *Digenea simplex* ag and related compounds», *J. Pharmacol. Soc. Jpn*, 75, 807-844, 1955
- [8] J.F. BIARD, J.F. VERBIST, Y. LET OURNEUX, R. FLOCH, « Cétols Diterpeniques à Activité Antimicrobienne de *Bifurcaria bifurcata* » *Planta Med.* 40, 288-294, 1980
- [9] P. LEBERTON, « Composition chimique des plantes intégrées et régime saisonnier de caprin » *Rev. Ecol. Terre vie*, 4,36, 1982
- [10] A. PRAUD; R.VALLS; L. PIOVETTI; B. BANAIGS; G. MALYNGAMIDE, « Novel secondary metabolite from madagascar collection" *Tetrahedron Letters*, 34, p 5437-5440, 1993
- [11] A. PRAUD; R.VALLS; L. PIOVETTI; B. BANAIGS; J. BENAÏM, " New bioactive natural products from marine algae ", *Photochemistry*, 40, 495-500, 1995

- [12] M.RIBERA, A.GARRETA, T.GALLARDO, M.C ORMACI, G.FURNARI and G.GIACCONE, «Check list of Mediterranean seaweeds I Fucophyceae » *Botanica Marina*, 35, 109-130. 1992.
- [13] R. Valls « Séparation, identification, étude spectroscopiques de métabolites secondaires d'algues brunes (*Cystoseiracées*). Dosage. Variation. Chimiotaxonomie » Thèse d'état, 1993, Université d'Aix-Marseille III
- [14] R. VALLS et L.PIOVETTI, « The chemistry of marine natural product from brown algae of the family *Cystoseiraceae*. Chemotaxonomic relationships» *Biochem. System. Ecol.*, 1995
- [15] R. VALLS, L. PIOVETTI, B. BANAIGS, A. PRAUD, «Secondary metabolites from Morocco brown algae of the genus *Cystoseira* », *Phytochemistry*, 32(4), 961-966, (1993).
- [16] N. KOTAKE; M. KUSHIRO; H. ZHANG; T. SUGAWARA; K. MIYASHITA; A. NAGAO, *JNutr*, 131 (12) (2001) 3303-6
- [17] G. CULIOLI ; M. DAOUDI ; A. ORTALO-MAGNE ; R. VALLS ; L. PIOVETTI ; «aceclic diterpens and sterols from the genera *Bifurcaria* and *bifurcariopteris* (*Cystoseiraceae*, *pohaephyceae*), *Biochem. Syst. Ecol.*, 29, p973-978, 2001
- [18] DJ. Faulkner, *Marine Natural Products*, *Naturals Products Report*, 18, pp1-49, 2001
- [19] DJ. Newman; GM. Crag; KM. Snader, *Natural Products s sources of new drugs over the periods 1982-2002*, *Journal of Natural Product* 66: 1022-1037, 2003
- [20] HJ. Park; M Kurokawa; K. Shiraki; N. Nakamura; JS. Choi; M. Hattori, Antiviral active of the marine alga *Symphyclocladia latiuscula* against herpes simplex virus (HSV-1) in vitro and its therapeutic efficacy against HSV-1 infection in mice, *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28: 2258-2262, 2005
- [21] AMS Mayer, *Marine pharmacology in 2003-4: marine compound with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immunes and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action, comparative Biochemistry and Physiology* 145: 553-581, 2007

- [22] F.KUTZING, *Phycologia Generalis* : I-XXXII, 458 pp. Ed. Leipzig (1843)
- [23] K.LUNING, *Seaweeds. Their environment, biogeography and ecophysiology*, 527 pp. Ed J. Wiley & Sons, New York (1990).
- [24] C.AGARDH, *Species algarum*, vol. 1, 168 pp. Ed. Lund. (1820).
- [25] C.SAUVAGEAU, «A propos des *Cystoseira* de Banyuls et de Guethary », *Bulletin de la Station biologique d'Arcachon*, 14, 133-556.1920
- [26] C.SAUVAGEAU, «A propos des *Cystoseira* de Banyuls et de Guethary», (supplément). *Bulletin de la Station biologique d'Arcachon*, 17, 3-52. 1920
- [27] G.HAMEL, *Péophycées de France, Fascicule V*, 337-432.Paris (1939).
- [28] M.ROVERTS, «Studies on marine algae of the British Isles-The genus *Cystoseira*», *British Phycological Bulletin*, 3 (2), 345-366, 1967
- [29] M.ROBERTS, «Modern approaches to the taxonomy of red and brown algae» *The systematics association special*, vol.10, num. 17: Active speciation in the taxonomy of the genus *Cystoseira* C. Ag., 399-422.Ed. D.E.G. Irvine and J.H. Price, London (1978).
- [30] C.AGARDH, *Species algarum*, vol. 1, 168 pp. Ed. Lund. (1820).
- [31] P. DEFFO, contribution à l'étude chimique de l'algue brune *Cystoseira Amentacea* variété *Stricta* : isolement, caractérisation structurale et analyse de nouveaux mérodiertènes , Thèse de doctorat, Université de Toulon et du Var, 1995
- [32] A. PRAUD, isolement, caractérisation structurale et analyse de nouveaux métabolites d'algues méditerranéennes appartenant aux genre *Cystoseira* et *Lyngbia* , Thèse de doctorat, Université d'Aix-Marseille I, France, 1994
- [33] V. MESGUICHE; R. VALLS; L. PIOVETTI; B. BANAIG, Meroditerpenes from *Cystoseira Amentacea* var. *stricta* collected off the Mediterranean coasts, *Phytochemistry*, V45, N7, pp. 1489-1494, 1997
- [34] S. Moussoukhoye, « Détermination structurale de biomolécules polaires isolées d'organismes marins de la côte sénégalaise », Thèse de doctorat, UNIVERSITÉ CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR, 2003

- [35] M. PIATELLI, *Chemistry and taxonomy of Sicilian Cystoseira species*, new journal of chemistry, pp 1144-0546, 1990
- [36] M. ROBERTS, «Studies on marine algae of the British Isles-The genus *Cystoseira*», *British Phycological Bulletin*, 3 (2), 345-366, 1967
- [37] C. FRANCISCO, B. BANAIGS, M. RAKBA, J. TESTE, A. CAVE, « Cystoseirols : Novel Rearranged Diterpenoids of Mixed Biogenesis from Cystoseiraceae (brown marine algae) ». *Journal of Organic Chemistry*, 51, 2707-2711, (1986).
- [38] S. Endoh; T. Mori; M. Miyagi; M. Kobayashi; S. Yamamoto; T. Mitsuhashi, Lipids from four species algae, *Tokyo Gakugei Daigaku kiyo, Dai-4-bumon*, 33: 125-129; *C.A.*, 96 : 17283., 1981
- [39] M. Kuniyoshi; Germination inhibitors from the brown algae *Sargassum crassifolium* (Phaeophyta, Sargassaceae), *Bot. Mar.*, 28: 501-503, 1985
- [40] B.N. Ravi; P.T. Murphy; R.O Lidgard; R.G. Warren; R.J. Wells; C₁₈ Terpenoid metabolites of the brown algae *Cystophora moniliformis*, *Aust. J. Chem.*, 35: 171-182., 1982
- [41] J. kimura; N. Maki; New loliolides from the brown algae *Undaria pinnatifida*, *J. Nat. Prod.*, 65: 57-58., 2002
- [42] W. Fenical; J.J. Sims; R.M. Wing; P. Radlick; Zonarene, a sesquiterpene from the brown seaweed *Dictyopteris zonarioides*, *Phytochemistry*, 11 : 1161-1163., 1972
- [43] E. Fattorusso; S. Magno; L. Mayol; V. Amico; G. Oriente; M. Piattelli; C. Tringali; Isolation of (2S, 8R)-germacra-1(11)5(12),E-trien-2-ol acetate from the brown alga *Dilophus fasciola*, *Tetrahedron Lett*, 4149-4152., 1978
- [44] Amico V; Oriente G; Piattelli M; Tringali C; Fattorusso E; Magno S; Mayol L; Sesquiterpenes based on the cadalane skelton from the brown alga *Dilophus fasciola*, *Experientia*, 35 : 450-451., 1979
- [45] Suzuki M; Kowata N; Kobayashi H; Tanaka I., The structure of germacrane-type sesquiterpene alcohol, a possible precursor of the guaiane-type sesquiterpene from the brown alga *Dictyopteris divaricata*, *Chem. Lett.*, 2187-2190 , 1990

[86] Carson C.F; Riley T.V, Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*, Journal of applied bacteriology, 78:264-269, 1995

[87] Faleiro M. L; Miguel M. G; Ladeiro F; Venancio F; Tavares R; Brito J. C; Figueiredo A. C; Barroso J. G; Pedro L. G, Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*, Letters in Applied Microbiology, 36:35-40, 2003

[88] Kunle O; Okogun J; Egamana E; Emojevwe E; Shok M; Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract, Phytomedicine, 10, 59 – 61, 2003

[89] Y. R. Naves ; S. Sabetay ; L. Palfray, « L'Analyse des parfums naturels (essences concrètes, produits d'enfleurage, essences absolues) », Ed Annales de chimie analytique, 1938

[90] Pharmacopée européenne, Direction de la qualité du médicament, Council of Europe, 2623 pages, 2002

[91] Meena M.R. Sethi V., antimicrobial activity of the essential oils from spices, Journal of Food Science and Technology Mysore, 31, 68-70, 1994.

- [46] Segawa M; Yamano K; Shirahama H; A germacrane-type sesquiterpene from the brown alga *Dictyopteris divaricata*, *Phytochemistry*, 27 : 2347-2349, 1990
- [47] Mayer A.M.S; Paul V.J; Fenical W; Norris J.N; De Carvalho M.S; Jacobs R.S, Phospholipase A₂ inhibitors from marine algae, *Hydrobiologia*, 260,/261 : 521-529., 1993
- [48] De Rosa S; De Giulio A; Iodice C; Zavidink N, Sesquiterpene from the brown alga *Taonia atomaria*, *Phytochemistry*, 37: 1372-1330., 1994
- [49] Jaenicke L; Donike M; Akintobi T; Sex attractant in a brown alga: chemical structure, *Science (Washington DC)*, 171: 815-817, 1971.
- [50] Moore R.E, Chemotaxis and the odor of seaweeds, *Llydia*, 39 : 181-191, 1976.
- [51] Moore R.E, Volatile compounds from marine algae, *Acc. Chem. Res.*, 10 : 40-47, 1977
- [52] Jaenicke L; Boland W; Signal substances and their reception in the sexual cycle of marine brown algae, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 21 :643-653, 1982
- [53] Maier I; Müller D.G, Sexual pheromones in algae, *Biol. Bull*, 170 : 145-175, 1986
- [54] Stratmann K; Boland W; Müller D, Pheromones of marine brown algae : A new branch of the eicosanoid metabolism, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*; 31 : 1246-1248, 1992
- [55] Stratmann K; Boland W; Müller D, Biosynthesis of pheromones in female gametes of marine brown algae (Phaeoohyceae), *Tetrahedron*, 49 : 3755-3766, 1993
- [56] Maier I, Brown algal pheromones, *Progr. Phycol. Res*; F.E. Round, D.J. Chapman, Eds; Biopress Ltd; Vol. II; pp. 472-514, 1995
- [57] Pohnert G; Boland W, The oxylipin chemistry of attraction and defense in brown algae and diatoms ; *Nat. Prod. Ref.*, 19 : 108-122, 2002
- [58] R.E. Moore, Algal nonisoprenoids in: marine, *Marine Natural Products-chemical and biological perspective*, P.J. Scheuer, Ed Academic Press, Vol I, pp43-124, 1978
- [59] Müller D.G; Jeanicke L , Fuccoserratene, the female sex-attractant of *fucus serratus* L., *FEBS Lett.*, 30: 137-139, 1973
- [60] Müller D.G; Seferiadis K; Specificity of sexual chemotaxis in *fucus serratus* and *focus vesiculosus*, (phaeophyceae), *Zeitschrift fur Pflanzen-physiology*, 84: 85-94 ,1977

- [61] Müller D.G; Gassman G; Sexual reproduction and the role of sperm attractants in monocious species of the brown algae order Fucales (*Fucus*, *Hesperophycus*, *Pelvitia*, and *Pelvetiopsis*), *J. Plant Physiol.*, 118: 401-408, 1985
- [62] Müller D.G; Clayton M.N; Gassmann G; Boland W; Marner F.J; Schotten T; Jaenicke L, Cytophorene and hormosirene, sperm attraction in Australian brown algae, *Naturwiss.*, 72: 97-99, 1985a
- [63] R.E. Moore, Chemotaxis and the odor of seaweeds, *Llylodia*, 39 : 181-191, 1979
- [64] Peters A.F; Müller D.G; On the sexual reproduction of *Dictyosiphon foeniculaceus* (Phaeophyceae, Dictyosiphonales), *Helgolander Meeresuntersuchungen* 39: 441-447, 1985
- [65] Müller D.G; Clayton M.N; Gassmann G; Boland W; Marner F.J; Schotten T; Jaenicke L, The sperm attractant of *Hormosira banksii* (Phaeophyceae, Fucales), a seaweed common to Australia and New Zealand, *Experientia*, 40: 211-212, 1984
- [66] L. Jaenicke; D.G. Müller; R.E. Moore, Multifidene and auctantene, C₁₁ hydrocarbons in the mal attracting essential oil from the gynogamete of *Cutleria multifida* (Smith) Grev. (phaeophyta), *J. Amer. Chem. Soc*; 96, pp 3324-3325, 1974
- [67] D.G. Müller; W. Boland; U. Becker; T. Wahl, Caudoxirene, the spermatozoid-releasing and attracting factor in the marine brown algae *Perithalia caudate* (Phaeophyceae, Sporochnales), *J. Biol. Chem*, 369: 655-659, 1988
- [68] Müller D.G, Olefinic hydrocarbons in sea-water, signal molecules for sexual reproduction in brown algae, *Pure Appl. Chem.*, 51 : 1885-1891, 1979
- [69] Müller D.G, The role of olefinic hydrocarbons in sexual reproduction of marine brown algae, *Xth international seaweed Symposium*, T. Levring, Ed., Walter de Gruyter, 1981
- [70] Müller D.G; Maier I; Gassmann G; Survey on sexual pheromone specificity in Laminariales (Pheophyceae), *Phycologia*, 24: 475-477., 1985b
- [71] Maier I; Müller D.G; Sexual pheromones in algae, *Biol. Bull.*, 170 : 145-175. , 1986
- [72] Müller D.G; Gassmann G, Sexual hormone specificity in *Ectocarpus* and *Laminaria* (Phaeophyceae), *Naturwiss*, 1980
- [73] J. Guertin, J.A. Jacobs, Chromium (VI) handbook', CRC Press, p 784,2005

- [74] P.D. Steinberg, Effect of quantitative and qualitative variation in phenolic compounds on feeding in three species of marine invertebrate herbivores, *J.Exp. Mar. Biol. Ecol.*; 120: 221-237, 1988
- [75] P.D. Steinberg; I. Van Altena, Tolerance of marine invertebrates herbivores to brown algal phlorotannins in temperate Australasia; *Ecol. Monogr*; 62 : 189-222; 1992
- [76] AFNOR, Recueil de normes: les huiles essentielles. Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles, AFNOR, 661-663, (2000)
- [77] O. Isler ; M. Montavon, La chimie des vitamines E et K et des quinones apparentées à chaînes isoprénoïdes ; *Bull. Soc. Chim*, 2403-2413, 1965
- [78] M. M. Fisch ; V. Bohm ; A. D. Wright ; G. M. König, Antioxidative meroterpenoids from the brown algae *Cystoseira crinite*; *J. Nat. Prod.* 66, p 968-975, 2003
- [79] S. C. Welch; A. S. C. P. Rao, Stereoselective total synthesis of (\pm) zonarol and (\pm) isozonarol; *Tetrahedron Lett*, 6, p 505-508, 1977
- [80] A. F. Barrero; E. J. Alvarez-Manzaneda; M. M. Herrador; R. Chahboun; P. Galer , Synthesis and antitumoral activities of marine ent-chromazonarol and related compounds, *Bioorg. Med. Chem*, 9, p 2325-2328, 1999
- [81] M. L. Bourguet-Kondracki; A. Longeon; E. Morel; M. Guyot, Sesquiterpene quinines as immune-modulating agents, *Int. J. Immunol. Pharmacol*, 13, p 393-399, 1991
- [82] S. Loya; R. Tal; R. L. Kashman; A. Hizi, Ilimaquinone, a selective inhibitor of the RNase H Activity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase, antimicrob. Agents. *Chemother*, 34, p 2009-2012, 1990
- [83] A. G. Gonzalez; M. A. Alvarez; J. D. Martin ; M. Norte ; C. perez ; J. Roviroso, Diterpenoids of mixed biogenesis in Phaeophyta biogenetic-type interconversion, *Tetrahedron*, 38, 719-728, 1982
- [84] J. L. Fauchère; J.L. Avril, « Bactériologie générale et médicale », Ed. Ellipses, p365, 2002
- [85] Deans S.G; Ritchie G, Antibacterial properties of plant essential oils, *International Journal of Food Microbiology*, 5, p165-180, 1987.