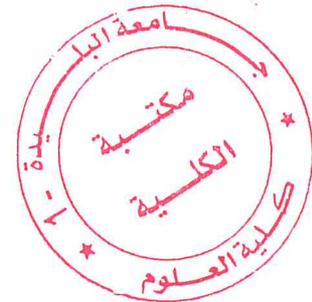


République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université BLIDA 1
Faculté des Sciences
Département de Chimie



Mémoire présenté par
Djellouli Nacera

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière
Filière : Chimie
Option : Chimie des Substances Naturelles

Titre

**Étude phytochimique de l'algue rouge *Laurencia Obtusa* :
Détermination de l'activité antimicrobienne**

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

S. Kasmi	MCA	Présidente	Université de Blida
N. Bouzidi	MCB	Examinatrice	Université de Blida
M. El Hattab	Pr	Promoteur	Université de Blida

Promotion 2014-2015

Remerciements

Avant toute chose, je remercie *Dieu*, le tout puissant pour m'avoir donnée la force et la patience tout le long de mes études.

Je tiens, en tout premier lieu, à remercier la personne sans qui ce présent travail n'aurait jamais vu le jour : EL HATTAB Mohamed, professeur à la faculté des sciences université de Blida 1, pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il m'accordé. Qui a su trouver les mots pour m'amener à exprimer mon rêve, faire de la recherche et transmettre les connaissances ainsi mise en évidence, il m'a soutenue tout au long de ce mémoire, dans les bons moments, comme dans les périodes de découragement. Je le remercie aussi pour ses qualités humaines qu'il trouve ici le témoignage de mon grand respect et de mon estime.

Je tiens à remercier Mme Kasmi, ~~M~~aitre de conférences à la faculté des sciences université de Blida 1 pour l'honneur qu'elle ma fait en acceptant de présider le jury de soutenance.

J'adresse mes sincères remerciements à Mme Bouzidi, maitre de conférence à la faculté des sciences université de Blida 1 qui m'a fait l'honneur de juger ce travail. Qu'elle soit assurée de mon entière reconnaissance.

Je remercie chaleureusement M^{elle} Hamiche Sonia, pour sa disponibilité en tout moment, son aide précieux, ces conseils et ses encouragements.

Je remercie sincèrement M^{me} Chader chef de service de laboratoire de microbiologie de l'entreprise Saidal pour leur accueil, sa gentillesse, sa disponibilité et son aide.

J'adresse aussi mes sincères remerciements à tous les professeurs et les enseignants pour leurs efforts et encouragement le long de ce master.

Mes remerciements s'adressent aussi aux membres du laboratoire de chimie des substances naturelles, qui ont mis à ma disposition les conditions matérielles nécessaires pour la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

À la mémoire mon très chère père

À ma très chère mère pour leur dévouement leur amours, leur sacrifices et leur encouragements le long de mon cycle d'étude

Que ce travail soit pour eux, un faible témoignage de ma profonde affection et tendresse.

À mon frère Nabil et sa femme Soltana pour leurs soutiens et leurs encouragements qu'ils m'ont apporté avec toute mon affection et ma reconnaissance.

Mon frère Brahim et sa femme Imane.

À mes sœurs

Lwiza et son mari Younes, Hanane et son mari Nabil

Tous mes neveux et mes nièces

À tous mes amis et toute ma famille

En fin à tous les personnes qui comptent pour moi, intervenues dans ma vie à un moment ou à un autre et qui ont participé à faire de moi celle que je suis aujourd'hui.

ملخص

يركز هذا العمل على الدراسة الكيميائية والبيولوجية للجزء المتبخر للطحلب الأحمر لورانسيا ابتوزا حصادها في المملكة العربية السعودية. تم الحصول على الجزء المتبخر عن طريق التقطير بالبخار للمستخلص الخام باستعمال تركيب دين ستارك فكان المردود بقدر 7.80%.

التحليل الكيميائي للجزء المتبخر تم بواسطة الكروماتوغرافيا الطور الغازي مقرونة بمطيافية الكتلة (CG/MS). وقد كشف التحليل على 67 مركب تم تحديدها بناء على بنوك البيانات الطيفية وإيلي 7ن، ن ب س 75ك وكذلك البيانات من الوثائق حول منتجات نقية منعزلة يتميز التركيب الكيميائي للجزء المتبخر بوجود المركبات التربينية((-)- α -جورجونان، 10-ميثيل سكوالان)،س 15 اسيتوجينين(سيس-مانيونان أ، سيس مانيونان س) وأحماض دهنية(حمض البالمتيك وحمض البالميتوليك). تتركز الدراسة البيولوجية على تقييم النشاط المضاد للميكروبات باستعمال طريقة الانثيبوغرام (انتشار القرص) باستخدام مجموعة من الكائنات الحية الدقيقة التي تضم أربعة بكتيريا، الخميرة والعفن. وظهرت النتائج نشاط قوي ضد البكتيريا ستافيلوكوكيس أوريوس والعفن اسبارجيلوس برازيليانسيس ، نشاط كاجح بشكل معتدل ضد باسيليس سيبتيليس ، بسودوموناس ايروجينوزا والخميرة كونديدا ألبيكانس، ونشاط مثبط قليلا ضد البكتيريا إيشيريشيا كولي.

الكلمات المفتاحية:

لورانسيا ابتوزا، الجزء المتبخر، المستخلص الخام، (CG/MS)، التركيب الكيميائية، النشاط المضاد للميكروبات

Résumé

Le présent travail porte sur l'étude chimique et biologique de la fraction volatile de l'algue rouge *Laurencia Obtusa* récoltée en Arabie saoudite. La fraction volatile a été obtenue par entraînement à la vapeur d'eau de l'extrait brut à l'aide du montage de Dean-Starck avec un rendement moyen de 7.80%.

L'étude chimique de la fraction volatile consiste à effectuer une analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS). L'analyse effectuée a permis de révéler 67 composés identifiés en se basant sur les banques de données spectrales Wiley 7n et NBS75K, ainsi que sur les données de la littérature concernant des produits purs isolés. La composition chimique de la fraction volatile est caractérisée par la présence de produits terpéniques ((-)- α -Gurjunene, 10-Demethylsqualene), des C₁₅ acétogénines (Cis-manoene-A, Cis manonene C) et des acides gras (Acide palmitique, acide palmitoléique).

L'étude biologique consiste à évaluer l'activité antimicrobienne de la fraction volatile par la méthode de l'antibiogramme (diffusion du disque) en utilisant un panel de microorganismes comprenant quatre bactéries, une levure et une moisissure. Les résultats ont montré une forte activité contre la bactérie *Staphylococcus aureus* et la moisissure *Aspergillus Brasiliensis*, une activité modérément inhibitrice contre *Bacillus Subtilus*, *Pseudomonas aeruginosa* et la levure *Candida Albicans* et une activité légèrement inhibitrice contre *Escherichia Coli*.

Mots clés : *Laurencia Obtusa*, fraction volatile, extrait brut, CG/MS, composition chimique activité antimicrobienne

Abstract

The present work focuses on chemical and biological study of the volatile fraction of the red alga *Laurencia Obtusa* harvested in Saudi Arabia. The volatile fraction was obtained by steam distillation of water from the crude extract by means of the Dean-Stark assembly with an average yield of 7.80%.

Chemical Study of the volatile fraction consists of performing a gas chromatography analysis coupled with mass spectrometry (GC / MS). The analysis has revealed 67 compounds identified based on spectral data banks and NBS75K Wiley 7n as well as the data of the literature on isolated pure products. The chemical composition of the volatile fraction is characterized by the presence of terpene products ((-)- α -Gurjunene, 10- Demethylsqualene), C₁₅ acetogenins (Cis-manoene-A, Cis manonene C) and fatty acids (Palmitic acid, palmitoléic acid).

The biological study is to evaluate the antimicrobial activity of the volatile fraction by the antibiogram method (diffusion disc) using microorganisms panel comprising four bacteria, yeast and mold. The results showed strong activity against the bacterium *Staphylococcus aureus* and the mold *Aspergillus Brasiliensis*, a moderate inhibitory activity against *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and the yeast *Candida albicans* and a slightly inhibitory activity against *Escherichia coli*.

Keywords: *Laurencia Obtusa*, volatile fraction, crude extract, GC / MS, chemical composition, antimicrobial activity

Liste des abréviations

ATCC	:	American type culture collection
CG/SM	:	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
EX	:	Extrait
FV	:	Fraction volatile
LO	:	Laurencia Obtusa
MV	:	Matière végétale
OMS	:	Organisation mondial de la santé

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des Rhodophytes d'après Van Den Hoek et al 1996	5
Tableau 2 : Position systématique de l'espèce <i>Laurencia Obtusa</i>	12
Tableau 3 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Laurencia Obtusa</i>	14
Tableau 4 : Propriétés organoleptiques de l'extrait de <i>Laurencia Obtusa</i>	22
Tableau 5 : Propriétés organoleptiques de la fraction volatile de <i>Laurencia Obtusa</i>	24
Tableau 6 : Composition chimique de la fraction volatile de l'algue rouge <i>Laurencia Obtusa</i>	26
Tableau 7 : Microorganismes utilisés	38
Tableau 8 : Activité antibactérienne de la fraction volatile de <i>Laurencia Obtusa</i>	42
Tableau 9 : Activité antifongique de la fraction volatile de <i>Laurencia Obtusa</i>	43

Liste des figures

Figure 1 :	<i>Laurencia obtusa</i>	13
Figure 2 :	Préparation de l'extrait brut à partir de la matière végétale	21
Figure 3 :	Entrainement à la vapeur d'eau de l'extrait brut à l'aide du montage de Dean-Starck	23
Figure 4 :	Extraction liquide-liquide de la fraction volatile de <i>Laurencia Obtusa</i> .	23
Figure 5 :	Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectroscopie de masse	25
Figure 6 :	Composition chimique de la fraction volatile de <i>Laurencia Obtusa</i>	34
Figure 7 :	Profil chromatographique d'analyse de la fraction volatile <i>Laurencia Obtusa</i>	36
Figure 8 :	Agrandissement et numérotation des pics du chromatogramme de la fraction volatile de <i>Laurencia Obtusa</i>	37
Figure 9 :	Illustration de la méthode des antibiogrammes	39
Figure 10 :	Activité antibactérienne de la fraction volatile de <i>Laurencia Obtusa</i> contre : A/ <i>Eschirichia Coli</i> , B/ <i>Staphylococcus aureus</i> , C/ <i>Basilus subtilis</i> , D/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
Figure 11 :	Activité antifongique de la fraction volatile de <i>Laurencia Obtusa</i> contre : E/ <i>Candidat Albicans</i> , D/ <i>Aspergillus Brasiliensis</i>	44

SOMMAIRE

Remerciements	I
Dédicaces	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 Généralités sur les algues rouges	4
I. 1.1 Introduction.....	4
I. 1.2 Classification des algues rouges	4
I. 1.3 Importance et utilisation des algues rouges	6
I. 2 Les algues rouges du genre <i>Laurencia</i>	7
I. 2.1 Systématique et taxonomie	7
I. 2.2 Distribution phytogéographique mondiale	8
I. 2.3 Composition chimique des algues rouges du genre <i>Laurencia</i>	8
I.2.3.1 Composition en terpènes	9
I. 2.3.1.1 Exemples de structures apparentées au squelette Laurane	9
I.2.3.1.2 Autres sesquiterpènes isolés du genre <i>Laurencia</i>	10
I.2.3.1.3 Exemple de diterpènes, triterpènes et C15-acétogénine isolés du genre <i>Laurencia</i>	11
I.2.3.1.4 Exemple de sesquiterpènes isolées de genre <i>Laurencia</i>	11
I.3.Étude systématique et taxonomique de l'espèce <i>Laurencia obtusa</i>	12
I. 3.1 Position systématique.....	12
I. 3.2 Description d'espèce <i>Laurencia obtusa</i>	13
I. 3.3 Étude chimique de <i>Laurencia obtusa</i>	13
I. 3.4 Activité biologique de l'huile essentielle de <i>Laurencia obtusa</i>	18
I.3.4.1 Activité antimicrobienne des huiles essentielle de <i>Laurencia Obtusa</i>	18

Partie II : Étude expérimentale

II. 1 Introduction	20
II. 2 Récolte et traitement du matériel végétal	20
II. 3 Préparation de l'extrait	20
III. 4 Extraction de la fraction volatile à partir d'un extrait du solvant	22
II.4.1 Description du dispositif d'extraction	22
II.4.2 Extraction liquide-liquide de la fraction volatile.....	23
II.4.3 Rendement de la fraction volatile.....	24
II.4.4 Caractéristiques organoleptiques et rendement de la fraction volatile de <i>Laurencia Obtusa</i>	24
II.5 Analyse qualitative de la fraction volatile par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	25
II.5.1 Description de l'appareil	25
II.5.2 Conditions opératoires.....	25
II.5.3 Résultats et discussion.....	26
II. 6 Étude du pouvoir antimicrobien de la fraction volatile de <i>Laurencia Obtusa</i>	38
II.6.1 Introduction	38
II.6.2 Microorganismes utilisés.....	38
II.6.3 Principe de la méthode.....	39
II.6.3.1 L'aromatogramme	39
II.6.4 Protocole expérimental	40
II. 6.5 Résultats et discussion.....	42
III. Conclusion.....	47
IV. Références bibliographiques.....	48

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale

Les océans et les mers présentent près des trois quarts de la surface du globe. La vie sur terre est apparue dans le milieu marin il y a environ 3,8 milliards d'années alors que les premières espèces terrestres remontent, quant à elles, à 400 millions d'années. Cette différence se traduit aujourd'hui par une plus grande diversité des phyla et des genres dans le milieu marin. Par exemple, parmi les principaux phyla qui composent le règne animal, une grande majorité comporte des espèces marines et nombre d'entre eux sont exclusivement marins. De la même manière, on peut constater que le règne végétal terrestre se limite au seul monde «vert», alors que le milieu marin en comporte trois : les mondes « vert », « rouge » et « brun » [1].

Sur près de 220 000 substances naturelles répertoriées, seules 10% sont d'origine marine. Ceci peut s'expliquer par le fait que les organismes marins ont été beaucoup moins étudiés que leurs analogues terrestres, et ce principalement à cause du manque de connaissance de ce milieu et des difficultés liées à la récolte des échantillons. 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 [2]

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 apparentées à tous les niveaux évolutifs [3,4].

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 [3].

La chimie marine de produits naturels a connu une croissance explosive pendant les 40 dernières années. A titre d'exemple, entre 1973 et 1987 plus de 3000 nouvelles molécules ont été bien isolés dans les organismes marins. Les sources les plus riches sont les algues rouges (598 nouveaux composés dans la période 1973-1987) et brunes (409 nouveaux composés dans la même période) [5].

Les algues rouges représentent le plus grand nombre des espèces, suivies par les algues brunes et les algues vertes avec 1700 et 1200 espèces, respectivement. Utilisées depuis des millénaires par les populations littorales pour leurs hautes valeurs nutritives, les algues rouges attirent actuellement, un regard particulier pour la recherche de nouvelles substances d'intérêt biotechnologiques [6].

Les algues rouges sont connues pour leur richesse en métabolites secondaires, qui ont montré une myriade d'activités biologiques (activité antioxydant, antimicrobienne, antifouling, anthelminthique et cytotoxique...etc). Parmi elles c'est l'activité antimicrobienne qui est largement étudiée, chez différentes espèces à travers le monde. D'ailleurs, les agents antimicrobiens naturels peuvent apporter des solutions aux problèmes de santé publique car ils peuvent constituer une alternative plus sûre et efficace aux produits synthétiques [6]. D'un autre côté, en agriculture et en aquaculture, le regard est également orienté vers les composés bioactifs des algues, dont l'utilisation réduit les pressions législatives concernant l'emploi des produits synthétiques et pharmaceutiques [7].

Les Rhodophycées de genre *Laurencia* font l'objet de plusieurs études pour leurs potentialités biotechnologiques. De ce fait nous avons opté à étudier la Rhodophycée *Laurencia Obtusa* et ceci en étudiant la composition et la bioactivité de cet espèce.

Le présent travail porte sur l'étude chimique et biologique de la fraction volatile de l'algue rouge *Laurencia Obtusa*. Il comporte deux parties :

- La première partie rassemble des données générales sur les algues rouges notamment les algues rouges du genre *Laurencia*.
- La deuxième partie est réservée à une étude expérimentale qui a pour objectif, l'étude de la composition chimique et l'évaluation du pouvoir antimicrobien de la fraction volatile de *Laurencia Obtusa*.

PARTIE I

Synthèse bibliographique

I.1 Généralités sur les algues rouges

I. 1.1 Introduction

Les Rhodophytes ou algues rouges forment un groupe d'algues très diversifiées. Ces algues montrent une originalité particulière avec leur pigments surnuméraires rouges (Phycoérythrines) et bleus (Phycocyanines) qui viennent masquer la chlorophylle. Les proportions relatives entre les différents pigments, conjuguées avec la forme du thalle, donnent à la lumière du jour toutes les couleurs imaginables depuis le brun noirâtre jusqu'au rose très clair en passant par les rouges pourpres et les orangés. De plus, pour une même espèce, la couleur varie en fonction de l'exposition aux rayons lumineux : souvent les individus qui se développent aux forts éclaircissements montrent des couleurs délavées, où dominent les jaunes orangés en raison de la forte concentration en pigments caroténoïdes photoprotectants [2].

De quelques micromètres de long pour les unicellulaires, la plupart des Rhodophycées mesurent quelques centimètres ou décimètres de longs et se rencontrent sous toutes les latitudes. Elles sont toutefois moins nombreuses dans les mers arctiques que dans les zones proches des tropiques. On en dénombre environ 4 000 espèces réparties en 700 genres [8].

Les algues rouges sont en majorité marines, les Rhodophycées d'eau douce sont peu nombreuses et se rencontrent dans les eaux courantes et peu minéralisées. On n'en recense qu'une vingtaine de genres réparties en 150 espèces environ. Les Rhodophycées sont majoritairement benthiques excepté 3 genres de Porphyridiales unicellulaires (*Porphyridium*, *Rhodella*, *Rhodorus*) qui sont planctoniques. Généralement fixées sur les rochers, elles peuvent être épiphytes, endophytes (*Schmitziella endophloea*) ou parasites (*Polysiphonia lanosa*). Grâce à leurs pigments surnuméraires (phycoérythrine en particulier) qui leur permettent d'absorber dans le vert (entre 500 et 565 nm), elles peuvent vivre à une profondeur allant jusqu'à 250 m [9].

I. 1.2 Classification des algues rouges

On estime à environ 4000 le nombre d'espèces d'algues rouges et 98% le pourcentage des formes marines [1]. Les Rhodophycées ou algues rouges forment un embranchement bien défini par un ensemble de caractères communs. En effet, les phycologues, sur des bases de phylogénie moléculaire, entre autres critères, s'accordent à considérer les algues rouges comme monophylétiques [9].

Les Rhodophycées se répartissent en deux classes distinctes, les Floridophycideae et les Bangiophycideae, mais d'importance très inégale par le nombre d'espèces qui en font partie [1].

→ Les Bangiophycideae, ou Bangiophyceae, sont des formes primitives d'algues rouges et la plupart d'entre elles sont monocellulaires (*porphyridium*). Les espèces pluricellulaires les plus connues appartiennent aux genres *Goniotrichum* (thalle filamenteux) et *porphyra*, une algue parenchymateuse dont le thalle lamellaire rouge-brun n'est constitué que d'une seule couche de cellules [1].

→ Les Florideophycideae, ou Florideophyceae, sont les formes les plus évoluées. La plupart d'entre elles sont pluricellulaires et macroscopiques. Les algues rouges sont généralement de taille moyenne et il n'en n'existe pas de très grandes, voir de géantes, comme c'est le cas pour les algues brunes. Les tailles s'échelonnent de quelques millimètres pour les plus petites, souvent épiphytes, à une trentaine de centimètres pour les plus grandes, quelques espèces peuvent atteindre le mètre. Ceci pourrait justifier qu'on les rencontre dans tous les milieux, des baies calmes aux roches les plus exposées [1].

Les Rhodophycées se répartissent en deux classes, celle des Floridophycideae comprenant 10 ordres et 23 familles, et celle des Bangiophycideae subdivisée en 3 ordres et 6 familles (tableau 1) [10].

Tableau 1 : Classification des Rhodophytes d'après Van Den Hoek et al.1996 [10]

Ordres	Principales familles
Classe des Bangiophycideae	
Porphyridiales	Porphyridiaceae Goniotrichaceae
Compsopogonales	Compsopogonaceae Erythropepltidaceae Boldiaceae
Bangiales	Bangiaceae

Classe des Floridophycideae	
Batrachospermales	Batrachospermaceae
Corallinales	Coralineaceae
Palmariales	Palmariaceae
Gigartinales	Solieriaceae Gigartinaceae Phyllophoraceae Gracilareaceae
Nemadiales	Acrochaetiaceae Nemaliaceae Helminthocladiaceae Chaetangiaceae
Rhodymeniales	Champiaceae
Gelidiales	Gelidiaceae
Ceramiales	Ceramiaceae Dasyaceae Delesseriaceae Rhodomelaceae
Bonnemaisoniales	Bonnemaisoniaceae
Cryptonemiales	Cryptonemiaceae Kallymeniaceae Choreocolaceae

I. 1.3 Importance et utilisation des algues rouges

Du fait de leur abondance en nombre dans le domaine aquatique qui recouvre les 2/3 de la planète, et de leurs propriétés, les algues sont essentielles pour l'équilibre du globe [11]. Ce sont des éléments d'importance capitale pour les écosystèmes aquatiques, elles produisent de l'oxygène et servent de nourriture pour les animaux aquatiques [12].

A l'échelle mondiale, les algues sont exploitées majoritairement dans le secteur de l'agroalimentaire (70%), soit directement pour l'alimentation humaine, soit sous forme de complément alimentaire, soit sous forme d'additifs.

Les algues rouges ont été consommées par les êtres humains pour au moins 2800 années, elles sont utilisées dans les domaines de poly électrolytes, les produits pharmaceutiques, la nutrition humaine, l'activité antimicrobienne, et dans la production de polysaccharides [13].

Cependant, les algues rouges sont surtout connues pour leur importance économique en tant que source d'agars, de carraghénanes et de polysaccharides sulfatés utilisés en agro-alimentaire et en biochimie [14].

Ces polysaccharides sont d'ailleurs principalement exploités pour leurs propriétés physiques comme agent gélifiant, épaississant, stabilisant, ou encore comme rétenteur d'eau. L'agar sert par exemple de base pour des milieux de culture en microbiologie, entre dans la composition des pâtes à empreintes dentaires en dentisterie, possède également des propriétés laxatives et est couramment employé en tant qu'additif alimentaire (E406). Les carraghénanes, notamment ceux extraits de certaines Gigartinales (*Chondrus crispus*, *Gigarina stellata*), sont employés comme épaississants (E 407) en pâtisserie, dans les pâtes dentifrices, ou encore dans l'industrie pharmaceutique comme pansement gastrique dans le traitement des ulcères. Les carraghénanes présentent également des activités antivirales, notamment contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou celui de l'Herpès. Certains carraghénanes réduiraient également le pouvoir infectant du virus de l'hépatite A grâce à la présence de leurs esters sulfatés [14]. On trouve actuellement environ 40 médicaments avec les extraits d'algues. Par exemple, le CEVA (Centre d'Étude et de Valorisation des Algues) travaille sur les propriétés antioxydantes des extraits d'algues qui auraient des effets sur la prévention et le développement de maladies telles que le cancer du colon et l'athérosclérose, aussi que sur d'autres molécules intéressantes pour le traitement de pathologies cardio-vasculaires [15].

I. 2 Les algues rouges du genre *Laurencia*

I. 2.1 Systématique et taxonomie

Les algues rouges du genre *Laurencia* sont probablement celles qui ont été les plus étudiées parmi les organismes marins [16]. Le genre *Laurencia* appartient à la famille des Rhodomelaceae et à l'ordre des Ceramiales, ce dernier comporte 4 familles [1]. Il comprend environ 419 espèces dans le monde [17].

Il faut souligner que 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 [18].

Le genre *Laurencia* pourrait se subdiviser en quatre groupes en fonction de la nature des métabolites secondaires majoritaires qu'il contient. Le premier groupe ne contient que des terpènes halogénés, le second contient uniquement des acétogénines, le plus souvent halogénées, le troisième ne comprend aucune des deux catégories précédentes et le quatrième groupe rassemble les espèces qui contiennent à la fois des terpènes et des acétogénines halogénées [1].

I. 2.2 Distribution phytogéographique mondiale

Les algues rouges du genre *Laurencia* (ordre des Ceramiales, famille des Rhodomelacés), sont principalement réparties le long des côtes tropicales, subtropicales et tempérées [15] ainsi que le long de la côte dans les zones subtidales intertidales et peu profondes [17]. Plusieurs raisons justifient l'intérêt des chimistes pour le genre *Laurencia*. En effet, les algues du genre *Laurencia* peuvent être trouvées sur tous les rivages du monde, et sous toutes les latitudes, elles sont faciles à reconnaître et donc à récolter. Cependant, les identifications au niveau de l'espèce nécessitent le concours de spécialistes car il existe plusieurs cas de synonymie [1].

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

L'ordre des *céramiales* est de loin le plus riche en dérivés halogénés avec plus de 500 molécules différentes caractérisées par une centaine d'espèces, la plupart appartenant à la famille des *Rhodomelaceae* qui comporte le genre *Laurencia*.

Il existe trois groupes distincts de dérivés halogénés : les terpènes, les éthers cycliques, les acétogénines, et les dérivés aromatiques et hétéroaromatiques. Chacun de ces groupes correspond à une voie de biosynthèse et, dans une même espèce, il est rare d'observer des métabolites provenant de voies métaboliques différentes. Ceci est particulièrement net pour le genre *Laurencia* [1].

Les algues rouges du genre *Laurencia* représentent l'un des organismes marins les plus étudiés de l'environnement, avec plus de 419 espèces collectées dans toutes les mers du monde et plus de 700 composés halogénés ont déjà été rapportés pour le genre *Laurencia* [17]. Les métabolites secondaires du genre *Laurencia*, qui ont fait l'objet d'étude depuis les années 1960, sont principalement composés de **sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes**, et des **C15-acétogénines**, ce sont les caractéristiques des espèces du genre *Laurencia* [19].

I. 2.3.1 Composition en terpènes

Plus d'une vingtaine de squelettes carbonés sont représentés dans les sesquiterpènes du genre *Laurencia*. La plupart d'entre eux sont halogénés et, en plus des squelettes traditionnels (**bisabolane**, **chamigrane**), il en existe plusieurs autres qui n'ont pas encore été rencontrés dans les végétaux terrestres [1].

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 [1].

Le genre *Laurencia* renferme également d'autres classes de terpènes, il s'agit de diterpènes, triterpènes et d'acétogénines [18].

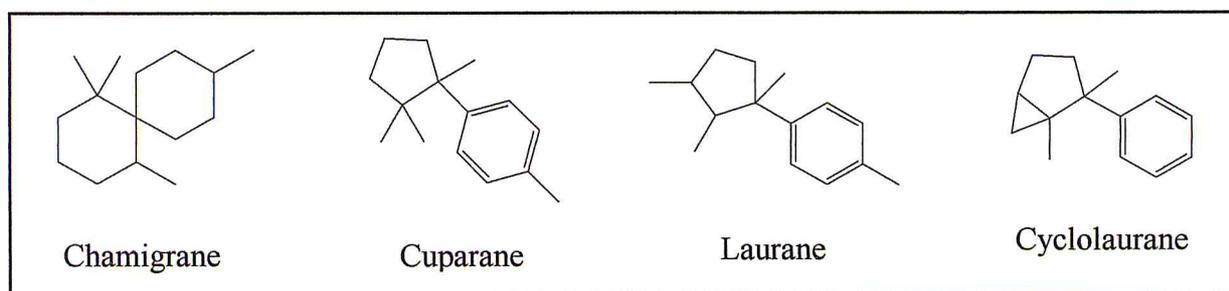


Planche 1 : Squelettes sesquiterpéniques fréquents dans le genre *Laurencia*

I. 2.3.1.1 Exemples de structures apparentées au squelette Laurane

Nous donnons à titre d'illustration non exhaustive des exemples de structures apparentés au squelette Laurane des espèces du genre *Laurencia*. Nous citons dans ce cadre les sesquiterpènes de type **Laurane** isolés de l'algue *Laurencia okumurai*, il s'agit de : 3 α -hydroxyaplysin (**2**), et deux sesquiterpènes réarrangés, laurokamurenes A (**3**) et B (**4**), conjointement avec trois composés connus, 3R-hydroxydebromoaplysin (**1**), debromoaplysin (**5**), et laurinterol (**6**). Leurs structures, y compris la stéréochimie relative, ont été déterminées sur la base de l'interprétation détaillée des spectres RMN 2D et la comparaison avec des composés apparentés connus [20]. Les structures isolées sont représentés sur la planche 2.

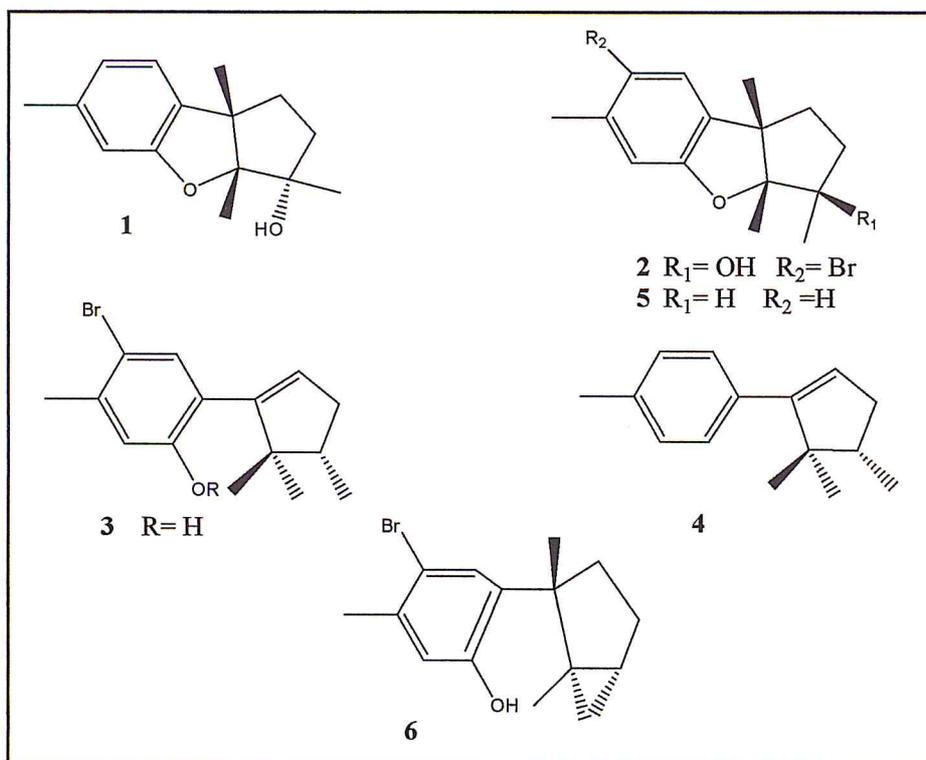


Planche 2 : Exemples de sesquiterpènes de type Laurane isolés de *Laurencia*

I. 2.3.1.2 Autres sesquiterpènes isolés du genre *Laurencia*

Nous présentons d'autres exemples de sesquiterpènes isolés de l'algue rouge *laurencia nidifica*, il s'agit du : Nidificène (1), Nidifidiénol (2), Laurequinone (3), Laurebiphényle (4) [1].

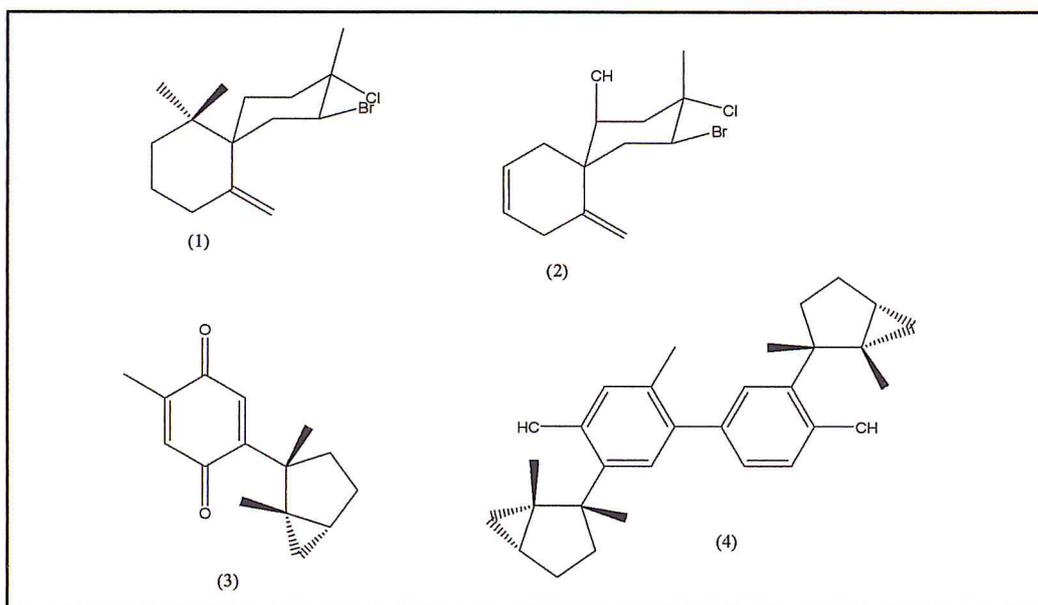


Planche 3 : Exemples de sesquiterpènes isolés à partir de *Laurencia*

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

Nous regroupons sur la planche 4 des exemples de diterpènes et triterpènes isolés de l'algue rouge *Laurencia saitoi*, il s'agit de sept diterpènes parguerane : 15-bromo-2,7,19-triacetoxyparguer-9 (11)-en-16-ol (**1**), 15-bromo-2,7,16,19-tetraacetoxyparguer-9 (11)-ène (**2**), 15-bromo-2,19-diacetoxyparguer-9 (11)-én-7, 16 - diol (**3**), 15-bromo-2-,16,19-triacetoxyparguer-9 (11)-én-7-ol (**4**), 15-bromo-2,16-diacetoxyparguer-9 (11)-én-7-ol (**5**), 15-bromoparguer-9 (11)-en-16-ol (**6**), 15-bromoparguer-7-én-16-ol (**7**), et deux triterpènes polyéther: thyrseferol (**8**) et thyrseferyl 23-acétate (**9**), et un C₁₅-acétogénine : neolaurallene (**10**). Leurs structures ont été établies par analyse RMN spectroscopique détaillée et la comparaison avec les données de la littérature [21].

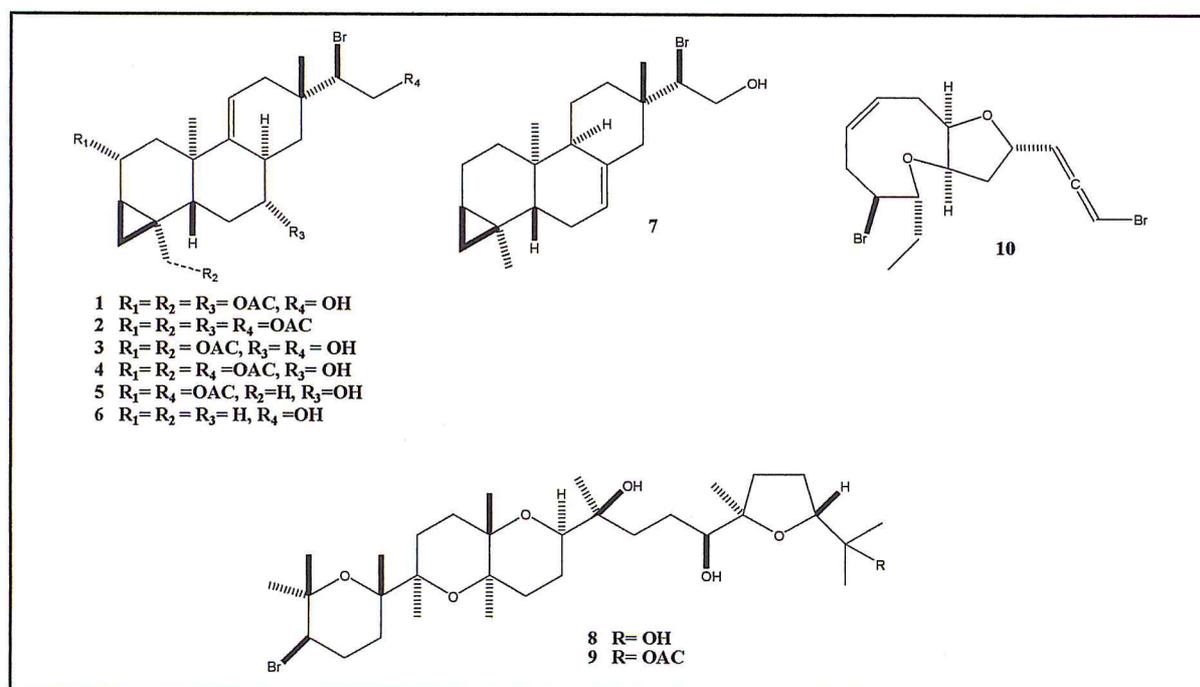


Planche 4 : Diterpènes et triterpènes isolés à partir de l'algue rouge *Laurencia saitoi*

I.2.3.1.4 Exemple de sesquiterpènes isolées de genre *Laurencia*

Nous regroupons sur la planche 5 des exemples de sesquiterpènes isolés de l'algue rouge *Laurencia Intricate* récolté aux Almadies près de DaKar, il s'agit de cinq composés : L'almadioxyde (**1**), l'époxychamigrène (**2**), le chamigrène hydroxylé (**3**) et les sesquiterpènes à squelette Laurane (**4**) et (**5**) : l'allolaurinterol (**4**) et le filiformin (**5**). Leurs structures ont été établies par analyse RMN spectroscopique détaillée et la comparaison avec les données de la littérature [22].

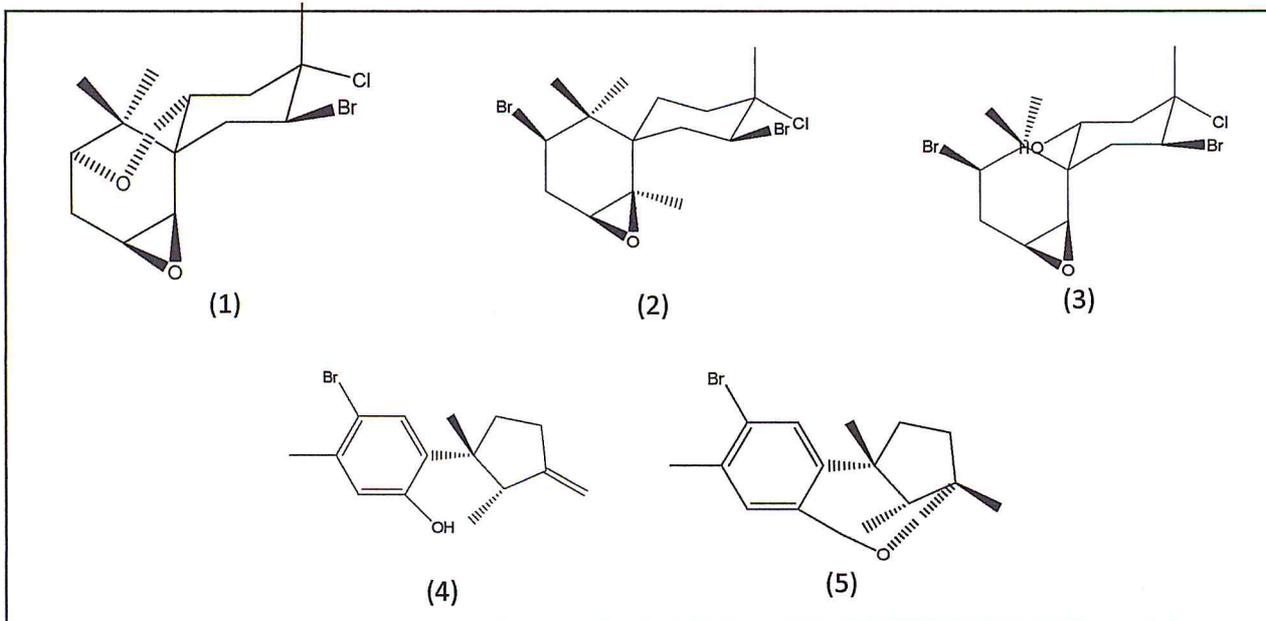


Planche 5 : Métabolites isolés de l'algue rouge *Laurencia Intricate*

I. 3 Études systématique et taxonomique de l'espèce *Laurencia Obtusa*

I. 3.1 Position systématique

La position systématique de l'espèce *Laurencia obtusa* est donnée dans le tableau 2 [23].

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

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

I. 3.2 Description d'espèce *Laurencia Obtusa*

Laurencia Obtusa est une algue rouge de couleur jaune, brun vert à rouge foncé [24], formant des touffes hautes de 3 à 10 cm, issues d'un petit disque basal. Le thalle est cylindrique de 1 à 8 cm de hauteur, à extrémités obtuses, formé d'axes dressés et ramifiés irrégulièrement. Les rameaux supérieurs sont courts et augmentent en longueur vers la base. Les ramules sont isolés ou sub-opposés. Lorsque le thalle est vu à plat, les cellules corticales ont une forme polygonale, et renferment des inclusions vacuolaires réfringentes ("corps en cerise") qui ne sont pas bien visibles que sur des échantillons frais [25].

C'est une espèce annuelle qui pousse en pleine lumière ou en lumière atténuée, sur les rochers en milieu battu et dans les cuvettes de l'étage infralittoral en Méditerranée et en Atlantique. C'est une hémiphanérophycée qui repousse au printemps à partir de sa base [24].

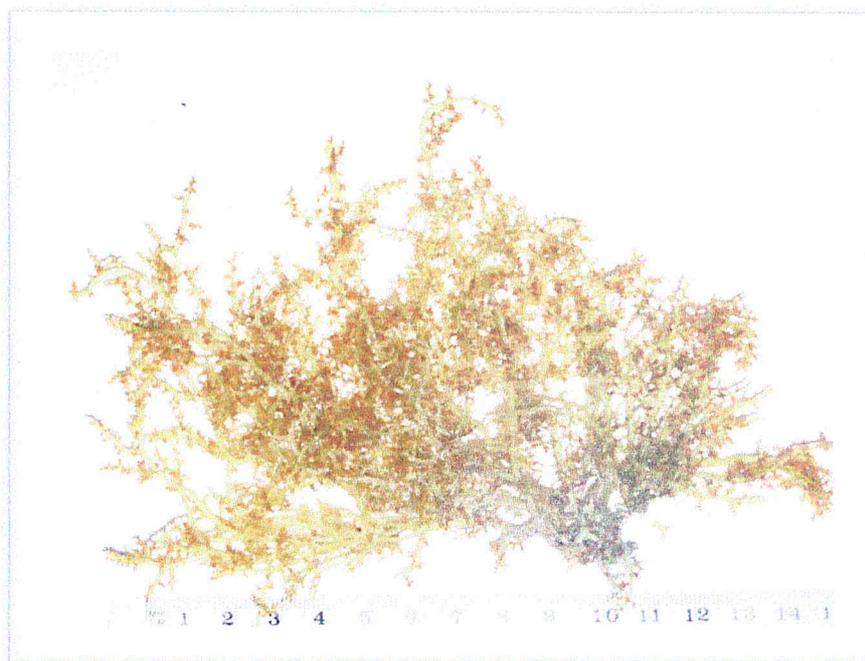


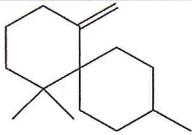
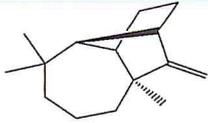
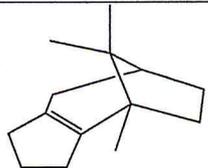
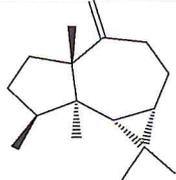
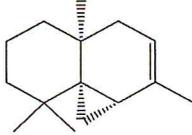
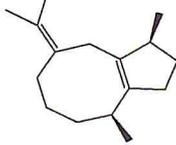
Figure 1 : *Laurencia obtusa*

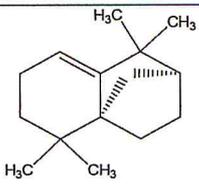
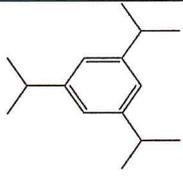
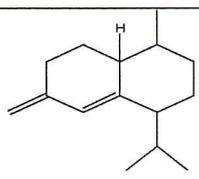
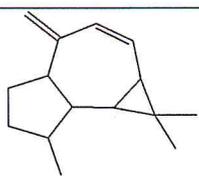
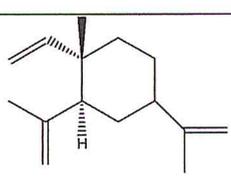
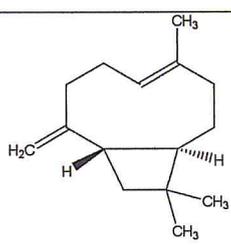
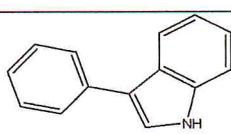
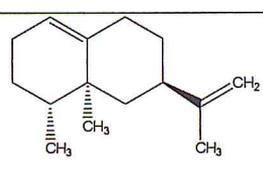
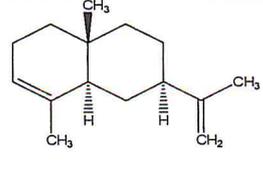
I. 3.3 Etude chimique de *Laurencia Obtusa*

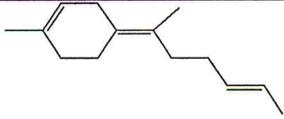
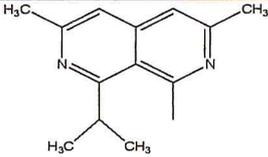
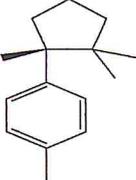
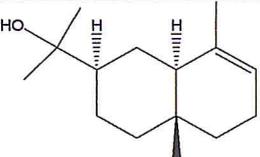
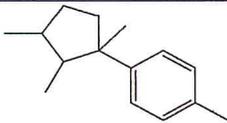
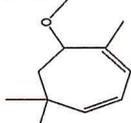
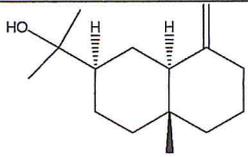
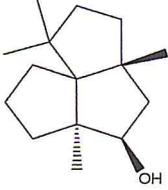
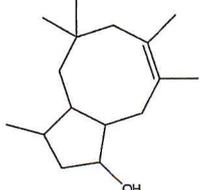
Les algues rouges du genre *Laurencia* comportent une large variété de métabolites secondaires, structurellement inhabituels, et semblent être une source inépuisable de nouveaux constituants chimiques [26]. *Laurencia Obtusa* est l'espèce la plus répandue et la plus connue comme une source de métabolites halogénés [27]. Les grandes majorités d'entre eux sont des diterpènes, des sesquiterpènes halogénés, et des C₁₅ non terpenoïdes contenant des cycles d'éther de différentes tailles avec acétylène terminal [28].

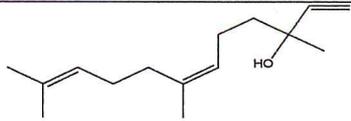
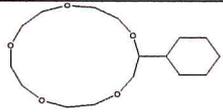
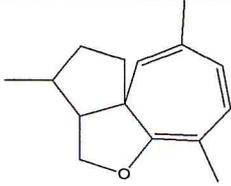
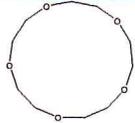
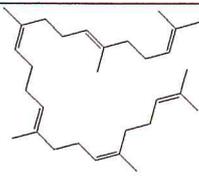
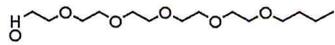
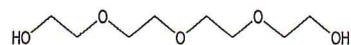
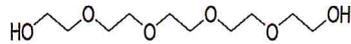
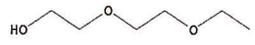
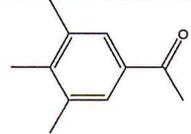
Différents travaux de recherche ont été effectués sur la composition chimique de l'huile essentielle de *Laurencia Obtusa*. L'analyse chimique de l'huile essentielle de *Laurencia obtusa* récolté en Turquie et obtenue par hydrodistillation a montré la présence de trente cinq composés représentant 77,74% de la composition chimique total de l'huile essentielle, les principaux composé sont : nerolidol 4,11% , valencene 2,90% , dactylool 1,10% , β .eudesmol 1,23%, β .elemene 0,66% et β , chamigrene 0,11% [29].

Tableau 3 : Compositions chimique de l'huile essentielle de *Laurencia obtusa*

T _r (min)	Composé	Pourcentage (%)	Structure
10,70	β -Chamigrene	0,11	
10,95	Longifolène	-	
11,08	β ,Patchoulène	-	
11,68	Aromadendrène	-	
12,06	Thujopsène	-	
12,67	α -guaiène	-	

13,23	Isolongifolène	-	
13,38	Benzène, 1,3,5-tri(méthyléthyl)	0,59	
13,95	Epi-bicyclosesquiphellandrène	0,23	
14,12	Dehydroaromadendrène	-	
14,18	β -élémente	0,66	
14,44	Trans-caryophyllène	-	
16,39	3-Phénylindol	0,24	
16,55	Valencène	2,90	
16,68	α -selinène	1,63	

17,07	Trans-gamma-bisabolène	1,56	
18,32	1,3,6-triméthyl-8-éthyl-2,7-naphthyridine	1,28	
18,48	Cuparène	2,21	
18,60	α -eudesmol	-	
18,65	Laurane	2,23	
18,95	7-méthoxy-1,5,5-triméthyl cyclohepta-1,3-diène	2,93	
19,62	β -eudesmol	1,23	
20,23	2,2,4,8-tetraméthyltricyclo undécan-7-ol	1,22	
20,84	Dactyolol	1,10	

21,49	Nérolidol	4,11	
21,95	Cyclohexyl-15-couronne-5	-	
22,33	5,10,13-Triméthyl-2-oxatricyclo tridécane-9,11,13 triene	7,21	
23,07	15-couronne-5	0,81	
23,45	10-deméthylsqualène	-	
24,32	Éther 18-couronne-6	4,16	
25,03	3,6,9,12,15-Pentaoxanonadécane-1-ol	-	
25,07	Tétra-éthylène glycol	1,89	
25,74	Penta-éthylène glycol	0,84	
27,46	Éthanol,2-(2 éthoxy-éthoxy)	1,18	
28,13	1-(3,4,5-triméthylphényl)thanone	3,61	

I. 3.4 Activité biologique de l'huile essentielle de *Laurencia Obtusa*

Les organismes marins sont des sources potentielles de métabolites secondaires bioactifs avec un potentiel pour une utilisation dans le développement de nouveaux agents pharmaceutiques et beaucoup de ces substances possèdent des activités biologiques intéressantes. Ils ont été signalés à produire une grande variété de métabolites secondaires bioactifs à savoir les alcaloïdes, les peptides cycliques, les polysaccharides, phlorotannins, les diterpénoïdes, les stérols, les quinones, les lipides et les glycérols [30].

I. 3.4.1 Activité antimicrobienne des huiles essentielle de *Laurencia Obtusa*

Laurencia Obtusa est une algue rouge connue comme une source riche en métabolites secondaires possédant une large variété d'activités biologiques, tels que l'activité antimicrobienne, antiparasitaire [31] et une activité cytotoxique [32]. Plus de 300 composés bioactifs, principalement des sesquiterpènes, C₁₅-acétogénines et quelques di- et tri-terpènes ont été identifiés à partir de 40 espèces d'algues rouges du genre *Laurencia* recueilli dans diverses parties du monde [33].

Certains métabolites halogénés ont montrés des activités antibactériennes contre les bactéries terrestres [33].

Des travaux de recherche ont révélé que les sesquiterpènes présents dans *Laurencia Obtusa* exercent un effet antitumoral contre des lignées de cellules CHO (ovaires de biopsie, de hamster chinois) et les lignées cellulaires tumorales humaines : K562 (une lignée de cellules de leucémie myéloïde chronique), MCF7 (dérivé à partir d'un adénocarcinome mammaire), PC3 (dérivée d'un adénocarcinome de la prostate) [34].

Les études effectuées sur l'huile essentielle de *Laurencia Obtusa* [29], ont montré une forte activité antibactérienne contre les bactéries *Staphylococcus aureus* Gram⁺, *Enterococcus faecalis* Gram⁺, *Staphylococcus epidermidis* Gram⁺, et *Enterobacter cloacae* Gram⁻ et antifongique contre la levure *Candida albicans*. L'huile essentielle de *laurencia obtusa* ne présente aucune activité contre *Escherichia coli* Gram⁻, *Proteus vulgaris* Gram⁻ et *Pseudomonas aeruginosa* Gram⁻. Par conséquent, *Laurencia Obtusa* présente un très fort effet inhibiteur contre les bactéries Gram positif et les levures et ne présente aucun effet inhibiteur contre les bactéries à Gram négatif [29].

PARTIE II

Étude expérimentale

II.1 Introduction

Cette partie est consacrée à l'étude chimique et aux activités microbiologiques de la fraction volatile de *Laurencia Obtusa*. Elle est scindée en quatre sous-parties : préparation de l'extrait brut de *Laurencia Obtusa*, extraction de la fraction volatile à partir de l'extrait, détermination de sa composition chimique par CG/SM, et enfin l'étude de son activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique).

La préparation de l'extrait et l'extraction de la fraction volatile ont été réalisées au laboratoire de chimie des substances naturelles (département de Chimie de l'Université Saad Dahlab de Blida), alors que l'analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a été effectuée au sein du laboratoire d'accueil en France.

Les tests d'activité antimicrobienne ont été réalisés au sein du laboratoire de microbiologie de la filiale Biotic, unité de Gué de Constantine, de l'entreprise Saidal.

II. 2 Récolte et traitement du matériel végétal

L'algue *Laurencia Obtusa* a été récoltée sur les côtes de la mer rouge au niveau de la ville de Jeddah (Arabie Saoudite). Un spécimen de voucher (JAD 03060) est déposé au niveau du département de chimie marine de l'Université du Roi Abdelaziz – Jeddah – Arabie saoudite. L'algue a été triée manuellement pour éliminer les épiphytes et autres organismes susceptibles de contaminer la nature chimique des extraits, puis elle est séchée à l'ombre, dans un lieu sec et aéré.

II. 3 Préparation de l'extrait

L'extrait a été préparé par macération avec le mélange de solvant $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1/1 : v/v) dans un système statique à une température ambiante pendant une semaine, suivie d'une filtration et de l'évaporation du solvant. Le résidu sec obtenu est traité par la suite avec l'éther diéthylique et l'eau distillée afin d'obtenir un extrait brut exempt des traces d'eau et des produits aqueux. Le protocole général d'extraction utilisé est présenté par la figure 2.

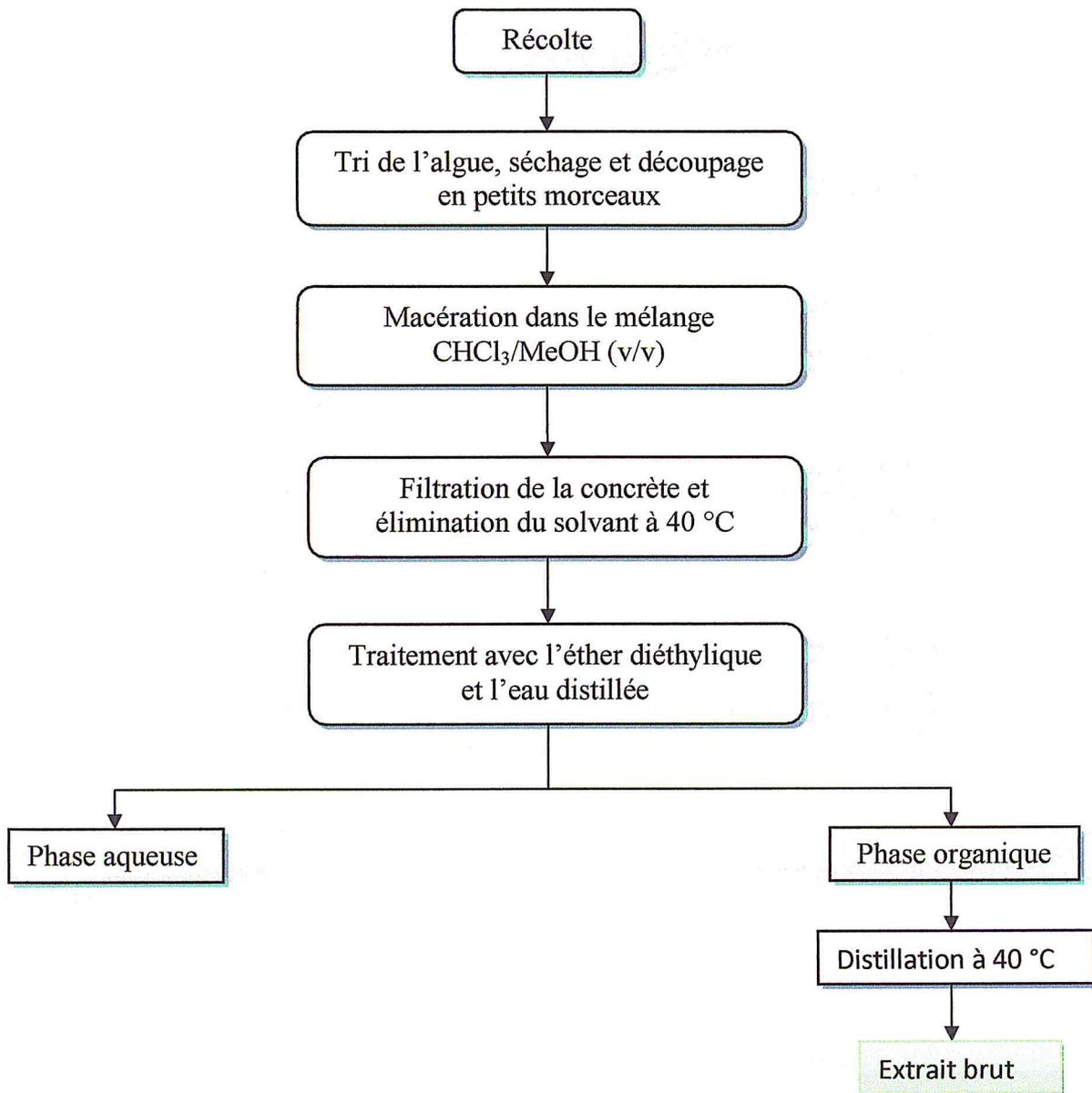


Figure 2 : Préparation de l'extrait brut à partir de la matière végétale

Le rendement d'extraction est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = (M_{\text{extrait}} / M_{\text{mv}}) * 100$$

R (%) : Rendement en extrait (%).

M_{extrait} : Masse de l'extrait en gramme.

M_{mv} : Masse de la matière végétale en gramme.

Le rendement d'extraction de *Laurencia Obtusa* est de 1,44%. Les caractéristiques organoleptiques de l'extrait obtenu, sont représentées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Propriétés organoleptiques de l'extrait de *Laurencia Obtusa*

Caractères organoleptiques		
Aspect	Couleur	odeur
Pâteux	verdâtre	caractéristique

II. 4 Extraction de la fraction volatile à partir d'un extrait du solvant

II.4.1 Description du dispositif d'extraction

L'extraction consiste à faire subir une masse d'extrait à un entraînement à la vapeur d'eau dans un montage de Dean-Starck modifié. Ce dernier est placé dans un ballon de 1L rempli à 2/3 d'eau.

Le procédé d'entraînement à la vapeur d'eau consiste à mettre en œuvre un flux de vapeur ascendant. En effet, la vapeur d'eau issue de l'ébullition de l'eau dans le ballon, traverse l'extrait brut placé dans le montage de Dean-Starck, entraînant ainsi la fraction volatile. Les vapeurs chargées en composés volatiles sont condensées dans le réfrigérant et le mélange eau-fraction volatile (hydrolat) est récupéré dans un bécher. L'hydrolat ainsi obtenu est soumis à une extraction liquide-liquide avec de l'eau distillée afin de récupérer la fraction volatile. Cette dernière est séchée sur du sulfate de sodium et stockée à l'obscurité à 4°C pour des analyses ultérieures.

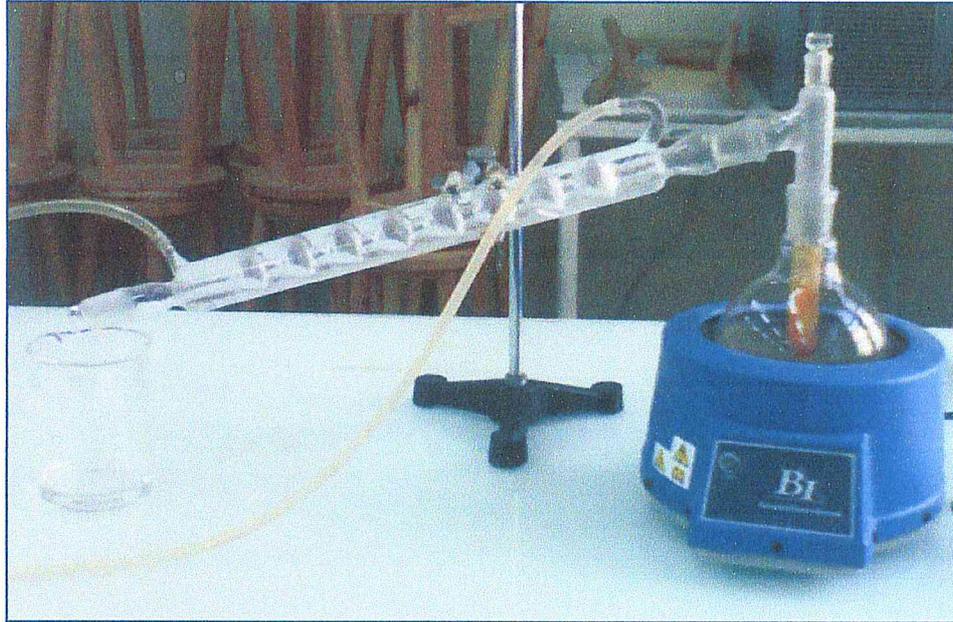


Figure 3 : Entraînement à la vapeur d'eau de l'extrait brut à l'aide du montage de Dean-Starck

II. 4.2 Extraction liquide-liquide de la fraction volatile

L'hydrolat ainsi obtenue de l'étape d'entraînement à la vapeur d'eau est soumise à une extraction liquide-liquide avec l'éther diéthylique afin de récupérer la fraction volatile. En effet, deux phases sont obtenues: une phase organique contenant la fraction volatile et une phase aqueuse. Cette opération est répétée deux fois afin d'épuiser complètement la fraction volatile. La phase organique obtenue est filtrée puis séchée sur du sulfate de magnésium ($MgSO_4$) pour éliminer toute trace d'eau (figure 4).

La fraction volatile ainsi obtenue est mise dans un flacon propre hermétiquement fermé et conservée à 4°C pour des analyses ultérieures. Le flacon doit être pesé avant d'introduire la fraction volatile afin de calculer le rendement en fraction volatile.

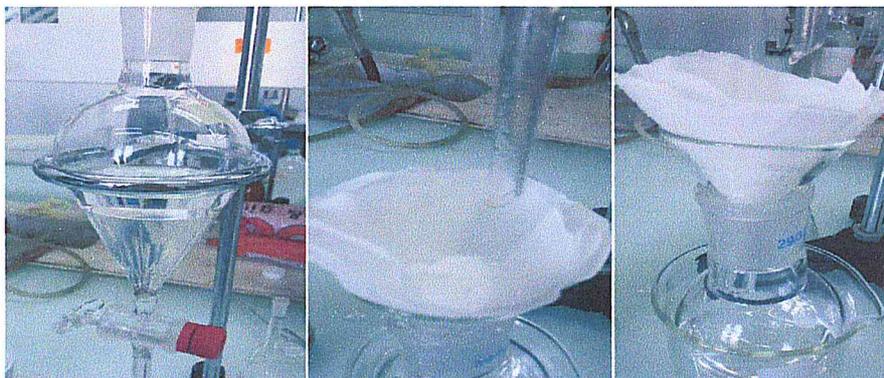


Figure 4 : Extraction liquide-liquide de la fraction volatile de *Laurencia Obtusa*

II. 4.3 Rendement de la fraction volatile

Le rendement de la fraction volatile est estimé par le rapport des masses respectives de la fraction volatile et de l'extrait utilisé. Il est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = (M_{FV} / M_{EX}) * 100$$

M_{FV} : La masse de la fraction volatile en gramme.

M_{EX} : la masse d'extrait en gramme.

$R(\%)$: Le rendement en fraction volatile en pourcentage.

II. 4.4 Caractéristiques organoleptiques et rendement de la fraction volatile de *Laurencia Obtusa*

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

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

Les propriétés organoleptiques de la fraction volatile sont regroupées dans le tableau 5.

Tableau 5: Propriétés organoleptiques de la fraction volatile de *Laurencia Obtusa*

Caractères organoleptiques		
Aspect	Couleur	odeur
Liquide visqueux	jaunâtre	Forte odeur Caractéristique

Nous avons réalisé une série d'extraction de la fraction volatile de *Laurencia Obtusa* afin d'augmenter le rendement d'extraction et d'obtenir une masse suffisante pour effectuer les analyses chimiques et microbiologiques. Le rendement exprimé en pourcentage et estimé par la moyenne de quatre expériences est de 7.80%.

II. 5 Analyse qualitative de la fraction volatile par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

II. 5.1 Description de l'appareil

L'analyse qualitative de la fraction volatile extraite par entrainement à la vapeur d'eau de l'extrait a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse « CG-SM » (figure 5). L'identification des différents composés est effectuée en se basant sur les banques de données spectrales Wiley 7n et NBS 75k.l. (comprenant, respectivement, des spectres de masse de 250000 et 75000 molécules), avec un taux de similitude supérieure ou égal à 90%.



Figure 5 : Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectroscopie de masse

II. 5.2 Conditions opératoires

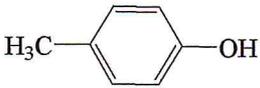
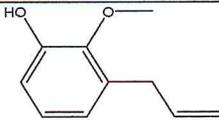
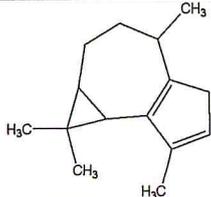
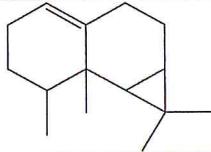
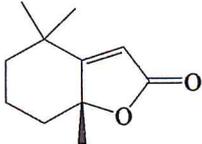
L'analyse est effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse HEWLETT-PACKARD-HP-6890 couplé à un spectromètre de masse HP 5972, dans les conditions suivantes :

- 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%.

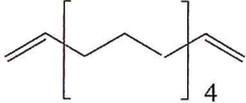
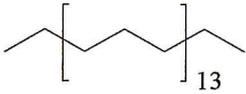
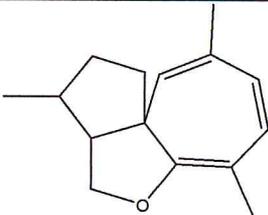
II. 5.3 Résultats et discussion

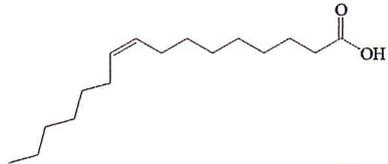
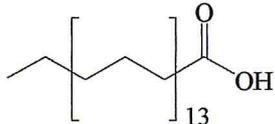
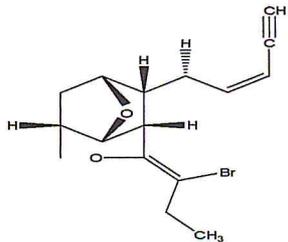
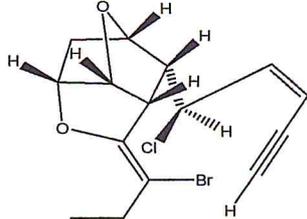
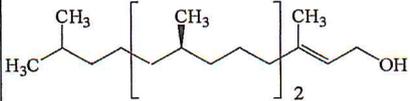
L'analyse par CG/SM dans les conditions citées auparavant (II.5.2) a permis l'identification des composés regroupés dans le tableau 6. Les différentes classes de composés identifiés et le profil chromatographique de la fraction volatile sont présentées par les figures 6 et 7.

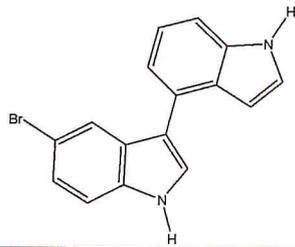
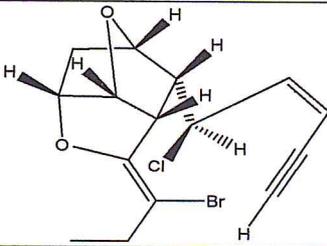
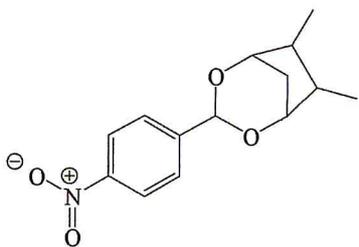
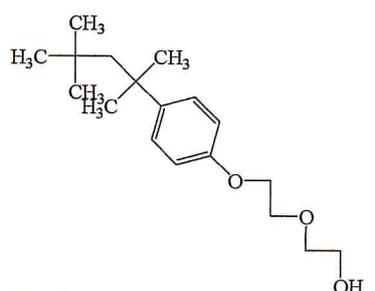
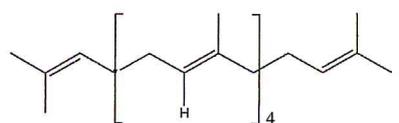
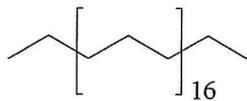
**Tableau 6 : Composition chimique de la fraction volatile de l'algue rouge
*Laurencia Obtusa***

Ordre d'élution	Tr (min)	Nom du composé	Formule moléculaire	Structure
01	2.72	p-Crésol	C ₇ H ₈ O	
02	11.06	Phenol, 2-methoxy-3-(2-propenyl)	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	
03	13.59	NI1	/	/
04	14.04	(-)-Aristolene	C ₁₅ H ₂₄	
05	14.29	(5),3-aromadenedradiene)	C ₁₅ H ₂₂	
06	14.53	(+)-Calarene)	C ₁₅ H ₂₄	
07	16.29	NI2	/	/
08	16.45	Dihydroactinidiolide	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	
09	16.77	NI3	/	/
10	17.34	NI4	/	/

11	18.21	Pentadécane	$C_{15}H_{32}$	
12	18.55	(-)- α -Gurjunene	$C_{15}H_{24}$	
13	18.98	2-Allyl-4-méthylphénol	$C_{10}H_{12}O$	
14	20.18	Cadina-1(10),6,8-triene	$C_{15}H_{22}$	
15	20.45	(beta.-copaen-4.alpha.-ol)	$C_{15}H_{24}O$	
16	21.11	NI5	/	/
17	21.86	NI6	/	/
18	22.20	NI7	/	/
19	22.33	NI8	/	/
20	22.90	NI9	/	/
21	23.49	NI10	/	/
22	23.66	NI11	/	/
23	24.25	NI12	/	/

24	24.45	NI13	/	/
25	24.89	NI14	/	/
26	25.14	1,12-Tridecadiène	$C_{13}H_{24}$	
27	25.59	Heptadécane	$C_{17}H_{36}$	
28	26.22	NI15	/	/
29	26.56	(5,10,13-trimethyl-2-oxatricyclo[6.5.0.0(4,8)]tridecan-9,11,13-triene)	$C_{15}H_{20}O$	
30	26.66	NI16	/	/
31	27.17	NI17	/	/
32	27.39	NI18	/	/
33	27.86	NI19	/	/
34	28.13	NI20	/	/
35	28.39	NI21	/	/
36	28.64	NI22	/	/
37	28.81	NI23	/	/
38	29.05	NI24	/	/
39	29.27	NI25	/	/
40	29.47	NI26	/	/
41	30.10	NI27	/	/
42	30.46	NI28	/	/
43	30.75	NI29	/	/
44	30.97	NI30	/	/

45	31.21	NI31	/	/
46	31.57	NI32	/	/
47	32.98	Acide palmitoléique	$C_{16}H_{30}O_2$	
48	33.75	NI33	/	/
49	33.93	Acide palmitique	$C_{16}H_{32}O_2$	
50	34.04	NI34	/	/
51	34.58	NI35	/	/
52	35.13	NI36	/	/
53	35.86	NI37	/	/
54	36.14	NI38	/	/
55	36.55	NI39	/	/
56	37.45	(Cis-Manéonène C)	$C_{15}H_{16}BrClO_2$	
57	37.52	NI40	/	/
58	37.80	(Cis-Maneonene-A)	$C_{15}H_{16}BrClO_2$	
59	37.94	Phytol	$C_{20}H_{40}O$	

60	38.73	NI41	/	/
61	39.09	NI42	/	/
62	39.55	(5-Bromo-1-methyl-3,4'-bi-1H-indole)	$C_{17}H_{13}BrN_2$	
63	39.80	Cis-Maneonene-A	$C_{15}H_{16}BrClO_2$	
64	42.12	6,7-dimethyl-3-(4-nitrophenyl)-2,4 Dioxabicyclo[3.2.1]octane	$C_{14}H_{17}NO_4$	
65	45.36	2-[2-[2-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenoxy]ethoxy]ethoxy]-Ethanol	$C_{20}H_{34}O_4$	
66	55.85	10-Demethylsqualene	$C_{29}H_{48}$	
67	64.27	Eicosane	$C_{20}H_{42}$	

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 (7.13), 59 (5.26), 69 (3.07), 83 (2.64), 99 (7.72), 111 (8.69), 127(100), 139 (6.10), 167 (4.03).

NI2 :41 (6.29), 77 (7.96), 91 (10.97), 105 (10.01), 128 (5.63), 143 (10.53), 157 (12.00), 185 (100), 200 (5.17).

NI3 : 41 (9.47), 55 (4.59), 67 (2.35), 81 (2.55), 91 (2.95), 105 (2.53), 113 (8.15), 125 (3.16), 141 (100), 161 (2.59), 181 (2.41), 189 (2.24).

NI4 : 41(64.45), 55 (31.32), 67 (51.02), 79 (79.48), 91 (100), 103 (25.57), 109 (53.05), 117 (49.21), 132 (47.32), 145 (25.27), 159 (14.73), 187 (27.29), 202 (19.58).

NI5 : 41 (12.19), 55 (5.20), 67 (46.23), 81 (13.17), 91 (85.06), 105 (5.90), 123 (100), 131 (35.79), 145 (3.68), 187 (11.09), 202 (8.72), 220 (19.55).

NI6: 43 (100), 57 (15.43), 69 (12.42), 77 (6.94), 91 (17.99), 105 (12.76) , 121 (18.53), 135 (8.33), 157 (15.75), 185 (7.48), 200 (15.67).

NI7 : 43 (28.88), 55 (16.08) , 67 (16.08), 81 (15.87), 91 (22.76), 109 (33.83) ,119 (23.08), 124 (100), 131 (11.76), 145 (14.41), 159 (20.84), 177 (10.99), 187 (9.56), 202 (8.06), 220 (5.99).

NI8 :43 (92.54), 55 (19.07), 67 (13.02), 79 (21.18), 91 (38.40), 105 (37.06), 119 (22.22), 131(14.64), 145 (17.10), 161 (21.36), 177 (11.28) , 189 (19.30), 205 (100), 220 (23.89).

NI9 : 41 (70.23), 55 (23.16) , 69 (61.77), 81(23.24), 91(31.79), 109 (100), 119 (22.77), 133 (17.74), 145 (10.57), 159 (86.74), 187 (9.37), 202 (10.85).

NI10 : 43 (92.71), 55 (49.81), 67 (40.80), 77 (56.89), 91 (100), 105 (58.15), 115 (46.81), 129 (80.15), 145 (56.68), 151 (55.88), 187 (40.03), 199 (43.54), 214 (23.74), 220 (22.93).

NI11 : 41 (57.03), 55 (30.96), 67 (29.81), 79 (36.41), 91 (55.70), 121(31.85), 133 (21.10), 145 (24.91), 159 (17.10), 187 (100), 205 (22.26), 220 (28.94).

NI12 : 41(7.85), 67 (5.41), 77 (8.49), 91 (16.33), 109 (14.73), 129 (13.42), 143 (14.97), 199 (100), 214 (6.27).

NI13 :41(100), 55 (84.84), 69 (76.96), 83 (49.17), 91 (69.38), 105 (31.74), 115 (42.36), 129 (58.17), 143 (46.10), 157 (30.37), 171 (29.96), 185 (46.99), 199 (33.51), 214 (27.63), 238 (3.06).

NI14 : 43 (44.61), 59 (26.94), 81(29.30), 91 (38.19), 97 (36.80), 109 (57.75), 123 (78.73), 179 (100), 205 (27.56), 214 (66.39).

NI15 : 41(5.41), 77 (7.74), 91 (11.71), 109 (11.52), 129 (12.04), 143 (15.45), 171 (10.74), 201 (100), 216 (5.23).

NI16 : 41 (41.99), 55 (26.37), 69 (46.31), 79 (62.55), 91 (79.55), 105 (72.45), 117 (28.94), 131 (100), 148 (22.01), 159 (9.05), 187 (38.60), 201 (12.33), 214 (4.86).

NI17 : 41(27.81), 55 (16.15) , 67 (29.73), 83 (26.49), 91 (46.20), 109 (100), 119 (19.32), 131(45 .57), 187 (69.27), 203 (34.93).

NI18 : 41 (68.34), 55 (45.65), 67 (44.52), 79 (60.38), 91 (100), 105 (76.81), 119 (41.61), 131 (49.26), 148 (26.62), 159 (12.88), 187 (278.77), 201 (18.31), 214 (7.62), 283 (4.32).

NI19 : 41 (21.55), 69 (100), 91 (9.86), 105 (13.76), 119 (50.27), 132 (9.94), 201 (21.65).

NI20 : 41 (31.27), 55 (19.65), 69 (100), 91 (21.09), 105 (19.95), 119 (54.09), 132 (12.75), 157 (10.56), 185 (9.30), 201 (18.36), 229 (19.40).

NI21: 41 (43.57), 55 (27.05) , 69 (39.99), 77 (36.52), 83 (40.72), 91 (72.85), 109 (100), 117 (42.76), 131 (82.44), 143 (22.68), 157 (13.57), 185 (24.07), 218 (18.64).

NI22 : 41 (22.30), 55 (18.27), 77 (22.80), 91 (20.53), 109 (17.49) , 121 (100), 137 (12.02), 173 (9.36), 201 (8.63), 216 (20.58).

NI23 : 41 (45.12), 55 (11.76), 69 (100), 77 (15.55) , 93 (30.13), 105 (31.83), 119 (38.63), 133 (22.23), 147 (22.13), 203 (37.50).

NI24 : 41 (16.69), 57 (12.03), 77 (10.18), 91 (11.62), 107 (14.45) , 121 (17.06), 135 (35.77), 179 (100).

NI25 : 41 (46.47), 55 (13.37), 69 (100), 77 (15.37), 93 (30.98), 105 (31.13), 119 (36.68), 133 (19.87), 147 (21.84), 203 (38.55).

NI26 : 41(26.81), 57 (100), 65 (21.23), 77 (13.04), 91 (47.20), 105 (14.46), 115 (25.65), 133 (31.68), 141 (18.66), 159 (12.88), 201 (7.02), 244 (13.85).

NI27 :45 (100), 57 (99), 69 (70.40), 83 (34.37), 97 (57.42), 111(30.38), 126 (16.38), 148 (12.89), 160 (20.35), 183 (6.39), 243 (10.52).

NI28 : 41 (20.15), 55 (21.91), 69 (11.18), 77 (12.56), 84 (14.29), 91 (13.97), 105 (15.23), 133 (5.67), 148 (100), 161 (14.85), 215 (6.55), 232 (9.76).

NI29 : 41 (70.95), 55 (18.49), 69 (67.97), 82 (100), 93 (35.07), 105 (31.82), 119 (15.87), 133 (59.41), 169 (24.22), 215 (9.16), 251 (2.51).

NI30 : 41(28.24), 55 (12.30), 69 (21.02), 82 (29.12), 91 (16.08), 107 (11.94), 123 (100), 133 (15.76), 169 (7.59), 179 (5.72), 213 (8.47).

NI31 : 43 (73.60), 55 (28.66), 77 (29.23), 91 (48.97), 109 (100), 119 (20.62), 131 (22.59), 149 (12.48), 177 (12.09), 191 (25.43), 219 (51.62), 234 (17.25).

NI32 :43 (100), 55 (40.22), 71 (3.82), 81 (30.96), 91 (6 .16), 104 (34.81), 115 (28.53), 129 (19.17), 139 (18.15), 165 (13.28), 201 (6.16).

NI33 :43 (100), 55 (62), 69 (52.61), 83 (26.17), 97 (33.83), 111 (19.97) , 121 (18.68), 129 (25..07), 157 (10.99), 171 (7.45), 201 (9.16)213 (5.02).

NI34 : 41(80.36), 55 (76.69) , 65 (50.85), 79 (68.45), 91 (100), 105 (87.37), 113 (29.20), 121 (25.58), 131 (13.94), 145 (9.78), 157 (27.42), 201 (5.64), 234 (5.32).

NI35 : 41 (100), 55 (44.82), 69 (48.40), 77 (48.40), 91 (82.36), 103 (48.48), 115 (32.70), 121 (56.32), 131 (34.11), 147 (18.05), 157 (15.60), 165 (22.92), 175 (12.79), 201 (29.66), 245 (18.12), 324 (6.56).

NI36 :41 (100), 55 (44.81), 69 (61.17), 79 (60.26), 91 (64.25), 103 (40.42), 121 (55.64), 131 (24.69), 147 (32.92), 157 (14.43), 165 (28.29), 201 (16.56), 245 (13.89).

NI37 : 41 (91.36), 55 (64.92), 69 (54.90), 77 (67.35), 95 (100), 105 (66.96), 119 (56.82), 145 (25.05), 161 (35.65), 171 (16.04), 187 (34.46), 202 (28.22), 229 (19.47), 245 (12.29).

NI38 : 41 (55.65), 57 (68.76), 69 (31.44), 77 (75.69), 91 (77.23), 105 (68.37), 119(100), 129(54.47), 143(30.47), 157(28.08), 173(25.30), 185(18.92), 199(15.03), 245(11.08).

NI39 :43 (100), 71 (28.29), 81(50.26), 91(39.16), 105 (27.89), 117 (32.29), 129 (19.19), 139 (40.66), 159 (12.11), 171 (11.99), 189 (5.96), 217 (6.55).

NI40 : 41(86.76), 53 (52.13), 69 (80.43), 77 (100), 91 (76.97), 107 (53.15), 115 (59.02), 122 (69.88), 159 (63.99), 201 (9.02), 263 (37.57), 307 (63.31).

NI41 : 41 (90.45), 53 (100), 65 (42.97), 77 (77.08), 91 (64.35), 108 (70.80), 133 (25.71), 147 (43), 159 (16.32), 171 (11.76), 187 (51.32), 187 (8.89), 200 (67.96), 324 (25.62).

NI42 : 41 (69.26), 53 (61.11), 69 (44.15), 79 (100), 91 (44.02), 107 (44.53), 115 (20.54), 122 (62.03), 157 (12.06), 201 (30.73), 245 (16.17), 326 (7.02).

L'analyse par CG/SM de la fraction volatile de *Laurencia Obtusa* a permis de relever 67 composés. L'identification a été faite en se basant sur les banques de données spectrales Wiley 7n et NBS.75K.1 de l'appareil ainsi que sur les données de la littérature. Nous avons pu identifier avec exactitude 25 produits, ce qui représente 37,31% de la composition globale. Concernant les produits non identifiés, nous avons donné le rapport m/z ainsi que le pourcentage des principaux fragments de leur spectre de masse.

L'examen du tableau 06 permet de relever la complexité de la composition chimique de la fraction volatile. Cette dernière est largement dominée par des terpènes tel que le (-)-l'Aristolene, le 10-Demethylsqualene et le Phytol.

Nous retrouvons, en plus des terpènes (sesquiterpènes, C₁₅ acétogénines) et des acides gras, des composés de structures chimiques très complexes. Nous avons aussi confirmé la présence des C₁₅ acétogénines en l'occurrence le manéonène A et C déjà identifié dans les extraits de *Laurencia obtusa* [35].

Nous avons représenté les différentes classes chimiques présentes dans la composition chimique (tableau 6) sous forme d'un secteur (figure 6).

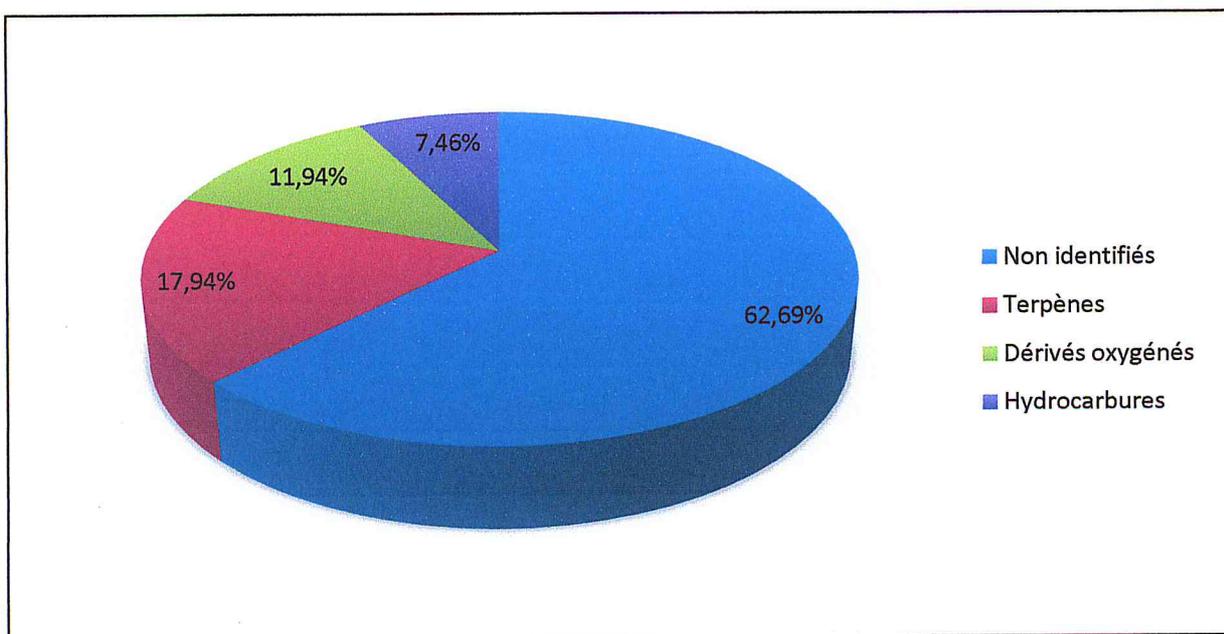


Figure 6: Composition chimique de la fraction volatile de *Laurencia obtusa*

La composition chimique de la fraction volatile de *Laurencia Obtusa* est dominée par la présence de 17,94% des terpènes : dont les principaux sont des sesquiterpènes et des C₁₅ acétogénines.

Nous avons notés la présence des dérivés oxygénés avec un pourcentage de 11,94% tel que l'acide palmitoléique, l'acide palmitique et le p-crésol.

Les hydrocarbures représentent 7,46% de la composition globale, notamment les alcènes et les alcanes linéaires.

Le nombre de composés non identifiés représente 62,69%, un pourcentage relativement élevé. Cet état de fait est dû notamment à la complexité de la composition chimique mais surtout à l'absence de travaux antérieurs sur la fraction volatile. À nôtres connaissances il faut bien le souligner qu'il s'agit du premier travail sur la fraction volatile de *laurencia obtusa* obtenue par entrainement à la vapeur d'eau de l'extrait brut.

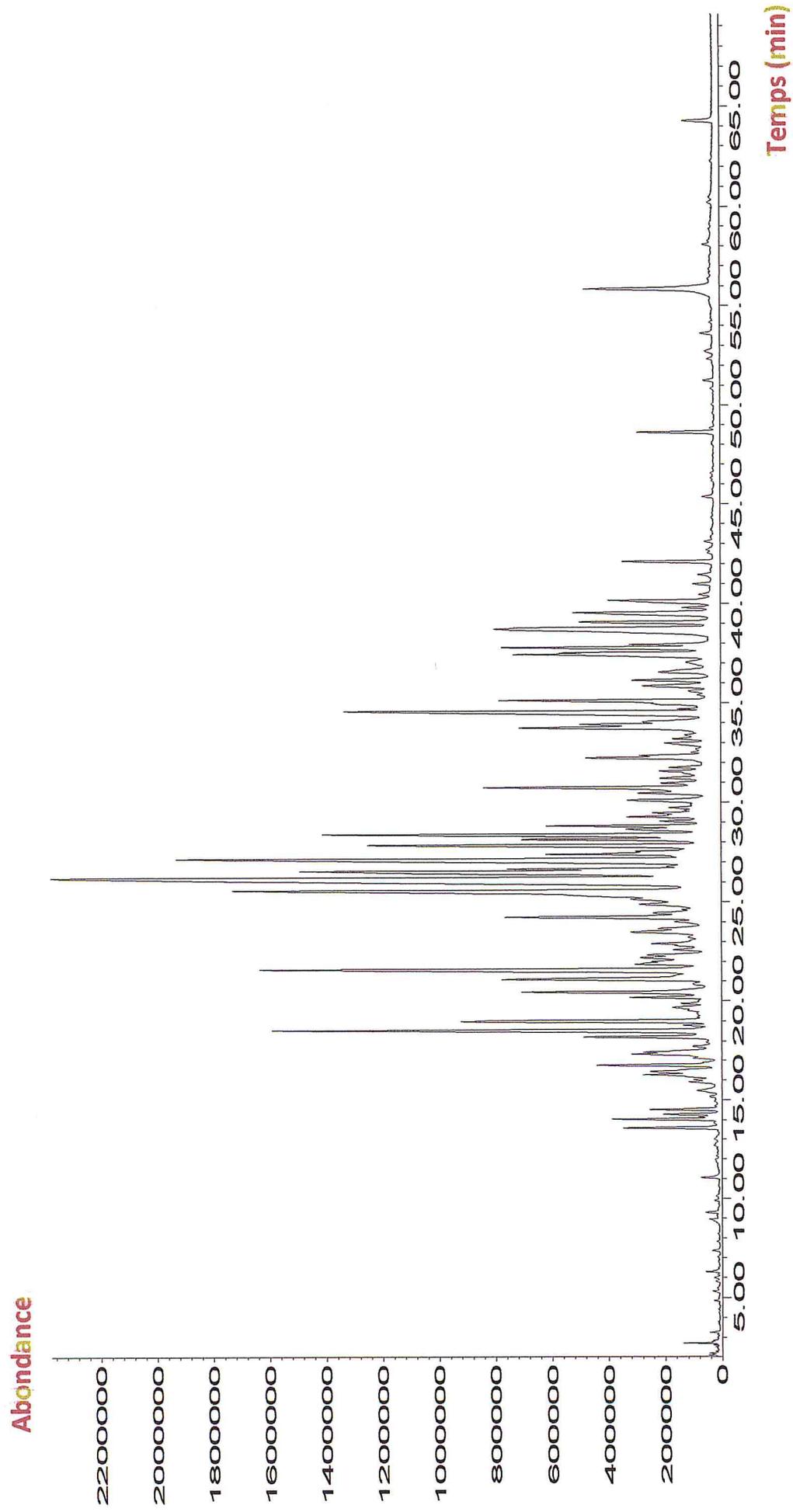


Figure 7 : Profile chromatographique d'analyse de la fraction volatile de *Laurencia obtusa*

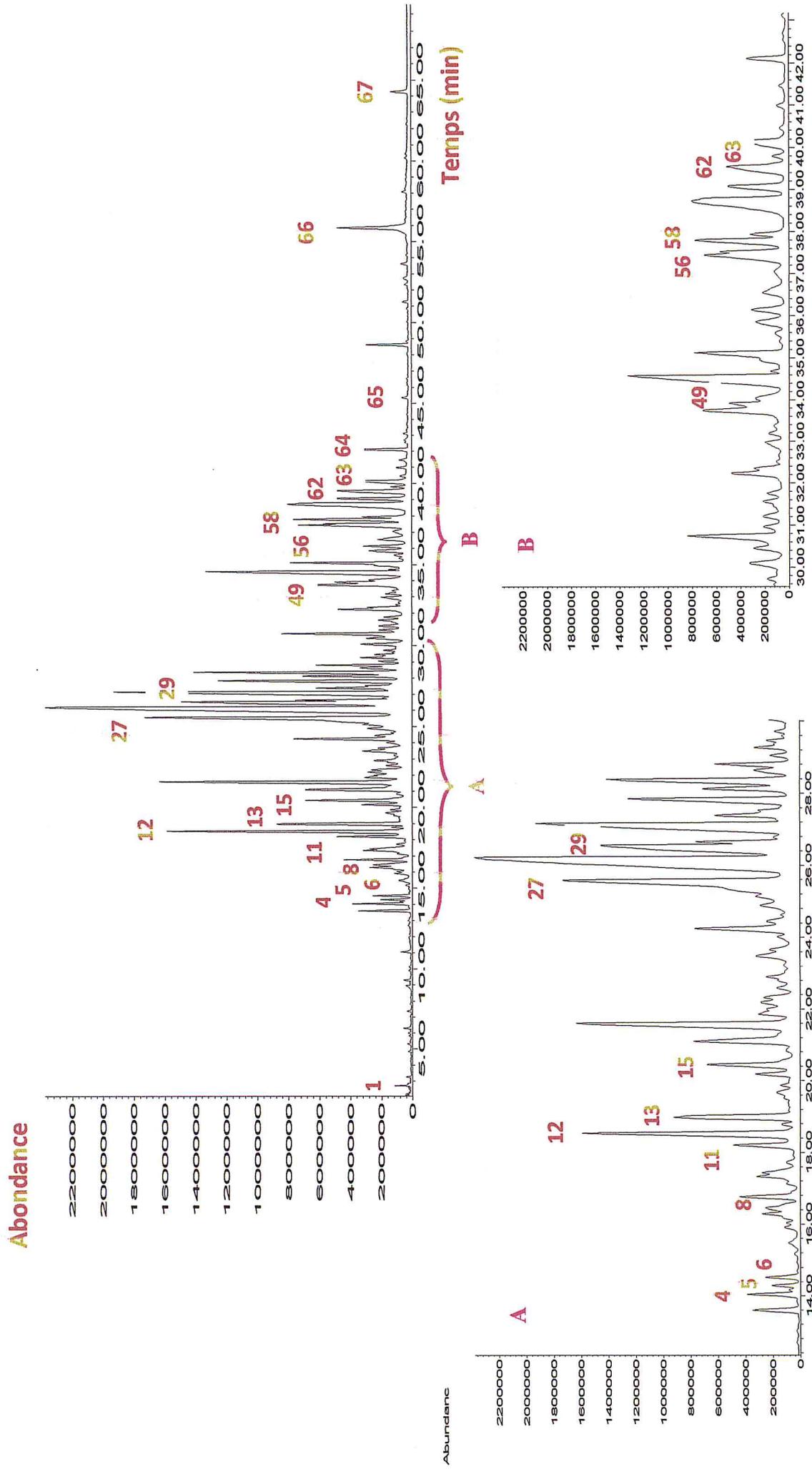


Figure 8: Agrandissement et numérotation des pics du chromatogramme de la fraction volatile de *Laurencia obtusa*

II. 6 Étude du pouvoir antimicrobien de la fraction volatile de *Laurencia Obtusa*

II. 6.1 Introduction

Il est connu depuis l'antiquité que les huiles essentielles présentent une activité antiseptique non négligeable. Elles sont utilisées dans de nombreux domaines comme la pharmacie, les cosmétiques, l'agroalimentaire...etc. Cependant, en phytothérapie, les huiles essentielles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre des maladies infectieuses d'origine bactérienne, comme les bactéries endocanaliaires ou la microflore vaginale, et d'origine fongique, comme les dermatophytes, les moisissures allergisantes ou les champignons opportunistes [36].

En effet, dans cette partie nous avons met en évidence le pouvoir antimicrobien de la fraction volatile par la méthode d'aromatogramme, en procédant à des tests sur un panel de microorganismes d'origine connues, identifiés avec un numéro ATCC.

II. 6.2 Microorganismes utilisés

Les souches microbiennes utilisées dans notre étude sont de référence ATCC provenant du laboratoire de microbiologie de la filial Biotic, unité de Gué de Constantine Saidal dont le fournisseur est l'institut Pasteur d'Alger agréé par l'OMS. En effet, six souches microbiennes sont utilisées dans notre étude, à savoir, quatre bactéries et deux champignons. Ces derniers sont conservés à l'état lyophilisé.

Tableau 7 : Microorganismes utilisés

Souches	Nature de souches	Gram	Références (ATCC)
<i>Bacillus Subtilis</i>	Bactérie	+	ATCC 6633
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bactérie	+	ATCC 6538
<i>Escherichia coli</i>	Bactérie	-	ATCC 8739
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactérie	-	ATCC 9027
<i>Candida albicanss</i>	Levure	/	ATCC 10231
<i>Aspergillus brasilien</i>	Moisissure	/	ATCC 16404

II. 6.3 Principe de la méthode

II. 6.3.1 L'aromatogramme

L'aromatogramme est une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée également « antibiogramme » ou « méthode par diffusion en milieu gélosé » ou encore « méthode des disques ». On utilise la méthode de diffusion en gélose dans les laboratoires d'enseignement pour évaluer l'efficacité d'un agent chimique [37].

L'antibiogramme est un test réalisé dans une boîte de pétri pour la détermination de la sensibilité d'une bactérie aux antibiotiques, effectué en milieu solide. Ce test est pratiqué sur toute souche isolée d'un prélèvement pathologique. Il a un intérêt double, thérapeutique (il permet de confirmer et ou adapter une antibiothérapie) et épidémiologique (surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques) [37].

▪ Principe

La technique consiste à déposer des disques de papier buvard stérile de 9 mm de diamètre imprégnés d'une concentration connue de la substance chimique testée sur une gélose en boîte de pétrie inoculée et uniformémentensemencée au préalable par la suspension bactérienne à étudier, puis incubé.

À la fin de la période d'incubation et si la substance est efficace, une zone pâle apparaît autour du disque, là où la croissance microbienne a été inhibée, cette région s'appelle « zone d'inhibition » ou « halo d'inhibition » (figure 9). Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à la substance chimique testée (huile essentielle). Plus il est petit, plus la bactérie est résistante.

Cette méthode est tirée du principe du titrage des antibiotiques « pharmacopées européennes 2002 », et son application pour les huiles essentielles a été validée par le laboratoire de microbiologie de la filiale Biotic, SAIDAL, elle a été aussi utilisée par plusieurs auteurs [38, 39, 40,41].

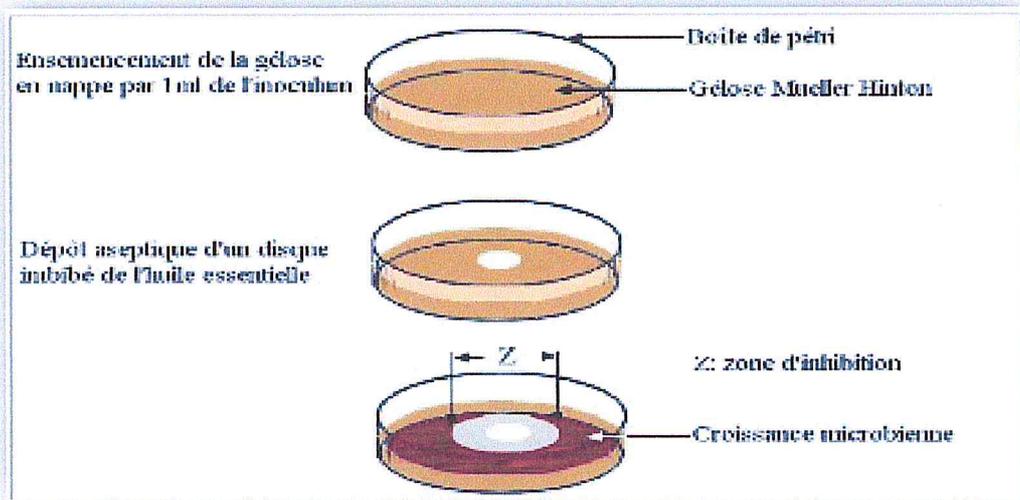


Figure 9 : Illustration de la méthode des antibiogrammes

II. 6.4 Protocole expérimental

L'activité antimicrobienne a été déterminée par le protocole adaptée par la pharmacopée européenne [42].

→ Préparation de l'inoculum

Cette méthode consiste à préparer une suspension microbienne on prélevant 2 à 3 colonies bien isolées et identiques à partir d'une culture microbienne de 18-24h et les introduire dans des tubes à essais avec 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 625 nm. La suspension microbienne est obtenue par la mesure de la densité optique (D.O) qui doit être comprise entre 0,08 à 0,1 pour les bactéries et de 1 à 2 pour les levures et les moisissures correspondant à une concentration optimale de 10^7 à 10^8 germes/ml.

→ Préparation de milieu de culture

- Faire fondre les milieux gélosés (Muller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures et moisissures) dans un bain marie réglé à 95°C.
- Couler aseptiquement les milieux de culture dans des boites de Petri de 90mm de diamètre à raison de 15ml par boite.
- Laisser refroidir et solidifier sur la paillasse

→ Ensemencement

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

NB : Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

→ Séchage

Laisser sécher les boîtes de Pétri pendant quelques minutes à température ambiante. Les couvercles des boîtes doivent être fermés.

→ Préparation de la solution à tester

- Faire dissoudre la quantité de l'échantillon à tester (fraction volatile de *Laurencia Obtusa*) dans du méthanol pour avoir la concentration désirée (72 mg/ml).
- Agiter pendant quelques secondes à l'aide d'un vortex.

→ Déposition des disques

- Une fois les milieux sont solidifiés, prélever aseptiquement à l'aide d'une pince un disque buvard imprégné dans la solution de la fraction volatile, ensuite les déposer à la surface des milieux de culture préalablement coulés. Appuyer doucement sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu.
- Laisser les boîtes pendant 30 minutes sur la pailasse à température ambiante pour permettre une bonne diffusion des produits étudiés.

→ Incubation

- Incuber les boîtes de Pétri à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25 °C pendant 48h à 5 jours pour les levures et moisissures.

→ Lecture des résultats

La sensibilité des germes au produit est déterminée après incubation, par mesure de diamètre des zones claires autour des disques (zone d'inhibition en mm) à l'aide d'un pied à coulisse.

NB : Pour le témoin négatif, nous déposons des disques imbibés du solvant (méthanol), pour confirmer que l'apparition des zones d'inhibition est due à la présence de la fraction volatile.

II. 6.5 Résultats et discussion

La sensibilité des microorganismes cibles envers les différents composés est classée selon les diamètres des halos d'inhibition, mise en place par Mutai et al, 2009 [43].

- ◆ Très fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur ou égale à 30mm.
- ◆ Fortement inhibitrice lorsque : $21\text{mm} \leq \text{diamètre de la zone} < 30\text{mm}$.
- ◆ Modérément inhibitrice lorsque : $16\text{mm} \leq \text{diamètre de la zone} < 21\text{mm}$.
- ◆ Légèrement inhibitrice lorsque : $11\text{mm} \leq \text{diamètre de la zone} < 16\text{mm}$.
- ◆ Non inhibitrice lorsque : diamètre de la zone $< 11 \text{ mm}$.

Les résultats de l'activité antimicrobienne de la fraction volatile de *Laurencia Obtusa* sur les souches de références par mesure de diamètre d'inhibition de la croissance des microorganismes sont donnés dans les tableaux 08 et 09 les figures 10 et 11.

Tableau 8 : Activité antibactérienne de la fraction volatile de *Laurencia Obtusa*

Souches	Gram	Diamètre d'inhibition (mm)
<i>Basilus subtilis</i>	+	17
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	23
<i>Escherichia coli</i>	-	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	16

Après 24h d'incubation à 37°C nous avons observé l'apparition des zones d'inhibition autour des disques. Le diamètre du disque témoin ne dépasse pas 9 mm pour les 4 souches de référence testées.

On peut constater d'après les résultats représenté dans le tableau 8 que parmi les souches testées, les souches *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilisse* se sont révélées les plus sensibles envers notre fraction volatile, Contrairement à *Escherichia Coli* qui s'est avérée légèrement inhibitrice.

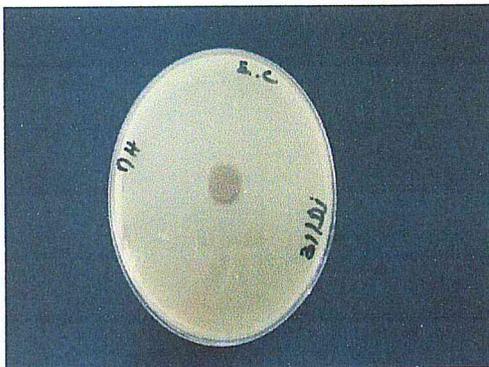
Tableau 9 : activité antifongique de la fraction volatile de *Laurencia Obtusa*

Souches	Identification	Diamètre d'inhibition (mm)
<i>Candida albicans</i>	Levure	17
<i>Aspergillus Brasiliensis</i>	Moisissure	21

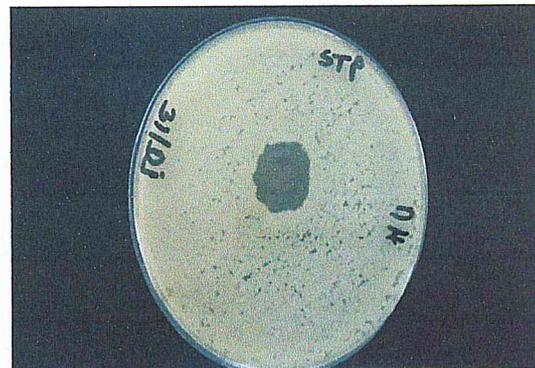
Après 72 d'incubation à 25°C, nous avons observé l'apparition des zones d'inhibition autour des disques. Alors que pour les boites de témoin contenant que le solvant, nous avons observé l'absence de ces zones. Ceci permet de conclure que la fraction volatile de *Laurencia Obtusa* présente une activité antifongique sur les souches de référence testées.

D'après les résultats représentés dans le tableau 9 on peut constater que la fraction volatile de *Laurencia Obtusa* a exercé une importante activité inhibitrice sur le champignon *Aspergillus Brasiliensis* avec un diamètre de 21 mm, que sur *Candida albicans*.

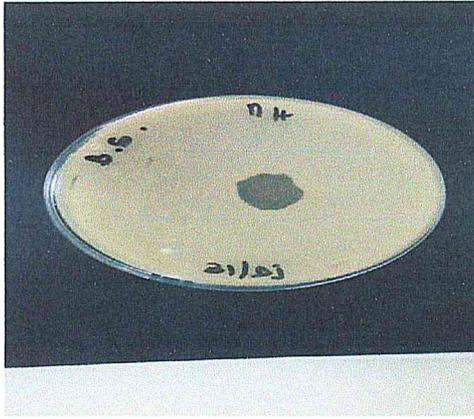
Les figure 10 et 11 montrent les photographies des résultats obtenus sur les boites de Pétri de l'activité antimicrobienne de la fraction volatile testée sur les bactéries et les champignons.



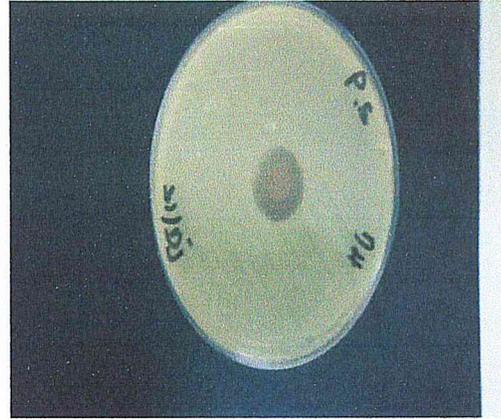
A



B



C



D

Figure 10 : activité antibactérienne de la fraction volatile de *Laurencia Obtusa* contre :
A/Escherichia Coli, B/ Staphylococcus aureus, C/ Bacillus subtilis, D/Pseudomonas aeruginosa



E



D

Figure 11 : activité antifongique de la fraction volatile de *Laurencia Obtusa* contre : E/
Candidat Albicans, D/ Aspergillus Brasiliensis

L'ensemble des souches testées dans notre étude ont montré un degré de sensibilité non négligeable à notre fraction volatile et ont subi une action bactériostatique et bactéricide/fongicide, excepté *Escherichia Coli* qui s'est montrée relativement plus résistante.

Le résultat obtenu avec cette dernière, rejoint celui déjà trouvé en testant l'effet de l'huile essentielle de *L.O* issue de Turquie sur plusieurs souches microbiennes, excepté sur *Escherichia Coli* qui ne présente aucun effet [29].

Selon les diamètres mesurés et d'après les auteurs Mutai et al (2009), la FV de *Laurencia Obtusa* présente une forte activité inhibitrice sur la bactérie Gram⁺ *Staphylococcus aureus* et une forte activité antifongique sur la moisissure *Aspergillus Brasiliensis*, car les diamètres sont supérieur ou égal à 21 mm.

Dans notre étude, la fraction volatile a montré une meilleure activité sur les bactéries de Gram⁺ que celle de Gram⁻. Ce résultat confirme les recherches M. zubia, C. payri qui ont signalé que les bactéries Gram⁺ sont plus sensibles aux huiles essentielles que les bactéries Gram⁻.

La faible sensibilité des bactéries Gram⁻ à l'action des huiles essentielles serait due à la présence d'une seconde membrane qui possède des chaînes hydrophiles de polysaccharides (LPS) jouant un rôle de barrière vis-à-vis des huiles essentielles qui ont un caractère hydrophobe [44,45].

CONCLUSION

GÉNÉRALE

Conclusion

Le présent travail comporte deux parties distinctes : une synthèse bibliographique et une partie expérimentale. La synthèse bibliographique nous a permis d'entreprendre une généralité sur les algues rouges et une discussion sur la systématique, l'étude chimique et l'activité biologique des espèces du genre *Laurencia*. La partie expérimentale a été consacrée à l'étude chimique de la fraction volatile de l'algue rouge *Laurencia Obtusa* et à la détermination de son activité antimicrobienne. La fraction volatile a été obtenue par entraînement à la vapeur d'eau de l'extrait brut à l'aide du montage de Dean-Starck avec un rendement moyen de 7.80%.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CG/SM) a permis la séparation et l'identification des différents produits de la fraction volatile de *Laurencia Obtusa*. La composition chimique obtenue est constituée principalement de 17,94% de terpènes, il s'agit notamment des sesquiterpènes ((-)- α -Gurjunene, phytol, ((+)-Calarene)), des C₁₅ acétoginines ((Cis-Maneonene-A) et (Cis-manoenene-C)) et des dérivés oxygénés. Un pourcentage relativement élevé représentant 62,69 % de la composition chimique globale n'a pas pu être identifié. Cet état de fait est dû notamment à la complexité de la composition chimique, mais surtout à l'absence de travaux antérieurs sur la fraction volatile.

L'étude de l'activité antimicrobienne effectuée sur quatre bactéries, une levure et une moisissure a montré une forte activité contre *Staphylococcus aureus* et *Aspergillus Brasiliensis*, une activité modérément inhibitrice contre *Bacillus Subtilus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida Albicans* et une activité légèrement inhibitrice contre *Escherichia Coli*.

Les performances antibactérienne et antifongique mises en évidence ainsi que d'autres activités biologiques méritent d'être étudiées avec plus de détails afin d'envisager des perspectives d'application plus larges de cette fraction volatile. En vue de la valorisation de l'algue rouge *Laurencia Obtusa*, il convient d'envisager une étude plus approfondie, tel que l'étude saisonnière et géographique et leur influence sur sa diversité chimique. On peut également envisager l'étude chimique des extraits lipidiques afin d'isoler des structures originales, éventuellement bioactives.

Références bibliographiques

- [1] J.-M. Kornprobst, «Substances naturelles d'origine marine, chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologie », Ed. TEC&DOC, France, 598p, 2005.
- [2] T. Ainane, « Valorisation de la biomasse algale du maroc : potentialités pharmacologiques et Applications environnementales cas des algues brunes », thèse de Doctorat, Université Hassan II – Casablanca, 2011.
- [3] J-K. Rajeev, R. Xuzi, « Biomedical compounds from marine organismes », journal of Marine Drug, 2, 123-146, 2004.
- [4] Blunt et al, « Marine Natural Products », Natural product report, 25, 35-94, 2008.
- [5] M. Piattelli, “Chemistry of marine algae: overview and current status”, journal of Oebalia, 7, 357-379, 1990.
- [6] J. Seckbach, D-J. Chapman, « Red Algae in the Genomic Age», Ed.Springer, Israel, 500p, 2010.
- [7] S-K. Kim, «Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology », Ed.John Wiley & sons, Corée, 592p, 2011.
- [8] M-C. Kathleen, G-S. Robert, «Biology of the red elgae», Ed. Combridge university press, Bretagne, 528p, 2011.
- [9] G. Ruiz, «Extraction, Détermination structurale et valorisation chimique de phycocoloides d'algues rouges », thèse de Doctorat, université de limoges, 2005.
- [10] C-V-D. Hoek, D-G. Mann, H-M. Jahns, «Algae: An introduction to phycology », Ed. Cambridge University Press, Australie, 523p, 1995.
- [11] R. Perez, R. Kaas, F. Campillo, F. Arbault, O. Barbaroux, «La culture des algues marines dans le monde », Ed. Ifremer, France, 614p, 1992.
- [12] P. Raven, R. Evert, S. Eichhom, « Biologie végétale », Ed. Boeck & Larcier, France, 927p, 2000.
- [13] Y-B. Seo, Y-W. Lee, C-H. Lee, H-C. You, «Red algae and their use in papermaking», Journal of Bioresource Technology, 101, 2549-2553, 2010.
- [14] S-G.Lardiere, «Étude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales) », thèse de Doctorat, université de Bretagne occidentale, 2004.
- [15] J. Guezennec, C. Moretti, J-C. Simon, «Substances Naturelles En Polynésie Française », Ed. IRD, France, 360p, 2006.

- [16] M. Masuda, T. Abe, T. Suzuki, M. Suzuki, «Morphological and chemotaxonomic studies on *Laurencia composita* and *L.okamurae* (Ceramiales, Rhodophyta) », journal of Phycologia, 35, 550-562, 1996.
- [17] F-L-S. Machado, W-P. Lima, H-M. Duarteb, B-R. Bergmann, L-M. Gestinari, M-T. Fujii, C-R. Kaiser, A-R. Soares, « Chemical diversity and antileishmanial activity of crude extracts of *Laurencia* complex (Ceramiales, Rhodophyta) from Brazil », Brazilian journal of pharmacognosy, 24, 635-643, 2014.
- [18] K-L. Erickson, « Constituents of *Laurencia* .In Marine Natural Products », journal of natural products, 5, 131-257, 1983.
- [19] Y. Zhang, B-G. Wang, « Two new halogenated chamigrane-type sesquiterpenes and other secondary metabolites from the marine red alga *Laurencia okamurai* and their chemotaxonomic significance Biochem », journal of phytochemistry, 35, 627-630, 2007.
- [20] S-C. Mao, Y-W. Guo, «A Laurane Sesquiterpene and Rearranged Derivatives from the Chinese Red Alga *Laurencia okamurai* Yamada», journal of natural products, 69, 1209-1211, 2006.
- [21] B-G. Wang, « Halogenated Terpenes and a C15-Acetogenin from the Marine Red Alga *Laurencia saitoi* », journal of Molecules, 13, 2894-2899, 2008.
- [22] I. NDiaye, M. Fofana, « Sesquiterpenes isolés de l'algue rouge *Laurencia Intricata*, conversion chimique de l'allolaurinterol en Filiformin », journal de la Société Ouest-Africane de Chimie, 33, 1-6, 2012.
- [23] M-J-V-F. Lamouroux, « Essai sur les genres de la famille des Thalasiophytes non articulées », Annales du Muséum d'Histoire Naturelle, Paris, 20, 21-47, 115-139, 1813.
- [24] J-V-F. Lamouroux, « Essai sur les genres de la famille des thalassiophytes non articulées », Annales du Muséum d'Histoire Naturelle, Paris, 20, 21-47, 115-139, 267-293, 1813.-<http://www.algaebase>.
- [25] N-B. Maiz, « Flore Algale (Rhodophyta,Phaeoophyceae) », Thèse de Doctorat, université D'Aix-Marseille II, juin 1986.
- [26] D. Iliopoulou, C. Vagias, C. Harvala, V. Roussis, « C₁₅ acetogenins from the red algae *Laurencia obtuse* », journal of Phytochemistry, 59, 111-116, 2002.
- [27] S. Imre, S. Islimyeli, A. Oztunc, R-H. Thomson, « Obtusenol, A sesquiterpenes from *Laurencia obtuse*», journal of Phytochemistry, 20, 833-834, 1981.
- [28] S-E. Ayyad, A-M. Dawidar, H-W. Dias, R. Howie, J. Jakopovic, R-H. Thomson, « Three halogenated metabolites from *Laurencia Obtusa* », journal of Phytochemistry, 29, 3193-3196, 1990.

- [29] Z. Demireli, F. Ferda, Y. Koz, N. Ulku, K. Yavasoglu, G. Ozdemir, A. Sukatar, «Antimicrobial and antioxidant activities of solvent extracts and the essential oil composition of *laurencia obtusa* and *laurencia obtusa* var. *pyramidata*», Romanian biotechnological letters, 16, 5927-5936, 2011.
- [30] S-S-A. Alsaif, A. Nevein, H-A. El-wazanani, I-A. Aref, « Antibacterial substances from marine algae isolated from Jeddah coast of Red sea, Saudi Arabia », Saudi Journal of Biological Sciences, 21, 57-64, 2014.
- [31] K. Kurata, K. Taniguchi, Y. Agatsuma, M. Suzuki, « Diterpenoid feeding-deterrents from *laurencia saitoi* », journal of phytochemistry, 47, 363-369, 1998.
- [32] L-p. Ding, B-g. Wang, « two new aristolane sesquiterpenes from *laurencia similis* », Chinese chemical letters, 18, 178-180, 2007.
- [33] D-Y. Shi, S-J. Guo, Z-H. Yuan, X-B. Zhu, « Sesquiterpenes from *Laurencia similis* », journal of Molecules, 14, 1889- 1897, 2009.
- [34] D. Iliopoulou, N. Mihopoulos, C. Vagias, P. Papazafiri, V. Roussis, « Novel cytotoxic brominated diterpenes from the red alga *Laurencia obtusa* », Journal of Organic Chemistry, 68, 7667-7674, 2003.
- [35] S-N. Ayyad, K-O. Al-footy, W-M. Alarif, T-R. Sobahi, S-A. BASSAIF, M-S. Makki, M. ASIRI, A-Y. Al halawani, A-F. Badria, F. al-raheem, « Bioactive C15 Acetogenins from the Red Alga *Laurencia obtusa* », Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 59, 1294-1298, 2011.
- [36] F-N. Ghomari, B. Kouache, A. Arous, S. Cherchali, « Effet de traitement par fumigation du Thym (*Thymus Vulgaris*) sur le *Varroa destructor* agent de la Varroase des abeilles », Revue de Nature & Technologie, 10, 34-38, 2014.
- [37] M-C. Pibiri, « Assainissement Microbiologique de l'air et des systems de ventilation au moyen d'huiles essentielles », thèse de Doctorat, École polytechnique fédérale de Lausanne, 2005.
- [38] S-G. Deans, Ritchie, « Antibacterial properties of plant essential oils », journal of Food Microbiology, 5, 165-180, 1987.
- [39] C-F. Carson, T-V. Riley, « Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* », journal of Applied Bacteriology, 78, 264-269, 1995.
- [40] M-L. Faleiro, M-G. Miguel, F. Ladeiro, F. Venancio, R. Tavares, J-C. Brito, A-C. Figueiredo, J-G. Barroso, L-G. Pedro, « Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus* », Letters in Applied Microbiology, 36, 35-40, 2003.

- [41] O. Kunle, J. Okogun, E. Egamana, M. Shok, « Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from Lippiamultiflora leaf extract », journal of Phytomedicine, 10, 59-61, 2003.
- [42] Pharmacopée européenne, Direction de la qualité du médicament, Council of Europe, 2623 p, 2002.
- [43] C. Mutai, C. Vagias, D. Abatis, V. Roussis., « Antimicrobial activity of Acacia mellifera extract and lupine triterpenes », journal of Ethnopharmacology, 10, 1016-1050, 2009.
- [44] C-C. Tassou, E-H. Drosinos, G-J-E. Nychas, « Effects of essential oil from mint (Mentha piperita) on salmonella Enteritidis and Listeria monocytogenes in model food systems at 4 and 10°C », journal of Applied Bacteriology, 78, 593-600, 1995.
- [45] S-C. Chao, D-G. Young, C-J. Oberg, « Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses », journal of Essential Oil Research, 12, 639-649, 2000.

