

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

Sekiou Safia

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière

Filière : Chimie

Option : **Chimie des Substances Naturelles**

Titre

Etude chimique de l'huile essentielle de *Laurencia papillosa*
Détermination de l'activité antimicrobienne

Soutenu publiquement le 28 septembre 2015 devant le jury composé de :

Y. Daghbouche	Pr	Président	Université de Blida
O. Touafek	MCB	Examineur	Université de Blida
M. El Hattab	Pr	Promoteur	Université de Blida

Promotion 2014-2015

Remerciements

Ce travail a été réalisé principalement entre le laboratoire de Chimie des Substances Naturelles à l'université de Blida, l'unité bactériologique du laboratoire CRD Saidal El Harrach et le Laboratoire MAPIEM de l'Université du Sud Toulon-Var (France). Nous tenons à saisir cette occasion et adresser nos sincères remerciements.

Avant tout je remercie ALLAH tout puissant de m'avoir accordé la force, le courage et les moyens pour accomplir ce Modest travail

J'adresse mes remerciements les plus sincères et les plus dévoués à Professeur EL HATTAB Mohamed, mon encadrant, pour avoir accepté de m'encadrer, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui m'ont permis d'apprendre et de mener à bien mon mémoire.

Mes vifs remerciements à Mme CHADER chef de service du laboratoire microbiologique CRD Saidal El Harrach Alger pour toute sa disponibilité et son aide.

Je tiens à remercier également Mlle Hamiche sonia de m'avoir aidé pour la réalisation de ce travail.

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

Dédicace

Je dédie ce mémoire de fin d'études

A

Mon très cher père et ma très chère mère

*En témoignage de ma reconnaissance envers le soutien, les sacrifices et
tous les*

efforts qu'ils ont fait pour mon éducation ainsi que ma formation

A

Mes chers Frères et ma sœur

Sidahmed et Mohamed, Asma

Pour leur affection, compréhension et patience

A

Mes amis

Rym , Sarah, Imene, Rachida, Amina, Ouissam

*Je vous remercie de votre patience vous m'avez aidé toujours à avancer
vous êtes tous des grands amis si gentils, merci d'être toujours près de moi,
amis avec lesquels je souris.*

A

Toute ma famille

المخلص

هذه الدراسة تركز على التركيب الكيميائي للزيت الاساسية للطحاب لورنسيا بابلوزة المحصودة في المركب القرن الذهبي و تحديد نشاطها الميكروبيولوجي. تم الحصول على الزيت الأساسية عن طريقة التقطير البخار بمردود قدره 0,016% وتحليلها بواسطة الكروماتوغرافيا الطور الغازي مقرونة بمطيافية الكتلة. وتم تحديد 76 مركب . المكونات الأساسية هي تتخوزان , , اينوكوزان , 1- تخد يسان , 8 - ايتنا ديسان, حمض البالمتيوليك , 1 -اكسانول , 1-اكساديكانول.

تم تقييم النشاطات المضادة للميكروبات نوعيا باستعمال طريقة الانتشار القرصي و قد أظهرت وجود نشاط بكتري مثبت هام ضد ستافيلوكوكيس أوريوس، باسيليس سيبتيليس، بسودومناس ايروجينوزا و إيشيريشيا كولي ، ضد الخميرة كونديدا أليكانس وفطر اسبرجلوس برلينسس .

الكلمات المفتاحية:

رودومناسيز, لورنسيا بابلوز, الزيت الاساسية, التركيب الكيميائي, النشاط البكتري

Résumé

La présente étude porte sur la composition chimique de l'huile essentielle de l'algue rouge *Laurencia papillosa* récoltée au niveau du complexe la Corne d'Or, et à la détermination de son activité microbiologique. L'huile essentielle a été préparée par entraînement à la vapeur d'eau avec un rendement de 0,016 %. L'analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a permis de relever la présence de 76 constituants. Les principaux produits identifiés sont : Tetracosane, Tritetracontane, Heneicosane, 1-Tridecene, 8-Heptadecène, Acide tridecanoïque, 1-Hexadécanol, Acide palmitoléique et Parabromo-phénol.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été effectuée par la méthode de l'antibiogramme (diffusion sur disques), et a montré une forte activité contre les bactéries *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Escherichia coli*, et les deux champignons *Candida albicans* et *Aspergillus brailiensis*.

Mots-clés: Rhodomelaceae, *Laurencia papillosa*, huile essentielle, composition chimique, activité antimicrobienne.

Abstract

This study focuses on the essential chemical composition of the oil of the red alga *Laurencia papillosa* harvested at the Corne d'Or complex and the determination of its microbiological activity. The essential oil was prepared by steam distillation of water with a yield of 0.016%. Analysis of the HE by gas chromatography coupled with mass spectrometry has identified the presence of 76 components. The main products are identified as Tetracosane, Tritetracontane, Heneicosane, 1-Tridecene, 8-Heptadecene, Tridecanoic acid, 1-Hexadecanol, Palmitoleic acid, Parabromo-phenol.

The evaluation of the antimicrobial activity was performed by the method of the antibiogram (diffusion disks) and showed significant activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and a very significant antifungal activity against two fungi *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*.

Keywords: *Rhodomelaceae*, *Laurencia papillosa*, essential oil, chemical composition, antimicrobial activity.

Liste des abréviations

ATCC	:	American Type Culture Collection
CG-SM	:	Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
°C	:	Degré Celsius
g	:	Gramm
HE	:	Huile Essentielle
LP	:	Laurencia Papillosa
min	:	Minute
MV	:	Matière Végétale
%	:	Pourcent

Liste des tableaux

Tableau 1	Position systématique de l'espèce <i>Laurencia papillosa</i>	9
Tableau 2	Composés de l'huile essentielle de <i>Laurencia papillosa</i> et leurs structures	11
Tableau 3	Caractères organoleptiques et rendement de l'huile essentielle de <i>Laurencia papillosa</i>	21
Tableau 4	Produits identifiés dans l'huile essentielle de l'algue rouge <i>Laurencia papillosa</i> par CG/SM.	22
Tableau 5	Les différentes souches microbiennes utilisées	32

Liste des planches

Planche 1	Squelettes sesquiterpéniques fréquents dans le genre <i>Laurencia</i>	5
Planche 2	Exemples de sesquiterpènes de type Laurane isolés de <i>Laurencia okumurai</i>	6
Planche 3	Exemples de sesquiterpènes isolés à partir de <i>Laurencia pacifica</i>	6
Planche 4	Structures des composés isolés à partir de l'algue rouge <i>Laurencia saitoi</i>	7
Planche 5	Structures des composés responsables de l'activité antibactérienne isolés à partir des extraits des algues rouges de genre <i>Laurencia</i>	8
Planche 6	Structures des composés isolés à partir des extraits d'algue rouge <i>Laurencia papillosa</i>	10

Liste des figures

Figure 1	Laurencia papillosa	9
Figure 2	Photo personnelle de l'espèce <i>Laurencia papillosa</i>	17
Figure 3	Dispositif expérimental d'entraînement à la vapeur d'eau de l'HE	18
Figure 4	Extraction liquide-liquide de l'HE de la phase aqueuse	19
Figure 5	Façons d'huile essentielle de <i>laurencia papillosa</i>	18
Figure 6	Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectroscopie de masse	20
Figure 7	profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle de <i>Laurencia papillosa</i>	29
Figure 8	Agrandissement et numérotation des pics du chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Laurencia papillosa</i>	30
Figure 9	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Laurencia papillosa</i>	31
Figure 10	Illustration de la méthode des antibiogrammes	33
Figure 11	Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des souches	35
Figure 12	Activité antifongique de l'huile essentielle de <i>Laurencia papillosa</i> vis-à-vis <i>Aspergillus brailiensis</i> et <i>Candia albicans</i>	36
Figure 13	Zones d'inhibition de l'huile essentielle testée sur <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus subtiles</i> , <i>Escherichia coli</i>	36

TABLE DES MATIERES

Remerciements	I
Dédicace	II
ملخص	III
Résumé	IV
Abstract.....	V
Liste des abréviations	VI
Liste des tableaux	VII
Liste des planches	VIII
Liste des figures	IX
Introduction générale.....	1
Partie I : Synthèse bibliographique	
I.1 Introduction.....	4
I. 2 Notions générales sur les algues rouges du genre <i>Laurencia</i>	4
I. 2.1 Systématique et taxonomie.....	4
I. 2.2 Distribution phytogéographique mondiale.....	4
I. 2.3 Composition chimique des algues rouges du genre <i>Laurencia</i>	4
I. 2.4 Activités biologiques des extraits et produits isolés des espèces du genre <i>Laurencia</i>	8
I. 3 Etude chimique de l'algue <i>Laurencia papillosa</i>	9
I. 3.1 Position systématique.....	9
I. 3.2 Description.....	10
I. 3.3 Composition chimique de <i>Laurencia papillosa</i>	10
I.3.3.1 Composition chimique des extraits bruts de <i>Laurencia papillosa</i>	10
I.3.3.2 Composition chimique des huiles essentielles de <i>Laurencia papillosa</i>	11
I. 3.4 Activité biologique de <i>Laurencia papillosa</i>	13
I. 4 Procédés d'extraction conventionnels des huiles essentielles	14
I.4.1 Introduction.....	14
I. 4.1 Hydrodistillation	14
I. 4.2 Entraînement à la vapeur d'eau.....	14
I. 4.3 Hydrodiffusion	14
I. 4.4 Expression à froid	15

Partie II : Etude expérimentale

II. 1 Introduction	17
II. 2 Récolte et traitement du matériel végétal	17
II. 3 Extraction de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau	18
II. 4 Analyse de l'huile essentielle par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	20
II. 4.1. Description de l'appareil	20
II. 4.2. Conditions opératoires	21
II. 4.3. Résultats et discussion	21
II. 5 Etude du pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de <i>Laurencia papillosa</i>	32
II. 5.1 Introduction.....	32
II. 5.2 Microorganismes utilisés.....	32
II. 5.3 Principe de la méthode	33
II. 5.4 Procédure générale	34
II. 5.5 Résultats et discussion.....	35
Conclusion	37
Références bibliographiques	39

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

La nature est une source importante de molécules aux propriétés biologiques intéressantes. La chimie des substances naturelles offre un champ d'investigation très large vu le nombre d'espèces présentes sur terre.

Au début, la chimie des produits naturels était focalisée sur les substances terrestres pour des raisons culturelles et de commodité pratique. Durant ces dernières décennies, le progrès scientifique a permis d'explorer nos océans et d'approfondir nos connaissances en chimio-biodiversité marine. Les premiers travaux sur les différents groupes taxonomiques : les algues, les éponges datent du début du 20^{ème} siècle [1].

Le monde marin renferme une grande biodiversité avec 20 000 à 30 000 espèces d'algues [2] et 8000 espèces d'éponges [3]. Cette grande biodiversité que l'on retrouve dans l'environnement marin explique l'importante chimio-diversité.

Les algues marines sont distribuées naturellement à travers le monde, elles croissent aussi bien dans les eaux froides de l'Arctique que dans les climats tempérés du Pacifique. Les algues sont constituées en majorité par des organismes unicellulaires, et en minorité par des individus macroscopiques; tous les deux jouent un rôle primordial dans le maintien de l'équilibre chimique et biologique des océans [4].

Les substances naturelles isolées des algues se caractérisent souvent par la présence d'éléments chimiques ou de structures nouvelles, rarement observés, voir inconnus en milieu terrestre [5].

Les métabolites isolés à partir des algues représentent près de 22% des produits naturels marins décrits à ce jour [6], ils sont souvent caractérisés par la présence de nouvelles structures, ils appartiennent à la classe des métabolites primaires (polyholosides sulfatés, nucléosides), et des métabolites secondaire (terpènes halogénés, et azotés, stérols, et triterpènes sulfatés, sucres arséniés,...) [7], beaucoup d'entre eux possèdent une activité biologique intéressante [6]. L'activité antibactérienne [8], antivirale, anti tumorale [9] 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 observées [10].

Notre travail entre dans le cadre de la chimie des produits naturels marins et porte sur l'étude chimique et l'activité biologique de l'huile essentielle extraite par entraînement à la vapeur d'eau de l'algue rouge *Laurencia papillosa*.

Ce mémoire s'articule autour de deux parties principales :

- La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique dans laquelle nous décrivons brièvement l'algue étudiée *Laurencia papillosa*, ainsi que l'étude chimique et biologique des espèces du genre *Laurencia*.
- La seconde partie est réservée à une étude expérimentale qui a pour objectif, l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de l'algue rouge *Laurencia papillosa*.

PARTIE I

Synthèse bibliographique

I. 1 Introduction

Les organismes marins sont des sources riches en métabolites secondaires bioactifs qui pourraient représenter des pistes utiles dans le développement de nouveaux produits pharmaceutiques. Les algues rouges sont considérées comme une source importante de nombreux métabolites biologiquement actifs en comparaison à d'autres classes d'algues. Les algues sont utilisées comme source d'alimentation humaine et comme source de gommes. Phycocolloïdes tels que l'agar-agar, l'acide alginique et le carraghénane qui sont principalement des constituants des parois cellulaires des algues brunes et rouges qui sont largement utilisées dans l'industrie.

L'algue rouge *Laurencia papillosa* du genre *Laurencia* (*Ceramiales*, *Rhodomelaceae*) est considérée comme une source de métabolites secondaires tels que les terpènes, dérivés halogénés, C15 acétogénines et stéroïdes.

I. 2 Notions générales sur les algues rouges du genre *Laurencia*

I. 2.1 Systématique et taxonomie

Les algues rouges du genre *Laurencia* (famille Rhodomelacés, ordre des Ceramiales) comprennent environ 135 espèces dans le monde [11]. La taxonomie des espèces du genre *Laurencia* a été largement étudiée et est souvent source de confusion en raison de la forte variabilité morphologique au sein des espèces individuelles [12].

I. 2.2 Distribution phytogéographique mondiale

Le genre *Laurencia* est principalement réparti le long des côtes tropicales, subtropicales et tempérées [13], on peut trouver sur tous les rivages du monde et sous toutes les latitudes [14]. Les espèces du genre *Laurencia* se développent dans des habitats variés, certaines appréciant les récifs profonds (comme *Laurencia brongniartii* qu'on trouve entre 11 et 37 m de profondeur le long de la côte du Mozambique), d'autres préférant la zone intertidale, c'est-à-dire la portion de la berge qui est tour à tour émergée ou immergée selon la marée (comme *Laurencia complanata*) [13].

I. 2.3 Composition chimique des huiles essentielles des algues rouges du genre *Laurencia*

Les algues rouges, notamment de nombreuses espèces du genre *Laurencia* (*Ceramiales*, famille *Rhodomelaceae*) se sont révélées être des sources riches en métabolites secondaires halogénés. On note la présence de diterpènes, sesquiterpènes-chamigrane de type β ,

sesquiterpènes bromés, sesquiterpènes, allolaurinterol, polycétides, des polysaccharides [14], des alcools, des phénols, des aldéhydes, des cétones, des acides, des esters et d'autres composés [15].

I. 2.3.1 Composition en terpènes

Quatre squelettes sesquiterpéniques biogénétiquement apparentés sont fréquents dans le genre *Laurencia*. Le premier est celui du **chamigrane**, également présent dans certaines plantes terrestres, les trois autres : **cuparane**, **laurane** et **cyclolaurane** semblent beaucoup plus spécifiques du milieu marin. Ces quatre squelettes (Planche 1) ont de très nombreux représentants parmi les *Laurencia* et certains mollusques herbivores qui les consomment, en particulier les *Aplysia*. Ceci justifie les noms donnés à plusieurs de ces sesquiterpènes qui rappellent leurs origines végétale ou animale [16].

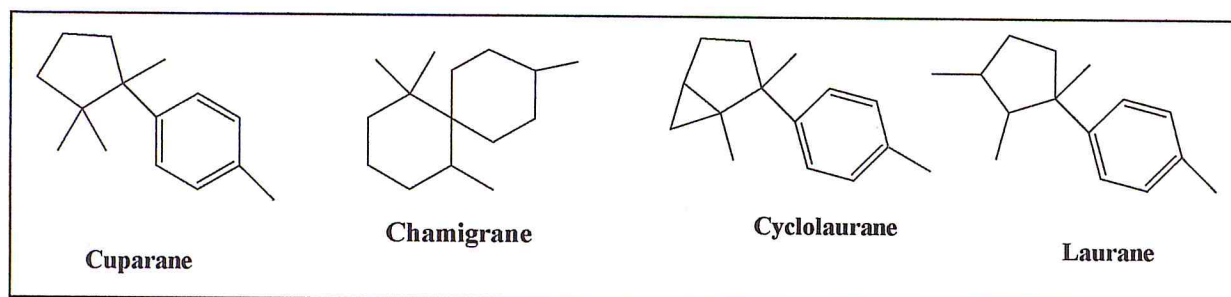


Planche 1 : Squelettes sesquiterpéniques fréquents dans le genre *Laurencia*

Le genre *Laurencia* renferme également d'autres classes de terpènes, il s'agit de diterpènes, triterpènes et d'acétogénines [17].

Laurencia okumurai, il s'agit de : 3 α -hydroxyaplysin (2), et deux sesquiterpènes réarrangés qui sont laurokamurenes (3) et B (4), conjointement avec trois composés connus, 3R-hydroxydebromoaplysin (1), debromoaplysin (5), et laurinterol (6). Leurs structures, y compris la stéréochimie relative, ont été déterminées sur la base de l'interprétation détaillée des spectres RMN bidimensionnelle et la comparaison avec des composés apparentés connus [18]. Les structures discutées sont représentées sur la planche 2.

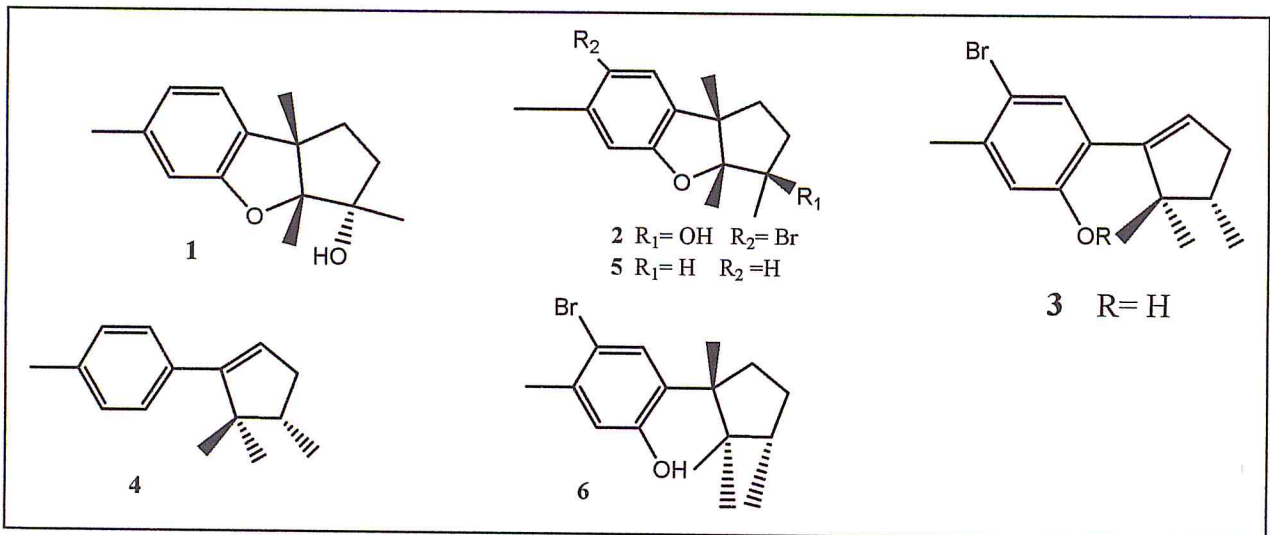


Planche 2 : Exemples de sesquiterpènes de type Laurane isolés de *Laurencia okumura*

I. 2.3.1.2 Autres sesquiterpènes de type laurane isolés du genre *Laurencia*

D'autres exemples de sesquiterpènes de type laurane ont été isolés de l'algue rouge *Laurencia pacifica*. il s'agit de l'isoaplysin (1), isolaurenisol (2), laur-11-en-10-ol (6), ainsi que trois autres bromosésquiterpènes, dibromoisolaurinterol(3), dibromroaplysinol(4), 10 α -hydroxydibromoepiaplysin (5) [19].

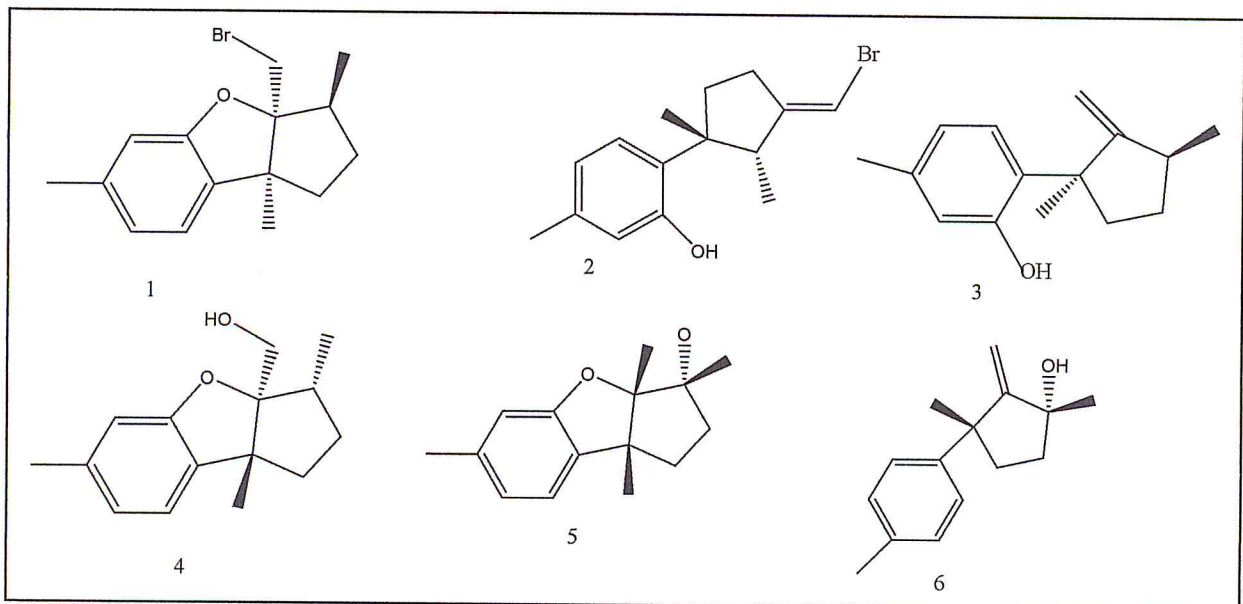


Planche 3 : Exemples de sesquiterpènes isolés à partir de *Laurencia pacifica*

I. 2.3.1.3 Exemple de diterpènes, triterpènes et C15-acétogénine isolés du genre *Laurencia*

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

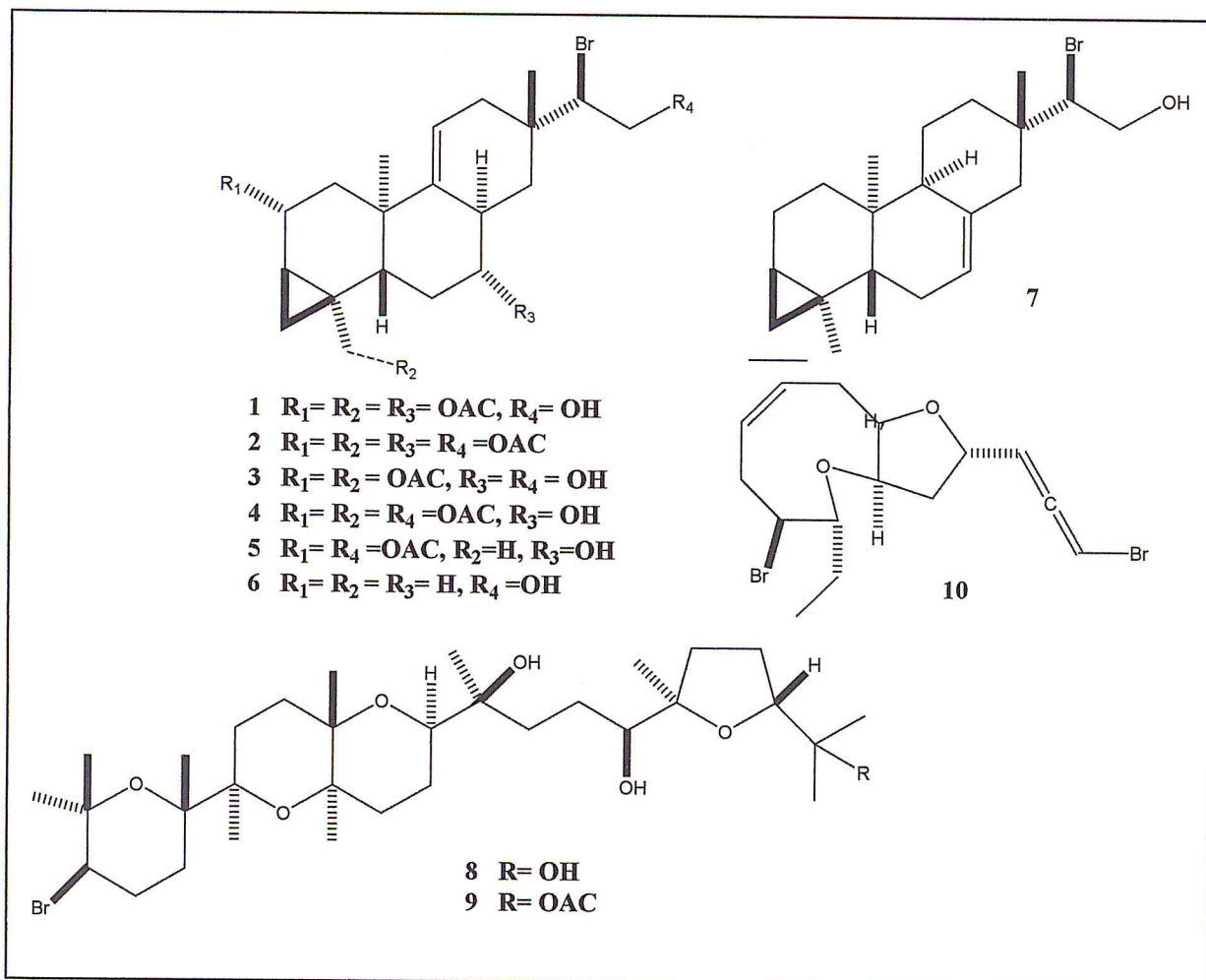


Planche 4 : Structures des composés isolés à partir de l'algue rouge *Laurencia saitoi*

I. 2.4 Activités biologiques des extraits et produits isolés des espèces du genre *Laurencia*

I. 2.4.1 Introduction

Les algues rouges du genre *Laurencia* sont connues comme une source inépuisable de métabolites bioactifs. Les principales substances produites sont les sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes et acétogénines. De nombreuses études révèlent que ces métabolites sont actifs, en particulier, des cytotoxiques et antibactériens [40].

I. 2.4.2 Activité antiasthmatique

L'activité antiasthmatique a été constatée sur les extraits polyphénoliques de l'algue rouge *Laurencia undulata* [41].

I. 2.4.3 Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne a été révélée chez les C₁₅ acétogénines isolés à partir de *Laurencia glandulifera* [42]. Les métabolites halogénés isolés des extraits des algues rouges du genre *Laurencia* ont été testés sur huit souches bactériennes de gram négative à savoir *Alcaligenes aquamarinus*, *Alteromonassp*, *Azomonas agilis*, *Azotobacter beijerinckii*, *Erwinia amylovora*, *Escherichia coli*, *Halobacteriumsp*, *Halococcus sp*. Ils ont montré une activité antibactérienne très importante, les molécules responsables de cette activité sont les molécules responsables de cette activité sont (1) 10-bromo-9-hydroxy-chamigra-2,7(14)-diene, (2) laurinterol, (3) iso-laurinterol, (4) (Z)-10,15-dibromo-9-hydroxy-chami-gra-1,3(15),7(14)-triene, (5) (E)-10,15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3(15),7(14)-triene. Les molécules sont présentées dans la planche 5 [43].

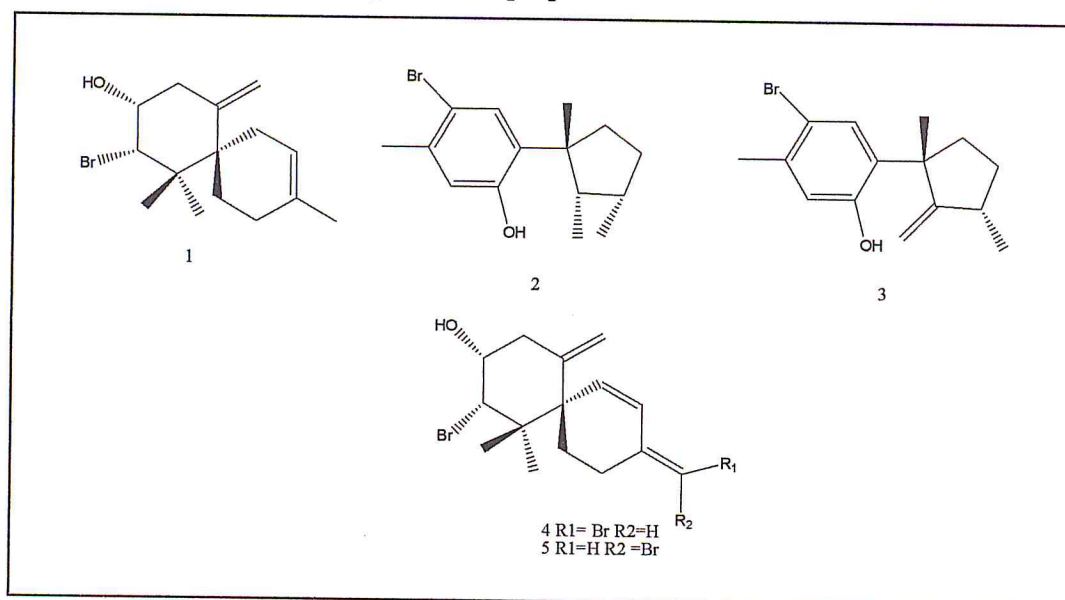


Planche 5 : Structures des composés responsables de l'activité antibactérienne isolés à partir des extraits des algues rouges de genre *Laurencia*

I. 3 Etude chimique de l'algue *Laurencia papillosa*

I. 3.1 Position systématique de l'espèce *Laurencia papillosa*

Le genre *Laurencia* appartient à l'ordre des *Ceramiales* qui comporte 4 familles dont l'une est la famille des *Rhodomelaceae*, cette dernière contient le genre *Laurencia* [16].

La position systématique de l'espèce (Figure 1) est donnée par le tableau 1 [21].



Figure 1 : *Laurencia papillosa*

Tableau 1 : Position systématique de l'espèce *Laurencia papillosa*

Classement	Nom
Phylum	<i>Rhodophyta</i>
Subphylum	<i>Eurhodophytina</i>
Classe	<i>Florideophyceae</i>
Sous-classe	<i>Rhodymeniophycidae</i>
Ordre	<i>Ceramiales</i>
Famille	<i>Rhodomelaceae</i>
Genre	<i>Laurencia</i>
Espèce	<i>Papillosa</i>

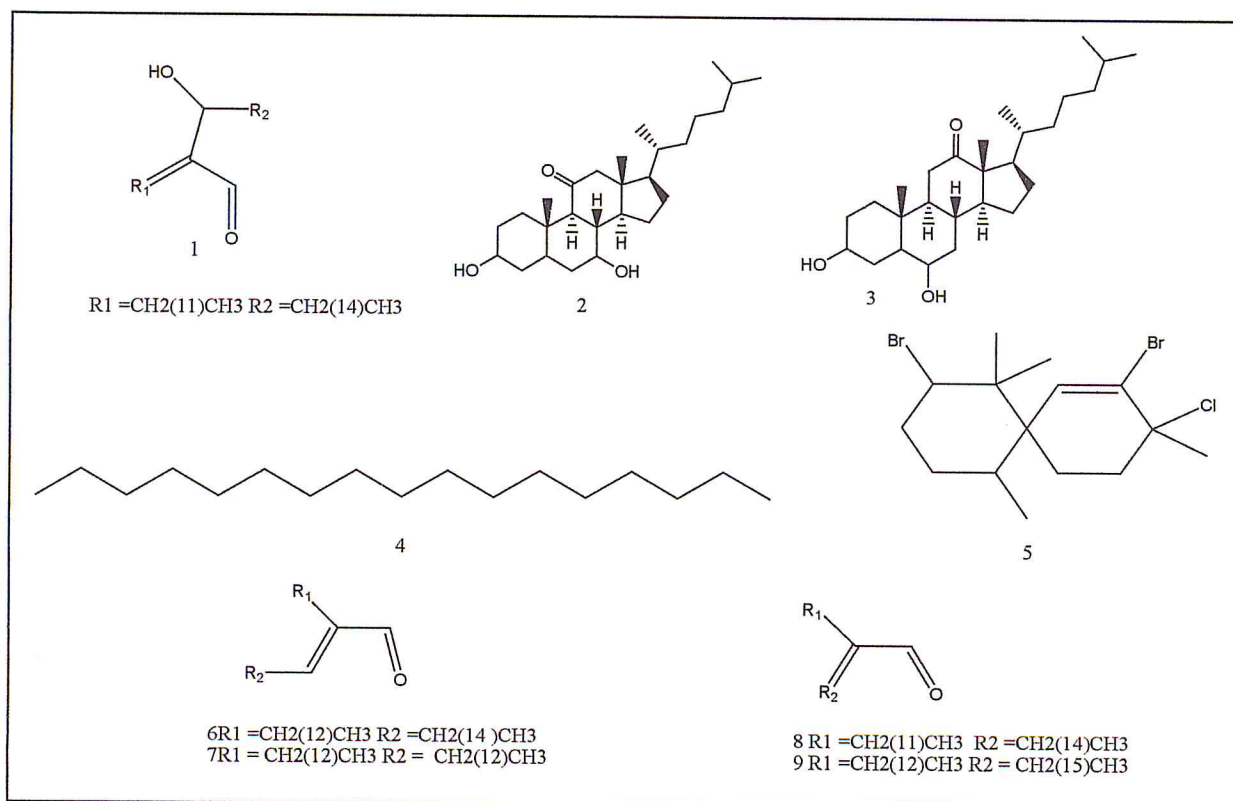
I. 3.2 Description de l'espèce *Laurencia papillosa*

C'est une plante d'environ 5-16 cm de haut, en grappes denses. Les parties inférieures des plantes sont lisses, mais vers les extrémités, les branches sont peu à densément bondées à court, de couleur vert olive [21].

I. 3.3 Composition chimique des extraits et huiles essentielles de *Laurencia papillosa*

I. 3.3.1 Composition chimique des extraits bruts de *Laurencia papillosa*

L'algue rouge *Laurencia papillosa* a été vérifiée comme source riche des métabolites secondaires [22]. L'analyse chimique de l'extrait brut a permis d'isoler divers métabolites appartenant à différentes classes chimiques, nous avons relevés la présence des composés suivants : (E)-2-(-1-hydroxy tridecyl)-2-heptadecenal (1), 3 β , 7 β -dihydroxy cholest-11-one (2) et 3 α ,6 α -dihydroxy cholest-12-one (3). heptadecane (4), 2,10-dibromo-3-chloro- α -chamigrene (5), (E)-2-tridecyl-2-heptadecenal(6), (E)-2 dodecyl-2-hexadecenal(7), (E)-2-dodecyl-2-heptadecenal(8), (E)-2-tridecyl-2-nonadecenal(9), phytol (10), cholesteryl (11), cholestanol (12), 24-méthylène cholesteryl (13) [23], papillamide (14) [24]. Les structures isolées sont représentées sur la planche 6



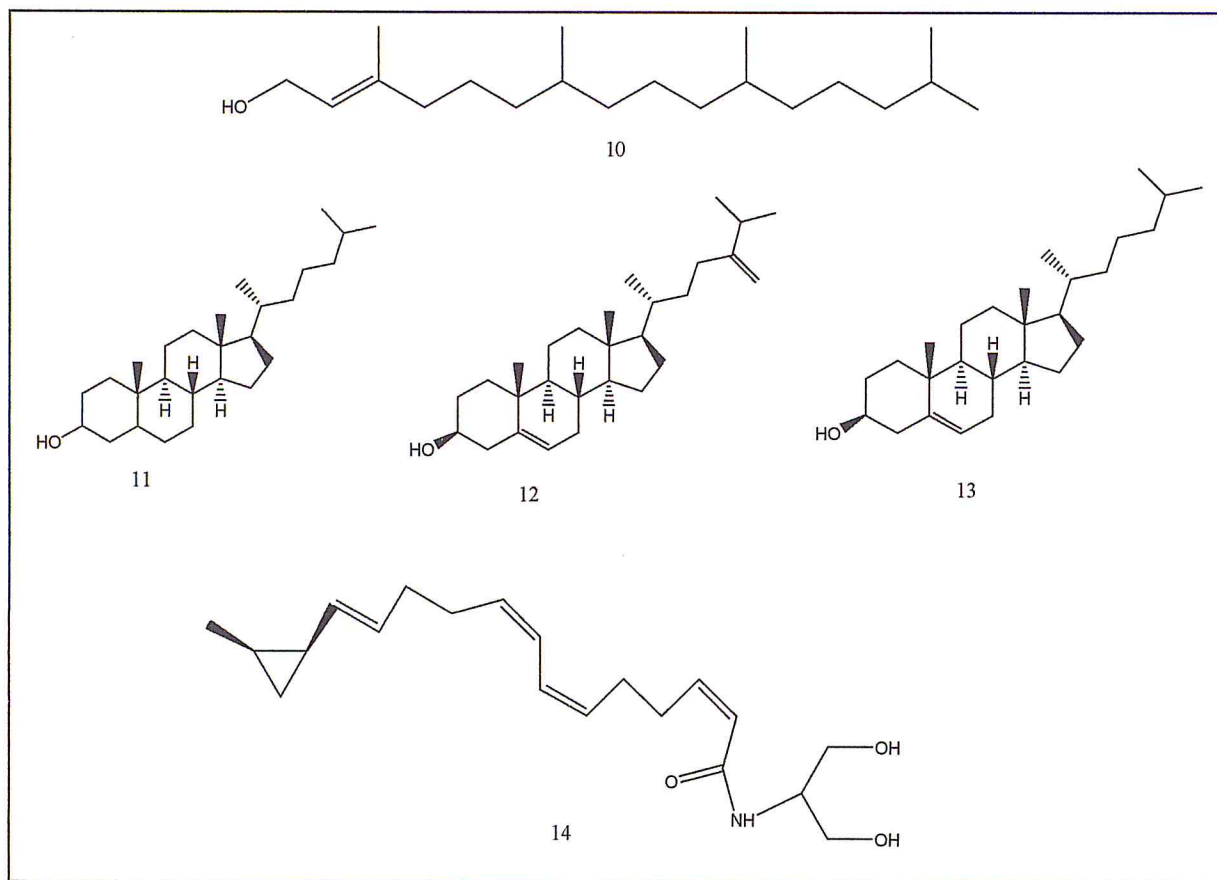


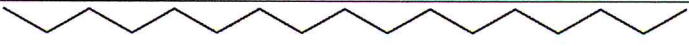
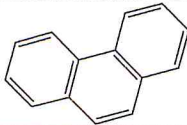
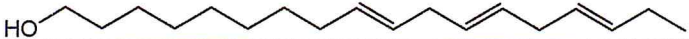
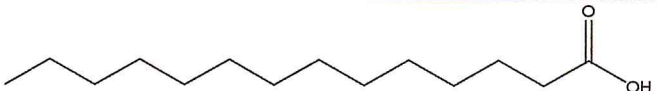
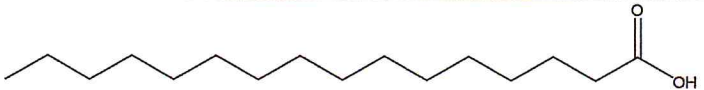
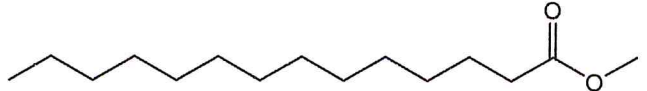
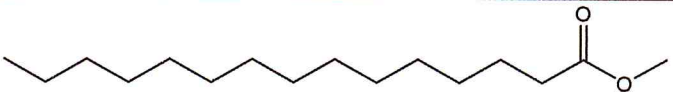
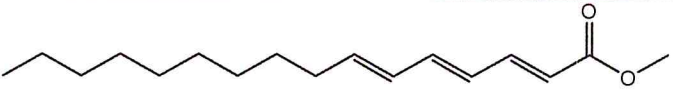
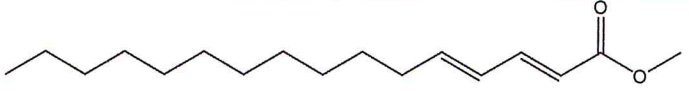
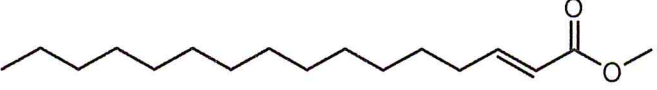
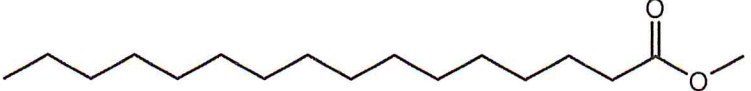
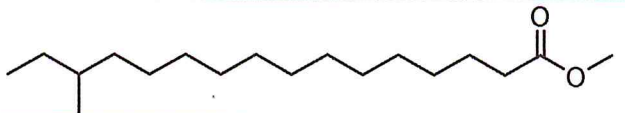
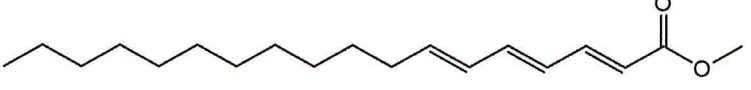
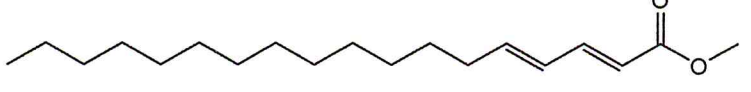
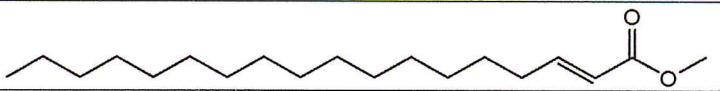
Planche 6 : Structures des composés isolés à partir des extraits d'algue rouge
Laurencia papillosa

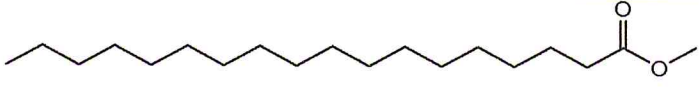
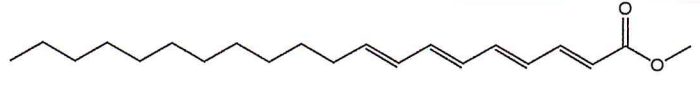
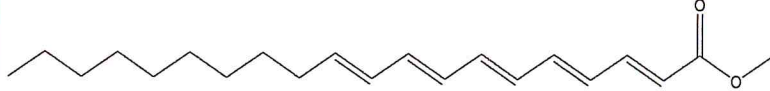
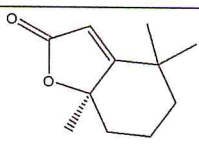
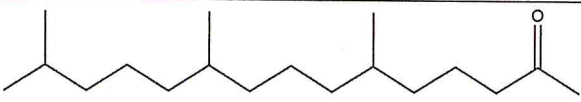
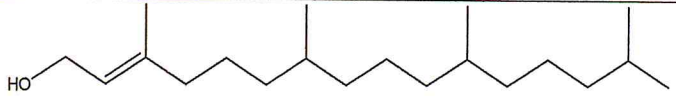
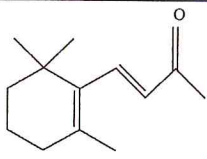
I. 3.3.2 Composition chimique de l'huile essentielle de *Laurencia papillosa*

L'huile essentielle de *Laurencia papillosa* est aussi considérée comme source riche des métabolites secondaire qui sont utilisés dans la communication et la défense chimique, ils sont notamment des hydrocarbures, des alcools, des acides et autres [25]. Des exemples de métabolites isolés dans l'huile essentielle sont regroupés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Composés de l'huile essentielle de *Laurencia papillosa* et leurs structures

Composés	Structures	(%)
Tetradécane		0.1
Pentadécane		0.1
Hexadécane		0.1
Heptadécène		0.1

Heptadécane		3.6
Phénantrène		0.3
9,12,15-Octadécatriène - 1-ol		0.7
Acide tétradécanoïque		0.4
Acide Hexadécanoïque		1.0
Tétradécanoate de méthyl		8.1
Pentadécanoate de méthyl		0.8
Hexadécatriénoate de méthyl		0.8
Hexadécadiénoate de méthyl		0.4
Hexadécénoate de méthyl		4.3
Hexadécanoate de méthyl		28.3
Méthyl-14-hexadécanoate de méthyle		0.3
Octadécatriénoate de méthyl		0.8
Octadécadiénoate de méthyl		3.2
Octadécénoate de méthyl		10.5

Octadécénoate de méthyl		0.9
Eicosatétraénoate de méthyl		3.4
Eicosapentaénoate de méthyl		14.8
Dihydroactinidiolide		0.1
Hexahydro Farnesyl Acétone		0.2
Phytol		1.2
β -Ionone		0.2

I. 3.4 Activité biologique des extraits et huiles essentielles de *Laurencia papillosa*

L'extrait méthanolique de *Laurencia papillosa* (Ceramiaceae, Rhodomelaceae, Rhodophyta) a une activité antimicrobienne maximale contre les bactéries Gram-positif suivants : (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus subtilis* ATCC 6051) et séronégatifs (*Escherichia coli* ATCC 8739 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027). Il a été testé contre quatre isolats cliniques Gram négatif (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Shigella flexneri*) et a montré une activité antibactérienne [26]. Récemment, les chercheurs ont constaté que l'huile essentielle de *laurencia papillosa* montre des activités antibactérienne, antifongique et cytotoxique [25].

I. 4 Procédés d'extraction conventionnels des huiles essentielles

I. 4.1 Introduction

Il existe plusieurs méthodes pour extraire les huiles essentielles. Les principales sont basées sur l'entraînement à la vapeur, l'expression, la solubilité et la volatilité. Le choix de la méthode la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire, de l'usage de l'extrait et l'arôme de départ au cours de l'extraction [27].

I. 4.2 Hydrodistillation

Le principe de l'hydrodistillation est celui de la distillation des mélanges binaires non miscibles. Elle consiste à immerger la biomasse végétale dans un alambic rempli d'eau, que l'on porte ensuite à l'ébullition. La vapeur d'eau et l'essence libérée par le matériel végétal forment un mélange non miscible. Les composants d'un tel mélange se comportent comme si chacun était tout seul à la température du mélange, c'est à dire que la pression partielle de la vapeur d'un composant est égale à la pression de vapeur du corps pur.

Cette méthode est simple dans son principe et ne nécessite pas un appareillage coûteux. Cependant, à cause de l'eau, de l'acidité, de la température du milieu, il peut se produire des réactions d'hydrolyse, de réarrangement, de racémisation, d'oxydation, d'isomérisation, etc. qui peuvent très sensiblement conduire à une dénaturation [28].

I. 4.3 Entraînement à la vapeur d'eau

La méthode d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau est basée sur le fait que la plupart des composés volatils contenus dans les végétaux sont entraînaables par la vapeur d'eau, du fait de leur point d'ébullition relativement bas et de leur caractère hydrophobe. Sous l'action de la vapeur d'eau introduite ou formée dans l'extracteur, l'essence se libère du tissu végétal et entraînée par la vapeur d'eau. Le mélange de vapeurs est condensé sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par décantation [29]. On utilise cette méthode pour éviter certains phénomènes d'hydrolyse sur des composants de l'huile essentielle ou des réactions chimiques pouvant altérer les résultats [30].

I. 4.4 Hydrodiffusion

C'est un procédé d'extraction d'huiles essentielles dans lequel la vapeur à une pression atmosphérique est passé à travers la matière végétale à partir de la partie supérieure de la chambre d'extraction, ce qui entraîne les huiles qui conservent l'arôme d'origine de la plante, processus est moins sévère que les distillations [31].

I. 4.5 Expression à froid

L'expression à froid est utilisée pour obtenir les essences et est réservée aux Citrus (citron, mandarine, orange...). Ce procédé consiste à briser mécaniquement les zestes frais d'agrumes en soumettant la substance végétale à une forte pression à l'aide d'une presse hydraulique. Cette méthode est simple et limite l'oxydation à son minimum [31].

PARTIE II

Etude expérimentale

II.1 Introduction

La partie expérimentale est consacrée à l'étude de la composition chimique et de l'activité biologique de l'huile essentielle de *Laurencia papillosa* (LP). Elle comporte deux parties principales

- La première partie est consacrée à l'extraction de l'huile essentielle de l'algue rouge *Laurencia papillosa*, et à l'étude de sa composition chimique par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
- La seconde partie est réservée à l'étude de l'activité antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle de *Laurencia papillosa*.

En effet, l'extraction de l'huile essentielle a été effectuée au laboratoire du département de chimie de l'Université Blida1, l'analyse de l'huile essentielle par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a été effectuée dans un laboratoire d'accueil à l'étranger. Les tests d'activité biologique ont été réalisés au sein de l'unité bactériologique du laboratoire CRD Saidal El Harrach Alger sur quelques germes pathogènes.

II.2 Récolte et traitement de l'algue

L'algue rouge *Laurencia papillosa* (**figure 2**) a été récoltée au niveau du complexe de la Corne d'Or durant le mois d'août 2012. L'algue a été séchée dans un endroit sec et aéré et à l'abri du soleil, elle a été ensuite nettoyée manuellement de tous les épiphytes.



Figure 2 : Photo personnelle de l'espèce *Laurencia papillosa*

II. 3 Extraction et analyse de l'huile essentielle de *Laurencia papillosa*

II. 3.1 Principe de l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau

La technique d'extraction de l'huile essentielle utilisée, repose sur le principe d'entraîner des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau. Cette technique est la plus fréquemment utilisée. La méthode est basée sur l'existence d'un hétéroazéotrope de température d'ébullition inférieure aux points d'ébullitions des deux composés, l'huile essentielle et l'eau, pris séparément. Ainsi, les composés volatils et l'eau distillent simultanément à une température inférieure à 100°C sous pression atmosphérique vont être entraîné par la vapeur d'eau sans subir d'altérations majeures [32].

II. 3.2 Préparation de l'huile essentielle de *Laurencia papillosa*

L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par entraînement à la vapeur d'eau dans un montage à l'échelle laboratoire (**Figure 3**), comprenant un ballon remplis aux deux tiers d'eau et surmonté d'une ampoule à décanter (jouant le rôle d'alambic) contenant une masse de 250g d'algue. L'eau est portée à ébullition, les vapeurs formées traversent la matière végétale et font éclater les cellules, les poches et les poils sécréteurs entraînant avec elles les produits volatils. La vapeur chargée d'huile essentielle se condense à son arrivée au niveau du réfrigérant, elle retombe sous forme de gouttelettes dans l'érène. Le mélange immiscible eau-huile est récupéré dans des flacons bien fermé pour éviter la vaporisation d'huile essentielle, puis, il subit un traitement spécifique pour récupérer l'huile essentielle. La durée de l'entraînement à la vapeur est de 4H.



Figure 3 : Dispositif expérimental d'entraînement à la vapeur d'eau de l'HE

II.3.2.1 Traitement et récupération de l'huile essentielle par extraction liquide-liquide

L'hydrolat (eau et huile essentielle) récupéré de l'entraînement à la vapeur d'eau est traité par l'éther diéthylique distillé 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 distillé en haut et une phase aqueuse formée d'eau et de quelques traces d'huile essentielle soluble dans l'eau, la phase aqueuse subit une deuxième extraction avec l'éther diéthylique distillé pour épuiser au maximum l'huile essentielle (Figure 4).

Les phases organiques obtenues sont regroupées en une seule phase et filtrée sur le sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) utilisé alors comme desséchant.

Enfin, on procède à l'évaporation de l'éther en utilisant l'évaporateur rotatif. L'huile essentielle ainsi obtenue est mise dans un flacon propre hermétiquement fermé et conservé au frais, le flacon doit être pesé avant d'introduire l'huile essentielle afin de calculer le rendement en huile essentielle.



Figure 4 : Extraction liquide-liquide de l'HE de la phase aqueuse

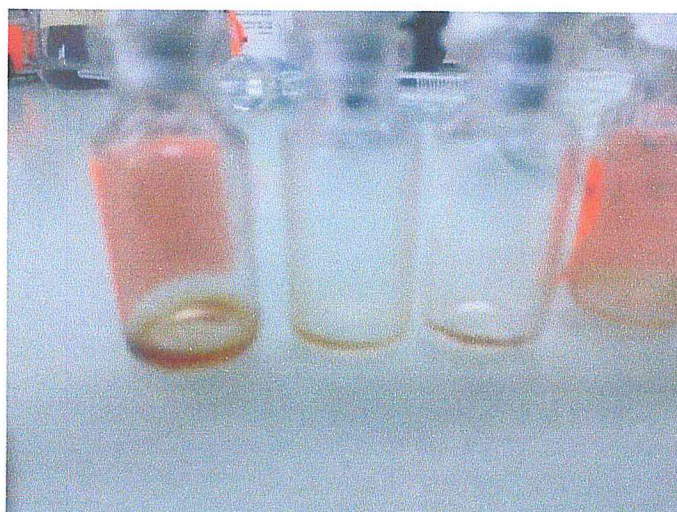


Figure 5 : Facons d'huile essentielle de *Laurencia papillosa*

II. 3.2.2 Calcul du rendement

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

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

Où :

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

II. 4 Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de l'algue rouge *Laurencia papillosa* par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

II. 4.1 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 » (figure 6). L'identification des différents composés est effectuée en se basant sur les banques de données spectrales Wiley 7n et NBS 75k.1. (comprenant, respectivement, des spectres de masse de 250000 et 75000 molécules) avec un taux de similitude supérieure ou égal à 90%.

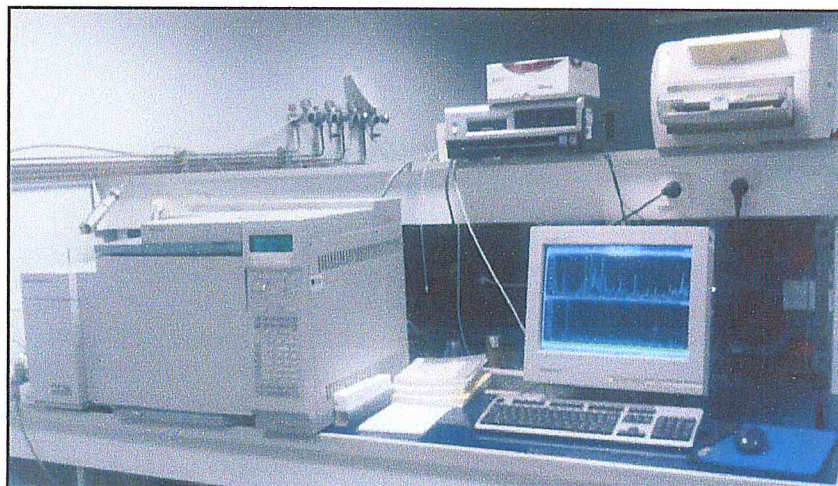


Figure 6 : Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectroscopie de masse

II. 4.2 Conditions opératoires

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

- ✓ Une colonne capillaire de type HP1 (polydiméthylsiloxane 100%), de longueur 30m d'un diamètre interne de 0.25 mm et une épaisseur du film de 0.25 µm.
- ✓ un gaz vecteur (hélium) d'un débit de 0.3 ml/mn.
- ✓ Un potentiel d'ionisation du spectromètre de masse égale a 70 eV.
- ✓ La programmation du four est : 90°C (3') -2°/mn -250°C (10')
- ✓ Injection d'une quantité de 1 µl en mode Split : 1/90.
- ✓ Les échantillons de l'huile essentielle sont dilués dans l'acétate d'éthyle à 1%.

II. 4.3 Résultats et discussion

II. 4.3.1 Propriétés organoleptiques et rendement d'extraction de l'huile essentielle de *Laurencia papillosa*

Les propriétés organoleptiques constituent généralement une partie d'études visant à analyser les facteurs qui affectent la qualité de l'huile essentielle. Notre analyse a été faite en observant et en inhalant directement l'huile essentielle.

Dans cette étude, 3 critères ont été considéré pour évaluer la qualité organoleptique :

- L'aspect
- La couleur
- L'odeur

La valeur du rendement est estimée comme une moyenne de 03 expériences. Les propriétés organoleptiques de l'huile essentielle et la valeur du rendement sont regroupés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Caractères organoleptiques et rendement de l'huile essentielle de *Laurencia papillosa*

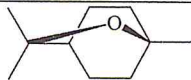
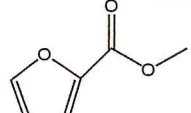
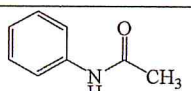
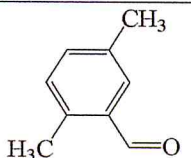
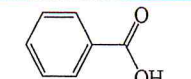
Caractères organoleptiques et rendement d'extraction				
	Aspect	Couleur	Odeur	Rendement (%)
Huile essentielle de <i>Laurencia papillosa</i>	Huileux	Orange	Forte odeur caractéristique	0,016

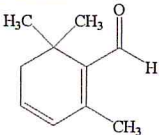

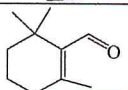
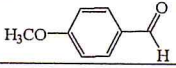
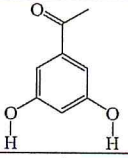
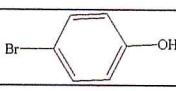
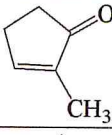
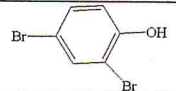
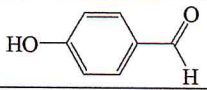
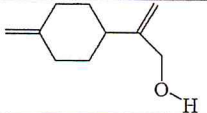
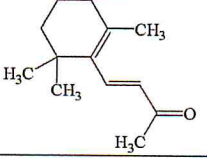
Le tableau 3 montre que le rendement de l'huile essentielle de *Laurencia papillosa* est trop faible (0,016%) en comparons avec les plantes terrestres où les rendements en huiles essentielles se situent au voisinage de 1% [33].

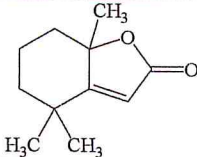
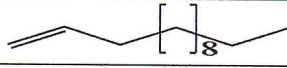
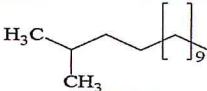
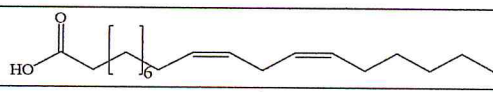
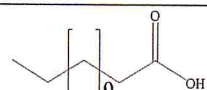
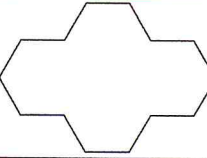
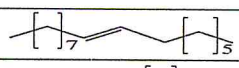
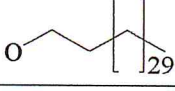
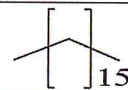
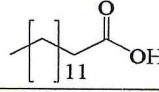
II. 4.3.2 Etude analytique de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

L'huile essentielle de *Laurencia papillosa* extraite par entrainement à la vapeur fait l'objet d'une analyse chromatographique. L'analyse par CG/SM dans les conditions citées auparavant (§II.4.2) a permis l'identification des composés regroupés dans le tableau 4 Le profils chromatographique est présenté sur la figure 7.

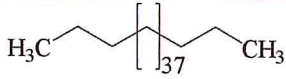
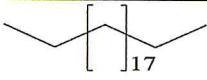
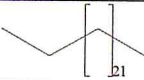
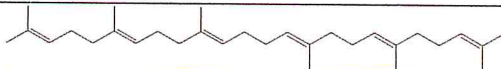
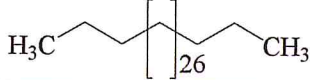
Tableau 4 : Produits identifiés dans l'huile essentielle de l'algue rouge *Laurencia papillosa* par CG/SM.

Ordre d'éluion	Tr (min)	Nom du composé	Formule moléculaire	Structure
01	2,23	NI1	/	/
02	2,31	Eucalyptol(Terpèn)	C ₁₀ H ₁₈ O	
03	2,65	Methyl carboxylate de furane(DO)	C ₆ H ₆ O ₃	
04	2.73	NI2	/	/
05	2.96	NI3	/	/
06	3.27	NI4	/	/
07	3.44	NI5	/	/
08	3.57	NI6	/	/
09	4.16	Acétanilide (DO)	C ₈ H ₉ NO	
10	4.65	2,5-Dimethyl-benzaldehyde(DO)	C ₉ H ₁₀ O	
11	4.84	Acide benzoïque(DO)	C ₇ H ₆ O ₂	

12	5.48	Safranal(DO)	C ₁₀ H ₁₄ O	
13	5.81	Parachlorophénol(DO)	C ₆ H ₅ ClO	
14	6.21	β-Cyclocitral(DO)	C ₁₀ H ₁₆ O	
15	6.38	NI7	/	/
16	6.84	Anisaldehyde(DO)	C ₈ H ₈ O ₂	
17	7.88	3',5'-Dihydroxyacetophénone (DO)	C ₈ H ₈ O ₃	
18	8.00	NI8	/	/
19	8.47	NI9	/	/
20	9.12	Parabromo-phénol(DO)	C ₆ H ₅ BrO	
21	10.30	2-Méthyl- 2-cyclopenten-1-one (DO)	C ₆ H ₈ O	
22	10.38	NI10	/	/
23	10.68	2,4-Dibromo-phénol (DO)	C ₆ H ₄ Br ₂ O	
24	11.28	NI11	/	/
25	11.81	NI12	/	/
26	12.57	4-Hydroxy-benzaldehyde(DO)	C ₇ H ₆ O ₂	
27	12.86	p-Mentha-1(7), 8(10)-dien-9-ol (DO)	C ₁₀ H ₁₆ O	
28	14.27	NI13	/	/
29	18.29	NI14	/	/
30	18.51	β-Ionone(T)	C ₁₃ H ₂₀ O	

31	18.83	Dihydroactinidiolide(DO)	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	
32	19.51	NI15	/	/
33	19.93	NI16	/	/
34	20.69	1-Tridecene(H)	C ₁₃ H ₂₆	
35	21.29	2-Methyl tetradecane(H)	C ₁₅ H ₃₂	
36	22.68	NI17	/	/
37	24.40	NI18	/	/
38	26.87	NI19	/	/
39	27.06	(3Z,13Z)-2-Méthyl-3,13-octadécadién-1-ol(DO)	C ₁₉ H ₃₆ O	
40	28.45	NI20	/	/
41	29.47	Acide tridecanoïque (DO)	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	
42	29.67	Cyclotetradécane(H)	C ₁₄ H ₂₈	
43	29.98	NI21	/	/
44	30.83	8-Heptadécène(H)	C ₁₇ H ₃₄	
45	31.25	1-Dotriacontanol(DO)	C ₃₂ H ₆₆ O	
46	31.47	NI22	/	/
47	31.81	Heptadécane(H)	C ₁₇ H ₃₆	
48	32.16	NI23	/	/
49	35.14	Acide tétradécanoïque (DO)	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	
50	36.79	NI24	/	/
51	38.01	NI25	/	/

52	39.32	Acide tetradécanoïque (DO)	C14H28O2	
53	39.74	1-Hexadécanol(DO)	C16H34O	
54	42.83	Acide palmitoléique (DO)	C16H30O2	
55	44.61	Acide palmitique(DO)	C16H32O2	
56	48.41	NI26	/	/
57	48.98	1-Nonadécanol(DO)	C19H40O	
58	49.74	2-[2-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenoxy]ethoxy]- Ethanol(DO)	C18H30O3	
59	50.23	Phytol(T)	C20H40O	
60	50.82	Acide thianaphtène-2-carboxylique(DO)	C9H6O2S	
61	50.94	Acide linoléique (DO)	C18H32O2	
62	51.44	9-Octadécanoate de methyl (DO)	C19H36O2	
63	51.62	Acide Oleique (DO)	C18H34O2	
64	52.68	Acide stéarique(DO)	C18H36O2	
65	54.03	5(E)-Eicosène(H)	C20H40	
66	57.02	Octyl methoxycinnamate (DO)	C18H26O3	
67	57.38	Methyl eicosa-5,8,11,14,17-pentaénoate (DO)	C21H32O2	

68	61.22	NI27	/	/
69	64.99	NI28	/	/
70	69.35	NI29	/	/
71	70.15	Tritetracontane(H)	C43H88	
72	72.34	Heneicosane(H)	C21H44	
73	73.65	Tetracosane(H)	C24H50	
74	76.87	Squalene (T)	C30H50	
75	77.03	Dotriacontane(H)	C32H66	
76	83.48	NI30	/	/

T : Terpènes

H : Hydrocarbure

DO :Dérivée oxygéné

NI : Produits non identifiés.

Les données de spectres de masse des produits inconnus sont représentées sous forme de m/z (abondance en %) pour les principaux fragments :

NI1 : 41(68.41), 57 (100), 69(36.90), 98 (8.10), 111(7.22), 126 (12.64), 140 (10.88)

NI2 : 41(92.35), 57(74.28), 67(53.35), 79(100), 95(43.53), 108(56.87), 126 (6.09)

NI3 : 43 (41.41), 55 (17.52), 71 (16.48), 81 (29.01), 95 (100), 109 (9.99), 124 (11.13), 135 (4.92) , 149 (0.60)

NI4 : 43 (71.80), 58 (37.85), 71 (100), 85 (19.44), 95 (52.53), 110 (25.27), 128 (15.86)

NI5 : 43 (100), 60 (24.24), 72 (29.56), 91 (47.94), 101 (1.99), 112 (2.66), 123 (8.87), 134 (11.80)

NI6 : 43(100), 60(35.66), 73(96.42), 86(18.44), 95(15.20), 105(4.94), 114(16.09), 123(33.38), 138(3.24), 166(4.82)

NI7 : 40 (16.50), 53(34.36), 67(65.30), 82 (4.78), 96 (16.62), 110 (8.00), 123 (37.95), 139 (100)

NI8 : 43(100), 55 (9.15), 69 (55.33), 86 (26.93), 97 (9.19), 109 (48.68), 127 (5.53), 137 (10.94), 152 (8.24)

NI9 : 41(44.65), 57(100), 67(64.35), 81(45.76), 95(15.44), 110(13.25), 119(7.02), 133 (2.42)

NI10 : 43 (69.45), 55(67.13), 67(34.77), 84(100), 96(29.89), 111(7.69), 125(39.21)

NI11 : 43(25.94), 55(18.35), 65(7.20), 85(100), 95(16.70), 109(9.29), 124(14.95), 135(8.40), 145(3.03), 160(69.45)

NI12 : 43(13.64), 63(17.49), 89(24.66), 117(47.59), 145(100), 160(46.31)

NI13 :43(33.80), 55(26.82), 67(21.75), 81(35.45), 95(100), 107(11.37), 121(10.22), 135(12.46), 153(3.48)

NI14 : 43(35.23), 55(3.88), 69(2.72), 79 (4.83), 91(6.01), 104 (5.20), 123(100), 135(8.80)

NI15 : 43 (13.77), 55 (37.26), 69 (4.57), 83 (100), 99 (3.65), 111 (47.10), 126 (6.90), 139 (2.27), 153 (4.90), 182 (8.25)

NI16 : 41 (16.02), 55 (65.62), 66 (7.62), 81 (20.11), 95 (13.27), 109 (13.58), 124 (100), 137 (82.36), 147 (30.58), 162 (32.48) , 180 (30.57)

NI17 : 43 (7.91), 55 (4.99), 67 (1.06), 75 (0.1), 83 (1.42), 99 (8.50), 127 (100)

NI18 : 41 (72.83), 60 (81.14), 73 (79.89), 83 (27.51), 97 (27.51), 115 (19.67), 129 (31.79), 143 (27.69), 157 (23.69), 171 (12.97), 182 (8.36), 200 (6.73), 222 (11.92), 250 (12.62), 332 (100)

NI19 : 43 (100), 55 (42.54), 68 (31.98), 83 (47.31), 99 (32.65), 109 (26.24), 121 (22.86), 149 (12.61), 163 (49.41), 206 (27.29)

NI20 : 43 (46.50), 55 (5.61), 67 (3.41), 77 (9.33), 91 (14.03), 105, (16.55), 121 (10.71), 131(11.51), 147 (9.90), 157 (4.91), 175, (19.05), 193 (100)

NI21 : 41 (70.60), 55 (65.07), 69 (100), 83 (32.45), 97 (34.47), 111 (13.70), 124 (12.22), 142 (18.24), 197 (6.15)

NI22 : 43 (51.13), 55 (40.88), 69 (41.78), 83 (31.38), 97 (29.22), 111 (23.29), 127 (37.17), 141 (9.94), 154 (100), 169, (42.25), 197 (86.45)

NI23 : 43 (18.14), 55 (4.06), 77 (28.46), 105 (100), 121 (2.77), 163 (6.10), 201 (8.03)

NI24 : 41 (1.86), 57 (13.53), 77 (4.97), 107 (12.89), 135 (32.29), 179 (100)

NI25 : 43 (100), 58 (72.18), 71 (36.95), 85 (22.62), 95 (25.23), 109 (27.66), 123 (9.79), 136 (9.81), 146 (5.53), 179 (9.13), 219 (19.70)

NI26 : 40 (34.20), 60 (31.47), 73 (31.14), 87 (48.71), 99 (18.17), 109 (8.58), 119 (30.11), 129 (18.69), 143 (9.35), 168 (15.67), 196 (19.02), 247 (49.55), 275 (27.92), 328 (14.95), 407 (10.60), 435 (82.07), 450 (100)

NI27 : 43 (22.73), 55 (23.90), 77 (21.90), 105 (50.80), 123 (100), 135 (6.23), 149 (2.73), 267 (8.21)

NI28 : 43 (55.06), 57 (44.55), 73 (39.03), 85 (17.56), 97 (10.71), 114 (11.86), 129 (100), 142 (26.73), 156 (4.78), 207 (8.02), 221 (8.02), 256 (12.80)

NI29 : 43 (87.24), 57 (67.13), 70 (47.94), 83 (43.43), 95 (19.86), 112 (32.96), 129 (9.98), 151 (11.99), 165 (13.87), 178 (36.18), 204 (100), 232 (77.16), 249 (103.93), 360 (41.51)

NI30: 43 (62.52), 57 (100), 71 (61.38), 85 (36.06), 97 (15.43), 98 (5.69), 111 (8.80), 123 (6.11), 145 (4.68), 169 (4.34), 207 (4.34)

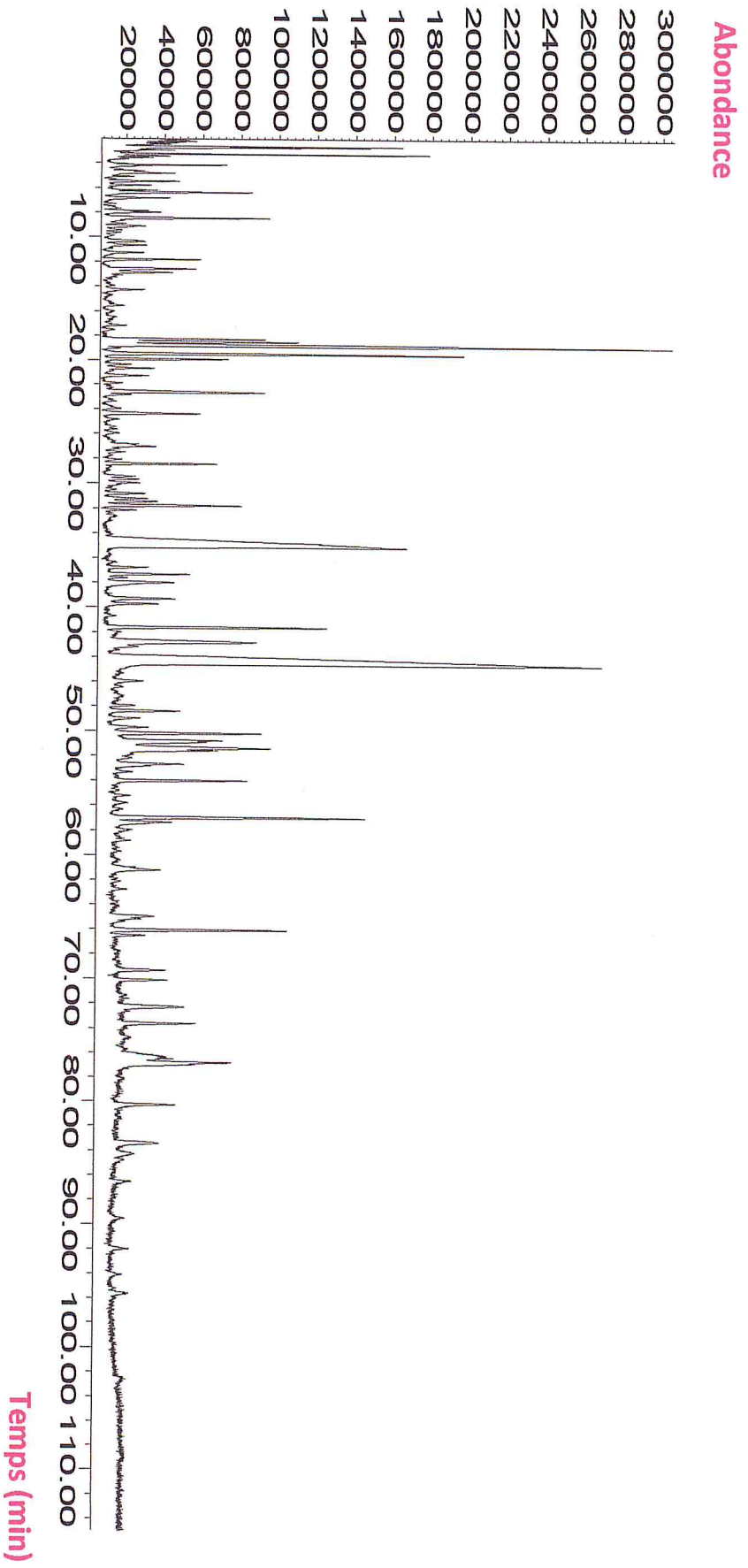


Figure 7 : Profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle de *Laurencia papillosa*

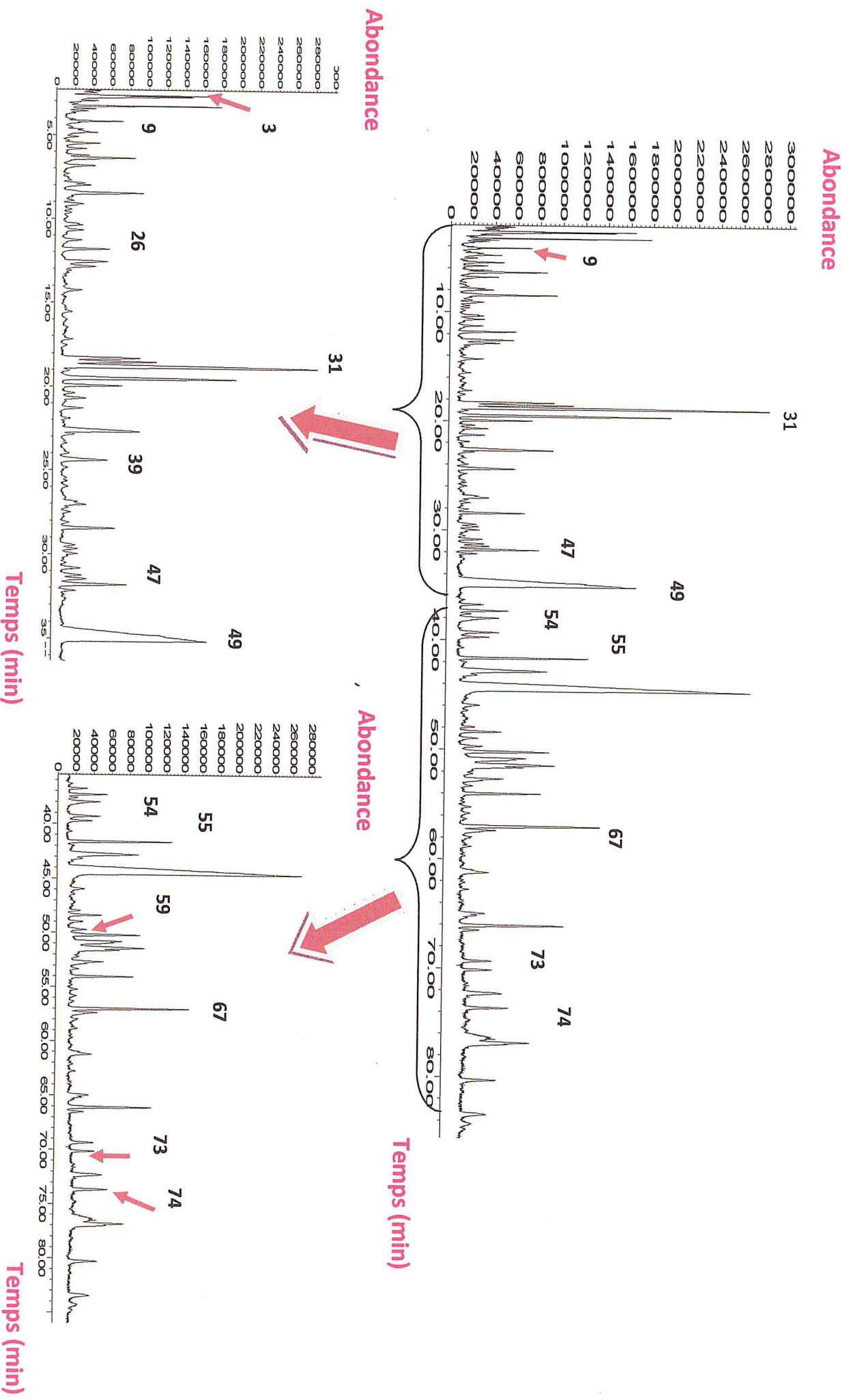


Figure 8 : Agrandissement et numérotation des pics du chromatogramme de l'huile essentielle de *Laurencia papillosa*

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse de l'huile essentielle de *Laurencia papillosa* a permis de relever 76 constituants. L'analyse du tableau 04 montre que la composition chimique est dominée par la fraction lipidique sous forme d'alcane linéaires et d'acides gras. Cet état de fait est probablement lié au mécanisme de biosynthèse mis en jeu au sein de l'espèce qui devrait, selon toute vraisemblance, privilégier la voie de l'acide acétique.

Nous avons noté la présence en quantité faible des composés de nature terpéniques tels que : Eucalyptol, Squalene. Nous pouvons évoquer également le processus de biosynthèse mis en jeu, mais cette faible proportion peut être liée à la période de récolte de l'espèce d'algue. Nous avons constaté également la présence des hydrocarbures saturés et insaturés 13,16% . Il s'agit notamment de : Tetracosane, Tritetracontane, Heneicosane, 1-Tridecene, 8-Heptadecène.

Nous avons noté la présence de dérivés de produits oxygénés représentant un taux de 42,11%. Il s'agit notamment de : Acide tridecanoïque, 1-Hexadécanol, Acide palmitoléique, 2-[2-[4-(1, 1, 3, 3-tetramethylbutyl) phenoxy]ethoxy]- Ethanol.

Nous avons été incapables d'identifier 30 composés en se basant uniquement sur les banques de données spectrales de l'appareil. Des manipulations complémentaires telles que le fractionnement et l'isolement des composés de l'huile essentielle s'avèrent nécessaire. Les données bibliographiques antérieures sur la composition chimique de l'huile essentielle de *Laurencia Papillosa* sont très pauvres. Nous avons présenté les principaux fragments avec l'abondance relative des différents produits inconnus.

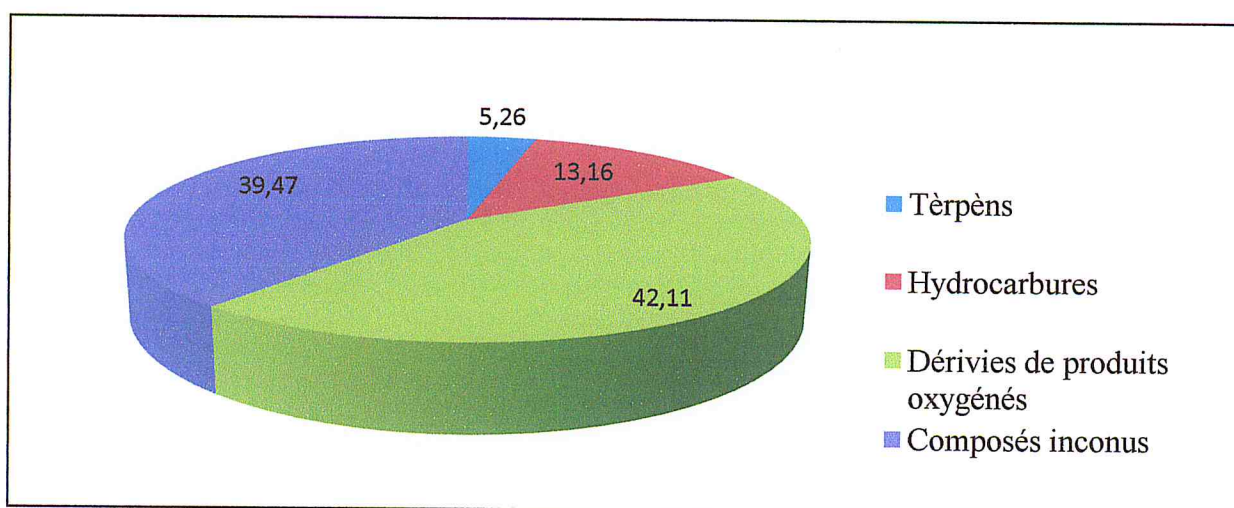


Figure 9 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Laurencia papillosa*

II. 5 Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Laurencia papillosa*

II. 5.1 Introduction

Les bactéries présentes dans l'environnement naturel de l'homme, dans le sol et dans les eaux ont innombrables effets, elles exercent des actions bénéfiques (ex: bactéries fertilisantes du sol), mais d'autres peuvent provoquer des infections chez les plantes, les animaux et également chez l'homme [34].

Cette partie consiste à mettre en évidence l'activité antibactérienne de l'huile essentielle à l'aide d'une méthodes qualitative, en procédant à des tests sur une sélection de souches de références bactérienne et fongique connues et qualifiées comme étant dangereuses et pathogènes pour l'homme et l'animal.

II. 5.2 Microorganismes utilisés

Les souches bactériennes utilisées proviennent de la collection de référence ATCC du laboratoire de microbiologie du Centre de Recherche et de Développement SAIDAL dont le fournisseur est le laboratoire d'antibiothérapie et d'hygiène de l'institut Pasteur d'Alger agréé par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé). Nous avons utilisées 6 souches : 4 bactéries, 1 levure et 1 moisissure. La liste des souches testées est regroupée dans le tableau 5.

Tableau 5 : Les différentes souches microbiennes utilisées

Souches	Noms	Références
Gram +	Bacillus subtilis	ATCC6633
Gram +	Staphylococcus aureus	ATCC6538
Gram -	Escherichia coli	ATCC8739
Gram -	Pseudomonas aeruginosa	ATCC9027
Levure	Candida albicans	ATCC10231
Moisissure	Aspergillus brasiliensis	ATCC16404

II. 5.2.1 Milieux de cultures

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

- ◆ Milieu Sabouraud pour les levures.
- ◆ Milieu Muller Hinton pour les tests anti-bactériens et anti-fongiques.

II. 5.3 Principe de la méthode

II. 5.3.1 Principe

L'aromatogramme est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles chémotypées. Différents types d'aromatogrammes, en milieu solide, liquide, sont exploitables. Cependant, en pratique quotidienne, c'est le milieu solide qui est le plus simple et le plus facilement reproductible [35]. 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 consiste à mettre en évidence une éventuelle activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Laurencia papillosa*, en la mettant en présence des germes testés. Placés dans une étuve à 37°C, dans des conditions optimales de culture, les germes pathogènes se développent rapidement sur le milieu nutritif. Sur ces colonies microbiennes, plusieurs séries de petits disques imprégnés dans l'huile essentielle à tester sont ensuite disposées. Après un temps de latence à 37,5 °C, le diamètre du halo d'inhibition (zone d'inhibition) entourant les disques est alors mesuré. Chaque halo, une zone claire, montrant la destruction des germes pathogènes et donne une indication précise de l'activité antibactérienne des huiles utilisées. L'aromatogramme représente cependant un point de repère essentiel puisque sa technique est identique à celle utilisée pour mesurer l'activité bactéricide des antibiotiques (Figure 10) [36].

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

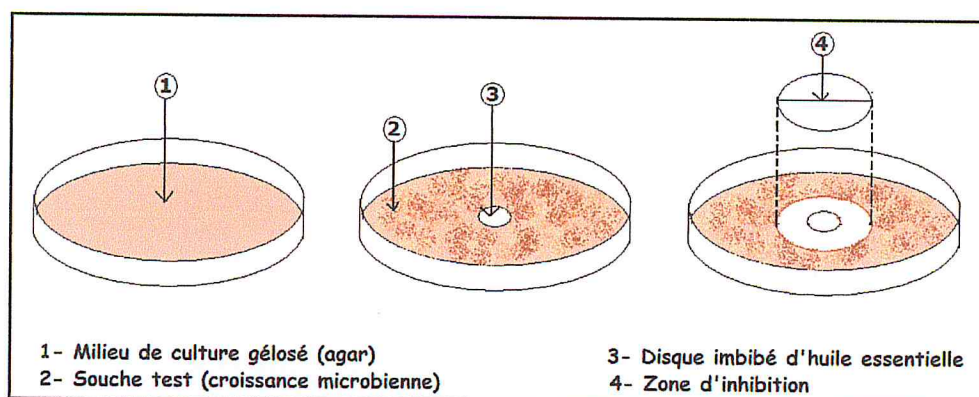


Figure 10 : Illustration de la méthode des antibiogrammes

II.5.4 Procédure générale

La méthode que nous avons utilisée est l'ensemencement par écouvillonnage préconisé [37] par NCCLS (National Comitee for Clinical Laboratory Standars) et recommandé par l'OMS.

Milieu

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

Ensemencement

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries séries.
- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boite de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

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

Dépôts des disques

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

Incubation

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

Lecture

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boite fermée.

- Comparer ces résultats aux valeurs critiques des ATCC.
- Classer la bactérie dans l'une des catégories : Sensibles, Intermédiaire ou Résistante.

Remarque :

A cause de la petite quantité de l'huile essentielle de *Laurencia papillosa*, nous avons procédé à une dilution de notre huile essentielle dans le méthanol (125 mg/ml). Le méthanol est un bon solvant pour les huiles essentielles, c'est un liquide incolore, volatil, inflammable, toxique avec une odeur caractéristique.

II.5.5 Résultats et discussion des activités biologiques

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle est évaluée en fonction du diamètre (mm ou cm) des zones d'inhibitions de la croissance microbienne [38].

L'estimation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est basée sur une échelle de mesure mise en place par Meena et al. (1994) [39], ils ont classé le pouvoir antimicrobien, en fonction des diamètres des zones d'inhibitions de la croissance microbienne, en 04 classes :

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

Les résultats qualitatifs de l'huile essentielle conventionnels sur les bactéries pathogènes et les champignons sont donnés dans la **Figure 11**.

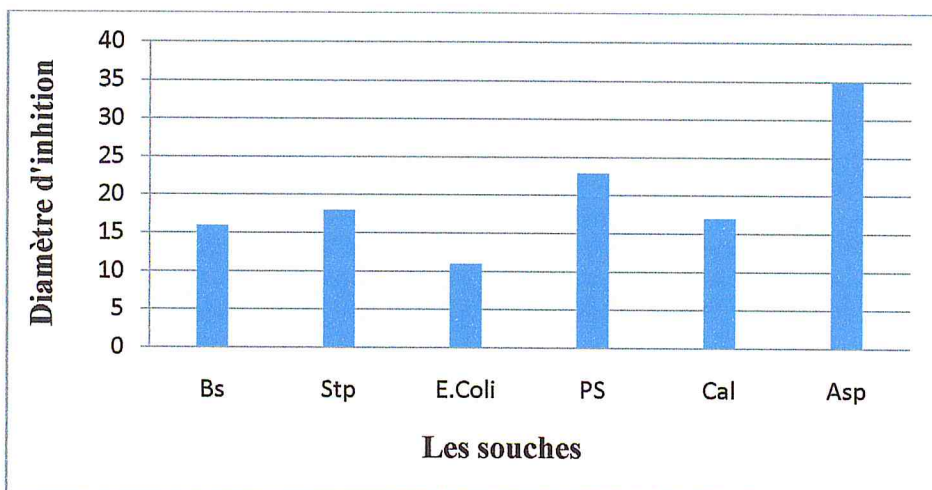


Figure 11 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des souches

On peut constater sur l'histogramme représenté par la figure 11 qu' un effet inhibiteur très important de l'huile essentielle sur le développement de souche *Aspergillus brailiensis* (activité antifongique) avec diamètre de la zone d'inhibition égal a 35 mm, Concernant les autres souches testées (*Bacillus subtiles*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candia albicans*), on a remarqué un effet modérément inhibiteur des diamètres d'inhibition égaux respectivement 16 mm , 18 mm, 23 mm, 17 mm.

Pour la souche *Escherichia coli* nous avons constaté un effet légèrement inhibiteur avec un diamètre d'inhibition égal à 11 mm.

Les figure 11 et 12 montrent les photographies des résultats obtenus sur les boites de Pétri de l'activité antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle testée sur les bactéries après 24 h d'incubation et sur les champignons après 48 d'incubation.



Figure 12 : Activité antifongique de l'huile essentielle de *Laurencia papillosa* vis-à-vis *Aspergillus brailiensis* et *Candia albicans*

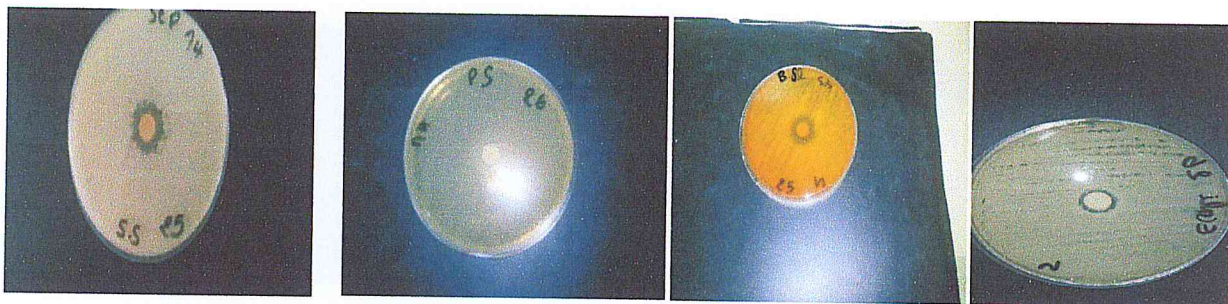


Figure 13 : Zones d'inhibition de l'huile essentielle testée sur *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtiles*, *Escherichia coli*

Conclusion

Notre travail est consacré à l'étude de la composition chimique et l'activité biologique de l'huile essentielle de *Laurencia papillosa*.

L'extraction de l'huile essentielle de *Laurencia papillosa* été effectué par entraînement à la vapeur d'eau avec un rendement de l'ordre de 0,016%. Cette valeur est assez faible comparativement à d'autres huiles essentielles.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CG/SM) a permis la séparation et l'identification de la composition chimique de l'huile essentielle de *Laurencia papillosa*. Cette dernière est constitué principalement d'alcane linéaires et d'acides gras, il s'agit notamment du : Tetracosane, Tritetracontane, Heneicosane, 1-Tridecene, 8-Heptadecène, Acide palmitoléique, Acide linoléique, Acide stéarique et des composés terpéniques (5,26%) tels que : Eucalyptol, Phytol, Squalene.

Les résultats des tests d'activités biologiques de l'huile essentielle *Laurencia papillosa* ont montré que cette dernière a une activité antibactérienne et antifongique très importante sur les cinq souches testées notamment vis-à-vis de « *Aserigillus brailiensis* ». Par contre la bactérie *Escherichia coli* s'est révélée assez résistante.

En vue de la valorisation de cette espèce, une étude chimique saisonnière et géographique permettant de mettre en évidence sa diversité chimique.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] S. Moussoukhoye, « Détermination structurale de biomolécules polaires isolées d'organismes marins de la côte sénégalaise », Thèse de doctorat, Université Cheikh AntaDiop de Dakar, Sénégal, 2003.
- [2] S. Garon-Lardiere ; « Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *ASPARAGOPSIS ARAMATA* (Bonnemaisoniales) », Thèse de doctorat, Université de Bretagne occidentale, France, Février 2004.
- [3] K. Patel, « Extraction de métabolites bioactifs d'éponges marines du Pacifique Sud », Thèse de doctorat, Muséum national d'histoire naturelle, Ecole Doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme – Ed 227, Paris, France, Avril 2010.
- [4] T. Ainane, « Valorisation de la biomasse algale du Maroc : Potentialités pharmacologiques et Applications environnementales, cas des algues brunes *Cystoseira tamariscifolia* et *Bifurcaria bifurcata* », Thèse de doctorat, Université du Hassan II – Casablanca, Maroc, 2011.
- [5] Y. Viano, « Recherche de molécules non-toxiques actives en antifouling à partir d'organismes marins de Méditerranée », Thèse de doctorat, Université du Sud Toulon-Var, France, 2010.
- [6] Y. Viano, « Recherche de molécules non toxiques actives en antifouling à partir d'organismes marins de méditerranée », Thèse de doctorat, Université du Sud Toulon-Var, France, 2010.
- [7] P. Rajasulochana, R. Dhamotharan, P. Krishnamoorthy, S. Murugesan, « Antibacterial Activity of the Extracts of Marine Red and Brown Algae », *American Science*, 5 (3), 20-25, 2009.
- [8] A.-A. El Gamal, « Biological importance of marine algae », *Saudi Pharmaceutical*, 18, 1-25, 2010.

- [9] E.-M. Balboa, E. Conde, A. Moure, E. Falque, H. Dominguez, « In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae», *Food chemistry* ,138,1764-1785, 2012.
- [10] F. Breton, S. Cérantola, E. Ar Gal, « Distribution and radical scavenging activity of phenols in *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae) », *experimental marine biology and ecology* , 399, 167-172, 2011.
- [11] M. Masuda, T. Abe, T. Suzuki, M. Suzuki, «Morphological and chemotaxonomic studies on *Laurencia composita* and *L. okamurai* (Ceramiales, Rhodophyta)», *Phycologia*, 35, 550-562, 1996.
- [12] K.-L. Erickson, « Constituents of *Laurencia*». In *Marine Natural Products, Chemical and Biological Perspectives*, P.J. Scheuer, Academic Press, New York, USA, 5, PP131-257, 1983.
- [13] N.-B. MAIZ « Flore algale (Rhodophyta, Phaeophyceae, Chlorophyceae, Bryopsidophyceae) de l'étang de thau (HERAULT) », thèse de doctorat , Université D'AIX-MARSEILLE II, France, 1986.
- [14] V.Gressler, M. Stein, «Sesquiterpenes from the essential oil of *Laurencia dendroidea* (Ceramiales, Rhodophyta): isolation, biological activities and distribution among seaweeds », *Pharmacognosy*,21(2), 248-254,2011.
- [15] M.-T. Cabrita, C.Vale, A.-P. Rauter « Halogenated Compounds from Marine Algae» *Marine Drugs*, P 2301-2317, 2010.
- [16] J.-M. Kornprobst, « Substances naturelles d'origine marine », TEC&DOC, Lavoisier, Paris, France, P598, 2005.
- [17] S.-K. Kim, « Marine Nutraceuticals: Prospects and Perspectives», Taylor & Francis Group ,USA, P437, 2003.
- [18] S.-C. Mao and Y.-W. Guo; «A Laurane Sesquiterpene and Rearranged Derivatives from the Chinese Red Alga *Laurencia okamurai* Yamada», *Naturel Products*, 69, 1209-1211, 2006.

- [19] D.-A. Pinet, I.-P. Holland «Cytotoxic compounds from *Laurencia pacifica*», *Organic and chemistry Letters*, 4(8), 286-288, 2014.
- [20] N.-Y. Ji; X.-M. Li and B.-G. Wang. «Halogenated Terpenes and a C15-Acetogenin from the Marine Red Alga *Laurencia saitoi*», *Molecules*,13, 2894-2899, 2008.
- [21] M. Kawaguchi, S. Phang, « Taxonomic notes on *Laurencia similis* and *L. papillosa* (Ceramiales, Rhodophyta) from the Western Pacific», *Botanica Marina* 40, 229-239, 1997.
- [22] S. Al-lihaibi, S.N. Ayyad, «3 β ,7 β -Di hydroxy-5 α -cholestan-11-one : A new oxidation pattern of cholesterol skeleton from *Laurencia papillosa* », *Biochemical Systematics and Ecology*, 49, 861 – 863, 2010.
- [23] M. Mohamed Fathy, « Pharmacognostical study of the red alga *laurencia papillosa* (forssk.) grev», thèse de doctorat, Université de Zagazige Eygypt, 1986.
- [24] S.Kwon Kim « Marine Medicinal Foods: Implications and Applications - Animals and Microbes», Academic Press, P523, 2012.
- [25] Z. Kamenarska, A.Ivanova«Volatile compounds from some Black Sea red algae and their chemotaxonomic application», *Botanica Marina*, 49, 47–56, 2006.
- [26] K. Kavita, V. Kumar Singh, « 24-Branched Δ^5 sterols from *Laurencia papillosa* red seaweed with antibacterial activity against human pathogenic bacteria», *Microbiological Research*,40,167-352, 2013.
- [27] S. Sutour, « Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthes de Corse et de Kumquats », Thèse de doctorat, Université Crose pascal Paoli, France, 2010.
- [28] F. Mayer, «Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles : étude de cas en maison de retraite», Thèse de doctorat, Université de Lorraine, France, 2012.
- [29] Z.Mohammedi, « Etude du pouvoir antimicrobienne et antioxydant des huiles essentielles et flavonoides de quelques plantes de la région de Tlemcen », Thèse de magistère, Université Abou baker Belkaid Tlemcen, 2006.

- [30] C. Pierron, « Les huiles essentielles et leurs expérimentation dans les services hospitaliers de France : exemples d'applications en gériatrie-gérontologie et soins palliatifs », Thèse de doctorat, Université de Lorraine, France ,2014.
- [31] E. Duvillard, « Les parfums : utilisations thérapeutiques et reformulation », Thèse de doctorat, Université Claude bernard-lyon1, France, 2013.
- [32] P. Franchomme., D.Pénoël., «L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles»; Ed Roger Jallois; Limoges, France, P445,1990.
- [33] Y. R. Naves, « Technologie et chimie des parfums naturels: essences concrètes, résinoïdes, huiles, et pommades aux fleurs », Masson, France, P326, 1974.
- [34] N.Benzeggouta « Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliment », Thèse Magister, Université Mentouri de Constantine, 2005.
- [35] M.-C. Pibiri, «Assainissement microbiologiques de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles», Thèse de Doctorat, EPFL, Lausanne, Suisse, 28-42, 2005.
- [36] A. ZHIRI «L'aromathérapie» ; Nutranews, Fondation pour le libre choix, 2-16, 2006.
- [37] Anonyme, « Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale », 5ème édition avec la collaboration de l'OMS, P106, 2008.
- [38] Pharmacopée européenne « Direction de la qualité du médicament », Council of Europe, P2623, 2002.
- [39] M.-R. Meena, V. Sethi., « Antimicrobial activity of the essential oils from spices», Food Science and Technology Mysore, 31(1), 68-70, 1994.
- [40] F. Machado S. L, C .R. Kaiser« Biological activity of the secondary metabolite from marine algae of the genus Laurencia », Pharmacognosy, 20(3), 441-452, 2010.
- [41] W.-K. Jung, I. Choi, S. Oh, S.-G. Park, S.-K. Seo, S.-W. Lee, D.-S. Lee, S.-J. Heo, Y.-J. Jeon, J.-Y. Je, C.-B. Ahn, J.S. Kim, K.S. Oh , Y.-M. Kim , C. Moon, I.-W. Choi, «Anti-

asthmatic effect of marine red alga (*Laurencia undulata*) polyphenolic extracts in a murine model of asthma», *Food and Chemical Toxicology*, 47, 293–297, 2009.

[42] M. Kladi, C. Vagias, M. Stavri, M.-M. Rahman, S. Gibbons, V. Roussis, « C15 acetogenins with antistaphylococcal activity from the red alga *Laurencia glandulifera*» *Phytochemistry Letters*, 1, 31–36, 2008.

[43] M. Suzuki, T. Abe « Division of Material Science, Graduate School of Environmental Earth Science », *Phytochemistry*, 58, 517–523, 2001.