



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



Université Amar Thelidji- Laghouat

**FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par : BOUAZZARA Noussaiba

DOMAINE : SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : BIOLOGIE

OPTION : BIOCHIMIE DES PRODUITS NATURELS

Thème

**Effet de la nature du solvant d'extraction sur l'activité
antioxydante et antibactérienne des extraits bruts d'algue
marine brune *Dictyota dichotoma***

Jury de soutenance :

Nom et Prénom	Grade	qualité
KHACHEBA IHCEN	Maitre de conférences classe B	Présidente
GUENANE HAMID	Maitre-Assistant classe A	Examinateur
GOUZI HICHAM	Maitre de conférences classe A	Rapporteur
SIFI IBRAHIM	Maitre-Assistant classe A	Co-rapporteur

Promotion : Juin – 2015



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



Université Amar Thelidji- Laghouat

**FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par : BOUAZZARA Noussaiba

DOMAINE : SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : BIOLOGIE

OPTION : BIOCHIMIE DES PRODUITS NATURELS

Thème

**Effet de la nature du solvant d'extraction sur l'activité
antioxydante et antibactérienne des extraits bruts d'algue
marine brune *Dictyota dichotoma***

Jury de soutenance :

Nom et Prénom	Grade	qualité
KHACHEBA IHCEN	Maitre de conférences classe B	Présidente
GUENANE HAMID	Maitre-Assistant classe A	Examineur
GOUZI HICHAM	Maitre de conférences classe A	Rapporteur
SIFI IBRAHIM	Maitre-Assistant classe A	Co-rapporteur

Promotion : Juin - 2015

Remerciement

Je remercie Dieu

A mon présidente de thèse

Mm. KHACHÉBA Ihcen

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Hommage respectueux.

A mon jury de thèse

Mr. GUENANE Hamid

Qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail

*Que ce travail soit le témoignage de ma
reconnaissance et de mon profond respect.*

A mon directeur de thèse

Pr. GOUZI Hicham

*De m'avoir accordé sa confiance en m'acceptant pour travailler sur ce
sujet avec lui. Il a suivi mes travaux avec intérêt tout en mon
prodiguant des conseils toujours justes. Et il a su me redonner courage
et aider à traverser des moments difficiles et des instants de doute. Je
tiens tous particulièrement à le remercier profondément pour son aide
appréciable, sa grande disponibilité et sa compréhension.*

Dédicace

À mes parents,

*Qui ont su me donner les ailes nécessaires pour réussir mon envol dans
la vie, tout en sachant la peine qu'ils auraient le jour de me voir
partir au loin.*

En remerciement de ce beau geste, ce mémoire leur est dédié.

À mes frères

À mes sœurs

À toute ma famille et ma belle-famille,

À tous mes amis

A tous ceux que j'aime.....

Je dédie ce travail

ملخص

في إطار البحث عن مركبات طبيعية جديدة ذات فعالية بيولوجية، اهتمنا بدراسة الفعالية الحيوية للمستخلصات الخامة للطحلب البني *Dictyota dichotoma* من الساحل الغربي الجزائري. تعبير المركبات الفينولية (الفينولات الكلية والكاروتينويدات) ومقدار القدرة المضادة للأكسدة لشهر مارس حدد أيضا.

المستخلص الميثانولي كان أفضل مستخلص للمستقلبات الثانوية المتواجدة في الطحلب البني *D,dichotoma* مثل الفينولات, التانويدات, المكونات المرجعة و أخرى.

محتويات الفينولات الكلية والكاروتينويدات مرتفعة في المستخلص الميثانولي قدرت بـ 4,329 ميليغرام معادل لحمض الغاليك من غرام للمادة الجافة، 1291 ميليغرام معادل للكاتشين من غرام للمادة الجافة على التوالي بالمقارنة مع المستخلصات الأخرى الإثنولية، الأسيونية، الكلوروفورمية والإكزانية.

المستخلص الإيثانولي لديه قدرة مضادة للأكسدة عالية بقيمة 52, 6 ميليغرام معادل لحمض الأسكوربيك من غرام للمادة الجافة مقارنة بالمستخلصات الأخرى.

فيما يخص الفعالية المضادة للبكتيريا بطريقة الانتشار على الأغار، المستخلص الإكزاني كان أكثر فعالية من المستخلصات الأخرى على ثلاث سلالات من بين الستة. بالنسبة للمستخلص الإكزاني، أفضل فعالية كانت ضد *S.aureus*، *B. cereus* و *L. monocytogenes* كانت في شهر مارس بفطر تثبيط 13,5 ; 20,5 و 10,5 مم على التوالي. الى جانب ان السلالات *P. aeruginosa*، *E.coli*، *K. pneumonia* كانت أكثر مقاومة لكل المستخلصات.

الكلمات المفتاحية: طحلب بني، *Dictyota dichotoma*، المركبات الفينولية، القدرة المضادة للأكسدة، الفعالية المضادة للبكتيريا.

Résumé

Dans le cadre de la recherche de nouveaux composés naturels biologiquement actifs, nous sommes intéressés à étudier l'activité biologique des extraits bruts méthanolique de l'algue brune *Dictyota dichotoma* de la côte ouest algérienne. Le dosage des composés phénoliques (phénol totaux et caroténoïdes) et la quantification du pouvoir antioxydant des extraits du mois de mars ont aussi été déterminés.

L'extrait méthanolique est le meilleur solvant d'extraction des métabolites secondaires contenus dans l'algue *D. dichotoma* tel que les phénols, les tannins, les composés réducteurs et autres.

Les teneurs en phénols totaux et en caroténoïdes sont élevées dans l'extrait méthanolique avec 4,329 mg EAG/g MS et 1291 mg/l, respectivement comparativement aux autres extraits (éthanolique, acétonique, chloroformique et hexanique).

L'extrait brut éthanolique a un pouvoir antioxydant élevé avec un $EC_{50} = 6,52$ mg/ml par rapport aux autres extraits.

En ce qui concerne le pouvoir antibactérien par la méthode de diffusion sur agar, l'extrait brut hexanique est le plus actif sur trois souches bactériennes parmi les six bactéries. Pour l'extrait hexanique, l'activité la plus puissante est contre *S. aureus*, *B. cereus* et *L. monocytogenes* avec des diamètres de zones d'inhibition de 13,5 ; 20,5 et 10,5 mm, respectivement. Par ailleurs, *P. aeruginosa*, *E. coli* et *K.pneumoniae* sont plus résistants aux extraits bruts.

Mots clés : Algue brune, *Dictyota dichotoma*, Composés phénoliques, pouvoir antioxydant, Activité antimicrobienne.

Abstract

Within the framework of the research for new biologically active natural compounds, we were interested to study the biological activity of the crude extracts of the brown alga *Dictyota dichotoma* of the Algerian west coast. The amount of the phenolic compounds (total phenolic and carotenoid) and the quantification of the antioxidant capacity of the extracts of March were also determined.

The crude methanolic extract are the best solvent for extract the secondary metabolic content in brown algae *D. dichotoma* as phenols, tannins, reducing compounds and others.

The contents in total phenols and in carotenoids are raised in the methanolic extract with 4,329 mg EAG/g MS and 1291 mg/l, respectively compared with the other extracts (ethanolic, acetic, chloroformic and hexanic).

The crude ethanolic extract has a better antioxidant capacity with $EC_{50} = 6.52$ mg/ml, with regard to the other extracts.

As regards the antibacterial activity by the method of distribution on agar, the crude hexanic extract was more active on three bacteria between six bacteria. For the hexanic extract, the best activity is against *S. aureus*, *B. cereus* and *L. monocytogenes* with inhibition diameter zones of 13, 5; 20, 5 and 10, 5 mm, respectively. Besides, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumonia* are more resistant to the crude extracts.

Keywords: Brown algae, *Dictyota dichotoma*, Phenolic compounds, Antioxidant capacity, Antimicrobial activity.

Liste des abréviations :

% : pourcentage.

μM : micromolaire

Abs: absorbance

AEAC: Ascorbic acid Equivalent Antioxidant Capacity

AGPI: Acide Gras Poly Insaturé

ATCC: American Type Culture Collection

BC: β-carotène

BHA: tertioButyl-HydroxyAnisole

BHIB: Brain Heart Infusion Broth

BHT: tertioButyl-HydroxyToluéne

C_a: Chlorophylle a

C_b: Chlorophylle b

CMI : concentration Minimale Inhibitrice

DO : Densité optique

DPPH: Diphenyl picrylhydrazil

EAG: Equivalent d'acide Gallique

FRAP: Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter

IC₅₀ : Concentration Inhibitrice de 50%

mol : mole

MS : Masse Sèche

nm : nanomètre

PG : Gallate de Propyle

PPT : Polyphénols Totaux

TBHQ : TertioButyl-HdroxyQuinone

UV-Vis : Ultraviolet

RL : Radicale Libre

ERO/ROS : espèce radicalaire oxygéné

OMS : Organisation Mondial de Santé

Liste des Figures

Figure 1	Représentation schématique d'une macro-algue brune de type Fucale	3
Figure 2	Photo d'un Micro-algue au microscope électronique	4
Figure 3	Distribution des algues selon l'intensité lumineuse	6
Figure 4	Thalles de <i>Dictyota dichotoma</i>	8
Figure 5	Description des différentes classes de terpènes	9
Figure 6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> au microscope électronique	12
Figure 7	<i>Escherichia coli</i> au microscope électronique	13
Figure 8	<i>Staphylococcus aureus</i> observé au microscope électronique	14
Figure 9	<i>Klebsiella pneumonia</i> au microscope électronique	15
Figure 10	<i>Bacillus cereus</i> au microscope électronique à balayage	15
Figure 11	<i>Listéria monocytogenes</i> au microscope électronique à balayage	16
Figure 12	Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène	17
Figure 13	Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie	18
Figure 14	Photo de l'algue brune <i>Dictyota dichotoma</i> au laboratoire	24
Figure 15	Carte géographique et photographie de la station de récolte de l'algue <i>D. dichotoma</i> (salamandre)	25
Figure 16	Evaporateur rotatif de type Hiedolph HB 4010	26
Figure 17	Résultats de l'effet des solvants d'extraction sur l'algue brune <i>Dictyota dichotoma</i>	35
Figure 18	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux	37
Figure 19	Histogramme de dosage des phénols totaux dans les extraits de l'algue <i>D. dichotoma</i>	38
Figure 20	Histogramme de dosage des caroténoïdes contenant dans les extraits bruts de l'algue <i>D. dichotoma</i>	39
Figure 21	La corrélation entre la teneur en composés phénoliques et la puissance antiradicalaire des extraits bruts des algues marines déterminée par la méthode DPPH et FRAP.	40

Figure 22	La corrélation entre la teneur en caroténoïdes et la puissance antiradicalaire des extraits bruts des algues marines déterminée par la méthode DPPH et FRAP.	40
Figure 23	Présentations graphiques des pourcentages d'inhibition du radical DPPH résiduels en fonction de concentration des extraits bruts algaux	41
Figure 24	Pouvoir réducteurs des extraits bruts par la méthode FRAP	44
Figure 25	Résultats représentent les zones d'inhibition de différentes concentrations des extraits de <i>D. dichotoma</i> testées sur les souches bactériens	47
Figure 26	Photos des résultats obtenus par la méthode des puits sur <i>K. p</i> , <i>E. c</i> et <i>P. a</i> testées par les extraits de <i>D. dichotoma</i>	47
Figure 27	Représentation graphique des zones d'inhibition à 60 µl de différents extraits algale	48
Figure 28	Résultats de détermination de la concentration minimale inhibitrice des extraits de l'algue <i>D. dichotoma</i>	51

Liste des Tableaux

Tableau 1	Caractères biochimiques d' <i>Escherichia coli</i>	13
Tableau 2	Caractères biochimiques de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	14
Tableau 3	Description et pouvoir pathogène des souches de bactéries utilisées lors de cette étude	32
Tableau 4	Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques recherchés dans la poudre algale	36
Tableau 5	Teneurs en polyphénols et en caroténoïdes existant dans les extraits bruts de l'algue brune <i>D. dichotoma</i>	37
Tableau 6	Les valeurs d'EC50 des activités antioxydants des extraits de <i>Dictyota dichotoma</i>	37
Tableau 7	Résultats de l'effet de l'antibiotique sur les souches bactériennes testés	46
Tableau 8	Evaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits d'algue	46

Table des matières

Remerciements	I
Dédicace	II
Résumés	III
Liste des abréviations	VI
Liste des Figures	VII
Liste des Tableaux	IX
Introduction générale	1
Partie bibliographique	
Chapitre I : présentation de l'algue étudiée	
1- Généralités sur les algues	3
1.1- Définition	3
1.2- Structure des algues	3
1.2.1. Les macro-algues	3
1.2.1. Les micro-algues	4
1.3- Composition des algues	4
1.4- Conditions de vie.....	5
1.5- Grandes groupes des algues	5
2- Présentation générale des algues brunes.....	6
2.1- Présentation de <i>Dictyota dichotoma</i>	7
2.1.1. Position systématique.....	7
2.1.2. Description morphologique.....	7
2.1.3. Métabolites secondaires de l'espèce étudiée.....	8
2.1.4. Eléments biologiques et écologiques.....	9
Chapitre II : Généralités sur les microorganismes	
1- Définition des microorganismes	10
2- Notion de pouvoir pathogène	11
3- Quelques espèces bactériennes	11
3.1- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
3.2- <i>Escherichia coli</i>	12
3.3- <i>Staphylococcus aureus</i>	13
3.4- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	14
3.5- <i>Bacillus cereus</i>	15
3.6- <i>Listeria monocytogene</i>	15
Chapitre III : Radicaux libres et les antioxydants	
1- Introduction	16
2- Radicaux libres	16
2.1. Origines des radicaux libres	17
2.2. Natures des radicaux libres	18
2.2.1. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)	18
2.2.2. Espèces libres non oxygénées	19
2.3. Action biologique des radicaux libres	19
2.4. Défenses contre les radicaux libres	19
2.5. Les radicaux libres et le stress oxydant	19
3- Les antioxydants	20
3.1. Définition	20
3.2. Mécanisme d'action	20
3.3. Utilisation des antioxydants.....	21
3.4. Classification des antioxydants.....	21

3.4.1. Antioxydants synthétiques.....	21
3.4.2. Substances synergiques	21
3.4.3. Antioxydants d'origine végétale.....	22
Partie expérimentale	
<i>Chapitre I : matériel végétal</i>	
1- Choix du matériel végétal	24
2- Station d'étude.....	24
<i>Chapitre II : préparation des extraits et dosages phytochimiques</i>	
1- Préparation des extraits bruts	25
2- Les tests phytochimiques	26
3- Dosage des composés phénoliques	29
3.1- Dosage des phénols totaux	29
3.3- Dosage des caroténoïdes.....	30
<i>Chapitre III : études du pouvoir antibactérienne et antioxydant</i>	
1- Etudes du pouvoir antioxydant.....	30
1.1- Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil).....	30
1.2- Réduction de fer (FRAP).....	31
1.3- Analyse statistique	32
2- Etude du pouvoir antibactérien	32
2.1- Revivification des souches	32
2.2- Souches testées	32
2.3- Milieux de culture utilisés	32
2.4- Evaluation de l'activité antibactérienne	33
2.5- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	34
Partie résultat et discussion	
<i>Chapitre I : dosage des composées phénolique et activité antioxydante</i>	
1- Rendements d'extraction	35
2- Tests phytochimiques.....	36
3- Teneurs en phénols totaux	37
4- Teneurs en caroténoïdes	39
5- Etude de l'activité antioxydante	40
5.1- Piégeage du radical libre DPPH	40
5.2- Réduction de fer FRAP.....	43
6- Analyse de corrélation entre les polyphénols /caroténoïdes et les tests DPPH-FRAP.....	45
<i>Chapitre II : activité antibactérienne</i>	
1. Résultats de l'antibiogramme	46
2. Sensibilité aux extraits	46
3. Méthode de diffusion sur milieu liquide (CMI)	49
Conclusion et perspectives	51
Références bibliographiques	53
Annexe	

Introduction générale

La terre est la planète bleue où l'eau recouvre plus de 70% de sa surface. Elle abrite des organismes marins riches en composés bioactifs à divers activités biologiques présentant une énorme ressource de nouveaux composés (**Yong-Xin et al., 2011**).

L'étude des produits d'origine marine a débuté à la fin des années 1970 et a conduit à l'isolement d'environ 21855 substances. Beaucoup d'extraits isolés présentent une potentialité pharmacologique, bien supérieure à celle de produits naturels provenant de plantes ou d'organismes terrestres (**Blunt et al., 2012**).

Parmi les organismes marins, les algues sont sources riches en composés bioactifs. Récemment, les chercheurs ont indiqué que les composés extraits d'algues marines montrent diverses activités biologiques à savoir : des activités antioxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoires (**Balboa et al., 2013**).

Bien que des algues soient exposées aux conditions environnementales défavorables telles que les rayons ultraviolets et les concentrations élevées en oxygène qui mènent à la formation des radicaux libres, et à d'autres oxydants forts, ils n'ont aucun dommage sérieux. Ainsi, l'algue produit des métabolites secondaires à caractères antioxydants tels que les caroténoïdes, fucoxanthine, phlorotanins et tocophérols (**Widjaja-Adhi et al., 2011**).

La résistance croissante des bactéries envers les antibiotiques existants est un problème majeur dans le monde entier. Une des manières d'empêcher cette résistance est l'élaboration des nouveaux composés qui ne sont pas basés sur les agents antimicrobiens synthétiques existants. Ainsi, la recherche des nouvelles sources naturelles des écosystèmes marins a pu mener à l'isolement de nouveaux antibiotiques d'origine algale tels : acide acrylique, composés aliphatiques halogénés, terpènes, composés hétérocycliques sulfurés et inhibiteurs phénoliques (**Chiheb et al., 2009**).

Notre présente étude permet d'évaluer l'étude de l'effet de la nature du solvant d'extraction sur l'activité antioxydante et antibactérienne de l'extrait de l'algue marine brune *Dictyota dichotoma* qui est récoltée au mois de Mars 2015.

Notre travail a été divisé en trois parties :

La première partie concernant l'étude bibliographique, comprend :

- ✓ L'étude générale de l'espèce *Dictyota dichotoma* en premier chapitre ;
- ✓ Les généralités sur les microorganismes dans un second ;
- ✓ Les radicaux libres et les antioxydants en troisième chapitre.

La deuxième partie reporte la description du protocole expérimental à savoir :

- ✓ Les dosages des composés phénoliques et analyses phytochimiques ;
- ✓ L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits bruts méthanolique ;
- ✓ L'évaluation de l'activité antimicrobienne de 5 extraits cités sur six souches :
Staphylococcus aureus, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*,
Klebsiella pneumoniae et *Listeria monocytogene*.

La troisième partie portera sur l'interprétation des résultats obtenus et leur discussion.

Partie bibliographique

Chapitre I : Présentation des algues marines

1- Généralité sur les algues

1.1- Définition :

Les algues, organismes photosynthétiques, sont conventionnellement définies comme des végétaux peuplant le milieu aquatique, les lieux humides et de nombreux milieux terrestres. Elles sont dépourvues de tige, de racine, de feuille ou de fleur, leur appareil végétatif relativement simple est appelé « thalle » (Guillaume, 2010). Elles peuvent être libres ou fixés sur un support, leur taille varie de moins d'un micromètre tel l'algue *Prochlorococcus* (0.5µm) à plusieurs dizaines de mètres pour les *Macrocystis* (60 m) (Leclerc, 2010).

Il est difficile de déterminer le vrai nombre d'espèces vu leur diversité inconnue et leur recensement et classification. Dernièrement, le nombre d'espèces recensées est de 136207 (Guiry, 2014).

1.2- Structure des algues :

1.2.1. Les macro-algues

Les macro-algues sont constituées à leur base par des crampons, leur permettant de se fixer sur un support. Elles absorbent les nutriments par toute la surface du thalle en contact avec l'eau. Les crampons sont surmontés d'un pédoncule de longueur et de diamètre variable, le stipe. L'algue se termine par une fronde qui peut être découpée en filaments, cordons ou lanières (figure 1) (Hortense, 2011).

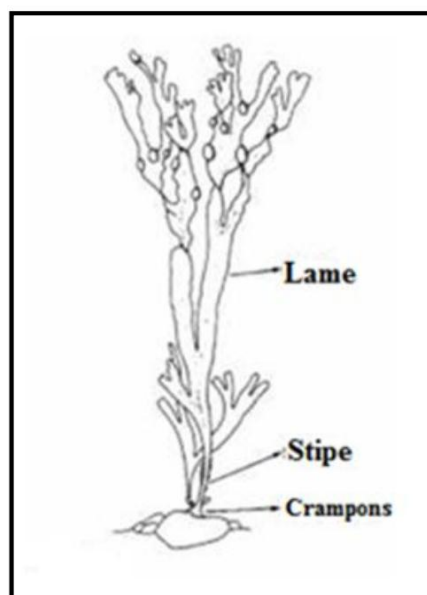


Figure 1 : Représentation schématique d'une macro-algue brune de type fucale (Person, 2011).

1.2.2. Les micro-algues :

La cellule unique des micro-algues unicellulaires est capable d'assurer toutes les fonctions. Leur taille est d'une dizaine de microns (figure 2) et la plupart d'entre elles sont adaptées à la flottaison. De nombreuses espèces possèdent un ou plusieurs flagelles mobiles qui leur confèrent une véritable aptitude à la nage (**Hortense, 2011**).



Figure 2 : Photo d'un Micro-algue au microscope électronique (**Person, 2011**).

1.3- Composition des algues :

Les algues marines ont une grande valeur biologique due à leurs richesses en :

- **Fibres** : de 33 à 61% (**Lahaye, 1991**).
- **Calcium** : les algues sont une source abondante de ce minéral qui peut être jusqu'à 34% de la matière sèche (**Frestedt et al., 2008**).
- **Vitamines** : surtout la vitamine B 12 à des teneurs assez importantes contrairement aux plantes terrestres (**Watanabe et al., 1999**).
- **Iode** : la teneur en iode des algues brunes est exceptionnelle et peut atteindre jusqu'à 14296 mg/kg de matière sèche (**Maro et al., 1999**).
- **Protéines** : les phycobiliprotéines sont les principaux pigments des algues rouges (phycoérythrine) et bleues (phycocyanine), possèdent des propriétés antioxydante utilisées dans les traitements de certains cancers et maladies inflammatoires liées au stress oxydatif (**Pàdula et Bioteux, 1999**).

○ **Polyphénols** : appelés phlorotannins chez les algues, ils sont présents surtout dans les phéophycées et montrent une activité antioxydante dans les tests *in vitro* (**Schibata et al., 2008**).

○ **Caroténoïdes** : des puissants antioxydants, les algues brunes sont riches en plus des fucoxanthine, β -caroténoïdes et violaxanthine. De nombreuses études ont démontré l'activité antioxydante des caroténoïdes et leurs effets préventifs contre les pathologies liées au stress oxydatif (**Yan et al., 1999**).

1.4- Conditions de vie :

Il y a des algues pratiquement partout sur notre planète. Très peu exigeantes, il leur suffit d'un brin de lumière et d'un soupçon d'eau pour se développer. La plupart des algues vivent en effet dans les océans, elles y représentent plus de 90% des végétaux. Les grandes algues vivent plutôt le long des côtes rocheuses, depuis la zone balayée par les marées jusqu'à 150 voire 200 mètre de profondeur (**Leclerc, 2010**).

1.5- Grands groupes des algues

Selon leur pigmentation, les algues sont divisées en trois groupes : les chlorophycées, les rhodophycées et les phéophycées (**Mohamed et al., 2012**).

Les Chlorophycées (algues vertes) : qui jouent un rôle important dans l'oxygénation des eaux. Elles sont de formes très variées, uni- ou pluricellulaires. Leurs plastes sont colorés en vert par les chlorophylles a et b, aux quelles sont associés aux carotènes et xanthophylles. La photosynthèse permet la formation d'amidon, comme pour les plantes supérieures. La plupart des algues vertes vivent en eau douce ou en milieux marins, mais certaines espè_ces peuvent également se développer sur terre (**Pérez, 1997**).

Les Rhodophycées (algues rouges) : l'association de la phycoérythrine à d'autres pigments chlorophylliens est à l'origine de la coloration rosâtre des plastes de ces algues. Les Rhodophycées sont des organismes pluricellulaires d'origine marine divisés en deux grands groupes, en fonction de leur cycle de reproduction : les *Bangiophycées* et les *Floridéophycées* (**Guillaume, 2010**).

Les Phéophycées (algues brunes) : de structure généralement pluricellulaire et de dimensions très variables, la majorité de ces algues vivent en milieu marin et présentent une couleur brunâtre résultant de l'association de pigments dominants, à savoir la xanthophylle et la fucoxanthine (**Guillaume, 2010**).

Les Cyanophycées (algues bleues) : elles possèdent des pigments surnuméraires bleus (phycocyanines) et rouges (phycoérythrines) qui masquent la chlorophylle a. en dépit de leur nom ancien d'algues bleues, elles sont rarement bleues mais plus souvent rouges, vertes avec des reflets bleutés, violets, bruns, jaunes ou orangés. La plupart d'entre elles ont une consistance gélatineuse voire gluante en raison des mucilages qu'elles sécrètent (Ainane, 2011).

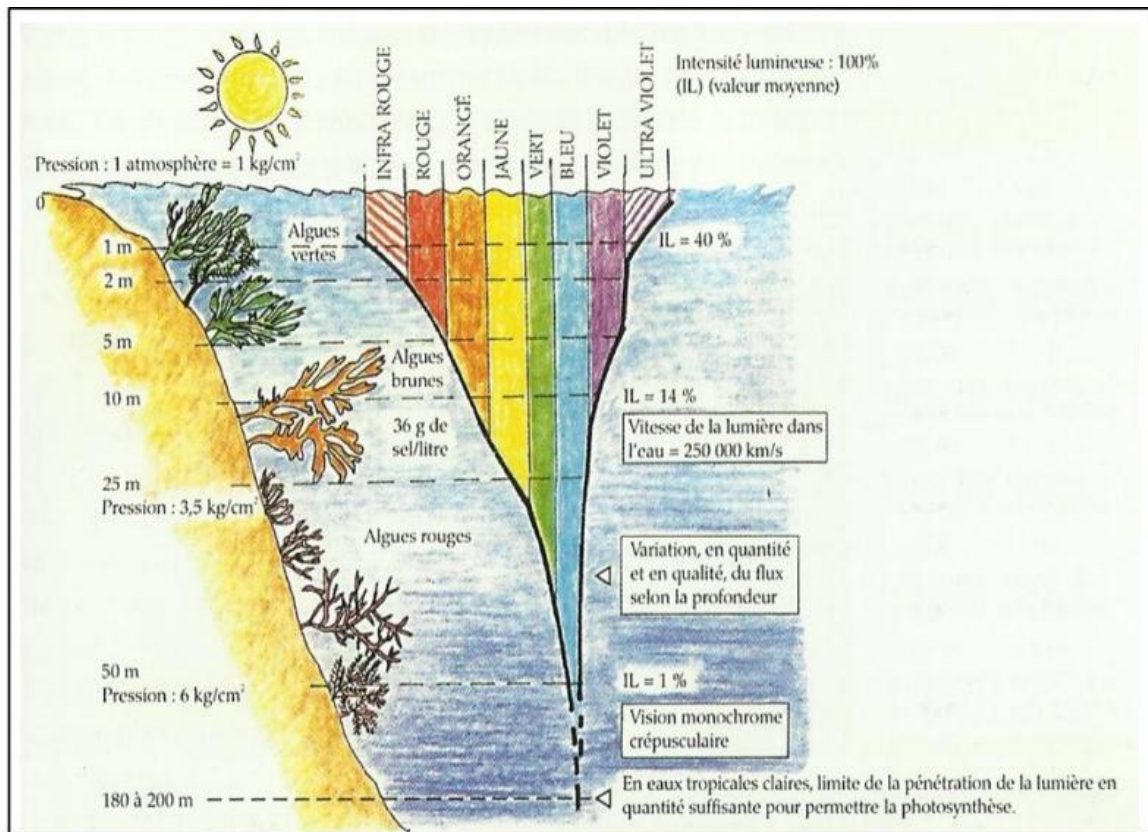


Figure 3 : Distribution des algues selon l'intensité lumineuse (Leclerc, 2010).

2- Présentation générale des algues brunes :

Les algues brunes, ou Phéophycées, forment une classe d'organismes photosynthétiques presque exclusivement marins qui appartiennent au phylum des Hétérokontes, ou Straménopiles. Elles sont communes dans le monde entier : elles se développent essentiellement dans les eaux tempérées profondes mais également dans les eaux tropicales chaudes. Une diversité très importante de la taille et de la forme des thalles est observée au sein de cette classe. La coloration brune de ces organismes est attribuée à la prédominance de pigments orangés, tels que les carotènes et les xanthophylles, par rapport aux chlorophylles (a, C₁ et C₂).

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

Leur croissance est apicale et leur cycle de vie est diplohaplontique isomorphe. L'ordre des Dictyotales se compose d'une large famille, les « Dictyotaceae », ainsi que d'une famille peu commune, celles des « Scoresbyellaceae ». La famille des Dictyotaceae se subdivise en deux tribus, les « Dictyoteae » et les « Zonarieae » sur la base du nombre de cellules méristématiques aux sommets des thalles (De Clerck et al., 2006)

2.1- Présentation de *Dictyota dichotoma* :

2.1.1. Position systématique :

Le genre *Dictyota*, ainsi que 14 autres genres, fait partie de la tribu des Dictyoteae qui est celle comptant le plus grand nombre d'espèces parmi les Dictyotaceae. Plus précisément, il existe 76 espèces de *Dictyota* réparties dans l'ensemble des mers et océans. En mer Méditerranée, seules six espèces sont recensées : *D. dichotoma*, *D. fasciola*, *D. linearis*, *D. ciliolata*, *D. mediterranea* et *D. spiralis*.

2.1.2. Description morphologique :

Les espèces appartenant au genre *Dictyota* présentent une grande diversité morphologique même si pour la plupart d'entre-elles un thalle aplati en forme de lanières est observé. L'espèce de *Dictyota dichotoma* possède des rameaux couchés, avec des marges lisses, dentées, crénelées et des ramifications dichotomiques, alternées. La forme de l'extrémité du thalle est arrondie qui mesurent entre 5 et 10 mm de large comme il représenté dans la Figure (4). La taille des individus varie entre 5 et 50 cm en fonction du genre et de son stade de vie. Ces algues se fixent au substrat par des rhizoïdes, se terminant par des disques adhésifs, d'une manière soit basale soit marginale. La couleur de ces algues montre différentes nuances de brun. Les pigments bruns (principalement la fucoxanthine) prédominent et masquent la couleur verte due à la présence des chlorophylles a et c.



Figure 4 : Thalles de *Dictyota dichotoma* <http://www.algaebase.org/>
<http://www.habitas.org.uk/marine/marine-life/species.asp?item=ZR4570>

2.1.3. Métabolites secondaires des Dictyotaceae :

D'un point de vue chimique, au sein des algues brunes les espèces issues de la famille des Dictyotaceae se distinguent par une production riche en métabolites secondaires : avec plus de 500 molécules, elles représentent en effet près d'un tiers des composés décrits dans cette classe d'organismes (**MarinLit, 2013**). Ces métabolites sont majoritairement des terpènes qui peuvent être classés en deux groupes :

➤ les terpènes "sensu stricto" désignant des composés dont la formule générale découle de $(C_5H_8)_n$, et qui sont constitués d'une ou plusieurs unités isopréniques. Ces substances à plusieurs unités isopréniques sont obtenues à partir du métabolisme des précurseurs bien définis. En fonction du nombre de ces unités, (**Ruzicka, 1959**) a proposé la nomenclature suivante :

- les monoterpènes (C_{10}) dérivant du géranyl pyrophosphate (GPP),
- les sesquiterpènes (C_{15}) provenant du farnésyl pyrophosphate (FPP),
- les diterpènes (C_{20}) ayant comme précurseur le géranylgéranyl pyrophosphate (GGPP),
- les sesterpènes (C_{25}) dérivant du géranylfarnésyl pyrophosphate (GFPP),
- et enfin les triterpènes (C_{30}), les tétraterpènes et caroténoïdes (C_{40}).

➤ les terpènes à biogenèse mixte dits "méroterpènes" comprenant un noyau méthyl hydro-quinonique plus ou moins substitué sur lequel est fixée une chaîne latérale terpénique souvent oxygénée. Dans cette classe de terpènes, on distingue pour les Dictyotaceae deux groupes principaux constitués par les méroditerpènes et les

mérosesquiterpènes. Ces composés pouvant être linéaires (chaîne latérale terpénique linéaire), cyclisés (chaîne latérale contenant un ou plusieurs cycles carbonés).

Les algues brunes peuvent renfermer des structures terpéniques halogénées du fait de la présence d'halopéroxydase (enzyme impliquée dans les réactions d'halogénéation) (La Barre *et al.*, 2010). De manière générale, les espèces appartenant au genre *Dictyota* renferment principalement des diterpènes, comme présenté dans la figure (5). (Blunt *et al.*, 2005)

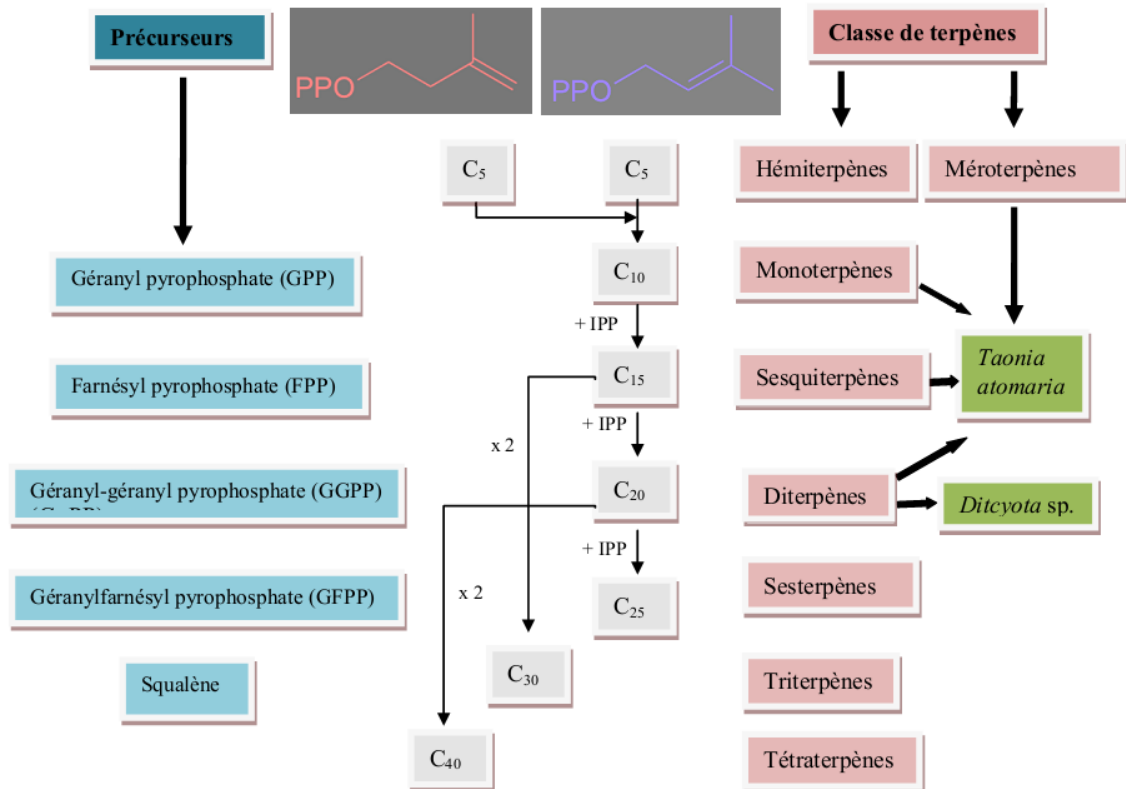


Figure 5 : Description des différentes classes de terpènes (IPP = Isopentényl-pyrophosphate)

2.1.4. Éléments biologiques et écologiques :

D'un point de vue biologique, l'espèce de *Dictyota dichotoma* est dioïque c'est-à-dire qu'elle porte les organes mâles et femelles sur des pieds séparés. Leur cycle de reproduction est diphasique isomorphe faisant intervenir une alternance de deux générations semblables (Gayral & Cosson, 1986). Il s'agit d'espèces annuelles dont le thalle disparaît en hiver alors que leur taux maximal de croissance intervient pendant le printemps et jusqu'au début de l'été.

Concernant leur distribution géographique, ces algues sont largement répandues dans l'ensemble des mers du globe. Elles se rencontrent essentiellement dans les eaux tropicales

et subtropicales chaudes et tempérées (De Clerck *et al.*, 2006), mais elles peuvent atteindre les régions tempérées froides des hémisphères nord et sud (Paula *et al.*, 2011).

L'habitat de ces algues est diversifié : elles sont présentes jusqu'à des profondeurs de 30m (Simeonidis, 1995), ainsi que dans les cuvettes de l'étage médiolittoral moyen et inférieur. Elles préfèrent les eaux claires peu battues où elles se fixent sur des fonds rocheux et elles sont capables de supporter un certain taux de pollution organique. Elles sont souvent épiphytes sur diverses algues et gorgones (Gayral et Cosson, 1986).

Les différentes espèces de *Dictyota* sont réparties sur les cinq continents, principalement dans les eaux chaudes et tempérées. *Dictyota dichotoma* est l'espèce-type du genre *Dictyota*. Elle est très commune en Europe, que ce soit en mer Méditerranée (du détroit de Gibraltar jusqu'en Turquie) ou le long de la façade Atlantique (des Açores à la Norvège). Elle est également présente en mer Rouge, en mer Noire, au Japon et dans l'océan Indien.

Chapitre II : Généralités sur les microorganismes

1- Définition des microorganismes :

Le terme microorganismes regroupe de façon assez impropre une grande diversité d'êtres vivants généralement unicellulaires. On distingue les procaryotes (Bactéries et Archaea) dont les cellules ne possèdent pas de noyau et les eucaryotes (Champignons, Levures et Protozoaires) qui possèdent un noyau. Les virus sont généralement considérés comme faisant partie des microorganismes mais leur incapacité à se reproduire en l'absence de cellules hôtes les range à part dans la taxonomie du vivant (Parazols, 2007).

Les microorganismes revêtent une importance capitale dans les domaines comme :

1) **L'industrie alimentaire** : nombreux produits de consommation élaborés grâce aux microorganismes. C'est le cas des yaourts, des fromages et autres produits laitiers ;

2) **L'énergie** : gaz naturel exclusivement produit par l'activité des germes. Ils interviennent surtout dans les processus de décontamination des sites pollués par les hydrocarbures ;

3) **L'agriculture** : rôle clé des microorganismes dans les transformations de la matière organique. Les différentes activités des groupes de microorganismes du sol assurent la mise à disposition de composés minéraux facilement assimilables par la plante et nécessaires pour son développement. Au nombre de ces microorganismes on peut citer les cellulolytiques, les ammonifiants, les nitrifiants, les amylolytiques, les bactéries fixatrices d'azote, etc (Asimi, 2009).

2- Notion de pouvoir pathogène :

Une bactérie pathogène est une bactérie capable de provoquer une infection chez un sujet sain après pénétration dans l'organisme vivant et modification de structure cellulaire d'un ou plusieurs tissus. On parle alors de maladie bactérienne infectieuse (Nicklin, 2000).

Les bactéries sont classées selon le pouvoir pathogène en :

Bactéries pathogènes :

Ce sont les bactéries qui possèdent des caractéristiques spécifiques leurs permettant de déclencher une infection. Ces caractéristiques représentent les facteurs de virulence : les toxines, les hémolysines et les systèmes chélateurs de fer. La mobilité, l'adhésion et le chimiotactisme bactérien sont aussi considérés comme des critères renforçant la virulence chez une bactérie pathogène (Chouder, 2006).

Le pouvoir pathogène dépend de l'espèce bactérienne en cause, ainsi pour un même pouvoir pathogène, il peut y avoir des souches plus ou moins virulentes. Exemple : *Shigella dysenteriae* et *Shigella flexneri* sont toutes les deux responsables d'une dysenterie bacillaire, mais pas avec les mêmes doses. Quelques bactéries suffisent pour développer une infection avec *S. dysenteriae* alors que plusieurs milliers sont nécessaires avec *S. flexneri*. Cette espèce est donc considérée comme moins virulente que *S. dysenteriae* (Pelmont, 1993).

Bactéries opportunistes :

Les bactéries opportunistes ne donnent habituellement pas de maladie chez les sujets sains. En revanche, elles peuvent devenir pathogènes chez les sujets aux défenses immunitaires altérées. Se sont souvent des bactéries commensales qui vivent à la surface de la peau et des muqueuses de l'homme, et des animaux, suite à une antibiothérapie ou immunodépression elles vont proliférer (Chouder, 2006).

3- Quelques espèces bactériennes :

3.1- *Pseudomonas aeruginosa* :

C'est un bacille pyocyanique (bacille du pus bleu) fréquemment isolé en bactériologie médicale. Il est commensal du tube digestif mais peu abondant chez le sujet sain, il occasionne de nombreuses infections chez les sujets fragilisés. Il produit deux pigments qui diffusent dans le milieu de culture : la pyocyanine (bleu vert) soluble dans le chloroforme et la pyoverdine (jaune vert) fluorescent et soluble dans l'eau. Il existe de rares souches produisant d'autres pigments (noir ou rouge) mais surtout 10% de souches sont non pigmentées. La production de pigments est favorisée sur les milieux de King A pour la pyocyanine et B pour la pyoverdine (Chouder, 2006).

❖ **Caractères bactériologiques :**

C'est un bacille Gram négatif, aérobic strict, mobile à ciliature polaire monotriche possédant les caractères biochimiques suivant d'après **Delarras (2010)** :

- Caractère en commun : Oxydase+.
- D'autres caractères sont utiles pour le diagnostic d'espèce : indole-, urée-, TDA- (tryptophane-désaminase), H₂S-, gélatine+, Nitrate-réductase+, ONPG- (orthonitrophényl-galactose), LDC-(Lysine-décarboxylase), ODC- (Ornithine-décarboxylase), ADH+(Arginine-déshydrogénase).

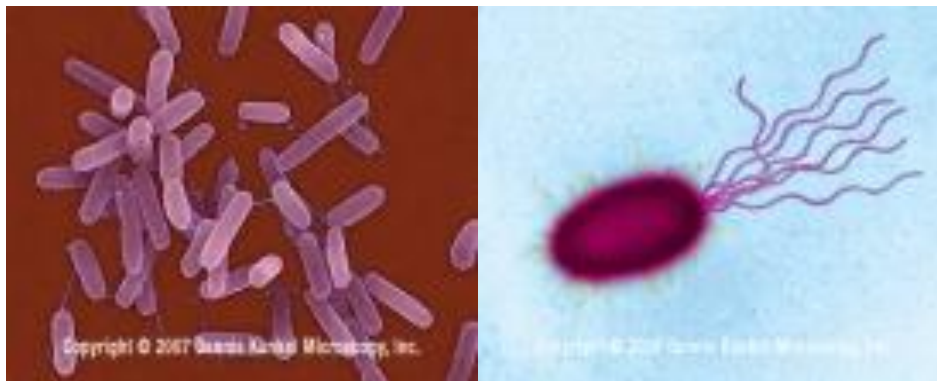


Figure 6 : *Pseudomonas aeruginosa* au microscope électronique
<http://education.denniskunkel.com>.

3.2- Escherichia coli :

C'est un bacille Gram négatif, anaérobie facultatif possédant des cils péritriches et flagelles. C'est une bactérie commensale du tube digestif des animaux et de l'homme. La seule présence des populations d'*E. coli* dans l'intestin crée une compétition pour le territoire et les sources alimentaires, limitant ainsi les invasions par d'autres espèces bactériennes (**Blanc et al., 2006**).

E. coli est largement utilisées en génie génétique pour l'obtention de l'insuline glargine analogue de l'insuline humaine (**Scheen, 2004**).

❖ **Caractères bactériologiques :**

Ce sont des bacilles à 70% mobiles, non sporulés, de 2,5µm de long et 0,6µm de large. Elles présentent les caractères mentionnées dans le tableau suivant d'après **Nicklin (2000)** :

Tableau 1 : Caractères biochimiques d'*Escherichia coli*

Caractères d'identification	
➤ Glucose + (production de gaz)	➤ ONOG+
➤ H ₂ S -	➤ Citrate de Simons -
➤ Lactose +	➤ VP -
➤ Manitol +	➤ Uréase -
➤ Sorbitol +	➤ TDA -
➤ β-galactosidase +	➤ Indole +

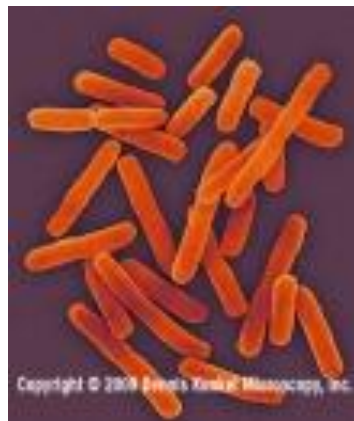


Figure 7 : *Escherichia coli* au microscope électronique
<http://education.denniskunkel.com>

3.3- *Staphylococcus aureus* :

S. aureus étant un organisme vivant procaryote et une bactérie à Gram positif, il se retrouve donc dans le règne bactérien puis dans le phylum firmicutes. Sa taxonomie complète le positionne dans la classe des Bacilli puis dans l'ordre des Bacilliales et à la famille des Staphylococcacées. Cette famille comporte les genres *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Salinicoccus*, *Macroccoccus*, ainsi que le plus important le genre *Staphylococcus* où il y a l'espèce *S. aureus* (Robert, 2013).

❖ Caractères bactériologiques :

On retrouve les staphylocoques en amas irréguliers de bactéries ou regroupés par deux (diplocoques) ou par quatre (tétraèdres). Ces petits amas forment souvent des grappes et c'est grâce à l'examen direct que la bactérie a été nommée par Ogston (1884) (Robert, 2013).

En effet, son nom dérive du grec « staphyle » qui signifie tout simplement grappe de raisin. Les staphylocoques ont été observés par Robert Koch (1878) puis reconnus par Louis

Pasteur (1880) et après une coloration de Gram, ils se révèlent être des Cocci Gram positif, d'environ 0,5 à 1µm de diamètre. Ils sont immobiles et non sporulés. La majorité des *S. aureus* sont capsulés mais ils peuvent perdre leur capsule après culture.

Cette bactérie est catalase+, oxydase-, glucose+ (sans dégagement de gaz), coagulase+ et Mannito1+ (Callon, 2008).



Figure 8 : *Staphylococcus aureus* observé au microscope électronique
<http://education.denniskunkel.com>

3.4- *Klebsiella pneumoniae* :

K. pneumoniae est une bactérie appartenant à la famille des Enterobacteriacées, elle représente l'espèce type du genre *Klebsiella*. Elle fait partie de la flore commensale de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux en faible quantité (Raud, 2003).

❖ Caractères bactériologiques :

C'est un bacille Gram- de 1 à 4 µm de long sur 0,4 à 0,6 µm de large, immobile généralement entouré de capsule polysidique donnant un aspect muqueux typique du genre. C'est une bactérie aéro-anaérobie facultative qui présente les caractères biochimiques représentés dans le Tableau (2) (Raud, 2003).

Tableau 2 : Caractère biochimiques de *Klebsiella pneumoniae*

Caractères d'identification	
➤ Oxydase –	➤ VP +
➤ Catalase +	➤ Tryptophane désaminase –
➤ Nitrate réductase +	➤ Arginine dihydrolase –
➤ Glucose +	➤ Ornithine décarboxylase –
➤ β-galactosidase +	➤ Production H ₂ S -



Figure 9 : *Klebsiella pneumoniae* au microscope électronique
<http://education.denniskunkel.com>

3.5- Bacillus cereus :

B. cereus est une bactérie Gram positive mobile, aéro-anaérobie facultative dont la cellule végétative mesure 3 à 5 μm de long pour un diamètre de 1 à 2 μm . elle peut se développer à des pH variant de 4,3 à 9,3. Sa tolérance au sel est relativement élevée puisqu'elle peut croître à des teneurs en NaCl atteignant 18%. Elle fait partie des pathogènes puisqu'elle produit deux toxines pouvant être à l'origine de toxi-infections alimentaires collectives. Les spores de *B. cereus*, bien que de résistance moyenne, sont capables de survivre aux températures utilisées lors de pasteurisations basses (Guillard, 2003).

Cette bactérie est catalase +, VP +, citrate +, nitrate +, gélatine + (Archambaud, 2007).



Figure 10 : *Bacillus cereus* au microscope électronique à balayage
<http://www.bacteriainphotos.com>

3.6- Listeria monocytogène

Le genre *Listeria* comporte 8 espèces dont l'espèce *monocytogenes*, pathogène pour l'Homme et les animaux et l'espèce *ivanovii*, pathogène pour les animaux et rarement pour l'Homme. *Listeria monocytogenes* est responsable d'une maladie touchant l'Homme et les animaux (zoonose) appelée la listériose.

Listeria est un petit bacille (0,5 - 2 μm x 0,5 μm), Gram positif, isolé ou en chaînettes, mobile à 20-25 °C, non sporulé. Aéro-anaérobie facultatif, catalase positive sauf de rares

souches, hydrolysant l'esculine, oxydase négative, *Listeria* fermente de nombreux glucides sans production de gaz.

Les souches de *L. monocytogenes* sont toujours D-xylose négatives et produisent des lécithinases. Elles sont généralement β -hémolytiques et L-rhamnose positives (OMS, 2011).

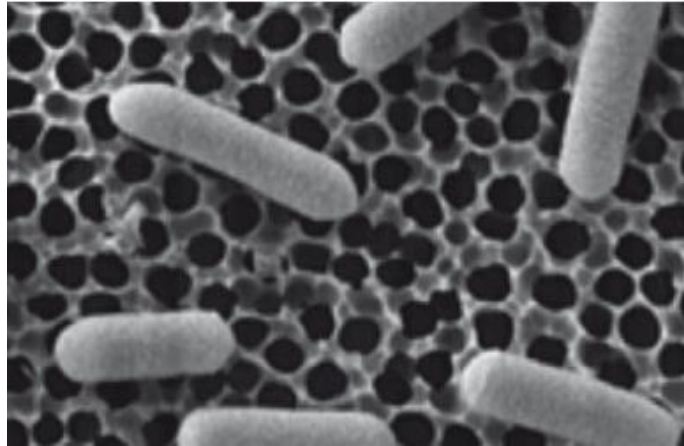


Figure 11 : *Listeria monocytogenes* au microscope électronique à balayage

© CNR-CCOMS des *Listeria*, Institut Pasteur, Paris

Chapitre III : Radicaux libres et les antioxydants

1- Introduction :

L'oxygène est la source de vie pour les organismes aérobies ; mais il peut être aussi une source d'agression pour ces organismes. En effet, des radicaux hautement réactifs dérivés de l'oxygène peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons U.V, des radiations ionisantes et de métaux de transition (Ekoumou, 2003). Leurs conséquences au niveau de l'organisme se font ressentir sur l'ADN, les lipides et les protéines (Ahamet, 2003).

2- Radicaux libres :

Un radical est une molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur ses orbitales électroniques externes. La présence d'un électron célibataire confère souvent à ces molécules, une grande instabilité et donc une durée de vie très courte (Lacolley, 2007).

Parmi les espèces réactives oxygénées (ERO), un ensemble restreint de ces composés jouent un rôle particulier en physiologie à savoir :

Les radicaux primaires : tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}), le radical peroxyde (ROO^{\bullet}) et le radical alkoxyde (RO^{\bullet}).

Les radicaux secondaires : tels que l'oxygène singulet O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le nitroperoxyde ($ONOOH$), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Favier, 2003).

2.1- Origine des radicaux libres :

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques afin de détruire les bactéries à l'intérieur des cellules immunitaires (macrophages, polynucléaires), d'inactiver les virus ou pour réguler des fonctions cellulaires létales comme l'apoptose (Favier, 2003).

La Figure (12) et (13) représentent les origines intra et extracellulaire des radicaux libres oxygénés.

- Les sources endogènes des radicaux libres se situent au niveau des chaînes mitochondriales des cellules aérobiques de l'organisme. Les radicaux libres peuvent également être formés au niveau du réticulum endoplasmique, du cytoplasme et de la membrane cytoplasmique (figure 12). Dans le muscle, les sites de production sont aussi les lysosomes, les peroxysomes, le réticulum nucléaire et sarcoplasmique, le sarcolemme et le sarcoplasme (Thiebault et Sprumont, 1997).
- Les sources exogènes sont multiples : l'oxygène et l'oxygène hyperbare, les radiations (UV, rayons gamma) et certains toxiques comme la bléomycine, le benzopyrène et les polluants atmosphériques (Thiebault et Sprumont, 1997).

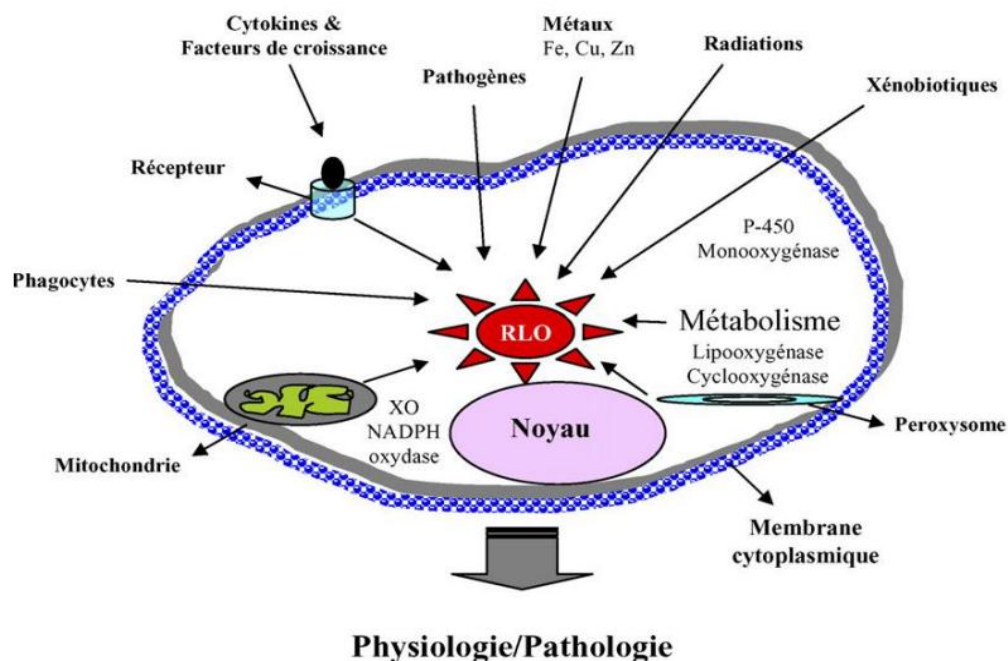


Figure 12 : Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène.
XO : xanthine oxydase ; P-450 : cytochrome P-450 (Afonso et al., 2007).

2.2- Natures des radicaux libres :

2.2.1. Espèces réactives dérivés de l'oxygène (ERO) :

L'oxygène doit sa grande réactivité à sa structure particulière. En effet, il possède deux électrons célibataires non appariés sur sa couche orbitale externe. Cette molécule est essentielle au bon Fonctionnement de l'organisme (Favier, 2003).

a) Ion superoxyde $O_2^{\cdot-}$:

L'ion super oxyde $O_2^{\cdot-}$ est un dérivé très réactif de l'oxygène, relativement stable, il n'est pas très toxique pour l'organisme, mais il est à l'origine de cascades de réactions conduisant à la production de molécules très nocives (Hadi, 2004).

b) Radical libre hydroxyle OH^{\cdot} :

Le radical libre hydroxyle (OH^{\cdot}) est très réactif. Il peut réagir avec de nombreuses molécules comme l'ADN, les glucides, les nucléotides, les protéines et être à l'origine de lésions de nécrose. C'est un dérivé de l'ion super oxyde (Hadi, 2004).

c) Oxygène singulet O_2 :

Lorsque de l'énergie est apportée à l'oxygène, celui-ci passe à l'état singulet qui représente la forme activée. C'est une forme très énergétique de grande réactivité qui peut oxyder de nombreuses molécules. Il est formé à partir de l'ion superoxyde selon la réaction suivante :

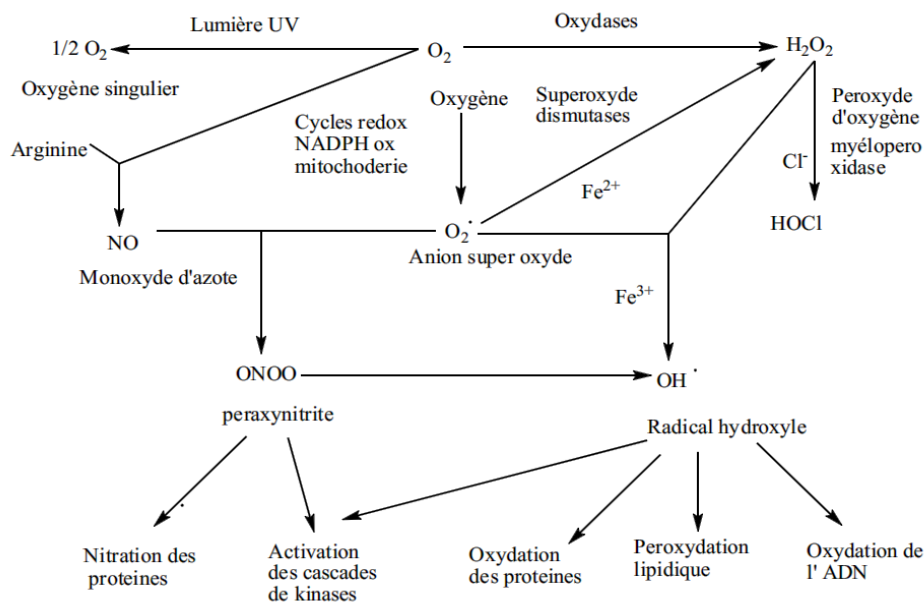


Figure 13 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003).

2.2.2. Espèces libres non oxygénées :

Les espèces libres non oxygénées sont les produits des réactions de certaines molécules avec les espèces réactives dérivées de l'oxygène.

Ils peuvent à leur tour réagir avec d'autres molécules et être à l'origine de la multiplication des réactions d'oxydation et de la propagation de dommages oxydatifs. Nous citerons, par Exemple :

Les acides gras peroxydés, résultats de l'action des espèces oxygénées sur les membranes biologiques.

Les fractions protéiques, les acides aminés et les acides nucléiques peuvent aussi réagir avec les ERO générant des molécules réactives et nocives. (Novelli, 1997).

2.3- Action biologique des radicaux libres :

Les RL réagissent particulièrement sur les macromolécules lipidiques, protéiques, glucidiques et nucléiques. La réaction initiale stimule d'autres réactions, ce qui accroît la production de radicaux libres. Le résultat de ces perturbations est un dysfonctionnement cellulaire menant à des désordres inflammatoires, à des troubles immunologiques, à des problèmes neurologiques, à des mutations génétiques et au vieillissement (Poortmans et Boisseau, 2003).

2.4- Défenses contre les radicaux libres :

L'organisme limite la formation et la propagation des radicaux libres par deux mécanismes :

- Des systèmes enzymatiques spécifiques (antioxydants endogènes)
- Des antioxydants d'origine alimentaire ou synthétique (antioxydants exogènes)

➤ **Les antioxydants endogènes** : ce sont des enzymes capables de transformer les radicaux libres en dérivés inoffensifs. Le superoxyde dismutase (SOD) transforme l'anion superoxyde en eau oxygénée, ce produit toxique va être ensuite dégradé par la catalase et la glutathion peroxydase (Poortmans et Boisseau, 2003).

➤ **Les antioxydants exogènes** : ils sont présents dans l'alimentation telle que les vitamines C et E, les caroténoïdes, les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins et le sélénium. D'autres sont des dérivés phénoliques d'origine synthétique (butylhydroxyanisole, butylhydroxytoluène, propylgallate) qui agissent comme la vitamine E (Allane, 2009).

2.5- Radicaux libres et stress antioxydant :

L'oxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant de la matière organique. Mais nos cellules

convertissent une partie de cet oxygène en métabolites toxiques : les radicaux libres organiques (**Lesgards, 2000**).

Ces espèces radicalaires très instables et très réactives sont produites d'une manière continue au sein de notre organisme, dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques. Par exemple, lors de la respiration cellulaire, l'oxygène moléculaire se transforme en diverses substances oxygénées, communément appelées radicaux libres de l'oxygène ou espèces réactives oxygénées (Reactive Oxygen Species : ROS) (**Gutteridge, 1993**).

Dans certaines situations, cette production augmente fortement, entraînant un stress oxydatif que l'on définit comme un déséquilibre entre la production et la destruction de ces espèces (**Gutteridge, 1993**). Ce déséquilibre est à l'origine de nombreux facteurs, notamment les polluants présents dans l'air que nous respirons et l'eau et les aliments que nous consommons. Les rayons ultraviolets du soleil, d'autres radiations, la fumée de tabac et l'exercice excessif sont également des facteurs qui augmentent considérablement la présence des radicaux libres dans notre système (**Favier, 2003**).

En raison de leur capacité à endommager les cellules, les tissus et les organes, les espèces réactives de l'oxygène sont impliquées dans un grand nombre de pathologies, tant aiguës que chroniques (**Gutteridge, 1993**).

3- Antioxydants :

3.1- Définition :

Les antioxydants sont des composés chimiques capables de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique, sans effet sur les propriétés sensorielle et nutritionnelle du produit alimentaire. Ils permettent le maintien de la qualité et d'augmenter la durée de conservation du produit.

En outre, l'antioxydant alimentaire idéal, doit être soluble dans les graisses, efficace à faible dose, et non toxique, n'entraîne ni coloration, ni d'odeur, ni saveur indésirable, résistant aux processus technologiques, il est stable dans le produit fin (**Hellal, 2011**).

3.2- Mécanisme d'action :

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques cas de dérivés du phénol.

En plus leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire.

Les antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires.

D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puissent réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur (Hellal, 2011).

3.3- Utilisation des antioxydants :

- Dans l'industrie chimique : pour éviter le durcissement du caoutchouc ou en métallurgie pour protéger les métaux de l'oxydation.
- Dans l'industrie agro-alimentaire : pour éviter le rancissement des corps gras.
- Dans l'industrie teinturerie : pour éviter l'oxydation des colorants au soufre ou des colorants de cuve lors de la teinture (Bouhadjra, 2011).

3.4- Classification des antioxydants :

Les antioxygènes sont classés dans trois catégories différentes :

- Les antioxydants synthétiques.
- Les substances synergiques.
- Les antioxydants d'origine végétale (Bouhadjra, 2011).

3.4.1. Antioxydants synthétiques :

Parmi les antioxydants phénoliques de synthèse qui sont autorisés dans certains aliments : Le BHT 321 (3,5-ditertiobutyl-4-hydroxytoluène), BHA 320 (3-tertiobutyl-4-hydroxyanisole), sont l'un et l'autre soluble dans les lipides et résistent bien à la chaleur.

Ils ont une action synergique, ils présentent l'inconvénient d'avoir une odeur désagréable et s'évapore rapidement. Le TBHQ (tertiobutyl-hydroxyquinone) est moins soluble dans les graisses et le PG (gallate de propyle) à l'avantage d'être relativement soluble dans l'eau, mais l'inconvénient d'être peu soluble dans les lipides, peu résistant à la chaleur et de donner avec le fer des sels de couleur foncée. Le nitrite présente des propriétés antioxydantes, il peut aussi former des nitrosamines cancérigènes. Les chélateurs de métaux utilisés et plus efficaces sont les polyphosphates et les dérivés d'acide citrique (Hellal, 2011).

3.4.2. Substances synergiques :

Ce sont des molécules qui améliorent l'action de certains antioxydants. Ce qui se traduit souvent par un accroissement de la période de protection, parmi eux se trouvent : Les acides

lactique, tartrique et ortho phosphorique et leurs sels de sodium, potassium ou calcium. Leurs propriétés peuvent s'expliquer par un effet chélatant de métaux comme le fer ou le cuivre, dont on connaît bien l'effet pro-oxydant à faible dose. Cependant, ce n'est peut-être pas la seule explication, car plusieurs de ces produits sont d'assez mauvais chélatants (*in Bouhadjra, 2011*).

3.4.3. Antioxydant d'origine végétale :

Les plantes constituent des sources très importantes d'antioxydants. Les antioxydants naturels dont l'efficacité est la plus reconnue aussi bien dans l'industrie agroalimentaire que pour la santé humaine sont : les tocophérols, les caroténoïdes et les polyphénols (*in Bouhadjra, 2011*).

a. Tocophérols :

La grande stabilité des huiles végétales, dans les conditions d'oxydation, est due à la présence d'un taux élevé d'antioxydants naturels dont les plus importants sont les tocophérols qui se présentent sous quatre formes isométriques : α , β , δ et γ . Les tocophérols protègent contre l'oxydation naturelle des acides gras, en particulier les acides gras polyinsaturés (AGPI). Ils ont signalé qu'une molécule de tocophérol peut protéger 103 à 106 molécules d'AGPI (*Burton et al., 1998*).

Exemple de Tocophérol :

La vitamine E :

La vitamine E est un antioxydant majeur liposoluble. C'est un composé amphiphile, capable de s'insérer dans les membranes cellulaires : globules rouges, cellules endothéliales, cellules musculaires, neurones (c'est le seul antioxydant du système nerveux central).

Il existe dans la nature plusieurs dérivés de la vitamine E à activités différentes (α -, β -, γ -, δ -tocophérol, tocotriénols,...). Ils sont différenciés par les substituants du noyau chromanol (noyau benzyle associé à un hétérocycle à six carbones substitués par un hydroxyle et par une chaîne latérale ramifiée saturée s'il s'agit de tocophérol ou insaturée s'il s'agit de tocotriénols) (*in Bouhadjra, 2011*).

b. Caroténoïdes :

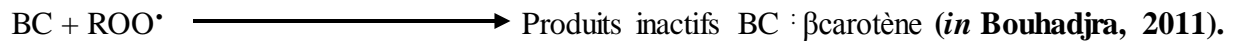
Les caroténoïdes sont, avec la chlorophylle et les anthocyanes, les pigments les plus répandus dans la nature. A ce jour, plus de 600 caroténoïdes ont été identifiés, mais seule une quarantaine est retrouvée régulièrement dans l'alimentation humaine. Une trentaine de caroténoïdes et de leurs métabolites a été identifiée dans le plasma et les tissus humains,

mais 6 caroténoïdes sont majoritaires : le β -carotène, le lycopène, la lutéine, la β -cryptoxanthine, l' α -Carotène, et la zéaxanthine (**Hale, 2003**).

Le plus important et le plus connu des caroténoïdes est le β -carotène. Il a longtemps été étudié pour son activité de provitamine A. Cependant, tous les caroténoïdes ne peuvent pas être convertis en vitamine A. Ils intéressent de plus en plus les chercheurs pour leur pouvoir antioxydant que n'a pas la vitamine A.

Les caroténoïdes peuvent agir en tant qu'antioxydants selon plusieurs mécanismes :

Ils sont capables de bloquer les chaînes de réactions radicalaires, selon les équations suivantes :



Partie expérimentale

Chapitre I : matériel végétal

1- Choix du matériel végétal :

L'organe végétal choisi de l'espèce *D. dichotoma* pour la réalisation des expérimentations de cette étude est les thalles puisque c'est à son niveau que se trouve la majorité des principales substances actives, en d'autre terme, c'est le lieu de synthèse et de la mise en réserve temporaire des principaux composés du métabolisme primaire et secondaire.

Le choix de cette espèce a pour but de valoriser la biomasse algale de la côte ouest algérienne en déterminant ses activités biologiques.

2- Station d'étude

Les prélèvements de l'algue ont été effectués pendant le mois de Mars 2015 à Salamandre (Mostaganem, 09°02'50'' longitude Ouest et 32°44'42'' l'altitude nord) (Figure 14) situés sur la côte Méditerranéenne Algérienne. Le choix de ce site est selon la disponibilité de cette algue qui est absente aux autres cotes Algérienne.

Les prélèvements ont été faits à marée basse. L'algue est lavée avec de l'eau de mer sur place puis sont emportées au laboratoire. Après séchage à l'ombre et à température ambiante les algues sont broyées à l'aide d'un mixeur en fine poudre qui sera stockée dans des flacons en verre pour son utilisation ultérieure.



Figure 14 : Photo de l'algue brune *Dictyota dichotoma* au laboratoire

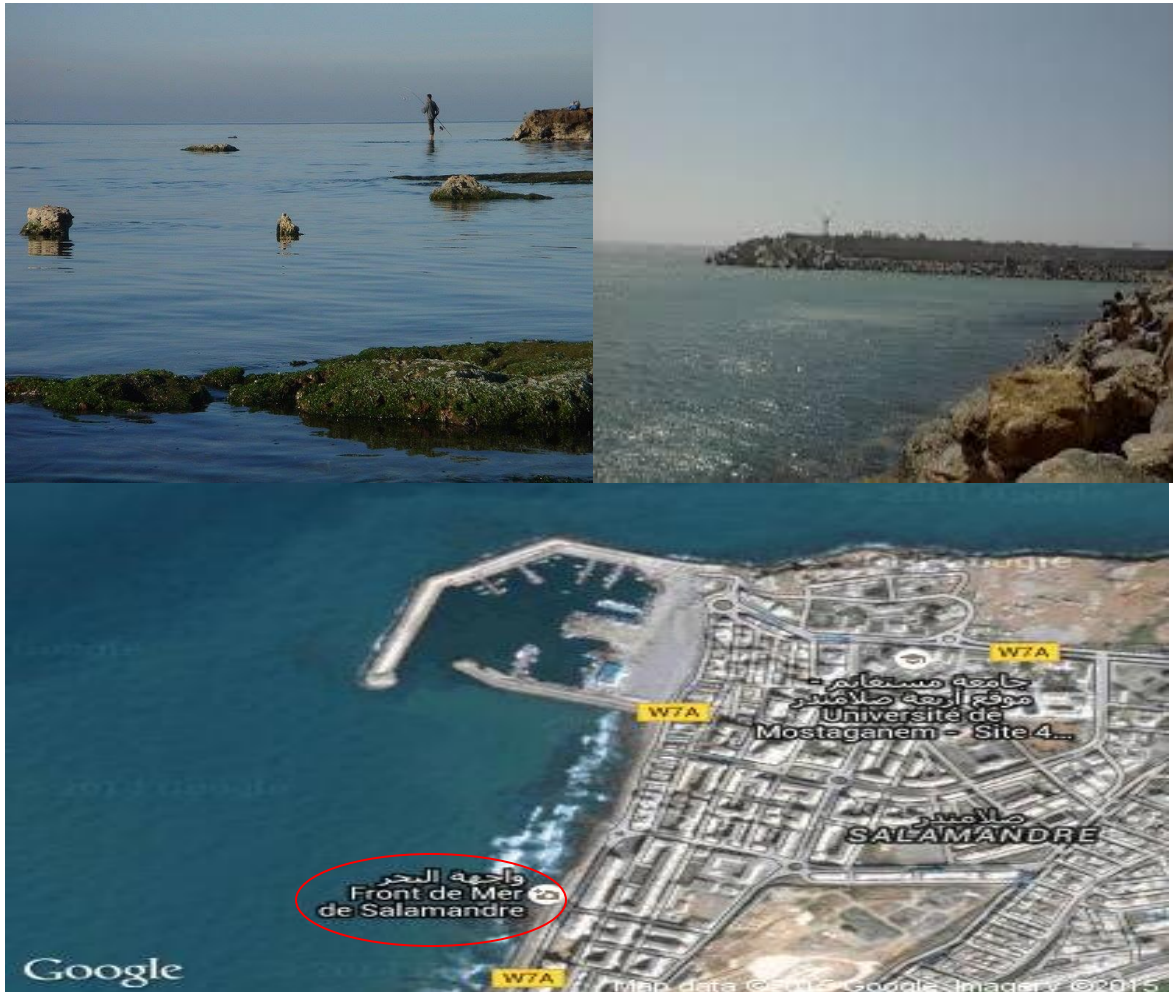


Figure 15 : Carte géographique et photographie de la station de récolte de l'algue *D. dichotoma* (Salamandre)

Chapitre II : préparation des extraits et dosages phytochimiques

1- Préparation des extraits bruts :

L'algue séchée est broyée avec un broyeur pour préparer une poudre qui est conservées à l'obscurité et dans un endroit sec. Une gamme des solvants (Méthanol, Ethanol, Acétone, Chloroforme et Hexane) ont été ajoutés à la poudre d'algue à raison 1g/10ml, ce mélange est macéré pendant 24h à température ambiante et sous agitation selon la méthode décrit par (Caccamese et al., 1980). Les extraits sont ensuite filtrés sur un papier wattman, et à l'aide d'un évaporateur rotatif (Photo 2), nous avons obtenus les résidus secs qui sont ensuite dissoutes dans un volume précis du méthanol. Les extraits obtenus pour chaque solvant sont conservées à 4°C pour les tests de différentes activités biologiques.



Figure 16 : Evaporateur rotatif de type Heidolph HB 4010

➤ **Calcul du rendement d'extraction**

Les pourcentages des extraits bruts méthanolique ont été calculés par la formule suivante :

$$R(\%) = M/M_0 \times 100$$

R : Rendement exprimé en %

M : Masse en gramme de l'extrait sec résultant

M₀ : Masse en gramme du matériel végétal à traiter

2- Tests phytochimiques :

Introduction :

L'examen phytochimique permet de détecter la présence ou l'absence des constituants chimiques essentiellement les composés phénoliques, les Saponosides, les alcaloïdes, les isoprénoides qui renferment les stéroïdes et les terpénoïdes, l'amidon et les composés réducteurs.

Ces tests phytochimiques sont basés sur :

- les essais de solubilité, des constituants de la plante, vis-à-vis des solvants organiques de polarité différente : le méthanol, l'éthanol, l'acétone, le chloroforme et l'hexane.
- des réactions de colorations et de précipitations
- l'examen sous la lumière ultraviolette comme les coumarines

➤ **Mise en évidence des phénols :**

Pour 1ml de l'extrait on ajoute 2ml de l'eau distillée et quelques gouttes de trichlorure de fer (FeCl_3) 10%. La présence des phénols est indiquée par l'apparition de couleur bleu ou vert (**Kuppusamy et al., 2014**).

➤ **Mise en évidence des alcaloïdes :**

Deux réactifs sont utilisés : réactif de Mayer et réactif de Wagner qui sont préparés

- Réactif de Mayer : 5g de KI et 1,358g de HgCl_2 solubilisés dans 100 ml d'eau distillée.
- Réactif de Wagner : 2g de KI et 1,27g d' I_2 solubilisés dans 100 ml d'eau distillée.

Ce test se fait par ajout de quelques gouttes de chaque réactif, séparément, aux différents extraits étudiés. L'apparition d'un précipité ou d'une turbidité confirme la présence des alcaloïdes (**Bruneton, 1999**).

➤ **Mise en évidence des tanins :**

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 1ml de l'extrait éthanolique, 2 ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl_3 diluée (1%). Un test révélé par l'apparition d'une coloration bleu-noire (tanins galliques), bleu-vert (tanins cathéchiques) (**Trease et Evans, 1987**).

➤ **Mise en évidence des Saponosides :**

La détection des Saponosides est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 ml de l'extrait aqueux, puis la solution est fortement agitée. Ensuite, le mélange est abandonné pendant 20 min et la teneur en Saponosides est évaluée :

- Pas de mousse = test négatif
- Mousse moins de 1 cm = test faiblement positif
- Mousse de 1-2 cm = test positif
- Mousse plus de 2 cm = test très positif (**Trease et Evans, 1987**).

➤ **Mise en évidence des composés réducteurs :**

Leur détection consiste à traiter 1 ml de l'extrait éthanolique avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling, puis chauffer. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique (**Trease et Evans, 1987**).

➤ **Mise en évidence des anthocyanes :**

2 ml d'infusé aqueux sont ajoutés à 2 ml de HCl 2N. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes (**Debray et al, 1971 ; Paris et al, 1969**).

➤ **Mise en évidence des acides aminés :**

Ce test est basé sur la réaction des acides aminés avec la ninhydrine. A 1ml de la solution à tester (solubilisée dans l'eau distillée) ajouter 1ml de solution de ninhydrine préparée dans l'acétone (ou éthanol) dont la concentration est de 1%. Chauffer dans le bain marie et observer le changement de couleur. La présence des aminoacides est confirmée par l'apparition d'une couleur violette (**Harbone, 1998**).

➤ **Mise en évidences des stérols et triterpènes :**

Les stérols et les polyterpènes ont été recherchés par la réaction de Liebermann. 5 ml de chacun des cinq extraits ont été évaporés sur bain marie. Le résidu est dissout à chaud dans 1 ml d'anhydride acétique ; nous avons ajouté 0,5 ml d'acide sulfurique concentré au triturat. L'apparition, à l'interphase, d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert, a indiqué une réaction positive.

➤ **Mise en évidence des hétérosides cardiotoniques :**

Ce test est basé sur la réaction de Keller-Kiliani. A 5 ml de chaque extrait ajouté 2 ml d'acide acétique glacial additionné d'une goutte de solution de chlorure de fer 5%, puis on ajoute 1ml d'acide sulfurique concentré. L'apparition d'un anneau brun à l'interface indique la présence des hétérosides (**Edeoga et al., 2005**).

3- Dosage des composés phénoliques :

3.1- Dosage des phénols totaux :

Le réactif utilisé est le réactif de «Folin-Ciocalteu» ; c'est un mélange de complexes des acides phosphotungstène ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolybdène ($H_3PMo_{12}O_{40}$) de couleur jaune.

Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif, elle entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleu qui absorbe à 765 nm, le dosage de PPT est effectué par la comparaison de la D.O observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue (**Dendougui, 2010**).

Les composés phénoliques totaux sont dosés de la manière suivante, 0,04 ml de l'extrait algale diluée est introduit dans un tube, l'extrait est ensuite dilué avec 3,16 ml d'eau distillée ensuite 0,2 ml du réactif de Folin-Ciocalteu est ajouté puis immédiatement après 3min il est ajouté 0,6 ml d'une solution de Na_2CO_3 20%. Le mélange obtenu est incubé à 40°C pendant environ 30 minutes. L'absorbance est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 765 nm contre une solution de méthanol utilisé comme blanc. Notons qu'une droite d'étalonnage est préalablement réalisée avant l'analyse avec de l'acide gallique dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser avec différentes concentrations (**in Maamri, 2008**).

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS) en appliquant la formule suivante donnée par Folin (**1927**).

$$C = (c \times v) / m$$

Où ; **C** : représente la teneur en phénols totaux en mg d'acide gallique /g de la matière sèche.

c : c'est la concentration de l'acide gallique établie à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml).

v : le volume de l'extrait méthanolique

m : le poids pur de la matière sèche (g).

3.2- Dosage des caroténoïdes :

Les solutions méthanolique de l'extrait algale de concentrations (1 à 4 mg/ml) sont analysées par spectrophotomètre UV-Vis Heyios \forall en 470, 653 et 666 nm. La concentration des caroténoïdes et de chlorophylles a et b a été déterminer par l'équation de **Lichenthaler et Wellburn (1985)** :

$$\text{Caroténoïde totaux (mg/l)} = 1000 \text{ Abs}_{470} - 2,860 C_a - 129,2 C_b/245$$

$$\text{Chlorophylle a (mg/l)} = 15,65 \text{ Abs}_{666} - 7,340 \text{ Abs}_{653}.$$

$$\text{Chlorophylle b (mg/l)} = 27,05 \text{ Abs}_{653} - 11,21 \text{ Abs}_{666}.$$

Chapitre III : Etudes du pouvoir antibactérien et antioxydant

1- Études du pouvoir antioxydant :

1.1- Piégeage du radical libre DPPH :

Le DPPH[•] (**1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl**) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517 nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH[•] est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH[•], qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (**Parejo et al., 2002**).

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par (**Benhammou et al., 2007**).

Le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ($C_{18}H_{12}N_5O_6$, $M=394.33\text{g/mol}$), est solubilisé dans le méthanol absolu pour en avoir une solution de 100 μM .

Un volume de 100 μl de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 2,9 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025 g/l) fraîchement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 100 μl du méthanol avec 2,9 ml d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante la lecture des absorbances est effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'acide ascorbique a été utilisé comme antioxydant standard. Le teste est répété deux fois

Expression des résultats :

✓ **Calcul des pourcentages d'inhibitions :**

Nous calculons ainsi les pourcentages d'inhibition par la formule suivante :

$$\mathbf{I \% = ((Ac-At)/Ac) \times 100}$$

Ac : absorbance du contrôle ;

At : absorbance du test effectué

✓ **Calcul des IC₅₀ :**

IC₅₀ ou concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC₅₀ pour Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH*. Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

1.2- Réduction de fer (FRAP) :

Ce test est découvert par **Oyaizu (1996)**. Ce test est considéré comme un test direct et rapide il est utilisé pour mesurer le pouvoir des antioxydants non enzymatiques, et utilisé pour déterminer l'activité antioxydant des extraits étudiés dans un milieu neutre. Ce test est basé sur la réduction des ions $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$ à des ions de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$, qui peut être mesuré leur absorbance à une longueur d'onde $\lambda = 700 \text{ nm}$. L'activité antioxydante est mesurée avec un nouveau terme appelé AEAC : qui présente l'activité antioxydante en équivalant de l'acide ascorbique des extraits étudiés (Ascorbic Acid Equivalent Antioxydant Capacity). L'évolution de l'activité antioxydante de nos extraits est comparée par rapport à l'acide ascorbique (vitamine C) et cela en traçant une courbe d'étalonnage.

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode préconisée par **Oyaizu (1986)**. En effet, 0,5 ml de différentes concentrations de chaque extrait (0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 mg/ml) dilués ont été introduits à l'aide d'une pipette dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 1 ml d'une solution de ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) (1%), 1 ml de solution tampon phosphaté (PH=6 C=0.2M). Les solutions ont été secouées immédiatement et bien mélangées, puis ils sont maintenus dans un bain marie pendant 20 minutes à une température de 50 °C. Ensuite, on ajoute 1 ml de l'acide trichloracétique (TCA 10%). On prend de chaque tube 1 ml et on introduit dans un autre tube à essai et on ajoute 1 ml de l'eau distillé, 0.2 ml de solution de FeCl_3 (0.1 %). L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 700 nm contre un blanc. Les lectures de la densité optique à 700 nm, des solutions ainsi préparées ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'extrait algale. (**Jrah, 2010**)

1.3- Analyses statistiques:

Dans toutes les expériences du dosage et d'évaluation de l'activité antioxydante. Les données expérimentales obtenues ont été exprimées en tant que la moyenne \pm l'écart-type. Le coefficient de corrélation de l'activité antioxydante a été déterminé en utilisant le logiciel XLstat 2015 et Sigma plot 12.0.

2- Etude du pouvoir antimicrobien :

2.1- Revivification des souches :

Les souches bactériennes de référence (ATCC) : en premier lieu, on réalise des repiquages sur des milieux solides (Müller Hinton Agar) et on incube pendant 24 heures dans l'étuve à 37°C pour avoir des proliférations rapides des bactéries conservées, en vue d'obtenir des souches jeunes.

2.2- Les souches testées : Afin d'évaluer leurs activités antibactérienne, les extraits d'algue préparés ont été testés sur les souches représenté sur le tableau 3 :

Tableau 3 : Description et pouvoir pathogène des souches de bactéries utilisées lors de cette étude.

<i>Gram</i>	<i>Espèces</i>	<i>Code</i>	<i>Origine</i>	<i>Pouvoir pathogène</i>
<i>Bacille Négatif</i>	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	MNHN	Gastro-entérite, infection urinaire
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	MNHN	Infection alimentaire
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IBMC Strasbourg	MNHN	
<i>Bacille Positif</i>	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 25921	LAPRONA	Infection alimentaire
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111	LAPRONA	Infection alimentaire
<i>Cocci Positif</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	MNHN	Infection alimentaire

MNHN : Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris) ; *LAPRONA* : Laboratoire des Produits Naturels (Université de Tlemcen).
ATCC : American Type Culture Collection ; *IBMC* : Institut de biologie moléculaire et cellulaire

2.3- Milieux de culture utilisés :

Les milieux de culture utilisés sont :

- Gélose Müller Hinton agar (fluka)
- BHIB (fluka)

2.4- Evaluation de l'activité antibactérienne :

➤ La résistance aux antibiotiques :

Nous avons utilisé la méthode décrite par **Younes et al. (2009)**. En effet, la détermination des propriétés antimicrobiennes des algues marines est effectuée par le test d'antibiogrammes réalisé en boîte de pétri sur Müller Hinton agar préalablementensemencée par inondation avec chacun des germes testés.

Sur les boîtes de Pétri inoculées par les germes cibles préparées préalablement, on réalise des puits (diamètre de 6 mm) qui sont remplis par la suite par une concentration de 10 µg d'antibiotique qu'il s'agit de l'ampicilline. Les boîtes de Pétri ainsi préparées sont par la suite incubées 18 à 24 heures, à 37 °C dans un étuve. En fin d'incubation, on observe les zones d'inhibition autour des puits, pour les différentes souches sélectionnées vis-à-vis des germes cibles testés. La lecture de l'activité bactériostatique se fait par la mesure du diamètre d'inhibition autour du puits, exprimée en mm (**Pulsani et al., 1979**).

➤ Principe de la méthode d'évaluation antibactérienne :

La méthode utilisée, méthode des puits ou de diffusion sur milieu gélosé décrite par **Perez et al. (1990)**. Cette méthode permet d'observer rapidement les effets d'une substance vis-à-vis du développement bactérien c'est-à-dire l'effet bactériostatique. Il s'agit d'une technique fiable, facile à mettre en œuvre, et sa lecture est rapide.

L'activité bactériostatique des extraits testés est rendue visible par la présence d'une auréole d'inhibition plus ou moins étendue du développement bactérien. Les diamètres des zones d'inhibition sont alors mesurés pour chaque substance testée.

➤ Protocole expérimental :

L'évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne a été réalisée par la technique de diffusion en puits en utilisant le milieu solide. Donc un milieu de culture solide est nécessaire au développement des bactéries. Il s'agit de milieu Agar Müller Hinton (MH), gélosé, stérilisé et coulé dans des boîtes de pétri.

On ensemence une suspension bactérienne en phase de croissance exponentielle sur la surface de la gélose (10⁸ bactéries/ml, correspondant à une absorption à 625 nm de densité optique (D.O) entre 0,1 et 0,08). La suspension est étalée le plus homogènement possible à l'aide d'un écouvillon stérile, et on réalise des puits de 6 mm sur la gélose par l'utilisation des pipettes pasteur stérilisées.

Une solution à 200 g/l du résidu solubilisé dans le méthanol a été préparée pour chaque extrait, différents volumes (30, 40, 50 et 60 µl) de ces solutions sont introduites dans les puits ce qui signifie à chaque puit on a de 6 à 12 mg/ml de substance à tester.

L'activité antibactérienne est déterminée en termes de diamètres de la zone d'inhibition produit autour des puits après 24h d'incubation à la température 37°C pour le développement du germe en question.

Une fois l'activité antimicrobienne réalisé et les diamètres des zones d'inhibition mesurés avec précision, on passe à la deuxième étape de l'étude de l'activité antibactérienne ; il s'agit de la détermination de la CMI (Ericsson et Sherris, 1971).

2.5- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) : test de microdilution

On peut définir la CMI par la concentration minimale inhibitrice ou bien la plus faible concentration d'un antibiotique capable d'inhiber dans un milieu (soit milieu liquide soit milieu solide), toute culture visible de la souche étudiée (Ferron, 1976 ; Le Minor et Veron, 1989).

Cette technique consiste à faire agir en phase liquide des concentrations croissantes des extraits sur des microorganismes. Elle est réalisée seulement pour les extraits organiques d'algue brune *Dictyota dichotoma* les plus actifs constatés lors des tests de sensibilité en milieu solide, ce choix est arbitraire (diamètre de la zone d'inhibition ≥ 7 mm)

Les souches conservées sont revivifiées dans du bouillon nutritif et incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. En utilisant le BHIB (Brain Heart Infusion Broth, fluka) comme milieu de culture liquide pour ces bactéries.

Pour les tubes témoins, chaque tube estensemencé avec 100 μ l d'un inoculum de 24 heures ($DO_{620\text{ nm}}=0.1$). un tube contenant seulement le milieu de culture (T1), servant de témoin de stérilité ,ainsi que deux autres témoins, dont l'un sans extrait (T2), servant de témoin de croissance, et l'autre le solvant à la place de l'extrait (T3), sont préparés.

Dans des tubes contenant chacun 9 ml du milieu BHIB stérile, on ajoute des concentrations différentes des extraits (de 4 à 40 mg/ml) et 0.1 ml d'une culture bactérienne jeune. Puis nous complétons le volume de chaque tube à 10ml avec le milieu de culture.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on ensemence les souches en stries sur milieu solide Müeller-Hinton Agar. Après une deuxième incubation aux mêmes conditions que la première, on note le développement ou l'inhibition de chaque souche comparativement au témoin.

*Partie résultats et
discussions*

Chapitre I : Dosage des composés phénolique et activité antioxydante

1- Rendements d'extraction :

Le rendement d'extraction des métabolites primaires et secondaires des végétaux est dépend de plusieurs facteurs, les plus importants sont le solvant d'extraction, la méthode d'extraction et la température.

L'histogramme suivant regroupe les valeurs des rendements d'extraction d'algue brune ainsi obtenus par des solvants de polarités différentes.

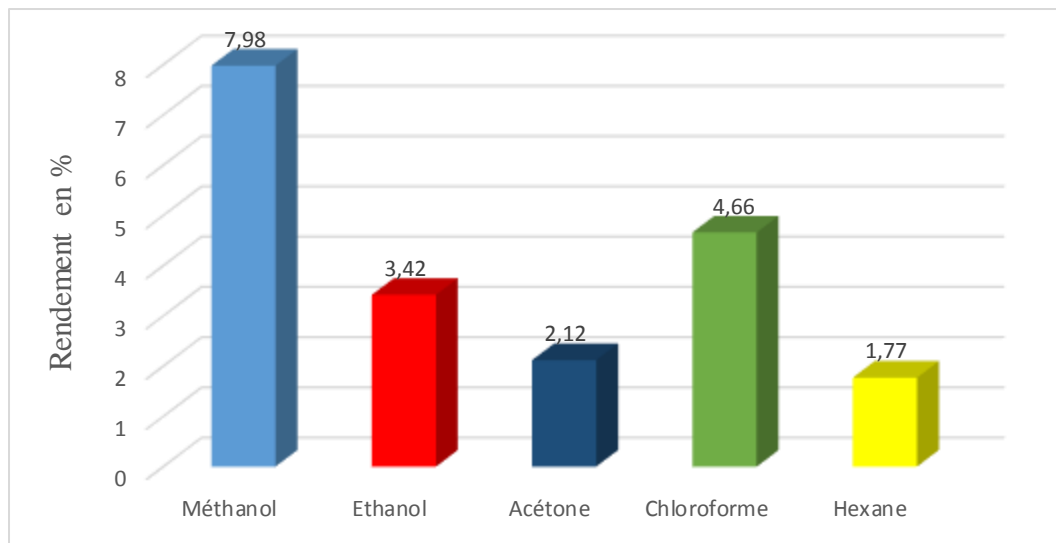


Figure 17 : Résultats de l'effet des solvants d'extraction sur l'algue brune *Dictyota dichotoma*

Les résultats obtenus pour les extraits bruts, montrent que le rendement le plus élevé a été obtenu de l'extrait brut méthanolique des thalles de *Dictyota dichotoma* (7,98%), et la plus faible est celle de l'extrait brut hexanique (1,77%).

Nos résultats sont relativement similaires par rapport à ceux trouvés dans la littérature.

En comparant avec les résultats trouvées par **Elnabris et al., (2013)**, l'extrait méthanolique de l'algue brune *Padina pavonica* a un rendement de 5,2 %.

Guezen, (2014) a trouvé un rendement d'extraction de (7,45%) avec le méthanol pour l'algue brune *Cystoseira stricta*.

Par contre, **Ainane, (2011)** a trouvé des rendements de 5,67% et 8,66% pour l'extrait méthanolique de *Cystoseira tamariscifolia* et *Bifurcaria bifurcata*, respectivement.

Ces variations des rendements d'extraction sont due à l'effet de la nature du solvant, la composition chimique des algues ; qui dépend de l'espèce et de son âge, aux facteurs environnementales, la localisation géographique des algues, et les conditions saisonnières (Balboa et al, 2013).

2- Tests phytochimiques :

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur différents extraits préparés à partir des talles de *Dictyota dichotoma*. En utilisant des solvants de polarité différente et des réactifs spécifiques de révélation.

Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques mentionnés dans le Tableau (4), montrent la présence des phénols, des composé réducteur, des hétérosides cardiotoniques dans l'algue ainsi que l'absence des anthocyanes et des Saponosides dans tous les extraits.

Les alcaloïdes, les tanins, les acides aminés et les stérols et triterpène sont présente dans tous les extraits sauf l'extrait hexanique.

Tableau 4 : Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques recherchés dans la poudre algale.

<i>Esp chimique</i>	<i>Méthanol</i>	<i>Ethanol</i>	<i>Acétone</i>	<i>Chloroforme</i>	<i>Hexane</i>
<i>Phénol</i>	++++	++	++	+++	+
<i>Alcaloïde</i>	++	+	+	+	-
<i>Tanins</i>	+++	+	+	++	-
<i>Saponosides</i>	-	-	-	-	-
<i>Composée réducteur</i>	++++	+	++	+	++
<i>Acide Aminé</i>	++++	++	+	+	-
<i>Stérol et tri terpène</i>	+	+	+	++	-
<i>Anthocyane</i>	-	-	-	-	-
<i>Hétéroside cardiotonique</i>	++	++	++	+++	+

D'après les résultats obtenus dans le tableau (4), le méthanol est le meilleur solvant d'extraction des métabolites secondaire.

Les tanins sont présents avec une intensité importante dans l'extrait méthanolique. Sa présence est confirmée par une réaction positive avec la solution de chlorure ferrique en donnant une coloration bleu verdâtre dans les extraits.

Le test positif des stérols et triterpènes nous a montré leur présence dans cette algue avec une apparition d'un anneau pourpre à l'interface et une phase de couleur bleu verdâtre.

3- Teneur en phénols totaux :

L'estimation quantitative des polyphénols totaux a été réalisée en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu et l'acide gallique a été utilisé comme standard (Li et coll, 2007).

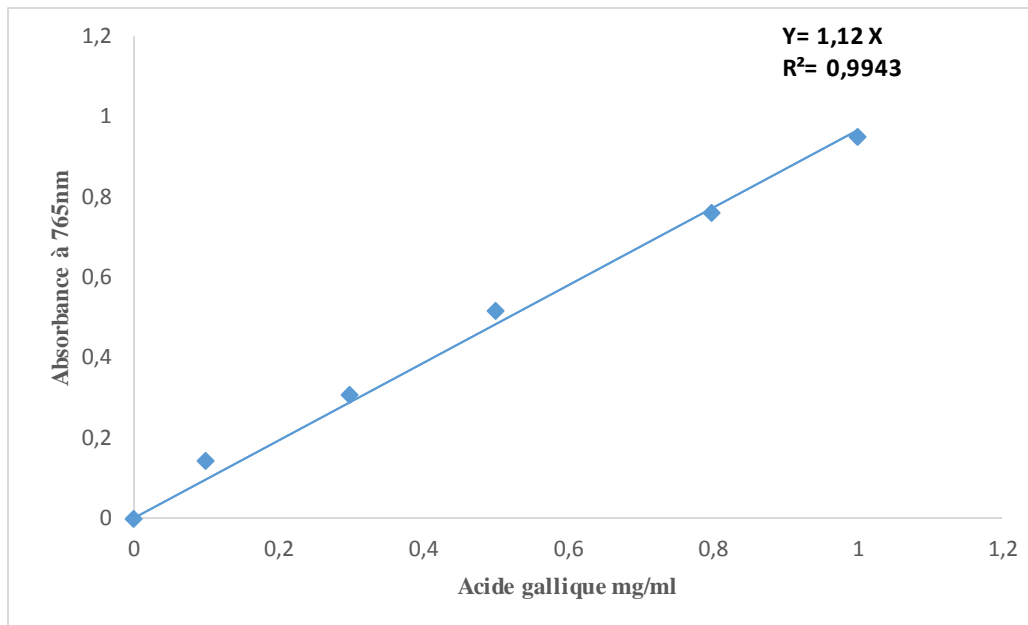


Figure 18 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

En se basant sur les valeurs d'absorbance des solutions d'extraits (Tableau 5), ayant réagis avec le réactif de Folin-Ciocalteu et comparées à la solution étalon en équivalence d'acide gallique (Figure 18), les résultats de l'analyse colorimétrique des composés phénoliques totaux sont représentés dans la figure (19).

Tableau 5 : Teneurs en polyphénols et en caroténoïdes existant dans les extraits bruts de l'algue brune *D. dichotoma*

<i>Extraits algale</i>	<i>Teneur des polyphénols (mg EAG/g MS)</i>	<i>Caroténoïdes total (mg/l)</i>
<i>Méthanol</i>	4,329±0,19	1291,624
<i>Ethanol</i>	1,864±0,05	587,103
<i>Chloroforme</i>	1,782±0,02	1176, 600
<i>Acétone</i>	1,363±0,006	630,230
<i>Hexane</i>	0,324±0,005	114,682

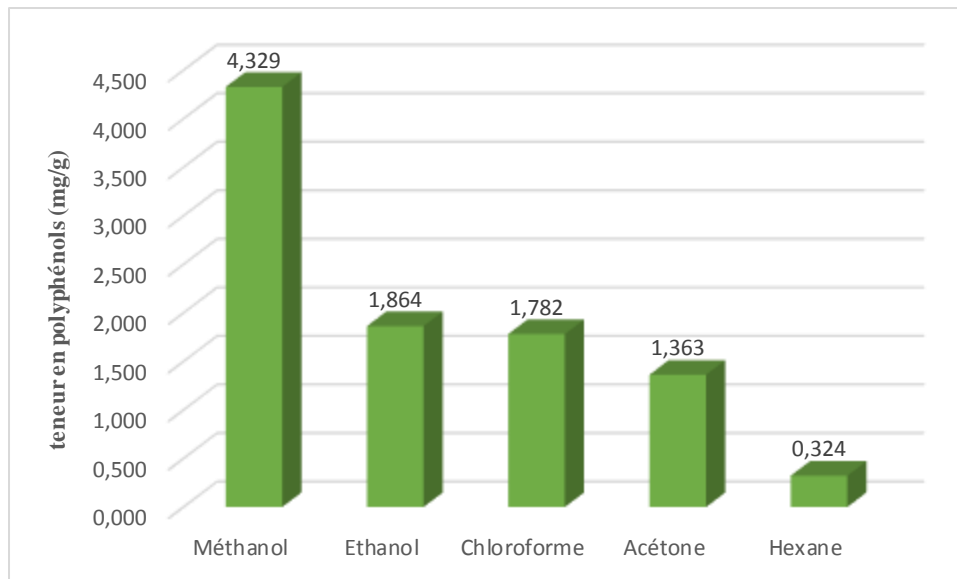


Figure 19 : Histogramme de dosage des phénols totaux dans les extraits de l'algue *D. dichotoma*

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de la matière sèche (mg EAG/g Ms), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique.

Dans les cinq extraits de l'algue étudiée, on remarque une variabilité des teneurs en polyphénols, la teneur la plus haute est celle de l'extrait méthanolique de l'ordre de $4,329 \pm 0,196$ mg EAG/g suivi par l'extrait éthanolique, chloroformique puis acétonique et en fin la teneur la plus faible est celle de l'extrait hexanique avec une teneur de $0,324 \pm 0,005$ mg GAE/g.

Ces résultats reflètent les données représentées dans la Figure (17) où nous avons enregistré des rendements plutôt élevés des extraits bruts.

Une étude faite par **Guezen, (2014)** sur l'extrait brut méthanolique de l'algue brune *Cystoseira stricta*. Les teneurs en phénol totaux de cette algue sont importants avec une concentration de $10,142 \pm 0,163$ mg EAG/g MS.

D'autres résultats de travaux de **Sadati et al. (2011)** et **Zubia et al. (2009)** sur les espèces *Cystoseira myrica* et *Cystoseira tamariscifolia* où les teneurs sont de $10,08 \pm 1,13$ mg EAG/g MS et $10,91 \pm 0,07$ mg EAG/g MS, respectivement. Alors que, **Reza Jassbia et al. (2013)** ont reporté une teneur faible de l'ordre de $0,17 \pm 0,03$ mg EAG/g MS chez *C. myrica*.

4- Teneur en caroténoïdes :

Les caroténoïdes jouent un rôle important dans la reproduction des plantes avec les composés phénoliques qu'ils sont responsables de couleurs vives.

Cette classe chimique considéré comme des antioxydants, avec des fonctions qui comprennent la protection des membranes contre les dommages causés par les radicaux libres et retardé le processus de vieillissement (Bulda et al., 2008). Tableau (5) montre la mesure spectrophotométrique de caroténoïdes totaux basés sur l'absorbance des échantillons à 470, 653 et 666 nm.

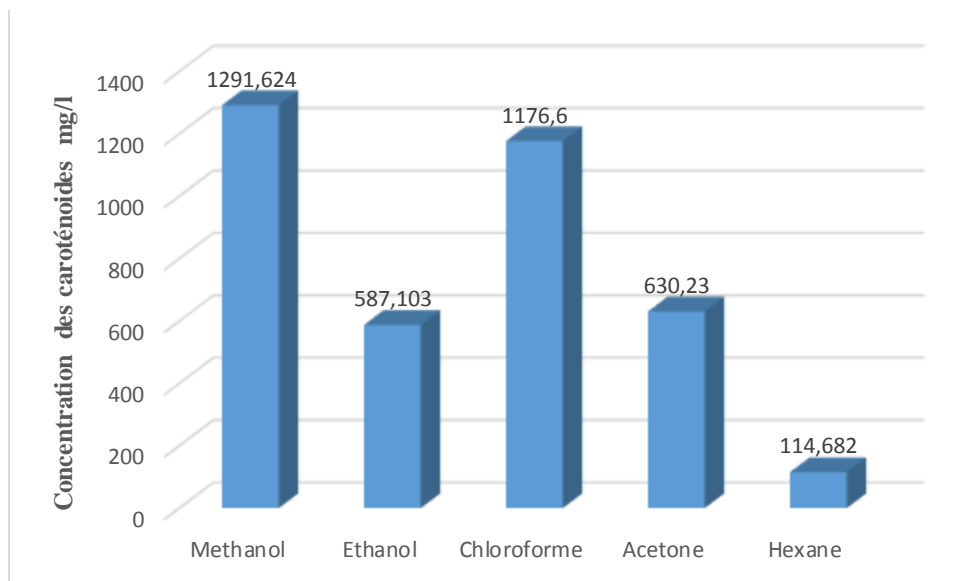


Figure 20 : Histogramme de dosage des caroténoïdes contenant dans les extraits bruts de l'algue *D. dichotoma*.

Les résultats ont révélé que les extraits méthanolique et chloroformique sont les plus riches en ces composants (1291,624 et 1176,60 mg/l, respectivement), et celle obtenu de l'extraction par l'hexane présente la valeur la plus faible (114,68 mg/l). La quantité de caroténoïdes totaux dans ces échantillons est importante et avec les composés phénoliques totaux représente une grande partie des extraits.

Bentireche et Achour, (2014) trouve que l'extrait méthanolique de l'algue *Cystoseira tamariscifolia* contient un teneur en caroténoïdes (196.01 mg/ml) faible par rapport à l'extrait méthanolique de l'algue étudiée.

5- Etudes de l'activité antioxydante :

5.1- Piégeage du radical libre DPPH• :

L'activité antiradicalaire de cinq extraits bruts de l'algue marine vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à 517 nm en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune. Le test de DPPH est une méthode fréquemment employée pour évaluer le potentiel antioxydant de différents composés naturels vue sa rapidité, sa fiabilité et son faible coût (**Senthilkumar et al, 2012**).

L'effet des antioxydants sur le piégeage du radical DPPH est vraisemblablement dû à leur capacité de donneur d'hydrogène. Le DPPH est un radical libre stable capable d'accepter un électron ou un atome d'hydrogène pour devenir une molécule diamagnétique stable. Lorsque le DPPH est mélangé avec un substrat qui agit comme donneur d'atome d'hydrogène, une forme non-radicalaire stable de DPPH est obtenue, avec le changement simultané de la couleur de la solution du violet au jaune pâle. Par conséquent, le DPPH a été largement employé comme un radical libre pour évaluer la réduction des substances, et il est un réactif utile pour étudier les activités antiradicalaires des composés (**Sathya et al, 2013**).

Les résultats de l'activité antioxydante des extraits organique exprimés en pourcentage d'inhibition du radical DPPH sont illustrés dans la Figure (21).

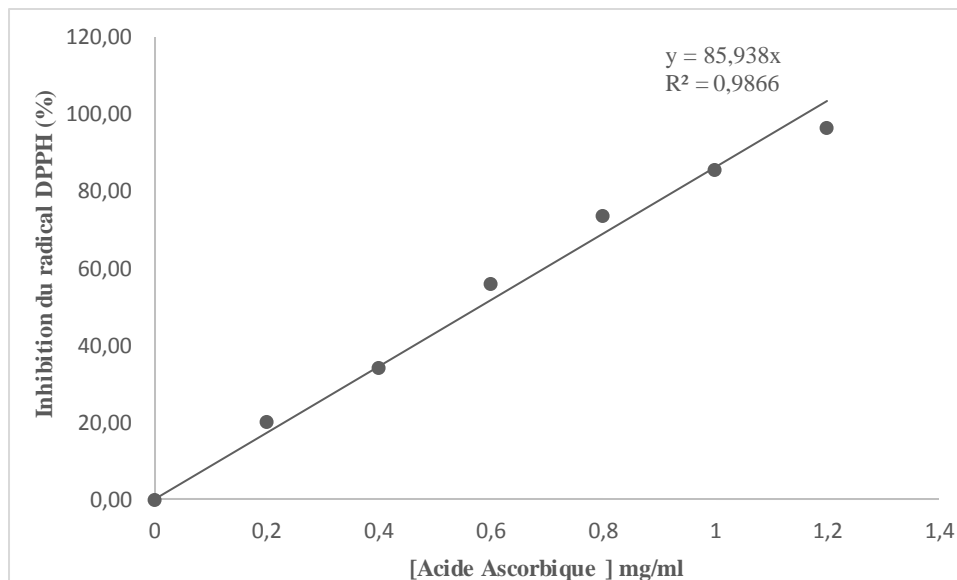


Figure 21 : Présentation graphique de pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées de l'acide ascorbique.

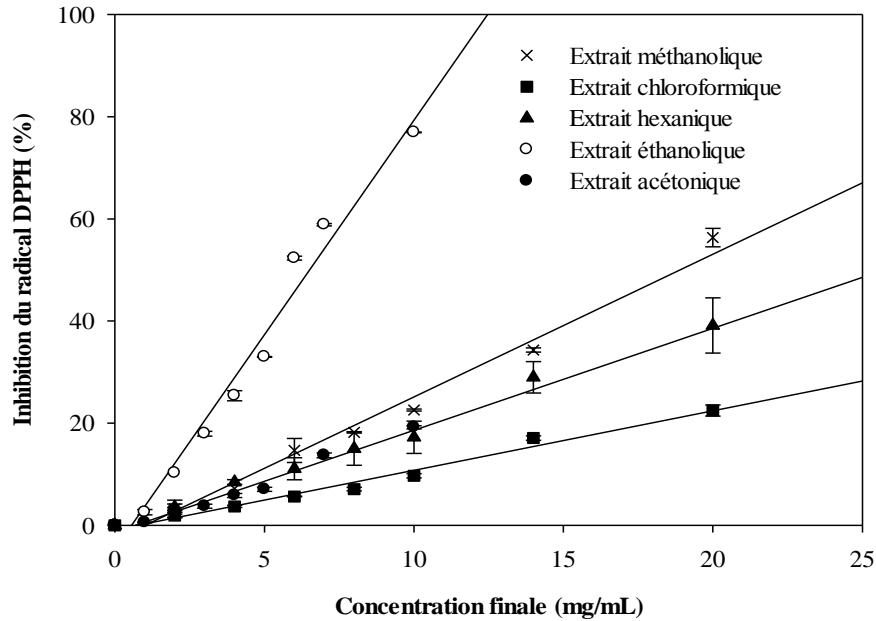


Figure 22 : Présentations graphiques des pourcentages d'inhibition du radical DPPH résiduels en fonction de concentration des extraits bruts algaux.

Les extraits préparés par les différents solvants organiques sont capables de piéger le radical libre DPPH de manière concentration dépendante.

D'après la Figure (22) on constate que les allures des courbes sont différentes d'un extrait à un autre et que le pourcentage d'inhibition du radical DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait brut d'algue.

L'extrait éthanolique de *Dictyota dichotoma*, réduit fortement le radical DPPH[•] par rapport aux autres extraits algaux ceci est démontré par l'allure exponentielle du graphe.

Les valeurs d'EC₅₀ ont été déterminées à partir des courbes de réduction du radical DPPH en fonction de la concentration des extraits d'algue marine par extrapolation à partir de l'analyse de régression non linéaire. L'EC₅₀ d'un composé est inversement lié à son capacité antioxydante, car elle exprime la quantité d'antioxydant exigée pour diminuer la concentration de DPPH de 50%, Une faible EC₅₀ indique l'activité antioxydante la plus élevée (Do et al, 2013).

Les valeurs de l'EC₅₀ pour chaque extrait ainsi que celle du standard, sont regroupées dans le Tableau (6).

Tableau 6 : Les valeurs d'EC₅₀ des activités antioxydantes des extraits de *Dictyota dichotoma*.

<i>Solvant d'extraction</i>	<i>DPPH (EC₅₀; mg/ml)^b</i>	<i>Test Ferricyanure/bleu de Prusse (EC₅₀ ; mg/ml)^a</i>
<i>Méthanol</i>	19.41±0.31	3.93±0.04
<i>Chloroforme</i>	45.6±0.73	5.05±0.04
<i>Ethanol</i>	6.52±0.03	3.36±0.07
<i>Acétone</i>	28.02±0.54	2.36±0.13
<i>Hexane</i>	25.95±3.67	11.44±0.20
<i>Acide ascorbique</i>	0.12±00	0.52±0.01

^a Valeur EC₅₀ : la concentration effective pour laquelle l'activité antioxydante est 50%; l'absorbance est 0.5 pour le pouvoir réducteur ; 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). La valeur EC₅₀ est obtenue par extrapolation à partir de l'analyse de la régression linéaire.
^b Chaque valeur est exprimée en moyenne ± erreur standard (n=2).

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide ascorbique (vitamine C). Dans notre étude nous avons utilisés l'acide ascorbique comme antioxydant standard qui a montré une activité antiradicalaire intéressante avec une EC₅₀ de 0.12 mg/ml. En comparaison avec l'acide ascorbique, tous les extraits testés s'avèrent moins actifs, car les composés antioxydant présent dans les extraits d'algue représentent une faible proportion d'un mélange complexe de métabolites primaire et secondaire par rapport à l'acide ascorbique qui est un composé antioxydant pur.

D'après les valeurs d'EC₅₀, l'extrait éthanolique de *Dictyota dichotoma* possède l'activité antioxydante la plus élevé (EC₅₀= 6.52 mg/ml), tandis que l'extrait chloroformique possède l'activité antioxydante la plus faible avec une EC₅₀ de 45.6 mg/ml.

Selon **Popovici (2009)**, plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant des algues et la cinétique de réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, rapport Antioxydant/DPPH[•], type de solvant, pH).

Auezova et al. (2012) trouve une valeur EC₅₀ = 23,4 mg/ml de l'extrait méthanolique de l'algue brune *Saccharina bongardiana* montrant une activité antioxydante faible par rapport à ce que obtenu par *D. dichotoma*.

Une autre espèce de *Dictyota* (*Dictyota sp*) donne une très faible activité antioxydant avec un EC₅₀= 77,78 mg/ml de l'extraction par un mélange dichlorométhane-méthanol (V : V).

De plus, l'extrait méthanolique de l'espèce *D. dichotoma* a un pouvoir antioxydant plus élevé par rapport à l'extrait de DCM-méthanol de *Dictyota sp* (EC₅₀=77,78mg/ml).

L'extrait méthanolique de l'espèce *Cystoseira crinita* a une forte activité antioxydante avec un EC₅₀ = 0,11 mg/ml (**Mhadhebi et al. 2011**).

5.2- Réduction de fer « test FRAP » :

Le test FRAP est une analyse d'activité antioxydante rapide, reproductible, et facile à mettre en œuvre. Cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} . La puissance de réduction est l'un des mécanismes antioxydants (Karagozler et al. 2008).

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. Ces résultats représentés dans la Figure (24) nous ont montré que la capacité réductrice qui est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des extraits bruts.

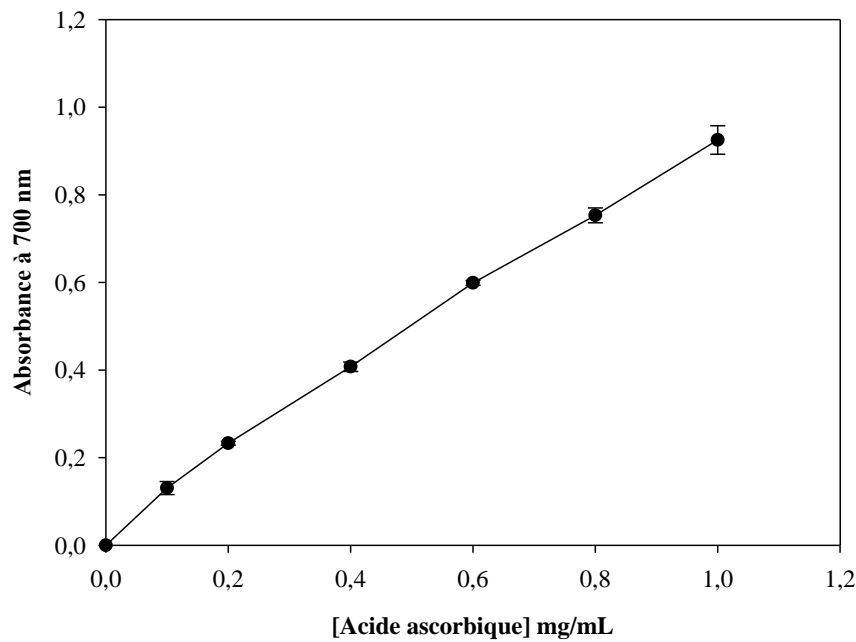


Figure 23 : Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique par la méthode FRAP

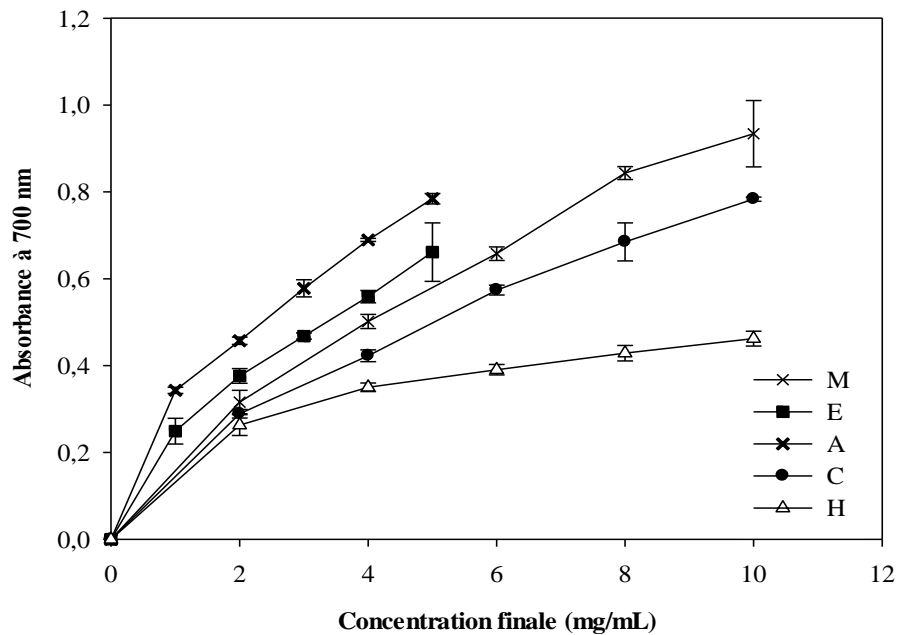


Figure 24 : Pouvoir réducteur des extraits bruts par la méthode FRAP

Les résultats obtenus dans la Figure (24) montrent que la capacité à réduire le fer par les composés extraits par l'acétone est la plus élevée ($EC_{50} = 2,36 \text{ mg/ml}$). Ainsi, l'extrait hexanique présente un pouvoir réducteur faible ($EC_{50} = 11,44 \text{ mg/ml}$) par rapport aux autres extraits bruts avec des valeurs observées de densité optique qui ne dépassent pas le 0,5 ($DO = 0,4$) à la concentration de 10 mg/ml.

Les valeurs d' EC_{50} ont été calculées et comparées avec l'acide ascorbique comme standard ($EC_{50} = 0,52 \text{ mg/ml}$), ces résultats montrent que les extraits d'algues contiennent des composés capables de réduire le fer (donneurs d'électrons).

Le pouvoir réducteur élevé de l'algue brune *D. dichotoma* peut être expliqué par la présence des phlorotannins qui sont des chélateurs puissants des métaux lourds (Devi et al., 2011).

D'après Manivannan et al. (2012), Les composés phénoliques ainsi que les caroténoïdes contribuent également au pouvoir réducteur des extraits bruts des algues marines.

Une étude réalisée par Bentireche et Achour (2014) montre que l'extrait méthanolique de l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* a une activité antioxydante très importante avec une valeur EC_{50} de 2.91 mg/ml.

D'après Farvin et Jacobsen (2013), l'extrait éthanolique des deux espèces *D. dichotoma* et *Sargassum muticum* a un pouvoir anti-radicalaire avec une valeur observée de densité optique qui atteint 0,4 à une concentration 1 mg/ml, où notre extrait ne dépasse pas le 0,3.

6- Analyse de corrélation entre les polyphénols / caroténoïdes et les tests DPPH-FRAP :

Les algues marines sont normalement riches en composés phénoliques et en caroténoïdes qui sont responsables de leurs activités antioxydantes (Gupta et Abu-Ghannam, 2011). Pour cela, nous avons établi une corrélation entre les teneurs en polyphénols et en caroténoïdes et les résultats de mesure du pouvoir réducteur et anti-radicalaire des extraits bruts des algues marines.

D'après la Figure (25), on remarque une forte corrélation linéaire entre la puissance réductrice des extraits d'algues marines et la teneur en phénols totaux, et faible entre la capacité antioxydante et la teneur en phénols totaux.

Par contre, il n'y a pas de corrélation entre la capacité antioxydante et réductrice des extraits de *D. dichotoma* et la teneur en caroténoïdes, Figure (26).

D'après les valeurs du coefficient de détermination (R^2), les composés phénoliques présents dans les extraits d'algues marines ne participent pas de manière considérable aux propriétés antiradicalaire et antioxydante par rapport aux caroténoïdes.

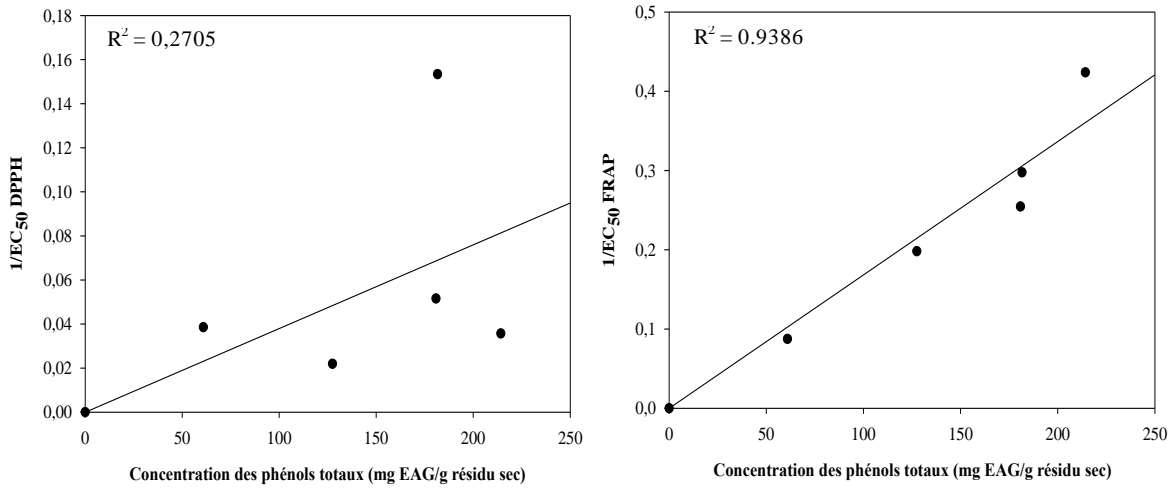


Figure 25 : La corrélation entre la teneur en composés phénoliques et la puissance antiradicalaire des extraits bruts des algues marines déterminée par la méthode DPPH et FRAP.

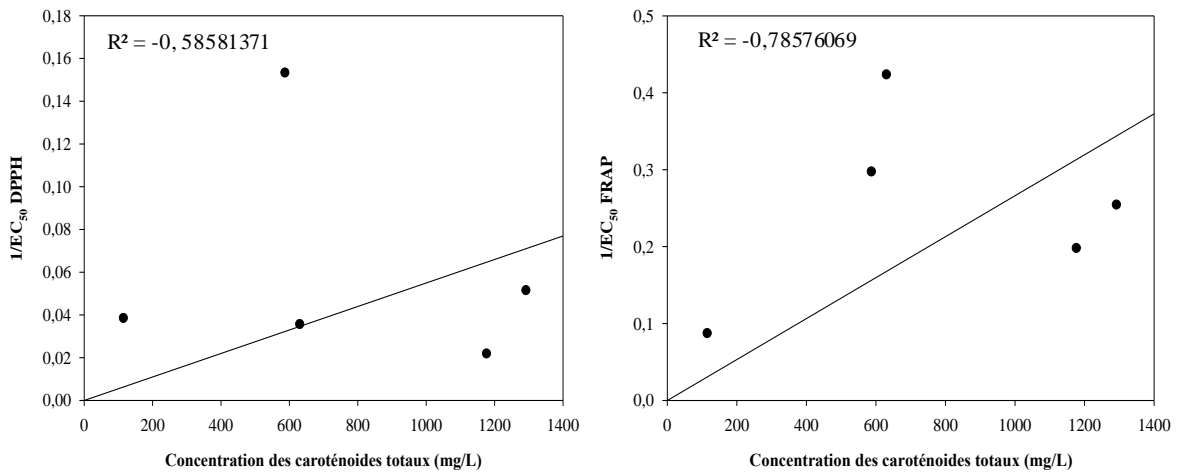


Figure 26 : La corrélation entre la teneur en caroténoïdes et la puissance antiradicalaire des extraits bruts des algues marines déterminée par la méthode DPPH et FRAP.

Chapitre II : activité antibactérienne

1- Résultats de l'antibiogramme :

L'antibiogramme a pour but de prédire la sensibilité d'un microorganisme vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques. Cette sensibilité est exprimée par l'apparition de zones d'inhibition autour des disques d'antibiotiques. Les mesures de celles-ci sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 7 : Résultats de l'effet de l'antibiotique sur les souches bactériennes testés

<i>Souche bactérienne</i>	<i>Diamètre d'inhibition (mm) (Disque d'ampicilline à 10 µg)</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	13.33
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16.00
<i>Escherichia coli</i>	15.75
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10.00
<i>Bacillus cereus</i>	18.00
<i>Listeria monocytogenes</i>	16.33

Les souches de bactéries à Gram + et à Gram - ont montré des sensibilités différentes à l'antibiotiques standard testé.

2- Sensibilité aux extraits bruts :

Pour vérifier le pouvoir antimicrobien du solvant de récupération des extraits algale, le méthanol a été testé sur les souches utilisées avec des volumes de 30, 40, 50 et 60 µl par puit. Les résultats négatifs obtenus prouvent qu'il n'a aucun effet inhibiteur.

Les résultats des tests antibactériens des extraits méthanolique, éthanolique, chloroformique, hexanique et acétonique de l'algue *D. dichotoma* sont résumés dans le tableau suivant qu'il présente les diamètres d'inhibition obtenus sur les bactéries pathogènes de références.

Tableau 8 : Evaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits d'algue.

<i>Souches Bacs</i>	<i>Méthanol</i>	<i>Ethanol</i>	<i>Acétone</i>	<i>Chloroforme</i>	<i>Hexane</i>
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	+	+	++	+	++
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	+	++	+	++	+++
<i>L. monocytogene</i>	+	++	++	+	+

Légende : - : pas d'inhibition, + : diamètre d'inhibition inférieur à 10mm, ++ diamètre d'inhibition compris entre 10 et 15 mm, +++ diamètre d'inhibition supérieur à 15 mm.

Les résultats de cette activité antimicrobienne ont montré que tous les extraits d'algue ont produit des zones d'inhibition intéressantes vis-à-vis de trois souches *S. aureus*, *B. cereus* et *L. monocytogene* comme montre la figure (27).

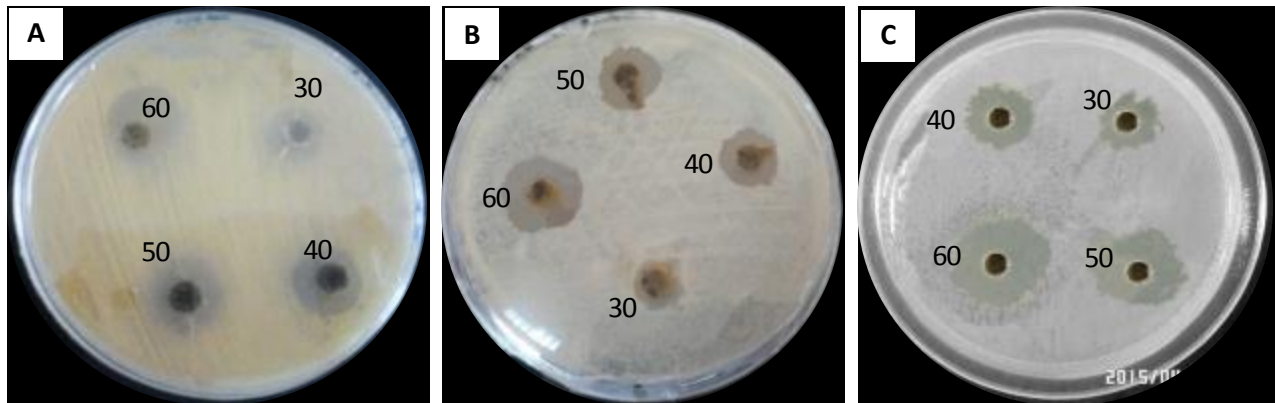


Figure 27 : Résultats représentent les zones d'inhibition de différentes concentrations des extraits de *D. dichotoma* testées sur les souches bactériens.

A : Zones d'inhibition de l'extrait acétonique testé sur *S. aureus*. ; **B** : Zones d'inhibition de l'extrait éthanolique testé sur *L. monocytogenes*. ; **C** : Zones d'inhibition de l'extrait hexanique testé sur *B. cereus*.

On note aussi pour les souches *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*, que les extraits méthanoliques de *D. dichotoma* n'ont montré aucune activité. La figure (28) présente ces résultats.

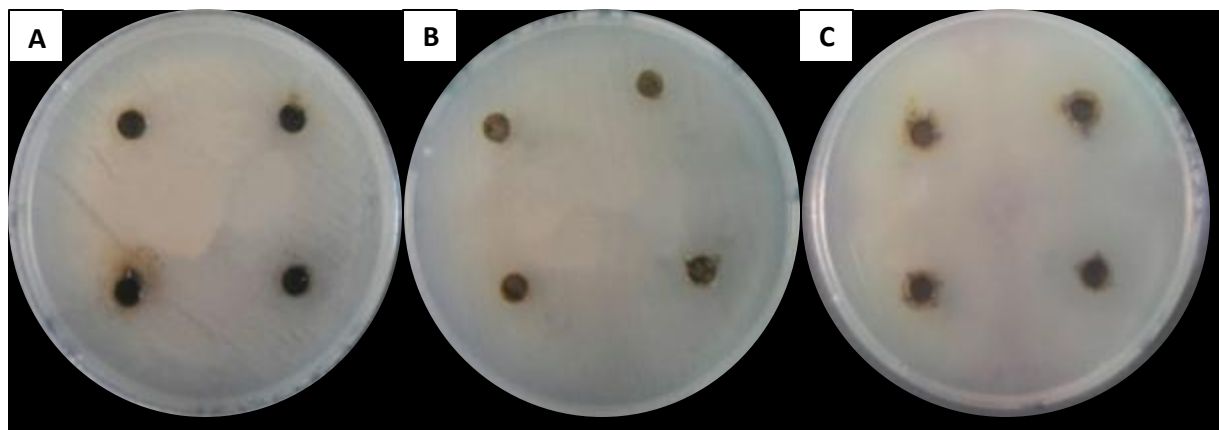


Figure 28 : Photos des résultats obtenus par la méthode des puits sur *K. p*, *E. c*, *P. a* testées par les extraits de *D. dichotoma*

A: *E. coli*; **B:** *K. pneumoniae*; **C:** *P. aeruginosa*.

On peut donc conclure que cette algue marine possède une activité antimicrobienne intéressante surtout contre *S. aureus*.

Pour une image globale, la Figure (29) présente les différents diamètres de zones d'inhibition à une concentration de 4 mg/ml testés sur les souches bactériennes.

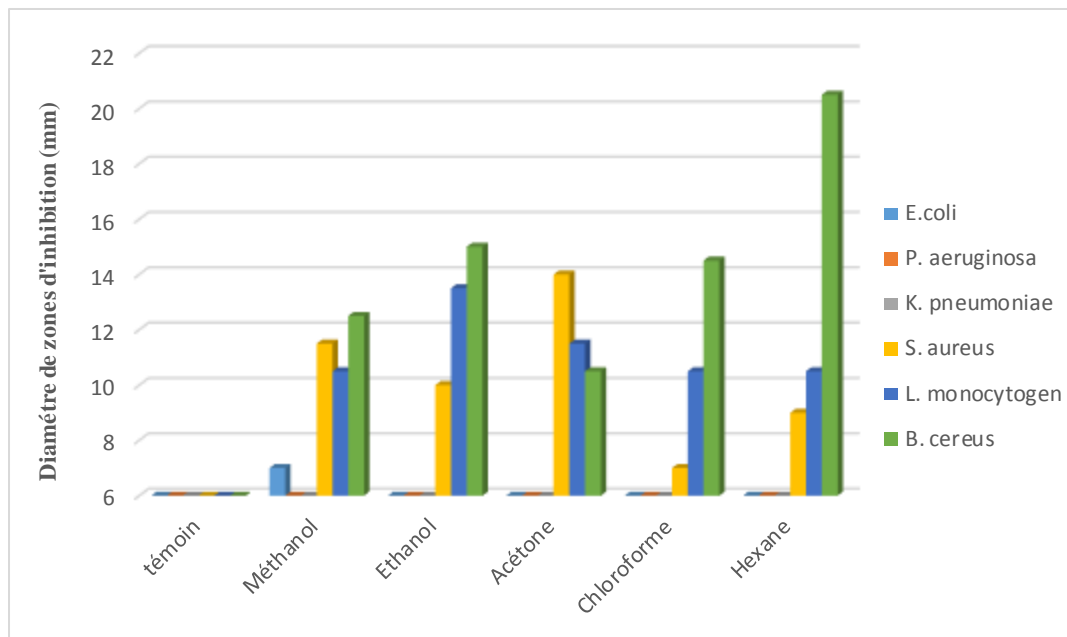


Figure 29 : Représentation graphique des zones d'inhibition à 60 µl de différents extraits algale.

Un autre travail sur l'extrait brut méthanolique de *Dictyota dichotoma* var *intricata* a été fait par **RIZVI, (2010)**, testé sur *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*, confirme une activité inhibitrice contre seulement *E. coli* avec un diamètre d'inhibition de 10 mm.

D'après **Chbani, et al. (2011)**, l'extrait méthanolique de l'algue brune *Padina pavonica*, exerce une activité moyenne (11.3 mm) contre la bactérie *E. coli*, et intéressante contre *P. aeruginosa* (16.4 mm) et ne donne aucune effet d'après **Elnabris et al. (2013)**.

Par contre, l'extrait algal ne donne aucune activité vis-à-vis *K. pneumoniae* (**Chbani, et al. (2011)**) ; mais une grande activité avec une zone d'inhibition de 6,6 mm selon **Elnabris et al. (2013)**.

Un autre espèce de *Padina tetrastromatica* a été étudié par **Pushparaj et al., (2013)** pour évaluer son activité antimicrobienne. Les bactéries sont testées par différents extraits (méthanolique, éthanolique, chloroformique et acétonique) par la méthode de puits avec différents concentration 40, 60, 80 et 100µg/ml.

Les résultats obtenus montrent que à 100µg/ml les extraits acétonique et chloroformique n'ont aucune activité contre *E. coli* et *P. aeruginosa*, et pour *S. aureus* l'extrait acétonique a une activité modérée (7mm).

Lavanya et Veerappan, (2011), ont été trouvé que les extraits bruts de deux espèces d'algues brunes *Sargassum wightii* et *Turbinaria conoides* testé sur les souches bactériennes (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*) par la méthode des disques, ont une activité antibactérienne.

L'extrait méthanolique de l'algue brune *Sargassum wightii* a montré une activité maximale contre *S. aureus* (5mm), et une activité modérée des extraits chloroformique et hexanique vis-à-vis les souches testées.

Les extraits de *Turbinaria conoides* ont été montrés une activité modérée contre tous les bactéries testés, les meilleures activités obtenus contre *S. aureus* sont celle des extraits méthanolique et acétonique de zones d'inhibition de 7 et 6mm respectivement.

D'autres études ont montré que les extraits (hexane, chloroforme et méthanol) des algues *Cystoseira tamariscifolia* et *Bifurcaria bifurcata* ont produit des zones d'inhibition intéressantes vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae*. Aussi, les deux extraits sont actifs envers *E. coli* (**Ainane, 2011**).

L'extrait chloroformique de *Bifurcaria bifurcata* présente une activité importante envers *Staphylococcus aureus*.

Alors les deux espèces d'algues marines possèdent une activité antibactérienne intéressante surtout contre *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*.

3- Méthode de diffusion en milieu liquide (CMI) :

Les CMI sont inversement proportionnelles aux diamètres des zones d'inhibition, obtenus avec les méthodes des disques et des puits.

Aligiannis et al. (2001) ont proposé une classification des extraits du matériel végétal sur la base des résultats des CMI, comme suit :

- forte inhibition : CMI inférieure à 0.5 mg/mL ;
- inhibition modérée : CMI varie de 0.6 à 1.5 mg/mL ;
- faible inhibition : CMI supérieure à 1.6 mg/mL.

Pour ce qui est des résultats obtenus par cette technique, on note l'absence de germes dans le premier témoin (T1) ne contenant que le milieu de culture (milieu stérile), et leur présence dans le deuxième témoin (T2) contenant l'inoculum bactérienne et dans le troisième témoin (T3) contenant le solvant (méthanol). Ce dernier n'a pas d'un effet inhibiteur sur nos souches.

Les résultats obtenus du pouvoir antimicrobien de nos extraits selon la méthode de croissance sur milieu liquide montrent qu'il n'y a pas d'inhibition des germes testées dans la plus grande concentration 12 mg/ml (Figure 30).

Suite à ceci, les solvants sont utilisés à un pourcentage inférieur à 5% car après plusieurs essais, à cet intervalle nous avons remarqué qu'il n'y a pas d'inhibition.

De plus selon ces résultats, la sensibilité des souches peut être se situe au-delà de 12mg/ml.

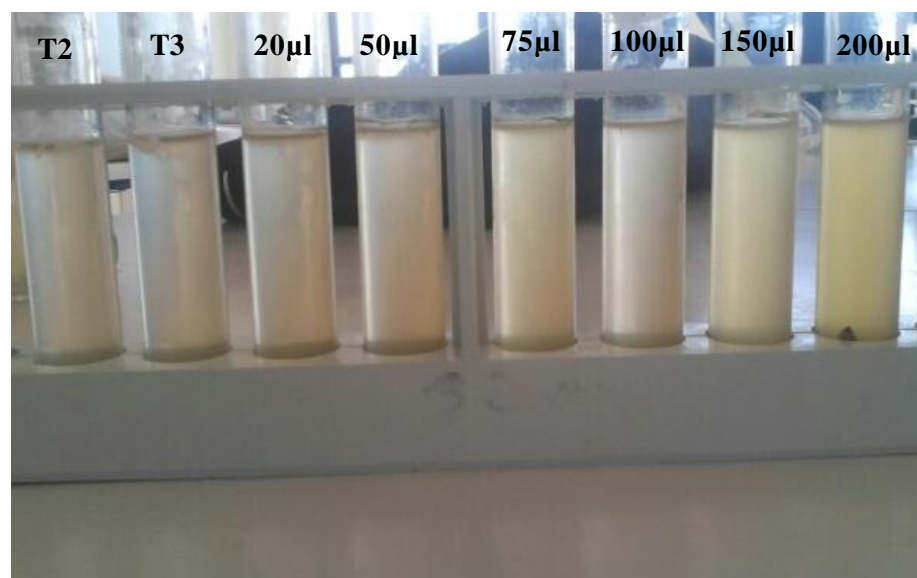


Figure 30 : Résultats de détermination de la concentration minimale inhibitrice des extraits de l'algue *D. dichotoma*.

Conclusion et perspective

Les algues marines sont reconnues depuis longtemps par leurs richesses en matière nutritionnel essentiel au corps humain. Dernièrement, la découverte de nouveaux composés bioactifs d'origine algale permet leur utilisation à des fins thérapeutiques.

Avec ses 1600 Km de façade maritime, l'Algérie dispose d'une flore marine très riche et diversifiées.

Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et à l'évaluation du pouvoir antioxydant et antimicrobien de différents extraits de l'algue brune *Dictyota dichotoma* récoltée de la région de Mostaganem.

Les tests phytochimiques réalisés par les réactions de caractérisation ont permis de mettre en évidence des phénols, des tanins, des stérols et triterpènes dans les cinq extraits de l'algue ainsi que l'absence des anthocyanes et Saponosides dans les extraits.

Dans les deux cas, les résultats obtenus montrent que l'inhibition de 50 % d'oxydation est atteinte en utilisant des extraits dilués 20 fois. Une inhibition totale de l'oxydation du radical a été obtenue en présence des extraits dilués 50 fois.

Le contenu en polyphénols totaux dans les extraits d'algue a été estimé à $4,329 \pm 0,196$ mg EAG/g de broyat, ce qui montre que *Dictyota dichotoma* renferme une teneur faible en composés phénoliques.

Les résultats obtenus montrent aussi que les extraits de différents solvants contiennent des capacités antioxydant différentes en termes de réduction et pouvoir antiradicalaire.

La corrélation entre les propriétés antioxydantes et celle des composées phénoliques totales et caroténoïdes ne sont pas significatif, indiquant que les composées phénoliques ne doivent pas la source majeure des pouvoirs antioxydant trouvé dans cette algue.

Au cours de cette étude nous avons réalisé également un test antimicrobienne vis-à-vis six bactéries pathogènes, les résultats microbiologiques ont montré que les extraits de *D. dichotoma* ont une action moyenne sur trois espèces bactériennes testées, qu'ils s'agit de *S. aureus*, *L. monocytogenes* et *B. cereus*.

Sachant que notre pays possède une biodiversité immense au long de façade marine dont chaque organisme se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par les recherches, de cet effet, et comme perspectives nous proposons de:

- ✓ Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments synthétiques.
- ✓ Développer des médicaments anti-radicalaires à base d'espèces marines, doués d'une activité antioxydante.
- ✓ Conserver les espèces marines (animal et végétal) contre la pollution des mares.

*Références
bibliographiques*

A

- Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., Lomri, A. (2007).** Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, 74: 636-643.
- Ahamet, S. (2003).** Etudes phytochimiques et des activités biologiques de *Balanites aegyptica* (Balanitaceae). *Thèse de doctorat en pharmacie*, Université de Bamako, Mali.
- Ainane, T. (2011).** Valorisation de la biomasse algale du Maroc : Potentialités pharmacologiques et applications environnementales, cas des algues brunes *Cystoseira tamariscifolia* et *Bifurcaria bifurcata*. *Thèse de doctorat en chimie*, université Hassan II-casablanca, Maroc.
- Aliyiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., Chinou, I., Harvala, C., Skaltsounis, A. L. (2001).** New semisynthetic antimicrobial Labdane. Type diterpenoids derived from the resin "Ladano" of *Citrus creticus*. *Z. Naturforsch*, 56: 49-52.
- Allane, T. (2009).** Etude des pouvoirs antioxydant et antimicrobien de quelques espèces végétales locales alimentaires e non alimentaires. *Mémoire de magister en biochimie*, Université M'hamed Bougara Boumerdas, Algérie.
- Archambaud, M., Clave, D. (2007).** Fiche technique : *Bacillus cereus*. Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique. *Fiche technique_ Bactériologie*, 71.
- Asimi, S. (2009).** Influence des modes de gestion de la fertilité des sols sur l'activité microbienne dans un système de cultures de longue durée au Burkina Faso. *Thèse de doctorat en écologie*, Université polytechnique de Bodo-Dioulasso, Burkina Faso.
- Auezova, L., Najjar, F., Selivanova, O., Hajj Moussa, E., Assaf, M. D. (2013).** Antioxidant activity of brown alga *Saccharina bongardiana* from Kamchatka (Pacific coast of Russia). A methodological approach, *J Appl Phycol*, 25:1189-1196

B

- Balboa, M.E., Conde, E., Moure, A., Falque, E., Dominguez, H. (2013).** *In vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chemistry*, 138: 1764-1785.
- Benhammou, N., Atik Bekkara, F., Kadifkova, P. (2007).** Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia atlantica* Desf, *Advances in Food Sciences*, 29 (3): 155-161.

- Bentireche, M., Achour, F. Z. (2014).** Étude de l'activité antioxydante des extraits méthanolique de quelques algues marines d'Algérie. *Mémoire d'ingénieur*, Université Amar Thelidji, Laghouat.
- Blanc, V., Mesa, R., Saco, M., Lavilla, S., Prats, G., Miro, B., Navarro, F., Corte's, P., Lagostera, M. (2006).** ESBL and plasmidic class C β -lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Veterinary Microbiology*, 118: 299-304.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H.G., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. (2005).** Marine natural products. *Natural Product Reports*, 22: 15-61.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H.G., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. (2012).** Marine natural products. *Natural Product Reports*, 29: 144-222.
- Bouhadjra, K. (2011).** Etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge, *Mémoire de magister*, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.
- Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Édition TEC et DOC, 3^{ème} Ed. In **Medjdoub, H. (2013).** Contribution à la recherche d'éventuelles activités biologiques de *Zygophyllum geslini* Coss. *Thèse de doctorat en biologie*, Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen.
- Bulda, O., Rassadina, V., Alekseichuk H., Laman, N. (2008).** Spectrophotometric measurement of carotenes, xanthophylls, and chlorophylls in extracts from plant seeds. *Russ. J. Plant Physiol*, 55(4): 544-551.
- Burton, M. R., Francis, P., Oppenheimer, C. (1998).** Remote measurements of volcanic gas compositions by solar occultation spectroscopy, *Nature*, 396: 567-570.

C

- Caccamese, S., R. Azzolina, G. Furnari, M. Cormaci and S. Grasso, (1980).** Antimicrobial and antiviral activities of extracts from Mediterranean algae. *Bot. Mar.* 23: 285-288.
- Callon, C., Gilbert, F.B., De Cremoux, R., Montel, M.C. (2008).** Application of variable number of tandem repeat analysis to determine the origin of *S. aureus* contamination from milk to cheese in goat cheese farms. *Food Control*, 19: 143-150.

Chbani, A., Mawlawi, H., Etahiri, S. (2011). Evaluation de l'activité inhibitrice des extraits d'une algue brune, *Padina pavonica*, récoltée sur les côtes libanaises. *Afrique Science*, 07 (3) : 91-96.

Chiheb, I., Radi, H., Martinez-Lopez, J., Dominguez, S.J.F., Gomez, V.J.A., Bouziane, H., Kadiri, M. (2009). Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco. *African Journal of Biotechnology*, 8 (7) : 1258-1262.

Chouder, N. (2006). Contribution à l'étude des flores intestinales des poulets conventionnels sains. *Mémoire de magister en médecine vétérinaire*, Université Mentouri Constantine. Algérie.

D

De Clerck, O., Leliaert, F., Verbruggen, H., Lane, C.E., De Paula, J.C., Payo, D.A., Coppejans, E. (2006). A revised classification of the Dictyoteae (Dictyotales, Phaeophyceae) based on *rbc* and 26S ribosomal DNA sequences analyses. *Journal of Phycology*, 42 (6) : 1271-1288.

Debray, M., Jacquemin, H., Razafindrambo, R. (1971). Travaux et documents de l'Orstom. (Paris, N°8).

Delarras, C. (2010). Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux. Edition Lavoisier. 2^{ème} éd, p 136-137.

Dendougui, S. (2010). Contribution de l'étude phytochimique et l'activité antioxydante de *Cleome Arabica*, *Mémoire de master*, Université Kasdi Merbah, Ouargla.

Devi, K. G., Manivannan, K., Thirumaran, G., Arthirajathi, F. A., Anantharaman, P. (2011). *In vitro* antioxidant activities of selected seaweeds from Southeast coast of India. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 205-211.

Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Lan T-N, Phuong., Huong Huynh, L., Edi Soetaredjo, F., Ismadji, S., Ju, Y. H. (2013). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoids content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*. *Journal of Food and Drug Analysis*.

E

Edeoga, H.O., Okwu, D.E., Mbaebie, B.O. (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* ; 4 (7) : 685-688.

Ekoumou, C. (2003). Etude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. *Thèse de doctorat en pharmacie*, Université de Bamako, Mali.

Elnabris, K.J., Elmanama, A.A., Chihadeh, W.N. (2013). Antibacterial activity of four marine seaweeds collected from the coast of GazaStrip, Palentine, *Mesopot. J. Mar. Sci*, 28 (1): 81-92.

Ericsson, H. M. A., Sherris, J. C. (1971). Antibiotic sensitivity testing. Repoet of International Collaborative Study. *Acta path Microbiol Scand. B Suppl*, 217: 1-90.

F

Farvin, K. H. S., Jacobsen, C. (2013). Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chemistry*, 138: 1670-1681.

Favier, A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité en chimie*, 108-115.

Ferron, A. (1976). Bactériologie médical à l'usage des étudiants en médecine. 8ème edition. Ed. Groun et Roques, France.

Frestedt, J., Zenk, J., Kuskowski, M., Ward, L., Bastian, E. (2008). A whey-protein supplement increases fat loss and spares lean muscle in obese subjects: a randomized human clinical study. *Nutrition and Metabolism*, 5 (8) : 1-7.

G

Gayral, P., Cosson, J. (1986). Connaître et reconnaître les algues marines. *Connaitre et reconnaitre* : p 220. In **Othmani, A. (2014).** Médiation chimique entre l'algue brune méditerranéenne *Taonia atomaria* et la communauté bactérienne associée à sa surface *Organic chemistry*. Université de Toulon et du Var. France.

Guezen, A. (2014). Etude de la variation saisonniere de l'activité antimicrobienne des extraits bruts de l'algue brune *Cystiseira stricta* de la côte ouest algérienne. Evaluation de la capacité antioxydante totale. *Mémoire de master en biologie*. Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen.

Guillard, P. (2003). Modélisation de la thermorésistance, de la viabilité et du comportement à la recroissance de *Bacillus cereus*, en fonction de la température, du pH et de l'activité aqueuse. *Thèse de doctorat en microbiologie*, Université de Bretagne Occidentale. France.

Guillaume, P. (2010). Caractérisation biochimique d'exopolymères d'origine algale du bassin de Marennes-Oléron et étude des propriétés physicochimiques de surface de microorganismes impliquées dans leur adhésion. *Thèse de doctorat en biochimie*, Université de La Rochelle, France.

Guiry, M.D., Guiry, G.M. (2014). Algae Base. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway.

Gutteridge, J.M. (1993). Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence, *Free Radic Res Commun*, 19:141-158.

Gupta, S., Abu-Ghannam, N. (2011). Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science and Technology*, 22: 315–326.

H

Hadi, M. (2004). La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. *Thèse de Doctorat*, Université Louis Pasteur. P 155.

Hale, A. L. (2003). Screening Potato Genotypes for Antioxidant Activity, Identification of the Responsible Compounds, and Differentiating Russet Norkotah Strains Using Aflp and Microsatellite Marker Analysis. *Office of Graduate Studies of Texas A&M University. Genetics.* P 260.

Harbone, J. B. (1998). Phytochemical Methods, a guide to modern techniques of plant analysis. Edition Chapman et Hall, 3^{ème} Ed.

Hellal, Z. (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydants de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). *Mémoire de Magister*, Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou.

Hortense, F. (2011). Les applications et la toxicité des algues marines. *Thèse de doctorat en pharmacie*, Université de Limoges. France.

<http://www.Algaebase.org>

J

Jrah harz Allah, H. (2010). Antioxidant and antigenotoxic activities of *Globularia alypum* leaves extracts, *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 (19):2048-2053.

K

Karagözler, A., Erdag, B., Emek, Y., Uygun, D. (2008). Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*. *Food Chem*, 111:400-407

Kuppusamy, P., Yusoff, M.M., Parine, N.R., Govindan, N. (2014). Evaluation of in-vitro antioxidant and antibacterial properties of *Commelina nudiflora* L. extracts prepared by different polar solvents. *Saudi Journal of Biological Sciences* (2015). <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.09.016>

L

La Barre, S., Potin, P., Leblanc, C., Delage, L. (2010). The halogenated metabolism of brown algae (Phaeophyta), its biological importance and its environmental significance. *Marine Drugs* 8 (4) : 988-1010.

Lacolley, P. (2007). Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux. John Libbey Eurotext. 1^{er} Ed. P 311.

Lahaye, M. (1991). Marine algae as sources of fibers: determination of soluble and insoluble dietary fiber contents in some sea vegetables. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, 54: 587-594.

Lavanya, R., Veerappan, N. (2011). Antibacterial Potential of Six Seaweeds Collected from Gulf of Mannar of Southeast Coast of India, *Advances in Biological Research*, 5 (1): 38-44.

Leclerc, V. (2010). Les secrets des algues. 1^{ère} Edition. Quae, p 13.

Le Minor, L., Veron, M. (1989). Bactériologie médicale. 2^{ème} Ed. Edition Flammarion. Paris.

Lesgards, J.F. (2000). Contribution à l'étude du statut antioxydant de l'homme ; aspect chimiques et biochimique. *Thèse de doctorat*, 19-20. In **Kanoun, K. (2011).** Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine), *Mémoire de magister en biologie*, Université Abou Bekr BELKAID, Tlemcen.

Li, H. B., Cheng, K. W., Wong, C. C., Fan, K. W., Chen, F., Tian, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102: 771-776.

Lichtenthaler, H., Wellburn, A. (1985). Determination of total carotenoids, chlorophylls a, and b of leaf in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.*, 11: 591-592. In **Rainha, N., Lima, E., Batista, J., Rodrigues, C. (2011).** Antioxidant properties, total phenolic, total carotenoid and chlorophyll content of anatomical parts of *Hypericum foliosum*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (10) : 1930-1940.

M

Maamri, S. (2008). Etude de *Pistacia atlantica* de deux régions de sud Algérien : dosage des lipides, dosages des polyphénols, essais antilishmaniens, *Mémoire de magister*, Université de Boumerdes.

Manivannan, K., Anantharaman, P., Balasubramanian, T. (2012). Evaluation of antioxidant properties of marine microalga *Chlorella marina* (Butcher, 1952). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. S342-S346.

MarinLit, (2013). MarinLit Database, Version 17.3, Department of Chemistry, University of Canterbury, Christchurch, New Zealand.
<http://www.chem.canterbury.ac.nz/marinlit/marinlit.shtml>. Accessed 9 Aug 2013.

Maro, D., Hebert, D., Gandon, R., Solier, L. (1999). Dosage par spectrométrie gamma de l'iode 129 dans les échantillons biologiques marins et terrestres, Application à des algues prélevées le long des côtes de la Manche : *Fucus serratus* et *Laminaria digitata*. *Radioprotection*, 34 (1): 13-24.

Mhadhebi, L., Laroche-Clary, A., Robert, J., Bouraoui, A. (2011). Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-oxidant activities of organic extracts from the Mediterranean seaweed, *Cystoseira crinita*. *African Journal of Biotechnology*, 10: 16682–16690.

Mohamed, S., Hashim, S.N., Rahman, A.H. (2012). Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends in Food Science and Technology*, 23: 83-96.

Mohammed, Z. (2005). Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région du Tlemcen, *Mémoire de magistère*, Université-Abou Bakr Belkaid- Tlemcen.

N

Nicklin, J., Graeme-Cook, K., Paget, T., Killington, R. (2000). L'essentiel en microbiologie. Edition Berti. 1^{er} Ed. P 365.

Novelli, G. P. (1997). Role of free radicals in septic shock. *Journal of Physiol Pharmacol*, 48: 517-527.

O

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine, *Japanese Journal of Nutrition*, 44: 307-315.

OMS. (2011). Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments, France. <http://www.who.int/foodsafety/en/>

P

Pàdula, M., Boiteux, S. (1999). Photodynamic DNA damage induced by phycocyanin and its repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Medical and Biological research*. 32 (9) : 1063-1071.

Parazols, M. (2007). Caractérisation physico-chimique et réactivité de la phase aqueuse des nuages prélevée au sommet du puy de Dôme. *Thèse de doctorat en chimie*, Université Blaise Pascal, France.

Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J., Codina, C. (2002). Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and non-distilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J. Agric Food Chem*, 50: 6882-90.

Paris, R., Moyes, H. (1969). Précis de matière médicale. Edition Masson. Paris

Paula, J.C.D., Vallim, M.A., Teixeira, V.L. (2011). What are and where are the bioactive terpenoids metabolites from Dictyotaceae (Phaeophyceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21: 216-228.

Pelmont, J. (1993). Bactéries et environnement (adaptation physiologique). *Presses Université de Grenoble*, p897. **in kanoun, K. (2011).** Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine), *Mémoire de magister en biologie*, Université Abou Bekr BELKAID, Tlemcen.

- Perez, C., Paul, M., Bazerque., P. (1990).** An antibiotic assay by the agar well diffusion method, *Acta Biologiae et Medicine Experimentalist*, 15: 113-115.
- Pérez, R. (1997).** Ces algues qui nous entourent. Editions Quae, P 272.
- Person, J. (2011).** Algues, filières de future. *Adebiotech*. Ed 1, P 4, 59.
- Poortmans, J., Boisseau, N. (2003).** Biochimie des activités physiques. Edition De Boeck Supérieur. Ed 1. P 412-413.
- Popovici, C., Saykova, I., Tylkowski, B. (2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*. 4 : 25-39.
- Pulsani, S.R., Rao, D.R., Sunki, G.R. (1979).** Antimicrobial Activity of lactic cultures: partial purification and characterization of antimicrobial compounds produced by *Streptococcus thermophilus*. *J. Food Science*, 44: 575-578.
- Pushparaj, A., Rajan, D., Balamurugan, S. J., Murugesan, R., Kannan, M., Raubbin, R. S. (2013).** An antimicrobial activity of the brown seaweed *Padina tetrastromatica* extract in different concentration against human pathogenic bacteria. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 5(1): 0976-4550.

R

- Raud, P. (2003).** Étude de la diversité génétique des souches de *Klebsiella pneumoniae* productrice de la β -lactamase à spectre étendu (BLSE), isolé au C.H.U de Nantes, de 1990 à 2001. *Thèse de doctorat en microbiologie*, Université de Nantes, France.
- Reza, J. A., Mohabati, M., Eslami, S., Sohrabipour, J., Miri, R. (2013).** Biological activity and chemical constituents of red and brown algae from the Persian Gulf. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 12 (3): 339-348.
- Rizvi, M.A. (2010).** Comparative antibacterial activities of seaweed extracts from Karachi coast, Pakistan, *Pakistan Journal of Pharmacology*, 27(2): 53-57.
- Robert, D. (2013).** *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) : généralités, antibiotiques actifs, résistances acquises, et implication en pathologie communautaire illustrée par l'exemple des infections acquises au cours de la pratique sportive. *Thèse de doctorat en microbiologie*, Université Anger, France.
- Ruzicka, L. (1959).** History of the isoprene rule. *Proceedings of the Chemical Society*: 341

S

- Sathya, R., Kanaga, N., Sankar, P., Jeeva, S. (2013).** Antioxidant properties of phlorotannins from brown seaweed *Cystoseira trinodis* (Forsskal) C. Agardh. In press.
- Scheen, A.J. (2004).** Le médicament du mois Insuline glargine. *Revue médicale de Liège*, 59 (2) : 110-114.
- Senthilkumar, P., Sudhan, S. (2012).** Antioxidant and antibacterial properties of methanolic extract of green seaweed *Chartomorphalinum* from Gulf of Manner: Southeast coast of India. *Jundishapur J Microbiol.* 5: 411-415.
- Shibata, T., Ishimaru, K., Kawaguchi, S., Yoshikawa, H., Hama, Y. (2008).** Antioxidant activities of phlorotannins isolated from Japanese Laminariaceae. *Applied Phycology*, 20: 705-711.
- Simeonidis, D. (1995).** Guide sous-marin du bassin méditerranéen : faune et flore. *Delachaux et Niestlé* 1 : 160.

T

- Thiebault, C., Sprunmont, P. (1997).** L'enfant et le sport : Introduction à un traité de médecine du sport chez l'enfant. Edition De Boeck Supérieur. 1^{er} Ed. P 145.
- Trease, E., et Evans, W.C. (1987).** Pharmacognosie, Billiaire Tindall. London 13th Edition. P 61-62. In **Karumi, Y., Onyeyili, P.A., Ogugduaja, V.O. (2004).** Identification des principes actifs de l'extrait de feuilles de *M. balsamia* (Baume de pomme). *Journal of Medicine and scientific.* 4(3), 179-182. Nigeria. ISSN 1682-4474.

W

- Watanabe, F., Takenaka, S., Katsura, H., Zakir Hussain Masumder, S.A.M., Abe, K., Tamura, Y., Nakano, Y. (1999).** Dried green and purple lavers (nori) contain substantial amounts of biologically active vitamin B₁₂ but less of dietary iodine relative to other edible seaweeds. *Agricultural and Food Chemistry*, 47 (6): 2341-2343.
- Widjaja-Adhi, A.M.K., Hosokawa, M., Miyashita, K. (2011).** Comparative antioxidant activity of edible Japanese brown seaweeds. *Journal of Food Science*, 76:104-111.

Y

Yan, X., Chuda, Y., Suzuki, M., Nagat, T. (1999). Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hifikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Bioschi Biotechnol Biochem*, 63(3): 605-607.

Yong-Xin, L., Isuru, W., Yong, L., Se-Kwon, K. (2011). Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochemistry*, 46:2219-2224.

Younes, F., Etahiri, S., Assobhei, O. (2009). Activité antimicrobienne des algues marines de la lagune d'Oualidia (Maroc) : Criblage et optimisation de la période de la récolte. *J. Appl. Biosci*, 24: 1543-1552.

Z

Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*, 64 (4) : 555-559.

Zubia, M., Fabre, M. S., Kerjean, V., Lann, K. L., Stiger-Pouvreau, V., Fauchon, M., et al. (2009). Antioxidant and anti-tumoral activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food Chemistry*, 116: 693-701.

Annexes

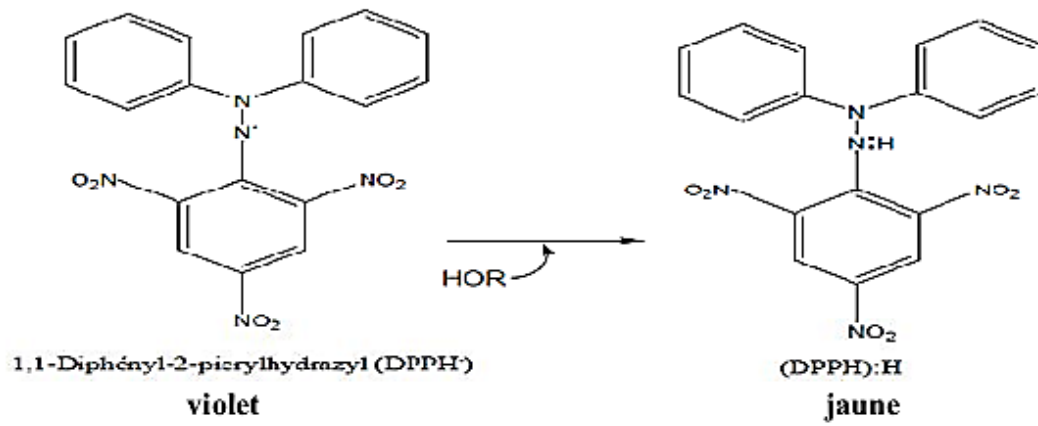


Figure : Réaction d'un donneur d'hydrogène (antioxydant) avec le radical DPPH[•]

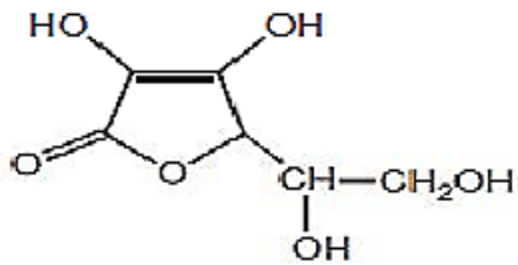


Figure : Structure de la vitamine C (acide ascorbique)

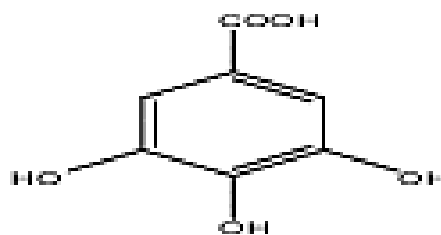


Figure : Structure de l'acide gallique

Concentration Minimale Bactéricide (CMB) :

La gamme des concentrations de tous les extraits bruts pour évaluer l'activité antimicrobienne, est représentée dans le Tableau suivant.

Tableau : Gamme des concentrations des extraits de *D. dichotoma* utilisés pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne en milieu liquide.

<i>Tubes</i>	<i>Volumes des extraits (µl)</i>	<i>Concentrations (mg/ml)</i>	<i>Dilutions</i>	<i>Concentrations dans le milieu (mg/ml)</i>
1	20	4	1/500	0,008
2	50	10	1/200	0,05
3	75	15	1/130	0,113
4	100	20	1/100	0,2
5	150	30	1/70	0,450
6	200	40	1/50	0,8

Tableau : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits algaux testés sur quelques souches bactériennes

<i>Souche bactérienne</i>	<i>Volume (µl)</i>	<i>Méthanol</i>	<i>Ethanol</i>	<i>Acétone</i>	<i>Chloroforme</i>	<i>Hexane</i>
<i>E. coli</i>	30	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	30	9,5	8	10,5	7	9
	40	11	8	12	7	10
	50	11,5	9	12	7	13,5
	60	11,5	10	14	7	13,5
<i>P. aeruginosa</i>	30	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	30	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	30	7,5	7	10	8	12
	40	8	13	10	9	13
	50	9	15	10,5	12,5	17,5
	60	12,5	15	10,5	14,5	20,5
<i>L. monocytogene</i>	30	9	9	9,5	7	7,5
	40	9	9	10,5	8	9
	50	10	11,5	10,5	9	10,5
	60	10,5	13,5	11,5	10,5	10,5

- : pas d'inhibition

Résumé :

Dans le cadre de la recherche de nouveaux composés naturels biologiquement actifs, nous nous sommes intéressés à étudier l'activité biologique des extraits bruts méthanolique de l'algue brune *Dictyota dichotoma* de la côte ouest algérienne. Le dosage des composés phénoliques (phénol totaux et caroténoïdes) et la quantification du pouvoir antioxydant des extraits du mois de mars ont aussi été déterminés.

L'extrait méthanolique est le meilleur solvant d'extraction des métabolites secondaires contenus dans l'algue *D. dichotoma* tel que les phénols, les tannins, les composés réducteurs et autres.

Les teneurs en phénols totaux et en caroténoïdes sont élevées dans l'extrait méthanolique avec 4,329 mg EAG/g MS et 1291 mg/l, respectivement comparativement aux autres extraits (éthanolique, acétonique, chloroformique et hexanique).

L'extrait brut éthanolique a un pouvoir antioxydant élevé avec un $EC_{50}=6,52$ mg/ml par rapport aux autres extraits.

En ce qui concerne le pouvoir antibactérien par la méthode de diffusion sur agar, l'extrait brut hexanique est le plus actif sur trois souches bactériennes parmi les six bactéries. Pour l'extrait hexanique, l'activité la plus puissante est contre *S. aureus*, *B. cereus* et *L. monocytogenes* avec des diamètres de zones d'inhibition de 13,5 ; 20,5 et 10,5 mm, respectivement. Par ailleurs, *P. aeruginosa*, *E. coli* et *K.pneumoniae* sont plus résistants aux extraits bruts.

Mots clés : Algue brune, *Dictyota dichotoma*, Composés phénoliques, pouvoir antioxydant, Activité antimicrobienne.

Abstract

Within the framework of the research for new biologically active natural compounds, we were interested to study the biological activity of the cruds extracts of the brown alga *Dictyota dichotoma* of the Algerian west coast. The amount of the phenolic compounds (total phenolic and carotenoid) and the quantification of the antioxidant capacity of the extracts of March were also determined.

The crude methanolic extract are the best solvent for extract the secondary metabolic content in brown algae *D. dichotoma* as phenols, tannins, reducing compounds and others.

The contents in total phenols and in carotenoids are raised in the methanolic extract with 4,329 mg EAG/g MS and 1291 mg/l, respectively compared with the other extracts (ethanolic, acetonic, chloroformic and hexanic).

The crude ethanolic extract has a better antioxidant capacity with $EC_{50}=6.52$ mg/ml, with regard to the other extracts.

As regards the antibacterial activity by the method of distribution on agar, the crude hexanic extract was more active on tree bacteria between six bacteria. For the hexanic extract, the best activity is against *S. aureus*, *B. cereus* and *L. monocytogenes* with inhibition diameter zones of 13, 5; 20, 5 and 10, 5 mm, respectively. Besides, *P. aeruginosa*, *E.coli*, *K. pneumonia* are more resistant to the brut extracts.

Keywords: Brown algae, *Dictyota dichotoma*, Phenolic compounds, Antioxidant capacity, Antimicrobial activity.

ملخص

في إطار البحث عن مركبات طبيعية جديدة ذات فعالية بيولوجية، اهتمنا بدراسة الفعالية الحيوية للمستخلصات الخامة للطحلب البني *Dictyota dichotoma* من الساحل الغربي الجزائري. تعيير المركبات الفينولية (الفينولات الكلية والكاروتينويدات) ومقدار القدرة المضادة للأكسدة لشهر مارس حدد أيضا.

المستخلص الميثانولي كان أفضل مستخلص للمستقلبات الثانوية المتواجدة في الطحلب البني *D. dichotoma* مثل الفينولات، التانويدات، المكونات المرجعة وأخرى.

محتويات الفينولات الكلية والكاروتينويدات مرتفعة في المستخلص الميثانولي قدرت بـ 4,329 ميليغرام معادل لحمض الغاليك من غرام للمادة الجافة، 1291 ميليغرام معادل للكاتشين من غرام للمادة الجافة على التوالي بالمقارنة مع المستخلصات الأخرى الإثنولية، الأستونية، الكوروفورمية والإكزانة.

المستخلص الإيثانولي لديه قدرة مضادة للأكسدة عالية بقيمة 6, 52 ميليغرام معادل لحمض الأسكوربيك من غرام للمادة الجافة مقارنة بالمستخلصات الأخرى.

فيما يخص الفعالية المضادة للبكتيريا بطريقة الانتشار على الأغار، المستخلص الإكزاني كان أكثر فعالية من المستخلصات الأخرى على ثلاث سلالات من بين الستة. بالنسبة للمستخلص الإكزاني، أفضل فعالية كانت ضد *S. aureus*، *B. cereus* و *L. monocytogenes* كانت في شهر مارس بقطر تثبيط 13,5 ; 20,5 و 10,5 مم على التوالي. الى جانب ان السلالات *P. aeruginosa*، *E.coli*، *K. pneumonia* كانت أكثر مقاومة لكل المستخلصات.

الكلمات المفتاحية: طحلب بني، *Dictyota dichotoma*، المركبات الفينولية، القدرة المضادة للأكسدة، الفعالية المضادة للبكتيريا.