

REPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ ABOUBEKR BELKAID TLEMCEM

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE,

DES SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DES PRODUITS NATURELS

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Option :

Science des aliments

Présenté par

M^{elle} MEBKHOUTI FOUZIA

Thème



**Étude phytochimique et activités biologiques de l'extrait
brut et ses fractions de l'algue brune *Cladostephus
hirsutus*, récoltée sur la côte ouest algérienne
(plage de Madrid)**

Soutenu le : 24/06/ 2014

Devant le jury composé comme suit :

-M ^r ABDELOUAHID D.E.	Professeur	Président
- M ^{me} BENGUEDDA W.	Maître de Conférences	Examinatrice
-M ^{me} BEKHECHI C.	Maître de Conférences	Examinatrice
- M ^{me} BELYAGOUBI-BENHAMMOU N.	Maître de Conférences	Examinatrice
- M ^r BELYAGOUBI L.	Maître assistant	Encadreur

Année Universitaire : 2013-2014

Sommaire

	Remerciement.....	
	Résumés.....	
	La liste des abréviations.....	
	Liste des figures.....	
	Liste des tableaux.....	
	Liste des photos.....	
	Introduction générale.....	01
Parte I:	Synthèses bibliographie.....	
Chapitre I	Généralité sur les algues.....	03
I.1	Définition.....	03
I.2	Classification.....	03
I.3	Composition.....	04
I.4	Utilisation.....	05
Chapitre II	<i>Cladostephus hirustus</i>	05
II.1	Description botanique.....	05
II.2	Classification.....	06
II.3	Position dans la systématique.....	06
II.4	Utilisation traditionnelle.....	06
II.5	Distribution (Habitat).....	06
II.6	Cycle biologique.....	07
II.7	Travaux antérieurs.....	07
Chapitre III	Activité antioxydants et composants phénoliques.....	08
III.1	Généralité.....	08
III.2	Systemes de défense.....	08
III.3	Les flavonoïdes.....	09
III.4	Les tannins.....	09
III.5	Les phénols totaux.....	10
Chapitre IV	Activité microbiologique.....	11
IV.1	Généralités.....	11
IV.2	Microorganisme utilise.....	11
Partie II:	Synthèse pratique.....	
I.	Matériel végétales.....	15
I.1	Zone d'échantillonnage.....	15
I.2	Méthode d'échantillonnage.....	15
I.3	Préparation des extraits.....	16
I.4	Calcul des rendements en extraits secs.....	18
II.	Evaluation de l'activité antioxydant et dosage des composés phénoliques...	19
II.1	Dosage des composés phénoliques.....	19
II.2	Activité antioxydant totale (CAT).....	20
III.	Etude de l'activité antimicrobienne.....	21
III.1	Les souches testées.....	21
III.2	Les milieux de culture.....	21
III.3	Réidentification des souches microbiennes.....	22
IV.	Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	23
IV.1	préparation de l'inoculum.....	23
IV.2	Préparation des extraits.....	24
IV.3	Test d'évaluation du pouvoir antimicrobien.....	24

Sommaire

IV.4	Sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques	24
IV.5	Antibiogrammes.....	24
IV.6	Application des disques d'antibiogramme.....	25
IV.7	Lecture.....	25
IV.8	Analyses statistique	25
	Résultas et discussion.....	
I.	Extraction et dosage des composés phénoliques.....	29
I.1	Rendement en extraite sec.....	29
I.2	Teneurs des extraits en phénol totaux, tannin condensé et flavonoïde	30
I.3	Activité antioxydant.....	33
II.	Antibiogramme.....	34
II.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	34
II.2	<i>Bacillus cereus</i>	35
II.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
II.4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	37
II.5	<i>Escherichia coli</i>	38
II.6	<i>Micrococcus luteus</i>	39
III.	Activité antimicrobienne	41
III.1	Test du catalase et coloration du Gram.....	41
III.2	Méthode de disques.....	42
	Conclusion.....	49
	Reference bibliographies.....	51
	Annex	

Remerciement

Je remercié tout d'abord mon dieu pour ses bienfaits inestimables, de m'avoir permis de terminer mes études dans de bonnes conditions.

*Je tiens particulièrement à remercier Monsieur **BELYAGOUBI Larbi**, Maître Assistant A à l'Université de Tlemcen, Département de Biologie, pour avoir encadré et dirigé ce travail, tout au long de sa réalisation, pour ses précieux conseils et qu'il puisse voir en ce travail l'expression de ma profonde gratitude.*

J'exprime ensuite mon estime et mes remerciements aux membres de mon jury :

*Que Monsieur **ABDELOUAHID D.E.** Professeur à l'Université de Tlemcen, Département de Biologie, de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire. Je la remercie également pour sa compréhension. Trouvez ici l'expression de mes sincères remerciements.*

*Madame docteur **BENGUEDDA Wassila**, laboratoire de recherche : Valorisation des actions de l'homme pour la protection de l'environnement et application en santé publique, Département d'Écologie, Université de Tlemcen. Maître de Conférences B, à l'Université de Tlemcen, Département de Biologie, trouve ici l'expression de ma gratitude pour avoir accepté d'examiner et juger ce travail.*

*Madame **BEKHECHI C.**, Professeur à l'Université de Tlemcen, Département de Biologie, maître assistant à l'université de Tlemcen, d'avoir accepté de juger ce travail et de faire partie du jury. Qu'elle trouve ici l'expression de toute mon estime et ma sincère considération.*

*Madame **BELYAGOUBI Née BENHAMMOU Nabila**, Maître de Conférences B, à l'Université de Tlemcen, Département de Biologie, trouve ici l'expression de ma gratitude pour avoir accepté d'examiner et juger ce travail.*

*Je ne saurai oublier de remercier les doctorants du laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA), Département de Biologie, Université de Tlemcen. , je cite ici :**MELLE AISSAOUI GHANIA, BENMAHDJOUR MERIEM, MADAME KANOUN KHADIDJA,***

Dédicaces

Avec l'aide de dieu tout puissant, j'ai pu achever ce travail que je dédie :

A mes très chers parents qui m'ont toujours encouragée dans mes études, vous m'avez permis d'arriver là où j'en suis et se passe par la suite.

Vous êtes les meilleurs cadeaux que la vie m'a apporté.

A ma très chère grand mère, pour l'amour qu'elle m'apporte et leur soutien.

A mes chères frères mohammed, djelloul, mouloud, ibrahim, abdefateh, chouaib, khaoula, zoubir, hafsa, younes. A mes petite famille : KARIMA, HALIMA, KHADOUDJA, « KHOULOUDJE, ZAKARIA, LOAI, « ABDALAZIZ »

A TOUT LES FAMILLE DE : MEBKHOUTI, TAYBI, ZAOUI, MEBKHOUTI, DAMBA, SBAGHOU,

A mes tantes et mes oncles.

A mes cousins et cousines.

A toutes les campagnes de mon parcours : IMANE, SAADIA, Nadjet, LAYLA, SOUMIA, RABIAA ; FATIMA, ZAINEB, HANAN,

Exceptionnelle pour « MEBARAKA, ASMA »

« Pour le promot e science des aliments 2014

A tous les enseignants et enseignantes qui ont contribué a ma formation.

Résumé

Ce travail a pour objectif d'étudier les activités antioxydantes et antimicrobiennes de l'extrait brut et ses fractions de l'espèce algale *Cladostephus hirsutus*, appartenant à la famille des *Cladostephacées*, récoltée de la plage de Madrid (Ain Témouchent).

Le rendement élevé est obtenu avec l'extrait brut de 2.483 ± 0.164 %. Les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés sont élevées dans l'extrait brut de 1.042 ± 0.004 mg EAG/g MS, 0.428 ± 0.004 mg EC/g MS et 2.739 ± 0.008 mg EC/g MS, respectivement.

Les propriétés antioxydantes utilisant le test de la capacité antioxydante totale révèlent que la fraction acétate d'éthyle et l'extrait brut ont des valeurs élevées de l'ordre de 1.3834 ± 0.008 mg EAA/g MS et 1.631 ± 0.008 EAA/g MS, respectivement.

L'activité antibactérienne vis-à-vis trois bactéries Gram-négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*), trois bactéries Gram-positif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*) et une levure (*Candida albicans*) par la méthode de diffusion sur agar montre que l'acétate d'éthyle présente une sélectivité d'activité antimicrobienne vis-à-vis les deux souches *S. aureus* et *B. cereus* observée à 100 mg/ml avec des diamètres des zones d'inhibition de 14,5 et 10,5 mm, respectivement. En ce qui concerne le pouvoir antifongique, tous les extraits possèdent un effet inhibiteur sur la levure *Candida albicans*, dont le plus élevé est illustré par la fraction acétate d'éthyle avec la zones d'inhibition de 24 mm à la concentration 200 mg/ml.

Mots clés : Algue brune, *Cladostephus hirsutus*, composés phénoliques, activité antioxydante, activité antimicrobiennes,

Abstract

This work aims to study the antioxidant and antimicrobial activities of the crude extract and its fractions of the algal species *Cladostephus hirsutus*, belonging to the family of *Cladostephaceae*, collected from the beach of Madrid (Ain Témouchent).

High yield is obtained with the crude extract of $2.4832 \pm 0.1640\%$. The contents of total phenolic contents, flavonoids and condensed tannins are higher in the crude extract of 1.0424 ± 0.0036 mg GAE / g DM, 0.4277 ± 0.0036 mg CE / g and 2.7387 ± 0.0080 mg CE/ g DM, respectively.

The antioxidant properties using the test of total antioxidant capacity show that the ethyl acetate fraction and the crude extract have high values of the order of 1.3834 ± 0.0084 mg AAE / g and 1.6315 ± 0.0083 mg AAE / g DM, respectively.

The antibacterial activity against three Gram negative bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*), three Gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*) and a yeast (*Candida albicans*) by the agar diffusion method shows that ethyl acetate has a selectivity of antimicrobial activity against the two strains *S. aureus* and *B. cereus* observed at 100 mg/ ml with diameters of inhibition zones of 14, 5 and 10, 5 mm, respectively. Regarding the antifungal potency, all samples have an inhibitory effect on the yeast *Candida albicans*, which the highest is illustrated by ethyl acetate fraction with the inhibition zones of 24 mm at the concentration 200 mg / ml.

Keywords: Algae Brown, *Cladostephus hirsutus*, Phenolic compounds, antioxidant activity, antimicrobial activity,

ملخص

يهدف هذا العمل إلى دراسة مضادات الأكسدة والأنشطة المضادة للميكروبات من استخراج النفط الخام وجزئياته من أنواع الطحالب *Cladostephus hirsutus* ، الذي ينتمي إلى عائلة من *Cladostephacées*، المحصودة من شاطئ مدريد (عين تموشنت).

يتم الحصول على الأداء العالي مع استخراج النفط الخام من محتويات مجموع الفينول، 2.483 $\pm 0.164\%$ مكثف أعلى في استخراج النفط الخام من مركبات الفلافونويد والعفص 1.0424 ± 0.004 ملغ / MS EAG / غرام، 0.004 ± 0.428 ملغ م / ز و 0.008 ± 2.739 MS EC / ملغ / DMغ ، على التوالي.

الخصائص المضادة للأكسدة باستخدام اختبار من إجمالي القدرة المضادة للأكسدة تبين أن خلاص الإيثيل ومستخلص الخام لديهما قيم عالية والمتمثلة 1.3834 ± 0.0084 ملغ / EAA ز و 1.631 ± 0.008 MS EAA / ز DM ، على التوالي.

النشاط المضاد للبكتيريا ضد ثلاث بكتيريا ذات الجرام السالبة (*Escherichia coli*)، *Pseudomonas aeruginosa*، *Klebsiella pneumoniae*، وثلاثة بكتيريا إيجابية الجرام (*Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus*، *Micrococcus luteus*) والخميرة (*Candida albicans*) من خلال طريقة أجار يبين أن نشر خلاص الإيثيل فيه الانتقائية من النشاط البكتيري وجها لوجه مع اثنين من سلالات بكتيريا المكورة العنقودية البرتقالية وحظ و B. الشمعية عند 100 ملغ / مل مع أقطار مناطق التثبيط من 14 و 5 و 10، 5 مم، على التوالي. بخصوص فعالية المضادة للفطريات، وجميع العينات يكون لها تأثير مثبت على الخميرة (*Candida albicans*)، والذي يتضح من ارتفاع جزء خلاص الإيثيل مع مناطق تثبيط 24 مم في تركيز 200 ملغ / مل .

الكلمات المفتاحية: الطحالب البحرية البنية، *Cladostephus hirsutus*، ومركبات الفينول، والنشاط المضادة للأكسدة، والنشاط المضادة للميكروبات،

Liste des abréviations

HCl	Acide chlorhydrique
ATCC	American Type Culture Collection
<i>C. albicans</i>	<i>Candidat albicans</i>
CAT	Capacité antioxydant totale
<i>C. hirustus</i>	<i>Cladostephus. hirustus</i>
°C	Degré Celsius
D°	Degrés Dornic
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane
DO	Densité optique
EAA	Equivalents d'acide ascorbique
GAE	Equivalent d'acide gallique
EC	Equivalent de la catéchine
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
h	Heure
NaOH	Hydroxyde de sodium
MS	Matière sèche
MeOH	Méthanol
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
M	Molaire
MH	Mueller Hinton
NaNO ₂	Nitrite de sodium
pd	Pendant
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée)
%	Pourcentage
<i>P.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Rdt	Rendement
UV /VIS	Radiation ultraviolette/Visible
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
AlCl ₃	trichlorure d'aluminium
UFC	Unité Formant Colonie
V	volume

Liste des figures

Figure 01	Espèce <i>cladostephus hirustus</i>	08
Figure 02	Systématique de la famille des <i>sphacelariaceae</i>	08
Figure 03	Schéma d'un cycle de Vie digénétique	10
Figure 04	<i>Staphylococcus aureus</i> vue au microscope électronique	14
Figure 05	<i>Escherichia coli</i> vue au microscope électronique	15
Figure 06	<i>Pseudomonas aeruginos</i> vue au microscope électronique	15
Figure 07	<i>Bacillus cereus</i> vue au microscope électronique	16
Figure 08	<i>Micrococcus luteus</i> vue au microscope électronique à balayage	16
Figure 09	<i>Klebsielle pneumonie</i> vue au microscope électronique	17
Figure 10	<i>Candida albicans</i> vue au microscope électronique	17
Figure 11	Situation géographique de station de la récolte	19
Figure 12	Sèche et broyage des algues	20
Figure 13	Appareil Soxhlet	20
Figure 14	Protocole d'extraction d'extrait brut	21
Figure 15	Protocole d'extraction	22
Figure 16	Evaporation par le rotavapor	22
Figure 17	Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage de phénol totaux.....	34
Figure 18	Teneurs en phénols totaux pour les déférentes fractions étudiées	34
Figure 19	Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage de flavonoïde	34
Figure 20	Capacité antioxydant totale des déférentes fractions étudiée de <i>C. huristus</i>	36
Figure 21	Zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	39
Figure 22	Zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876.....	40
Figure 23	Zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>Pseudomonas</i> ATCC 27853.....	41
Figure 24	Zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13047.....	42
Figure 25	Zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>Escherichia coli</i> ATCC8739.....	43
Figure 27	Zones d'inhibition sur <i>Bacillus cereus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> en fonction des concentrations.....	47

Figure 28 Zones d'inhibition de *Candida albicans* ATCC 10231 en fonction des concentrations.....

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification des algues selon les pigments trouvés.....	05
Tableau 02 : Situation géographique de la station de la récolte	19
Tableau 03 : Source de souches testées.....	27
Tableau 04 : Liste des antibiotiques testés.....	31
Tableau 05 : Rendements en extraits obtenus à partir de l'algue <i>Cladostephus hirus</i> tus	33
Tableau 06 : Teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés dans les extraits de <i>C. hirus</i> tus	35
Tableau 07 : Test de catalase	37
Tableau 08 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour <i>Staphylococcus aureus</i>	39
Tableau 09 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour <i>Bacillus cereus</i>	41
Tableau 10 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
Tableau 11 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour <i>Klebsiella pneumoniae</i>	42
Tableau 12 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour <i>Escherichia coli</i>	44
Tableau 13 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour <i>Micrococcus luteus</i>	45

Liste des photos

Photo 01	Coloration de Gram des souches bactériennes testées.....	38
Photo 02	Effet antimicrobien des extraits algaux sur <i>Bacillus cereus</i> ATCC10876 et <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538.....	48
Photo 03	Effet antifongique des extraits algaux sur <i>Candida albicans</i> ATCC10231.....	51

*INTRODUCTION
GENERALE*

Depuis la nuit des temps, les hommes ont utilisé les produits naturels à bases de plantes terrestres, marines ou d'extraits organiques, pour leurs propriétés biologiques et à des fins thérapeutiques et cosmétiques (**Mann, 2000**).

Selon des estimations, le nombre total d'espèces marines représente environ la moitié de la biodiversité totale de la planète. Seulement 1% des espèces marines identifiées ont été étudiées à ce jour. L'étude des produits d'origine marine a débuté à la fin des années 1960 et a conduit à l'isolement d'environ 10000 substances. Beaucoup des extraits isolés présentent une potentialité pharmacologique, bien supérieure à celle de produits naturels provenant de plantes ou d'organismes terrestres (**Gonzales, 1997**).

Parmi les organismes marins, les algues marines sont toujours identifiées comme un sous-exploité des ressources végétales bien qu'elles sont utilisées dans les régimes alimentaires ainsi que les remèdes traditionnels dans l'hémisphère Oriental (**Heo et al., 2009**).

À l'échelle mondiale, les algues sont exploitées majoritairement dans le secteur de l'agroalimentaire (70%), et essentiellement sur le marché de l'alimentation humaine et la médecine en particulier dans les pays asiatiques, du fait de leur richesse en minéraux et en polysaccharides ; Dans les sociétés polynésiennes, l'utilisation des algues était traditionnelle, mais elle est encore importante à Hawaii, où une trentaine d'espèces est consommée (**Guezennec et al., 2005**).

Les algues marines constituent un énorme réservoir de molécules naturelles potentiellement actives (**Rajeevet al., 2004 ; Blunt et al., 2006 ; 2008 ; 2009**). La littérature scientifique s'enrichit très régulièrement de données liées à la mise en évidence de métabolites bioactifs d'origine marine (**Borowitzka, 1992 ; Ely et al., 2004**). Plusieurs chercheurs ont étudié ces métabolites secondaires pour la recherche de nouvelles structures chimiques à activité biologique (**Ren et al., 2001 ; Engel et al., 2002 ; Steinberg et al., 2002 ; Kubanek et al., 2003 ; Paul et al., 2004 ; Younes et al., 2009**).

En général, les algues rassemblent quatre groupes qui sont différenciées par rapport à la couleur, *Cyanophyta* (algues bleues), *Chlorophyta* (algues vertes), *Rhodophyta* (algues rouges) et *Phaeophyta* (algues brunes) (Khan et al., 2010); Ces dernières constituent une bioressource importante, riche en composés tels que les polysaccharides, les acides aminés, les acides gras, les stérols, ainsi que les composés phénoliques (Deslandes et al., 2000). Leurs activités décrites sont très diverses, antimicrobienne (Reichelt et al., 1984 ; Etahiri et al., 2007), antioxydante (Etahiri et al., 2001 ; Zubia et al., 2007), anti-inflammatoire (Etahiri et al., 2004), cytotoxiques (Ktari et al., 1999) et antivirales (Cacamesse et al., 1980).

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de la biomasse algale que dispose notre pays. Ainsi, nous avons jugé nécessaire d'apporter des éléments de connaissances chimiques et biologiques relatifs à une algue brune. Il s'agit de *Cladostephus hirsutus*, appartenant à la famille des *Cladostephaceae* et qui est récoltée de la plage de Madrid, de la wilaya d'Ain Témouchent. Les travaux scientifiques antérieurs qui ont été réalisés sur cette algue se font rares, ce qui a suscité notre intérêt à investiguer les aspects phytochimiques et pharmacologiques de cette espèce.

Notre travail est ainsi subdivisé en trois parties ;

La première partie constitue une étude bibliographique qui renferme des généralités sur les algues : définition, classification, composition et utilisation, un aperçu général sur l'espèce étudiée, des notions générales sur l'activité antioxydante et les composés phénoliques en fin nous décrivons les microorganismes utilisés dans notre étude.

La deuxième sera consacrée à la présentation du matériel utilisé ainsi que la méthodologie suivie, à savoir :

- La préparation de l'extrait brut et ses fractions avec des solvants de polarité différente
- L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de cette algue par le test de la CAT ainsi que le dosage des composés phénoliques à savoir : phénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés ;
- La réponse antimicrobienne des extraits de cette espèce vis-à-vis sept souches bactériennes potentiellement pathogènes et une levure.

Enfin, dans **la troisième partie**, nous discutons les résultats obtenus lors de cette étude pour terminer par une conclusion et les perspectives attendues.

Synthèse bibliographie

I.1 Définition

Les algues regroupent un ensemble d'organismes très variés (Leclerc et al., 2010). Comme tous les végétaux, elles possèdent des pigments chlorophylliens qui leur procurent l'énergie nécessaire à leur survie ; elles ont également besoin d'un peu d'eau, de lumière et de dioxyde de carbone (CO₂) afin d'effectuer la photosynthèse (Cabioc et al., 1992 ; Raven et al., 2007). Elles constituent une part très importante de la biodiversité, et une des bases des réseaux trophiques des milieux aquatiques d'eaux douces, saumâtres et marines (Lee et al., 1989).

Les algues marines sont distribuées naturellement à travers le monde (Clarisse et al., 1988) ; elles forment une source riche de métabolites structurellement originaux et biologiquement actifs (Borowitzka et al., 1992). Près de 30000 espèces d'algues ont été répertoriées à ce jour (Leclerc et al., 2010).

I.2 Classification

Certains phycologistes considèrent toutefois encore les algues comme des plantes (Bugnon, 1971). La biodiversité dans les macroalgues est basée sur les différences entre les trois pigments chlorophylles, caroténoïdes et phycobiliprotéines qui distinguent les algues en quatre groupes: rouges (*Rhodophyta*), vertes (*Chlorophyta*), brunes (*Phaeophyta*) et bleu-vert ou *Cyanobactéries* (autrefois appelées *Cyanophycées*) (Tableau 01) (Leclerc et al., 2010). Cette différence offre la possibilité de trouver une large variété de composés naturels ayant des propriétés intéressantes.

Tableau 01 : classification des algues selon les pigments trouvés (Leclerc et al., 2010).

Algues	Pigments dans les algues
Algues bleues	Chlorophylle a + phycoérythrine + phycocyanine +allophycocyanine
Algues vertes	Chlorophylle a + Chlorophylle b + caroténoïdes
Algues brunes	Chlorophylle a + Chlorophylle c + caroténoïdes (surtout fucoxanthine)
Algues rouges	Chlorophylle a + phycoérythrine + phycocyanine +allophycocyanine
Diatomées	Chlorophylle a + Chlorophylle c + caroténoïdes (fucoxanthine, diatoxanthine, diadinoxanthine et d'autres).

I.3 Composition des algues

La littérature scientifique s'enrichit très régulièrement de données liées à la mise en évidence de métabolites bioactifs d'origine marine (**Guezennec et al., 2005**).

Les algues représentent 90% d'eau (10 à 15%) de son poids de plus que chez les autres végétaux, en outre, le contenu exceptionnel en oligo-éléments, vitamines et protéines font des algues une source alimentaire non négligeable (**Guillaume et al., 2011**). Lorsque ces dernières sont de grande qualité nutritionnelle (acide aminé essentiel), alors de nombreuses algues sont utilisées comme source de protéine végétale, riche en vitamines (A. B. C. D. E. K. PP) (20 à 35%) du poids de matière sèche (**Leclerc et al., 2010**) ; 20 % poids sec des sels minéraux comme « Na, I, Ca, K, Po » (**Guezennec et al., 2005**).

Classiquement, on considère que la teneur lipidique, notamment des macroalgues, est très faible (1 à 5 %) de la matière algale sèche (**Becker, 1994 ; Marfaing et al., 2007**).

Les algues sont en général riches en polysaccharides (**Guezennec et al., 2005**). Plus de la moitié de matière sèche des algues (40-70%) selon l'espèce, exploitée comme gélifiant et épaississant dans l'industrie agroalimentaire et textile. On trouve des alginates dans les algues brunes, des carraghénanes dans les rouges, des agars et d'autres polysaccharides sulfatés dans les vertes (**Guezennec et al., 2005**).

Elles sont riches en fibres (de 33 à 61%), qui facilitent le transit intestinal, leur structure est variée et différente de celle des végétaux terrestres (**Lahaye et al., 1991**).

Face aux métabolites primaires classiques (glucides, protéides et lipides), les végétaux accumulent habituellement des métabolites dits « secondaires » (**Herbert, 1989**). Ils ne sont pas indispensables pour l'organisme mais jouent nécessairement un rôle important de part la machinerie enzymatique complexe nécessaire à leur production ; Ils représentent donc une grande source potentielle d'agents thérapeutiques (**Thomas, 2009**).

Parmi ces composés chimiques, les algues renferment des phlorotannins (phloroglucinol), stérols et tocophérols (**Schwarz et al., 2001**), les caroténoïdes, les composés phénoliques, les tanins, les flavonoïdes, les terpénoïdes (monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes, stéroïdes, tétraterpènes) et les alcaloïdes à un ou plusieurs atomes d'azote hétérocycliques (**Chouikhi, 2013**).

I.4 Utilisation

Les algues formées sur les côtes un bourrelet de protection contre le choc répété et violent des vagues, diminuant la désagrégation des roches, mais elles sont maintenant une source de valeur qui se recueille commercialement et s'exploite industriellement (**Naegelé,**

1967; Gayral, 1975). Du fait de leurs propriétés texturant dans le secteur de l'agroalimentaire (gélifiantes, épaississantes, émulsifiantes et stabilisantes), mais aussi dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques (thalassothérapie) et alimentaire ou comme engrais « source d'azote et de carbone » (Guezennec *et al.*, 2005).

Elles constituent des pistes prometteuses de développement, notamment dans les domaines des antibactériens, des anti-inflammatoires, voir des antitumoraux à plus long terme (Younes *et al.*, 2009); Elles sont entrées aujourd'hui dans le secteur des compléments alimentaires grâce à leurs propriétés nutritionnelles remarquables (Pérez *et al.*, 1997; Kornprobst *et al.*, 2006; Bourdonnec *et al.*, 2011).

Les algues brunes, qui sont des phéophycées de 1500 espèces (Lahaye *et al.*, 1997) sont l'une des principales espèces d'algues cultivées le long de la côte chinoise, elles sont une bonne source d'alginate et carraghénanes (Guezennec *et al.*, 2005), elles sont utilisées comme produits alimentaires et ont été utilisées dans les herbes médicinales traditionnelles depuis longtemps (El hattab *et al.*, 2008).

II.1 Description botanique

Cladostephus hirsutus (Linnaeus) a été identifiée par Linné et actualisée par Boudoureque et Perret en 1977. Elle est formée d'un thalle noirâtre, rigide, formé d'axes en queue de rat de 10 à 25 cm, elle est constituée de portant des verticilles de ramules courts, peu ramifiés et recourbés vers le sommet du thalle (Délepine et *al.*, 2002) (Figure 01).



Figure 01: *Cladostephus hirsutus* (<http://www.algaebase.org>).

II.2 Classification

La classification de Muller et *al.* (1986) est la plus utilisée actuellement. La famille *Sphacelariaceae* est caractérisée par les trois genres *Sphacelari*, *Sphacela* et *Cladostephus*. Ce dernier genre comprend quatre espèces : *C. hariatii*, *C. setaceus*, *C. spongiosus* et *C. spongiosus f. verticillatus* (Figure 02).

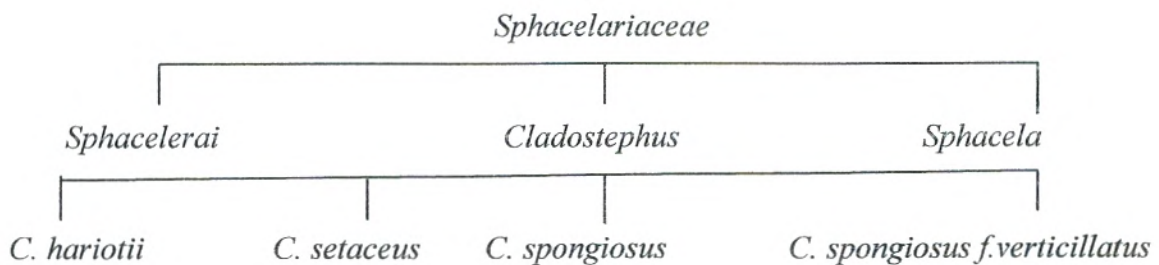


Figure 02 : Systématique de la famille des *Sphacelariaceae* (Muller et *al.*, 1986).

II.3 Position systématique

Selon Cavalier-Smith (1981-1995), la classification botanique est la suivante :

Domaine	Eucaryotes
Embranchement	Straménopiles
Sous-embranchement	Ochrophyta
Classe	Phaeophycées
Ordre	Sphacelariales
Famille	Cladostephacées
Genre	<i>Cladostephus</i>
Espèce	<i>Cladostephus hirsutus</i>

II.4 Récolte et utilisation

Cette espèce est récoltée à la main ou à l'aide de petites dragues. Elle trouve son utilisation potentielle médicale en raison de sa richesse en phlorotannins (Boudouresque et al., 1977).

II.5 Habitat

Cladostephus hirsutus est largement distribuée dans les régions tempérées comme la mer méditerranéenne (Muller et al., 1986) ; Elle est présente également en Atlantique du Maroc jusqu'à l'Irlande (El hattab et al., 2008).

II.6 Cycle biologique

Le cycle de vie de cette algue est digénétique, c'est-à-dire cycle à deux générations. La plante diploïde (2n) (sporophyte) forme des spores (n) par méiose. Les spores sont libérés dans l'eau, se fixent et engendrent des plantes haploïdes (gamétophytes n). Ces gamétophytes libèrent des gamètes (formés par mitose) qui fusionnent pour donner un zygote (2n), qui donnera une nouvelle plante (un sporophyte 2n).

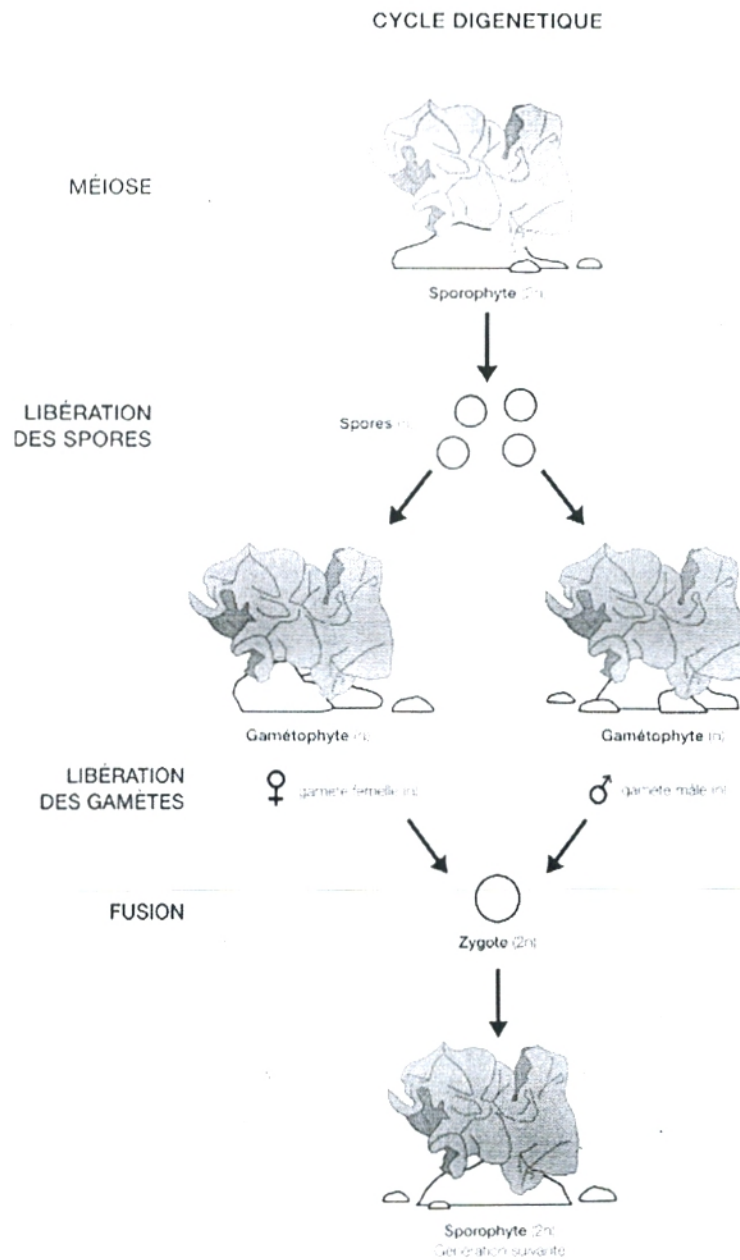


Figure 03: Schéma d'un cycle de Vie digénétique (Réseau de Suivi Lagunaire Languedoc-Roussillon, 2011).

II.7 Travaux antérieurs

Les principaux travaux relatifs à l'étude de l'espèce *C. hirsutus* sont rapportés ci-dessous :

Dere et al., (1998) ont étudié l'effet du solvant d'extraction sur les teneurs en chlorophylle A et B et en caroténoïdes totaux chez quatre espèces d'algues dont *Cladostephus hirsutus* qui a présenté la valeur la plus élevée en caroténoïdes.

L'étude chimique effectuée par **El Hattab et al. (2004)** a abouti à l'identification de nouveaux métabolites tels que les fucoxanthines, apo-fucoxanthinoides et furanoides dans les extraits lipidiques de l'algue brune *Cladostephus spongiosus f. verticillatus*.

Taskin et al. (2007) ont évalué l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques de *Cladostephus spongiosus f. verticillatus* et autres espèces de la mer Égée (Turquie) contre six bactéries pathogènes, 3 bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* et *Enterococcus faecalis*) et 3 bactéries Gram négative (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*).

Les travaux de **Bouzidi et al. (2008)** sur l'analyse des stérols totaux de quatre espèces d'algues brunes dont *Cladostephus hirsutus*, par infrarouge ont démontré que le fucostérol est le stérol majoritaire chez toutes ces algues.

III.1 Généralité

Boyd *et al.*, 2003 ont défini l'antioxydant comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques. Se sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs (Vansant, 2004).

Alors que, ils sont officiellement autorisés pour l'utilisation dans l'alimentation ; leur présence se contrôle également nécessaire au sein des produits pharmaceutiques et cosmétiques afin d'éviter leur dégradation (Halliwell *et al.*, 1999).

Cependant, des études toxicologiques ont montré que certains antioxydants synthétiques sont reconnus comme sources de danger (Barlow, 1990; Evans *et al.*, 1992) ; Si pour quoi la recherche de nouveaux antioxydants naturels est l'objectif de nombreux industriels et scientifiques (Namiki, 1990; Wanasundara *et al.*, 1994; Larson, 1997; Pietta, 2000; Moure *et al.*, 2001).

D'un point de vue biologique, les composés antioxydants peuvent protéger les systèmes cellulaires des effets des processus potentiellement nocifs qui causent l'oxydation excessive. Ils sont la stratégie préventive la plus prometteuse contre la formation des cataractes (Hale *et al.*, 2013).

Parmi les systèmes de défense, nous citons :

III.2 Systèmes de défense

Systèmes de défense permettent de prévenir la formation radicalaire ou de limiter les lésions d'oxydation résultantes. Ces systèmes peuvent être endogènes ou exogènes, d'origine nutritionnelle.

III.2.1 Antioxydants endogènes

Ce sont des enzymes ou protéines antioxydantes (Superoxyde dismutase, Catalase et Glutathion peroxydase) élaborées par notre organisme avec l'aide de certains minéraux. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge (Mika *et al.*, 2004).

III.2.2 Antioxydants exogènes

Ils sont présents dans l'alimentation comme les vitamines (A, C, E) et les polyphénols en particulier les flavonoïdes, ainsi que les cofacteurs des enzymes impliquées dans les systèmes antioxydants endogènes comme le sélénium, le zinc et le manganèse. Ces

antioxydants nutritionnels sont indispensables mais leur action est limitée jusqu'à ce qu'ils soient régénérés.

Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques très variés tels les alcaloïdes, les terpènes, les composés phénoliques, etc. (Macheix *et al.*, 2005). Les spécificités caractéristiques des composés phénoliques sont la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyle libres ou engagés avec des glucides (Boizot *et al.*, 2006).

La plupart des algues marines contiennent des polyphénols algaux aussi appelés phlorotannins, fournissant une grande variété d'activités biologiques particulièrement l'activité antioxydante, les plus élevées sont retrouvées dans les algues brunes entre 5 et 15% du poids sec (Glombitza *et al.*, 1995).

III.3 Méthodes d'études de l'activité antioxydante *in vitro*

Des nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des composés purs ou des extraits. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel.

Parmi ces techniques, nous citons : la réduction du fer (Oyaizu, 1986), le piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) (Sanchez-Moreno *et al.*, 1998), la quantification de la capacité antioxydante totale (Prieto *et al.* (1999).), la méthode de décoloration du bêta-carotène (Sun et Ho, 2005)....etc.

IV.1 Généralité

Face à l'apparition de formes résistantes de plusieurs bactéries à certains antibiotiques, la recherche de nouvelles molécules actives est devenue une nécessité (Chbani et al., 2011 ; Westh et al., 2004).

C'est pourquoi les travaux scientifiques en cours s'intéressent à l'utilisation des molécules actives à structure chimique originale (Glombitza et al., 1974 ; Smit et al., 2004).

IV.2 Microorganismes utilisés

Les micro-organismes sont souvent décrits comme unicellulaires, quelques protistes unicellulaires sont visibles à l'œil nu et quelques espèces multicellulaires sont microscopiques.

On trouve les micro-organismes dans tous les types d'environnement présents dans la nature ; ils colonisent tous les écosystèmes, comme les sols, les eaux douces et les eaux marines, l'air, mais aussi des environnements plus hostiles tels que les pôles, les déserts, les geysers, le fond des océans, etc (Nasser et al., 2004).

IV .2.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus est une cocci à Gram positif, non sporulé, immobile, coagulase et catalase positive. Il croit plus rapidement en aérobie qu'en anaérobie.

C'est une bactérie mésophile, capable de se multiplier à des valeurs de pH comprises entre 4,2 et 9,3 (Laurent et al., 1998) ; Alors dans beaucoup de pays, cette bactérie est considérée comme le deuxième ou le troisième germe pathogène le plus commun causant des manifestations d'intoxication alimentaire (Ananou et al., 2005).

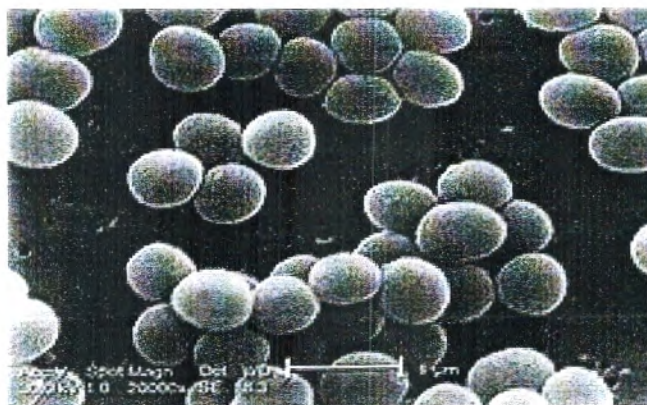


Figure 04 : *Staphylococcus aureus* au microscope électronique (<http://upload.wikimedia.org>)

IV.2.2 *Escherichia coli*

Cette bactérie est un bacille Gram négatif, de la famille des *Entérobacteriaceae*. elle fermente le glucose par la voie des acides mixtes (Kaper et al., 2004). Elle est considérée comme un hôte naturel de la microflore digestive de l'homme et de nombreuses espèces animales (Federighi, 2005).

E. coli constitue l'espèce dominante de la flore aérobie anaéro-tolérante (Ahoyo et al., 2007) ; à raison de 10^8 par gramme de fèces (flore totale : 10^{11} à 10^{12} bactéries par gramme) (Delarras, 2007).

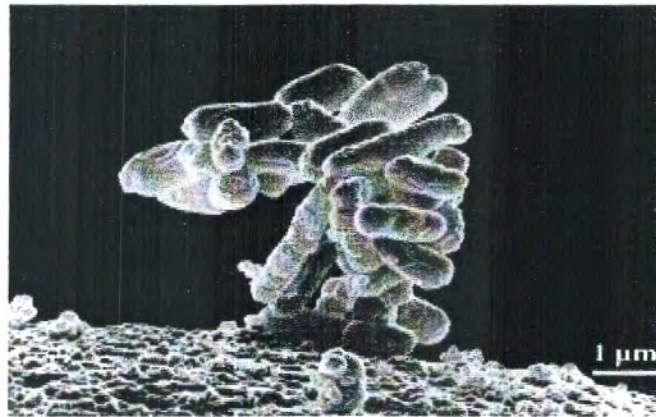


Figure 05: *Escherichia coli* au microscope électronique à balayage (www.futura-sciences.com)

IV.2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est une bactérie à Gram négatif omniprésente qui est l'une des trois principales causes des infections humaines, un facteur majeur de son importance comme un agent pathogène est sa résistance essentielle aux antibiotiques et aux désinfectants (Stover et al., 2000). Cette bactérie pousse dans le sol, les marais côtiers et les habitats marins, ainsi que sur des tissus végétaux et animaux (Hardalo et al., 1997).



Figure 06: *Pseudomonas aeruginosa* au microscope électronique (fr.wikipedia.org).

IV.2.4 *Bacillus cereus*

Le germe *B. cereus* correspond à un grand bacille en forme de bâtonnet de 1 μm de large pour 3 à 4 μm de long, sporulé, mobile grâce à une ciliature péritriche, de type respiratoire aéro-anaérobie et de Gram positif. Cette bactérie retrouvée de manière ubiquitaire dans le sol, est fréquemment responsable d'intoxications alimentaires opportunistes, souvent de l'ingestion d'aliments non réfrigérés après cuisson et après une première consommation (Logan et al., 2006).

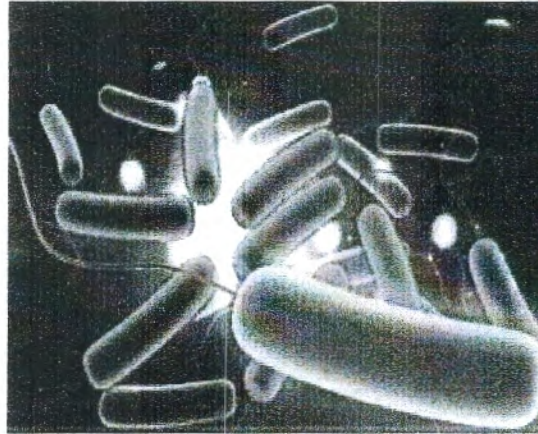


Figure 07: *Bacillus cereus* au microscope électronique (<http://www.mybiolumix.com>).

IV.2.5 *Micrococcus luteus*

Ce germe de famille des *Micrococcaceae* est une bactérie Gram positive aérobie, sphérique et saprophyte (Madigan et al., 2005).

C'est une bactérie du sol, des poussières, de l'eau et de l'air et fait partie de la flore naturelle de la peau des mammifères, elle n'est pas pathogène et elle est considérée comme un contaminant naturel, elle peut aussi coloniser la bouche, des muqueuse, de l'oropharynx et des voies respiratoires supérieures humaines (Greenblatt et al., 2004).

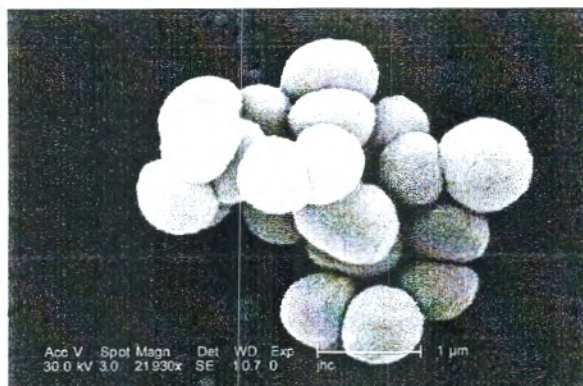


Figure 08: *Micrococcus luteus* au microscopie électronique à balayage (<http://upload.wikimedia.org>).

IV.2.6 *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae de la famille des *Entérobactéries* est la plus fréquente des bactéries à Gram négatif impliquée dans les cas de pneumonies nosocomiales (dont le taux de mortalité atteint souvent environ 50 %) (Denis et al., 2007).

Cette bactérie est responsable des infections respiratoires, intestinales et urinaires (pneumonies, abcès pulmonaires, pleurésies) (Lawlor et al., 2005).

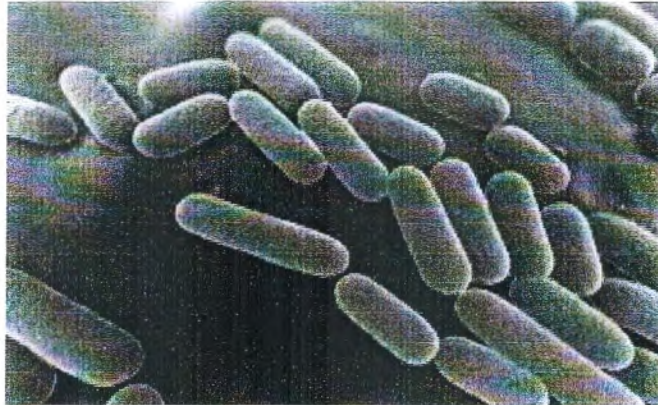


Figure 09 : *Klebsiella pneumoniae* au microscope électronique (<http://www.bioquell.com>).

IV.2.7 *Candida albicans*

Cette levure est l'espèce la plus importante et la plus connue du genre *Candida* (Ochiai et al., 2000); Elle provoque des infections fongiques (*Candidas* ou *candidose*) essentiellement au niveau des muqueuses digestive et gynécologique.

Les candidoses sont une cause importante de mortalité chez les patients immunodéprimés comme les patients atteints du sida, les patients cancéreux sous chimiothérapie ou après transplantation de moelle osseuse (Bennett et al., 2005).

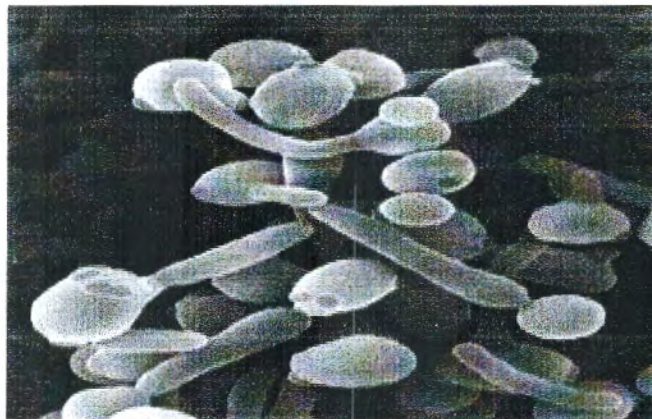


Figure 10 : *Candida albicans* au microscope électronique (<http://cdn.shopify.com>).

Matériel et Méthodes

I.1 Zone d'échantillonnage

L'échantillonnage de l'algue étudiée *Cladostephus hirsutus* a été fait durant le mois de juin 2013 à la plage de Madrid, de la wilaya d'Ain Témouchent, située à environ 69 Km au nord de la wilaya de Tlemcen (Figure 11).

Les paramètres géographiques de cette région sont représentés dans le **tableau 02**.

Tableau 02 : Situations géographiques de la station de la récolte.

Station	Altitude (m)	Latitude (N)	Longitude (O)	Etage bioclimatique
Plage Madrid	0	1°28'	35°18'	Littoral



Figure 11 : Situation géographique de station de la récolte (Encarta, 2009).

○ Station de la récolte.

I.2 Méthode d'échantillonnage

Les échantillons de *C. hirsutus* ont été identifiés par le docteur BENGUEDDA Wassila, laboratoire de recherche : Valorisation des actions de l'homme pour la protection de l'environnement et application en santé publique, Département d'Écologie, Université de Tlemcen.

La récolte de l'algue est faite à la main, les échantillons après leurs lavages avec l'eau de mer sur place ont été emportés au laboratoire. Ces algues sont lavées par l'eau de robinet,

ensuite par l'eau distillée afin d'éliminer l'excès du sel et les épiphytes attachés, puis séchées à l'ombre à température ambiante pendant 7 jours (Gonzalez del val *et al.*, 2001).

Après broyage et tamisage une poudre algale est obtenue (Figure 12).

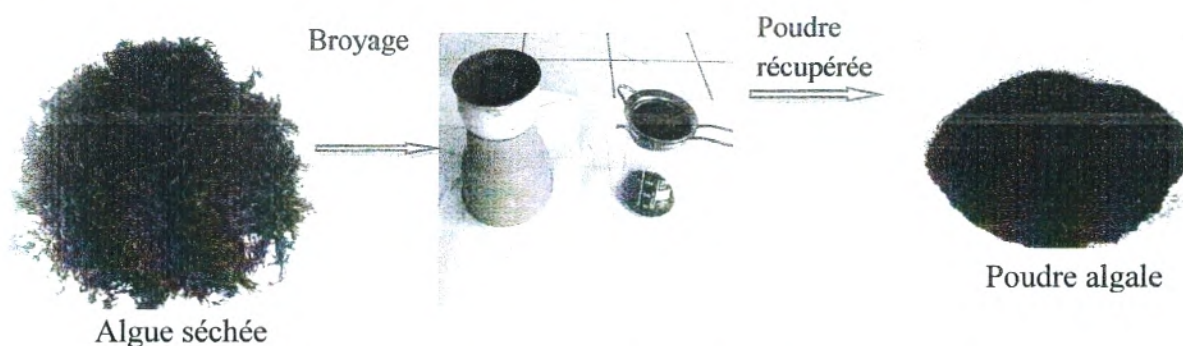


Figure 12 : Séchage et broyage de l'algue à gauche et poudre à droite.

I.3 Préparation de l'extrait algal

I.3.1 Méthode d'extraction

L'extraction par Soxhlet (Figure 13) est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première (Hellio *et al.*, 2001).

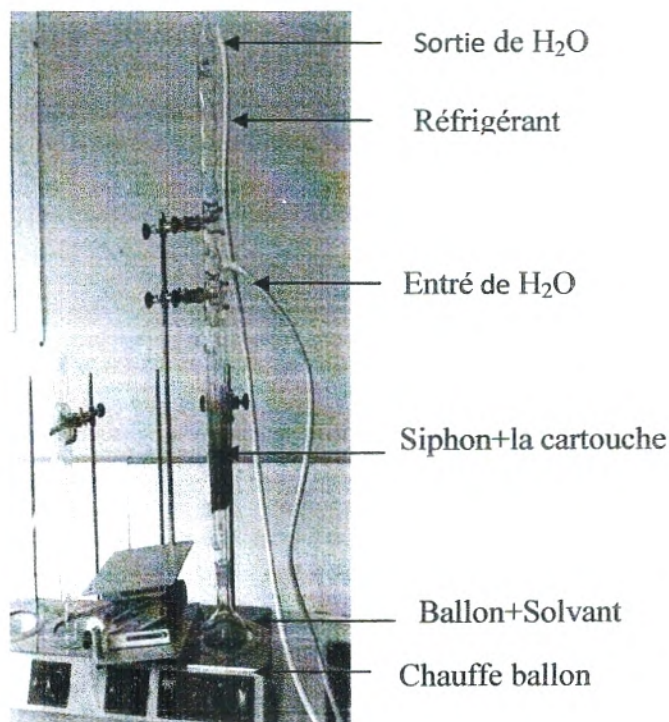


Figure 13: Appareil Soxhlet.

I.3.2 Préparation de l'extrait brut

une quantité de 50 g du matériel végétal broyé est ajoutée à un mélange de 350 ml méthanol : chloroforme (2:1)(v/v) pendant 6h. la solution récupérée est évaporée à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif de type HAHNSHIN HS HS-2005V-N à 40°C Le résidu secs pesé est récupéré par 10 ml du méthanol (Zhang et al., 2004) .

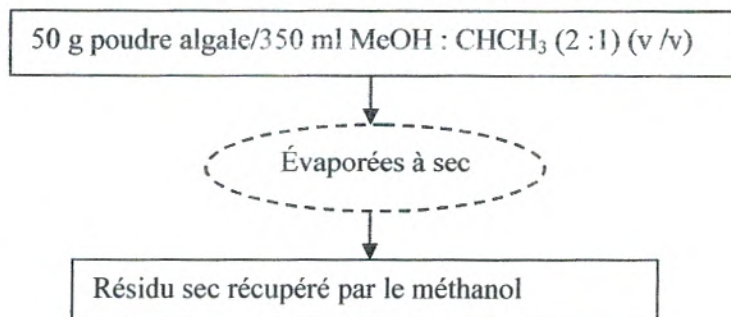


Figure 14 : Protocole d'extraction d'extrait brut (Zhang et al., 2004).

I.3.3 Fractionnement de l'extrait brut

I.3.4 Protocole d'extraction

Le fractionnement de l'extrait brut est réalisé par la méthode de Zhang et ses collaborateurs (2004). Une quantité de 100 g de poudre d'algale *C. hirustus* est ajoutée à un mélange de 500 ml méthanol : chloroforme (2:1)(v/v) dans un extracteur de Soxhlet pendant 6 h. L'extraction a été répétée deux fois, les solutions récupérées sont évaporées à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif de type HAHNSHIN HS HS-2005V-N pour donner un extrait brut. Ce dernier est dissout dans 90% méthanol aqueux (MeOH-H₂O), puis extrait avec 100 ml d'éther de pétrole (EP). La solution aqueuse du méthanol est évaporée sous pression réduite, qui a ensuite été dissoute dans 2 x 100 ml d'eau distillée puis extraite successivement avec 100 ml d'acétate d'éthyle (AE), 100 ml de dichlorométhane (DM) (CH₂Cl₂), et 100 ml de n-butanol (BOH), respectivement. Les extraits résultants ont été évaporés à sec sous pression réduite (40°C), pour rapporter les cinq différentes fractions selon l'organigramme ci-dessous : (Figure 15).

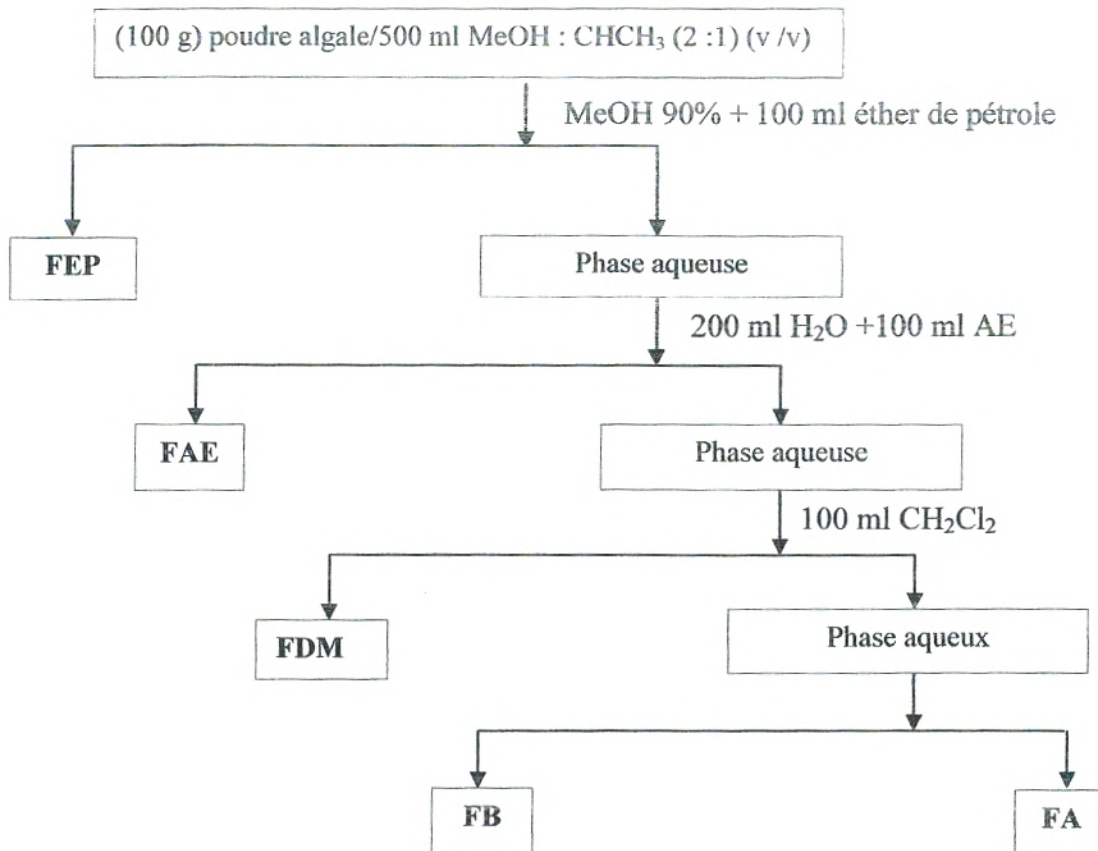


Figure 15: Protocole d'extraction (Zhang *et al.*, 2004).

Fraction éther de pétrole (FEP) ; Fraction acétate d'éthyle (FAE) ; Fraction dichlorométhane (FDM) ; Fraction butanolique (FB) ; Fraction aqueuse (FA).

I.3.3 Évaporation

Les solutions sont évaporées à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif de type HAHNSHIN HS HS-2005V-N à 40°C (Figure 16). Les résidus obtenus sont solubilisés dans le méthanol et conservés à 4°C.

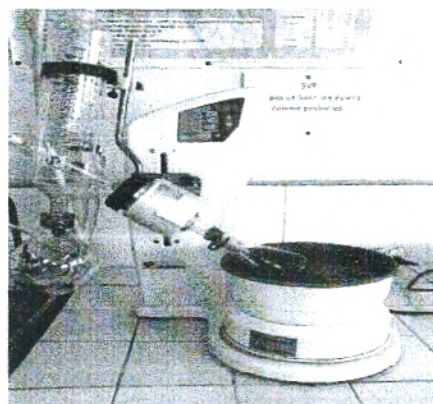


Figure 16: Évaporation par le rotavapor

I.4 Calcul des rendements en extraits secs (AFNOR, 1986)

Nous pouvons déterminer le rendement comme étant le rapport entre la masse du ballon obtenue après évaporation (M1) et la masse du ballon avant évaporation (M2).

Le rendement (**Rdt**) est exprimé en pourcentage, et il est donné par la formule suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{M1 - M2}{M3} \times 100$$

M1 : masse du ballon après évaporation ;

M2 : masse du ballon avant évaporation ;

M3 : masse de la matière algale de départ.

II.1 .1 Dosage des phénols totaux

Principe

Le dosage des phénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit dès 1965 par **Singleton et ses collaborateurs**. Ce réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (**Ribéreau et al., 1968**).

La coloration produite, dont l'absorption maximale est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Boizot et Charpentier, 2006**).

Mode opératoire

Un volume de 200 μ l pour chaque extrait est introduit dans des tubes à essais, le mélange (1ml du réactif de Folin- Ciocalteu dilué 10 fois et 0,8 ml de carbonate de sodium à 7.5%) est additionné. Les tubes sont agités et conservés durant 30 min à la température ambiante. L'absorbance est mesurée à 765 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre SPECORD 200 Plus.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif.

Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalents d'acide gallique par gramme de la matière algale sèche (mg EAG/g MS).

II.1 .2 Dosage des flavonoïdes

Principe

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par **Zhishen et al. (1999)** avec le trichlorure d'aluminium et la soude. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose absorbe dans le visible à 510 nm.

Mode opératoire

Un volume de 500 μ l de solution méthanolique de catéchine à différentes concentrations ou des extraits dilués est ajouté à 1500 μ l de l'eau distillée. Au temps zéro, 150 μ l de nitrite de sodium ($NaNO_2$) à 5 % est ajouté au mélange. Après 5 min, 150 μ l de

trichlorure d'aluminium (AlCl_3) à 10 % (m/v) est rajouté. Après l'incubation de 6 min à la température ambiante, 500 μl d'hydroxyde de sodium (NaOH) (1 M) est additionné. Immédiatement, le mélange est complètement agité. L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est mesurée à 510 nm contre le blanc.

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits algaux étudiée est exprimée en milligramme (mg) équivalents de la catéchine par gramme de matière algale sèche (mg EC/g MS).

II.1.3 Dosage des tanins condensés

Principe

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode de vanilline en milieu acide (Julkunen-Titto., 1985). Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré mesuré à 500 nm.

La réactivité de la vanilline avec les tanins n'implique que la première unité du polymère.

Mode opératoire

Un volume de 50 μl de l'extrait brut et des différentes fractions est ajouté à 1500 μl de la solution vanilline/méthanol (4%, m/v) puis mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 750 μl de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) est additionné. Le mélange obtenu est laissé réagir à la température ambiante pendant 20 min. L'absorbance est mesurée à 550 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre SPECORD 200 Plus.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif.

Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalents de la catéchine par gramme de la matière algale sèche (mg EC/g MS).

II.2 Activité antioxydant totale (CAT)

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* de nos fractions a été réalisée par la quantification de la capacité antioxydant totale (CAT).

Principe

La capacité antioxydante totale (CAT) des extraits est évaluée par la méthode de phosphomolybdène de Prieto et al (1999). Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdate Mo (V) MoO^{2+} en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate /Mo(V) à pH

acide.

Mode opératoire

Un volume de 0.3 ml de chaque extrait est mélangé avec 3 ml de solution du réactif (0.6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium). Les tubes sont vissés et incubés à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 3 ml de la solution du réactif et 0.3 ml du méthanol et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon. La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalents d'acide ascorbique par gramme de matière sèche (mg EAA/ g MS).

III. 1 Souches testées

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne, les extraits d'algue préparés ont été testés sur les microorganismes les plus rencontrés dans les pathologies humaines qui sont illustrés dans le **tableau 03**.

Tableau 03 : Source des souches testées

Souches testées		Code
Bactéries	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
	<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603
Levure	<i>Candida albicans</i>	ATCC 26790

ATCC: American Type Culture Collection

III.2 Milieux de culture

Suivant les méthodes employées dans l'essai et selon les souches, nous avons utilisé les milieux de culture suivants :

- Bouillon Brain Heart Broth (BHB) et gélose Mueller Hinton (MH) pour les bactéries (Sigma-Aldrich).
- Bouillon et gélose Sabouraud pour la levure (Sigma-Aldrich).

III.3 Tests microbiologiques

III.3.1 Revivification et vérification de la pureté des souches

A partir des tubes de gélose inclinée conservés contenant les souches microbiennes étudiées, on réalise un repiquage sur Muller Hinton pour les bactéries et sur gélose Sabouraud pour la levure. Les boîtes de Petri sont incubées respectivement à 37°C pendant 24 h et à 32°C pendant 48 h (Chbani et *al.*, 2001).

III.3.2 Coloration de Gram

Principe

Cette coloration différentielle repose sur l'aptitude ou non de la paroi bactérienne à s'opposer à la décoloration par l'éthanol. Un frottis bactérien est préalablement séché puis coloré au violet de gentiane.

pour les bactéries dites Gram positif (+) : leur paroi est épaisse et composée de peptidoglycane qui leur donne leur imperméabilité à l'éthanol. Chez ces bactéries, la décoloration échouera, on dit que la bactérie conserve sa couleur violette.

pour les bactéries dites Gram négatif (-) : leur paroi ne contenant qu'une fine couche de peptidoglycane et composée de lipides en quantité importante. La décoloration sera effective, le cytoplasme de la bactérie sous l'action de l'alcool sera décoloré. Une contre coloration à la fuschine (colorant rose) recolorera en rouge rosé les cytoplasmes décolorés.

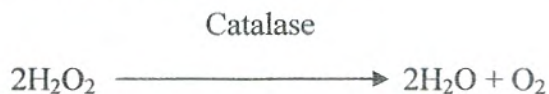
Technique

La technique utilisée est celle de **Lambin et German (1969)** qui consiste à déposer sur une lame une goutte d'eau distillée ; un prélèvement bactérien est étalé dessus. La préparation est fixée à la flamme du bec Bunsen. Une première coloration par le violet de gentiane est effectuée. Un temps d'action de 30 sec à 1 min est marqué puis la préparation est rincée à l'eau distillée. Le frottis est recouvert par le lugol, laissé pendant 20 sec puis rincé à l'eau distillée. Cette dernière opération est répétée une deuxième fois. Par la suite, l'échantillon est décoloré à l'alcool éthylique 80° versé goutte à goutte sur la lame inclinée. Cette dernière est rincée à l'eau distillée. Une deuxième coloration à la fuschine est réalisée puis laissée de 30 sec à 1 min. La lame est lavée à l'eau distillée puis séchée à la flamme du bec Bunsen. L'échantillon est observé sous microscope photonique au grossissement (G 10 x 100) en mettant une goutte d'huile à immersion.

- Les bactéries Gram positif (+) apparaissent colorées en violet.
- Les bactéries Gram négatif (-) apparaissent colorées en rose.

III.3.3 Test de catalase

Certaines bactéries sont capables de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) grâce aux enzymes qu'elles synthétisent notamment la catalase. Cette enzyme est capable de décomposer l'eau oxygène selon la réaction :



Ce test a pour but de différencier les microorganismes de catalase- et des entérobactéries (catalase+), sur une lame une colonie est mise en suspension avec une ou deux gouttes de solution de H₂O₂. La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (O₂) (Marchal et al., 1991).

IV. Évaluation de l'activité antimicrobienne

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de *C. hirsutus*, on a suivi la méthode de diffusion en milieu gélosé. Cette méthode est effectuée par un dépôt de disque en papier filtre, imbibé de l'extrait à tester sur un milieu gélosé préalablement coulé dans des boîtes de Pétri etensemencé par 10⁸ UFC/ml du microorganisme à tester.

Après incubation, l'évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits se fait par une mesure du diamètre de la zone d'inhibition, qui se traduit par un halo clair autour du disque absorbant.

IV.1 Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture pure sur milieu d'isolement, frotter à l'aide d'une anse de platine stérile quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques, décharger l'anse dans 5 à 10 ml du (BHB) pendant 24h (Rahal et al., 2008). Après l'incubation bien homogénéiser la suspension microbienne, sa densité optique doit être de 0,08 à 0,1 mesurée à 625 nm (10⁸ UFC/ml) pour les bactéries et 0,11 à 0,15 mesurée à 540 nm (10⁷ UFC/ml) pour la levure. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien BHB stérile s'il est trop fort.

L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum (Atwal et al., 2003).

IV.2 Préparation des extraits

Imprégner les disques de 6 mm de diamètre avec 10 µl de chaque extrait algal préparé à trois concentrations différentes 50, 100 et 200 mg/ml. On aboutit alors à des doses de 0.5, 1 et 2 mg/disque pour chaque extrait. Un contrôle négatif a été fait avec des disques standards de DMSO.

IV.3 Test d'évaluation du pouvoir antimicrobien

A Partir d'une suspension bactérienne, tremper un écouvillon stérile, l'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum ; frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire tourner l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois (**Rahal et al., 2011**).

A l'aide d'une pince stérile, déposer les disques imprégnés en appuyant très légèrement au dessus pour les adhérer à la gélose. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 32°C pendant 48 h pour la levure.

Après l'incubation, des zones claires sont présentes autour des disques si l'extrait inhibe la croissance microbienne, la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire, ou résistante. Dans cette technique, il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion des extraits testés, donc nous avons procédé à la mesure du diamètre des zones d'inhibition de croissance microbienne (**Broadasky et al., 1976**).

IV.4 Antibiogramme

Le but de réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques. Nous avons utilisé des disques d'antibiotiques de 6 mm de diamètres à différentes concentrations (**Tableau 04**).

Tableau 04 : Liste des antibiotiques testés

Antibiogrammes	Code	Charge
Ampiciline	AMP	10 µg
Bacitracine	B	10 UI
Cefotaxime	CTX	30 µg
Lincomycine	L	15 µg
Penicilline	P	6 µg
Tétracycline	TE	30 µg
Vancomycine	VA	30 µg

IV.5 Application des disques d'antibiogramme

Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte. Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm, centre à centre ; Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide d'une pince bactériologique stérile pour s'assurer de son application. une fois appliqué, le disque ne doit pas être déplacé (**Rahal et al., 2011**).

Les boîtes sont incubées pendant 24 h à 37 °C pour les bactéries et 48 h à 30 °C pour la levure.

IV.6 Lecture

On mesure avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'une règle graduée sur le fond de la boîte ; Selon le résultats trouvé, on classe la bactérie dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire, ou Résistante (**Bonnet et al ., 2012**).

IV.7 Analyse statistique

Les données expérimentales obtenues à partir des expériences du dosage, de la teneur en capacité antioxydante totale et le pouvoir antimicrobien sont exprimées en tant que la moyenne \pm l'écart-type.

Résultats et Discussion

I.1 Rendement en extraits secs

Les rendements ont été déterminés par rapport à 100 g du matériel végétal sec et broyé, les résultats ont été exprimés en pourcentage et sont illustrés dans le **tableau 05**.

Tableau 05: Rendements en extraits obtenus à partir de l'algue *Cladostephus hirus*tus.

Extraits		Rendement (%)
Extrait brut	EB	2.483 ± 0.164
Fraction éther de pétrole	FED	0.579 ± 0.094
Fraction acétate d'éthyle	FAE	0.449 ± 0.00 4
Fraction Dichlorométhane	FDM	0.026 ± 0.013
Fraction n-butanol	FB	0.191 ± 0.037
Fraction aqueuse	FA	0.823 ± 0.157

Les résultats obtenus dans le **tableau 05** montrent que le rendement en extrait brut de l'ordre de 2.483% est supérieur par rapport aux autres fractions, suivi par la fraction aqueuse à raison de 0.823 %. Les rendements des autres fractions varient entre 0.026 ± 0.013 et 0.579 ± 0.094 %.

Ces résultats sont nettement faibles par rapport aux études de **Bhaskar et al. (2005)** sur l'espèce *S. marginatum*. Ces auteurs ont montré que le rendement obtenu en extrait brut est de 5.45%. Pour les autres fractions, ces rendements sont élevés et sont égales à 28.40, 25.04, 21.39, 14.38 et 10.80 % pour FEP, FB, FA, FAE et FDM respectivement.

I.2 Teneurs en phénol totaux, en flavonoïdes en tanins condensés

Les dosages spectrophotométriques ont été effectués à partir de l'extrait brut et les fractions de l'algue *C. hirus*tus afin de déterminer les teneurs en phénol totaux, en flavonoïdes et tanins condensés à partir des équations de la régression linéaire des courbes d'étalonnage (**Figure 17, 18 et 19**).

Les résultats obtenus dans le **Tableau06** sont exprimés en mg équivalents d'acide gallique par gramme de matière algale sèche (mg EAG/ g MS) pour les phénols totaux, et en mg équivalents de catéchine par gramme de matière algale sèche (mg EC/g MS) pour les flavonoïdes et les tanins condensés.

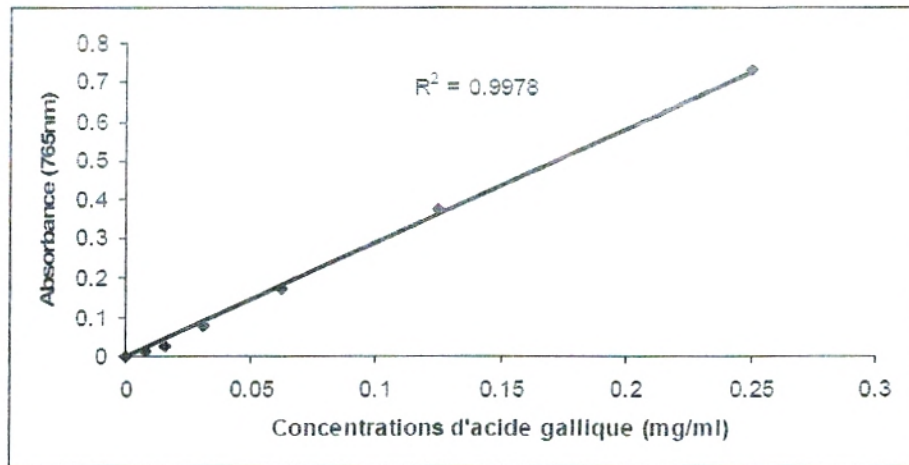


Figure 17 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

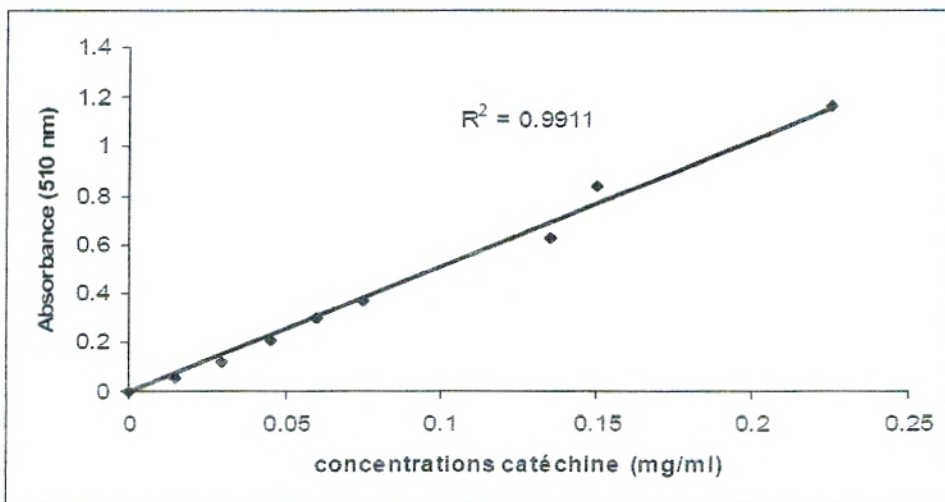


Figure 18 : Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

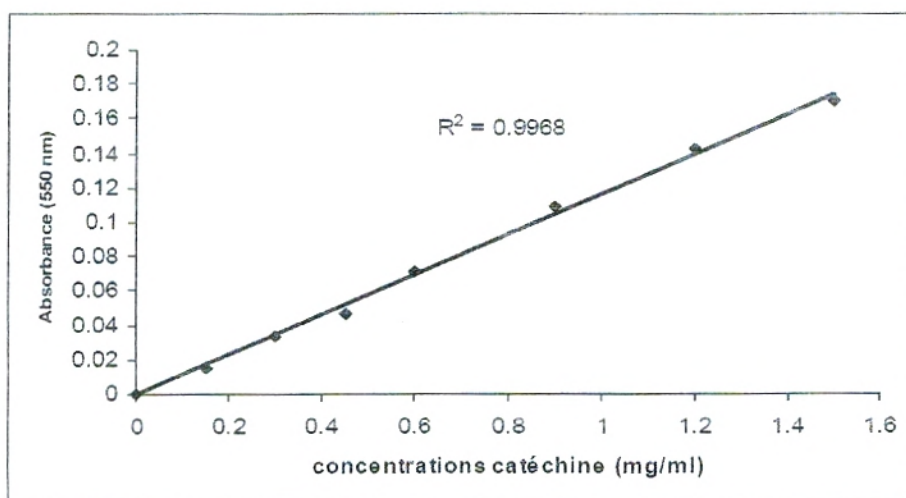


Figure 19 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés.

D'après le tableau 06, nous observons que la teneur élevée en phénols totaux est enregistrée dans l'extrait brut avec une concentration de 1.042 ± 0.004 mg EAG/ g MS. Pour les autres fractions, les teneurs obtenus sont faibles.

Tableau06 : Teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés dans les extraits de *C. hirustus*.

Extraits		Phénols totaux (mg EAG/g MS)	Flavonoïdes (mg EC/g MS)	Tanins condensé (mg EC/g MS)
Extrait brut	EB	1.042 ± 0.004	0.428 ± 0.004	2.739 ± 0.008
Fraction éther de pétrole	FEP	0.158 ± 0.002	0.094 ± 0.001	0.815 ± 0.003
Fraction acétate d'éthyle	FAE	0.526 ± 0.001	0.278 ± 0.004	2.783 ± 0.034
Fraction dichlorométhane	FDM	0.070 ± 0.001	0.025 ± 0.002	0.159 ± 0.002
Fraction n-butanol	FB	0.096 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.068 ± 0.003
Fraction aqueuse	FA	0.144 ± 0.001	0.017 ± 0.001	0.050 ± 0.001

Le dosage des flavonoïdes a montré des teneurs nettement faibles pour tous les extraits dont les valeurs varient entre 0.006 ± 0.001 et 0.428 ± 0.004 mg EC/ g MS. Pour les tanins condensés, la quantification de cette famille dans ces extraits a démontré la richesse de l'extrait brut et la fraction acétate d'éthyle avec des teneurs de 2.739 ± 0.008 et 2.783 ± 0.034 mg EC/ g MS. Les autres fractions ont présenté des concentrations en tanins légèrement élevées comparativement à celles des flavonoïdes.

Les résultats de notre dosage sont faibles comparativement à l'étude de **Bhaskar et al. (2005)** sur l'espèce *S. marginatum*. Les teneurs en phénols totaux reportées par ces auteurs sont élevées, elles sont de 24.61 mg EAG/g pour FA, suivi par la FDM (16.87 mg/g) et EB (11 mg/ g).

Par parallèle, **Chbani et ses collaborateurs(2012)** ont reporté des teneurs en phénols totaux plus élevées par rapport à notre étude. Ils ont trouvé des valeurs de 5.79 mg EAG/g dans FAE, 5.97 mg EAG/g dans FA et 6.10 mg EAG/g dans FEP, dont la plus élevée est enregistrée dans le FB de 7.00 mg EAG/g.

I.3 Capacité antioxydant totale

Dans cette étude, nous avons limité juste à la quantification de la capacité antioxydante totale de l'extrait brut et ses fractions de *C. hirustus*.

Le résultat obtenu dans la **Figure 20**, nous montre que tous les extraits présentent des capacités antioxydantes dont la meilleure est obtenue avec l'extrait brut et la fraction acétate d'éthyle avec des valeurs de 1.631 ± 0.008 et 1.383 ± 0.008 mg EAA/g MS, respectivement.

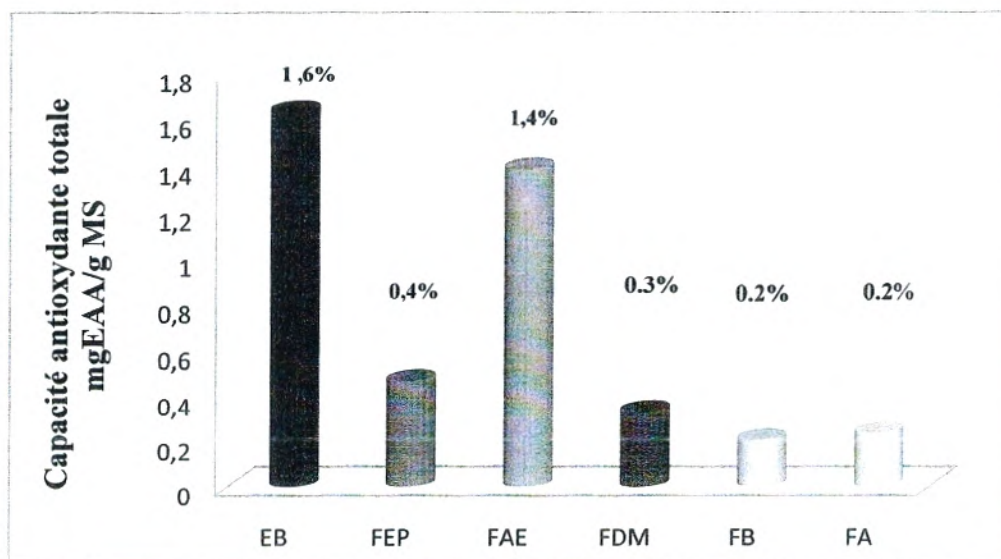


Figure 20: Capacité antioxydant totale des différentes fractions étudiée de *C. hirustus*

EB : Extrait brut ; **FEP :** Fraction Ether de Pétrole ; **FAE :** Fraction Acétate d'éthyle ;
FDM : Fraction Dichlorométhane ; **FB :** Fraction n-butanol ; **FA :** Fraction aqueuse.

La relation entre le dosage des composés phénoliques et le pouvoir antioxydant nous a permis de déduire la présence d'une corrélation positive entre la teneur en tanins condensés et le test de la capacité antioxydante totale avec tous les extraits, particulièrement, avec l'extrait brut et la fraction acétate d'éthyle.

Comparativement à l'étude d'algue brune pour **Bhaskar et al. (2005)** sur *S. marginatum* où les valeurs de CAT égalent à 39.62 mg EAA / g MS pour la FAE, 14.45 mg EAA /g MS pour FEP et des valeurs semblables pour FA (1.09 mg EAA /g MS), FB (1.01 mg EAA /g MS) et FDM (1.00 mg EAA /g MS).

II. Activité antimicrobienne

II.1 Test de catalase

Toutes les souches bactériennes sont pourvues de l'enzyme catalase.

Tableau 07 : Test de catalase.

Souches bactériennes	Test catalase
<i>Escherichia coli</i> ATCC8739	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	+
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	+
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	+

(+) : Catalase positive.

II.2 Coloration de Gram

Les photos ci-dessous représentent la coloration de Gram des souches bactériennes testées vue en microscope optique (Grossissement : 10 X 100).

II.3 Antibiogramme

Face aux problèmes de la résistance bactérienne aux antibiotiques synthétiques, beaucoup de travaux ont été menés sur le pouvoir antimicrobien des produits naturels extraits des algues. Pour l'évaluation du potentiel antimicrobien de ces extraits, on a préféré de les tester contre plusieurs cibles (bactéries, levure), car chacune d'elles possède des structures cellulaires et un métabolisme particulier.

Dans notre étude, nous avons testé l'effet des antibiotiques vis-à-vis de quelques souches bactériennes et mycéliennes. Les diamètres des spectres d'action des antibiotiques ont été mesurés et représentés dans les **figures** qui suivent :

II.3.1 *Staphylococcus aureus* ATCC6538

Selon les résultats de l'antibiogramme présentés dans la **Figure 26**, les antibiotiques Pénicilline, Lincomycine, Tétracycline, Cefotaxime, sont les plus efficaces sur *S. aureus* avec des diamètres des zones d'inhibition de 50, 40, 33 et 30 mm, respectivement.

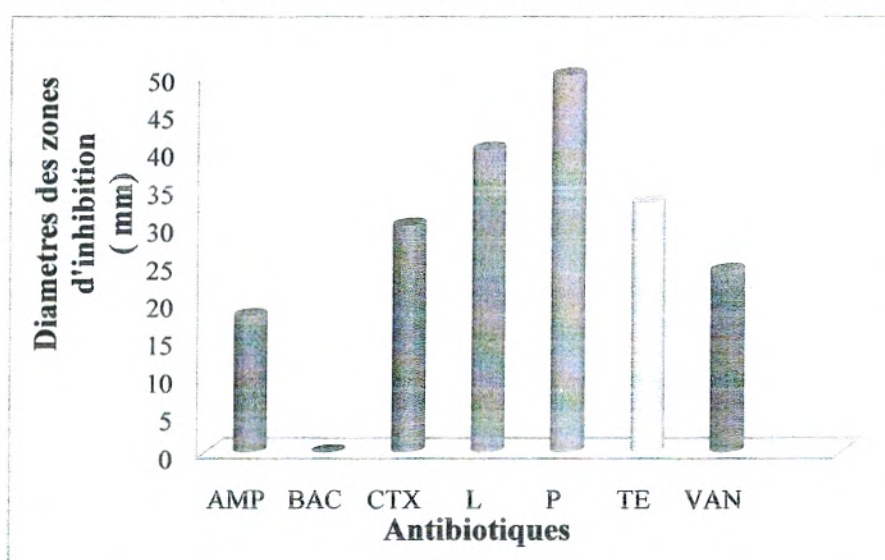


Figure 21 : Zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *Staphylococcus aureus* ATCC6538.

D'après le **tableau 08** nous enregistrons une sensibilité de *S. aureus* vis-à-vis des antibiotiques testés, sauf pour Bacitracine et l'Ampicilline où notre souche est résistante et de sensibilité intermédiaire, respectivement.

Tableau 08: Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *Staphylococcus aureus* (CASFM, 2012).

Antibiotiques	Interprétation de l'antibiogramme
Ampicilline	I
Bacitracine	R
Cefotaxime	S
Lincomycine	S
Pénicilline	S
Tétracycline	S
Vancomycine	S

R : Résistante ; S : Sensible, I : Intermédiaire.

II.3.2 *Bacillus cereus* ATCC10876

Selon les résultats de l'antibiogramme présentés dans la **Figure 22** les antibiotiques Ampicilline, Bacitracine, Cefotaxime et Pénicilline ne possèdent aucun effet inhibiteur sur *B. cereus*. Pour les autres antibiotiques, les diamètres sont de 27 mm pour le Lincomycine et 21 mm pour les Tétracycline et Vancomycine.

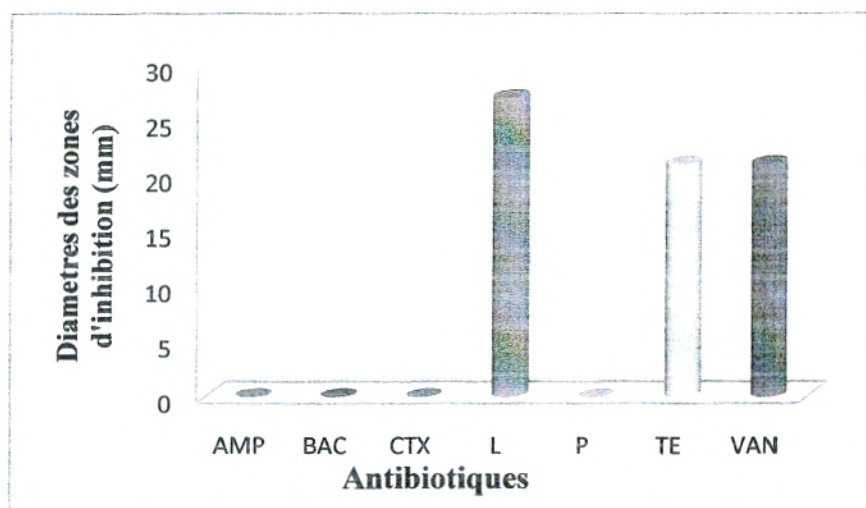


Figure 22: Zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *Bacillus cereus* ATCC 10876.

D'après le **Tableau 09**, *B. cereus* résiste aux antibiotiques Céfotaxime, Ampicilline, Bacitracine et Pénicilline, mais elle est sensible aux Lincomycine, Tétracycline et Vancomycine.

Tableau 09: Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *Bacillus cereus* ATCC 10876 (CASFM, 2012).

Antibiotiques	Interprétation de l'antibiogramme
Ampicilline	R
Bacitracine	R
Céfotaxime	R
Lincomycine	S
Pénicilline	R
Tétracycline	S
Vancomycine	S

R : Résistante ; S : Sensible.

II.3.3 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Les diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *P. aeruginosa* sont présentés dans la **Figure 23** Sauf la Céfotaxime et la Tétracycline qui ont un effet inhibiteur sur *P. aeruginosa* avec des zones d'inhibition de 18 et 13 mm respectivement, les autres antibiotiques ne possèdent aucun effet sur cette souche.

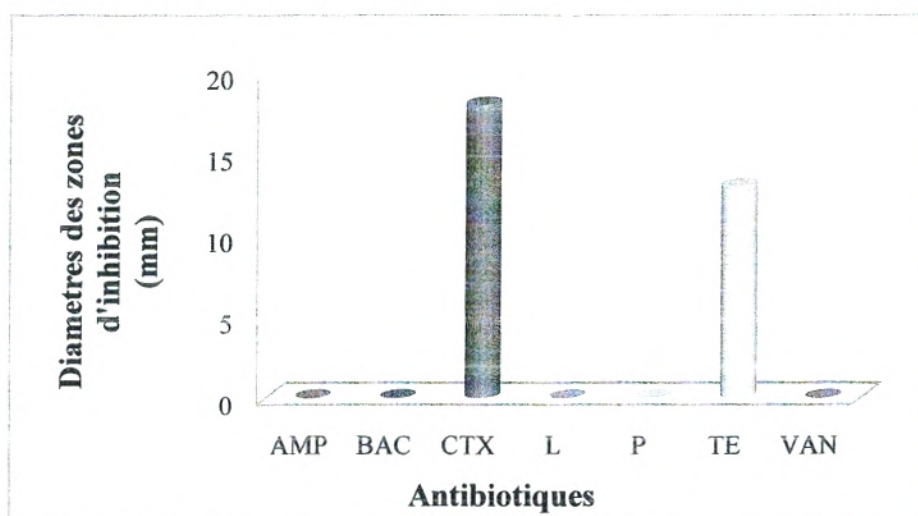


Figure 23 : Zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

L'interprétation de l'antibiogramme reportée dans le **Tableau 10** nous a permis de montrer la résistance de notre souche vis-à-vis de tous les antibiotiques testés (**Tableau 08**).

Tableau 10 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (CASFM, 2012).

Antibiotiques	Interprétation de l'antibiogramme
Ampicilline	R
Bacitracine	R
Cefotaxime	R
Lincomycine	R
Pénicilline	R
Tétracycline	R
Vancomycine	R

R : Résistante.

II.3.4 *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13047

Selon les résultats de l'antibiogramme présentés dans la **Figure 24**, les antibiotiques Cefotaxime et Tétracycline sont les plus efficaces sur *K. pneumoniae* avec des diamètres des zones d'inhibition de 27 et 15 mm, respectivement.

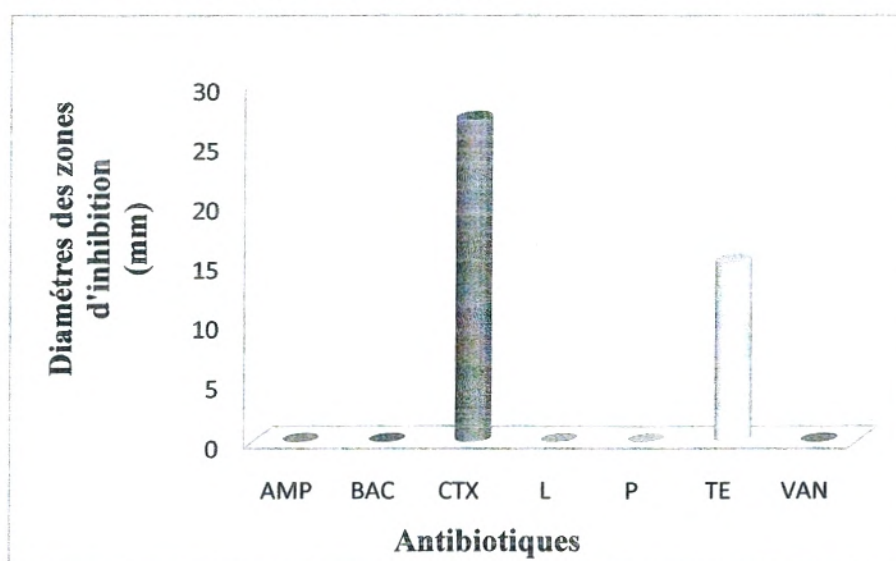


Figure 24 : Zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13047.

Nous constatons une résistance remarquable de la souche *K. pneumoniae* testée vis-à-vis de l'Ampicilline, Bacitracine, Lincomycine, Pénicilline, Tétracycline et Vancomycine ; et une sensibilité pour le Cefotaxime (**Tableau 11**).

Tableau 11: Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13047 (CASFM, 2012).

Antibiotiques	Interprétation de l'antibiogramme
Ampicilline	R
Bacitracine	R
Cefotaxime	S
Lincomycine	R
Pénicilline	R
Tétracycline	R
Vancomycine	R

R : Résistante ; S : Sensible.

II.3.5 *Escherichia coli* ATCC8739

D'après la **figure 25**, nous observons que les antibiotiques Céfotaxime et Tétracycline sont les plus efficaces sur *E. coli* avec la même zone d'inhibition de 31 mm, mais aucun effet n'a été observé avec les autres antibiotiques.

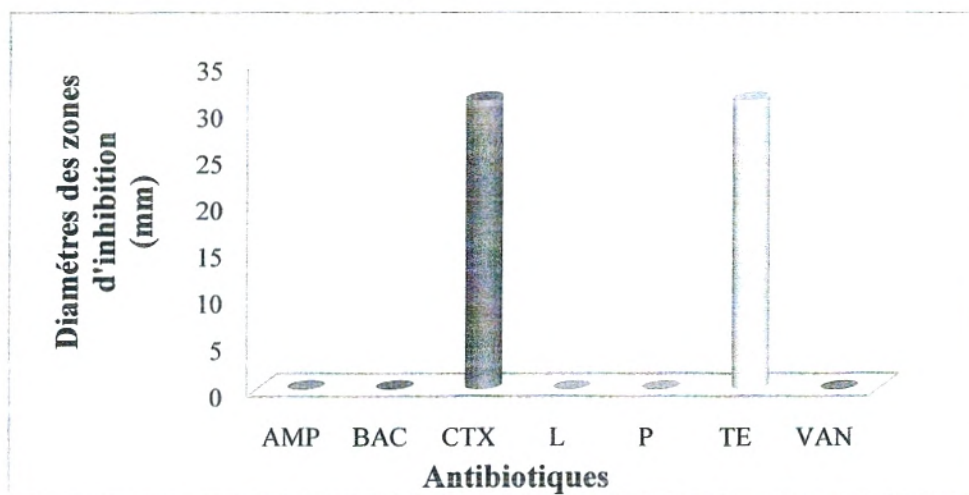


Figure 25 : Zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *Escherichia coli* ATCC8739.

Les deux antibiotiques Céfotaxime et Tétracycline exercent un effet inhibiteur sur *E. coli*, contrairement aux antibiotiques restant où notre souche a une résistance totale (Tableau 12).

Tableau 12 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *Escherichia coli* ATCC8739 (CASFM, 2012).

Antibiotiques	Interprétation de l'antibiogramme
Ampicilline	R
Bacitracine	R
Céfotaxime	S
Lincomycine	R
Pénicilline	R
Tétracycline	S
Vancomycine	R

R : Résistante ; S : Sensible.

II.3.6 *Micrococcus luteus* ATCC 13047

Les diamètres des zones d'inhibition varient entre 9 et 40 mm. Pour Lincomycine, Bacitracine, Pénicilline et Ampicilline, l'effet inhibiteur est très observé sur *M. luteus*

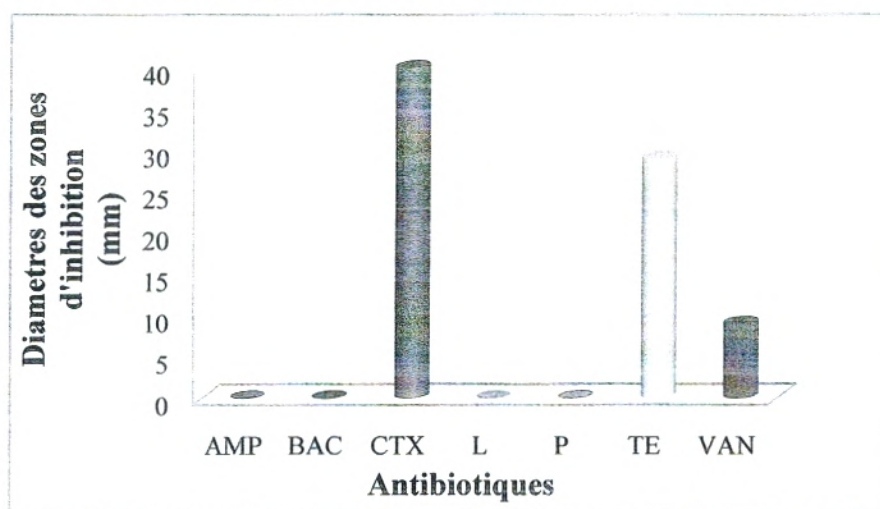


Figure 26: Zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *Micrococcus luteus* ATCC 13047.

Selon les résultats de l'antibiogramme présentés dans le **Tableau 13**, les antibiotiques Lincomycine, Bacitracine, Pénicilline, Vancomycine et Ampicilline ne possèdent aucun effet inhibiteur sur *M. luteus* ; pour le Cefotaxime et Tétracycline, cette souche est sensible.

Tableau 13 : Interprétation des diamètres des zones d'inhibition pour *Micrococcus luteus* ATCC 13047 (CASFM, 2012).

Antibiotiques	Interprétation de l'antibiogramme
Ampicilline	R
Bacitracine	R
pCefotaxime	S
Lincomycine	R
Pénicilline	R
Tétracycline	S
Vancomycine	R

R : Résistante ; S : Sensible.

II.3.7- *Candida albicans* ATCC 26790

La nystatine n'a donné aucune zone d'inhibition, donc la levure *C. albicans* a montré une résistance totale vis-à-vis cet antifongique.

III Méthode de disques

Du fait que l'extrait brut et ses fractions algales ont été récupérés par le DMSO, ce dernier utilisé comme témoin négatif a été testé vis-à-vis les sept souches étudiées afin de vérifier son pouvoir antimicrobien avec un volume de 10 μ l. Les résultats étaient négatifs, ce qui prouve qu'il n'a aucun effet inhibiteur.

L'activité antimicrobienne des différents extraits d'algues a été déterminée par la méthode de diffusion sur agar, les résultats obtenus ont montré l'absence d'effet inhibiteur pour toutes les fractions testées sur les bactéries à Gram négatif, par contre les fractions butanolique et aqueuse inhibent les bactéries à Gram positif à l'exception de la souche *M. luteus* qui a été révélée comme étant très résistante. Cette observation coïncide avec celle trouvée par **Gonzalez et al. (2001)** et **Salvador et al. (2007)** qui ont montré que les macroalgues marines peuvent inhiber la croissance de certaines bactéries.

✓ Effet inhibiteur sur *Bacillus cereus* ATCC10876 et *Staphylococcus aureus* ATCC6538

L'effet inhibiteur des extraits algales sur les souches à Gram positif (*B. cereus* et *S. aureus*) est illustré dans la **figure 27** et la **photo 03**. Nous remarquons que les deux souches *B. cereus* et *S. aureus* sont plus sensibles à la fraction algale d'acétate d'éthyle. Ce pouvoir antibactérien augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait. Les diamètres des zones d'inhibition sont de l'ordre de 9.75, 10.5 et 10.75 mm pour *B. cereus* et 13, 14.5 et 14 mm pour *S. aureus* à des concentrations 50, 100 et 200 mg/ml, respectivement.

Nous notons aussi que la souche *S. aureus* est plus sensible aux extraits algales par rapport à *B. cereus*. Pour l'extrait brut et les fractions éther de pétrole et Dichlorométhane, les diamètres des zones d'inhibition sur les deux bactéries dépassent 7 mm à la concentration 50 mg/ml.

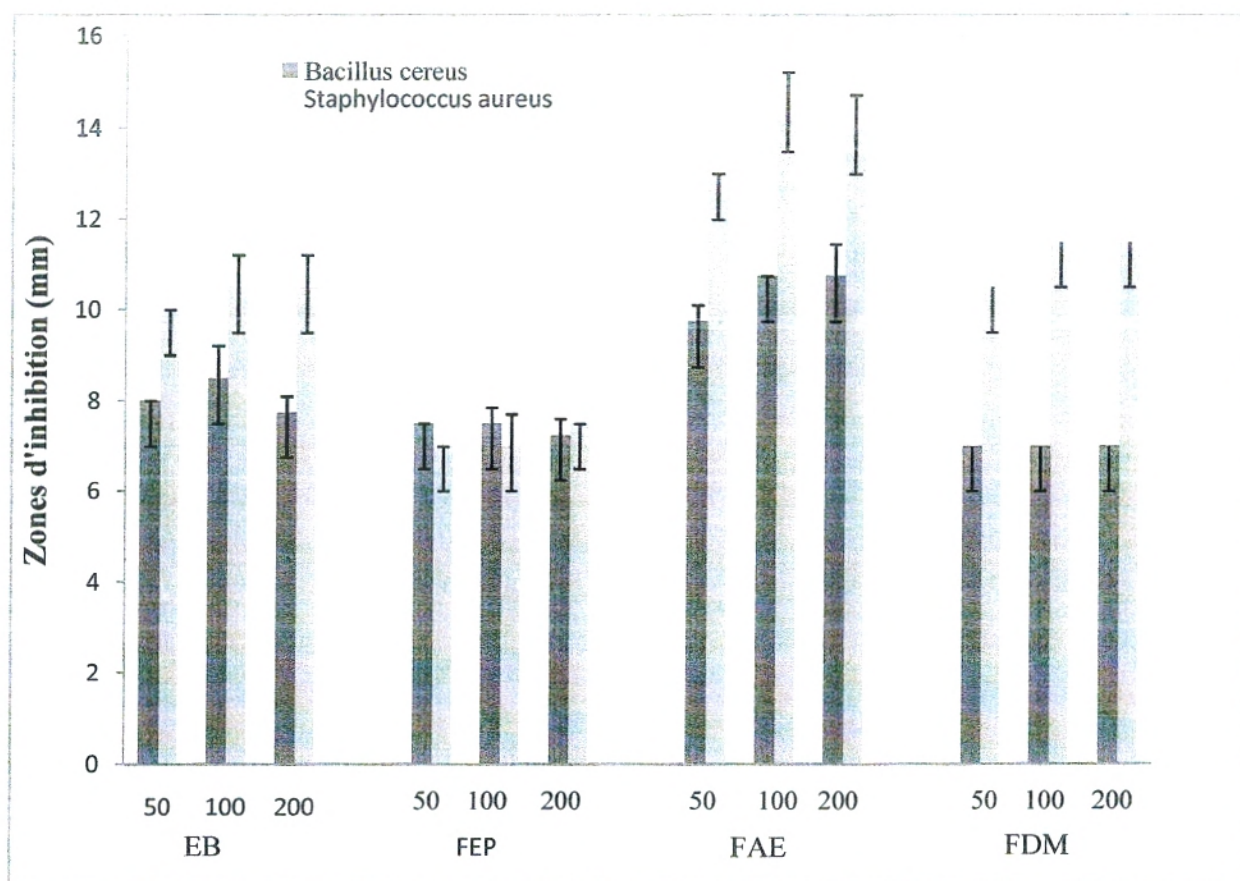


Figure 27 : Zones d'inhibition sur *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* en fonction des concentrations.

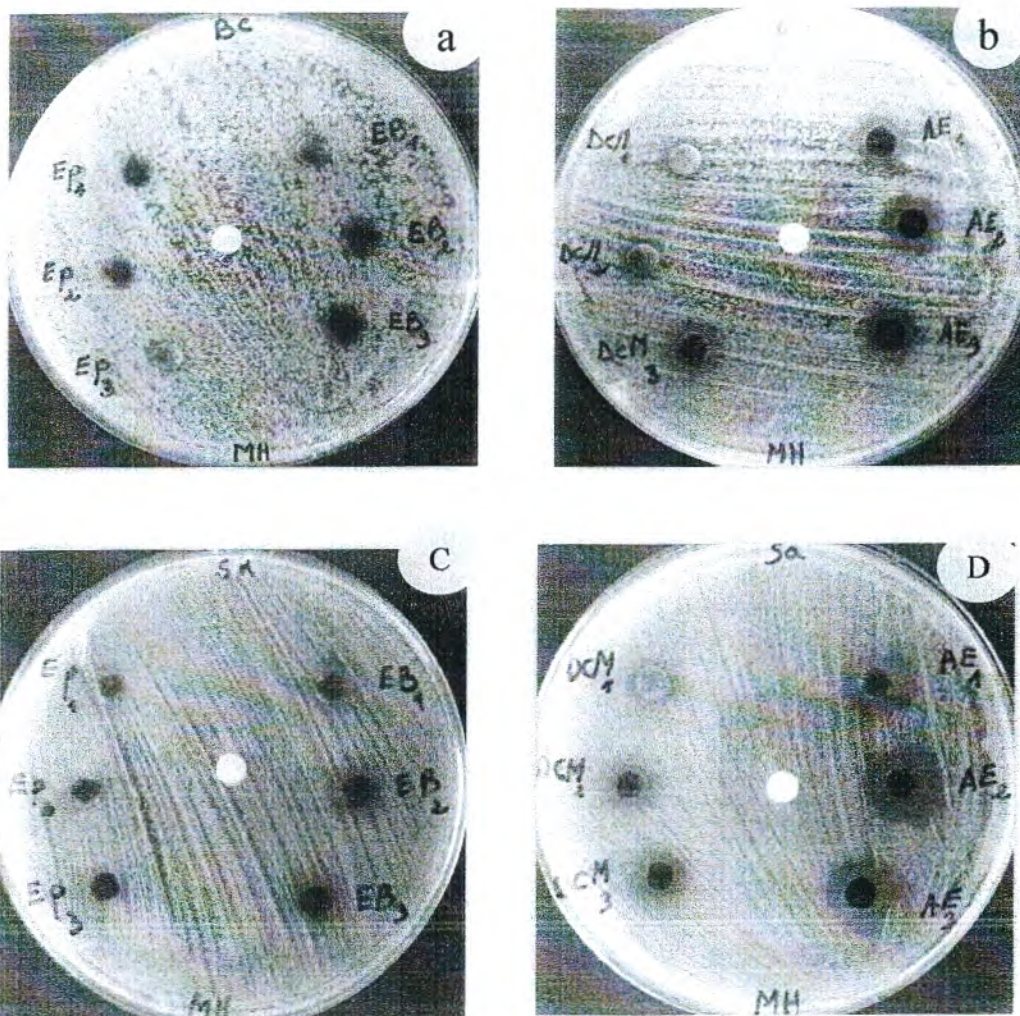


Photo 02 : Effet antimicrobien des extraits algaux sur *Bacillus cereus* ATCC10876 et *Staphylococcus aureus* ATCC6538.

a : Effet de l'extraits brut (EB) et la fraction éther de pétrole (FEP) sur la croissance de *B. cereus* selon les trois concentrations (1 : 50 mg/ml ; 2 : 100 mg/ml ; 3 : 200 mg/ml) ;

b : Effet des fractions acétate d'éthyle (FAE) et Dichlorométhane (FDM) sur la croissance de *B. cereus* selon les trois concentrations (1 : 50 mg/ml ; 2 : 100 mg/ml ; 3 : 200 mg/ml) ;

C : Effet de l'extrait brut (EB) et la fraction éther de pétrole (FEP) sur la croissance de *S. aureus* selon les trois concentrations (1 : 50 mg/ml ; 2 : 100 mg/ml ; 3 : 200 mg/ml) ;

D : Effet des fractions acétate d'éthyle (FAE) et Dichlorométhane (FDM) sur la croissance de *S. aureus* selon les trois concentrations (1 : 50 mg/ml ; 2 : 100 mg/ml ; 3 : 200 mg/ml) ;

Comparativement à d'autres espèces, l'étude de Taskin et al. (2007) sur l'extrait méthanolique de *C. spongiosus f. verticillatus* de la Mer Égée (Turquie) a révélé la présence d'un effet antimicrobien contre les souches *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* dont les diamètres des zones d'inhibition sont de l'ordre de 11.33 ± 0.57 et 12.33 ± 0.57 mm, respectivement.

✓ **Effet inhibiteur sur *Candida albicans* ATCC 10231**

Les données obtenues dans la **Figure 28**, montrent l'effet antifongique de tous les extraits algaux sur *C. albicans*. Nous reportons aussi l'augmentation de cette activité en fonction de l'augmentation de la concentration de l'extrait.

La fraction acétate d'éthyle est la plus active contre *C. albicans*. Elle présente des diamètres des zones d'inhibition les plus élevés de l'ordre de 19.75, 20.75 et 24 mm à 50, 100 et 200 mg/ml, respectivement.

A la concentration 200 mg/ml, l'extrait brut et les fractions aqueuse, dichlorométhane et butanol ont des zones d'inhibition proches à raison de 14.5, 19, 15.75 et 14.5 mm, respectivement, à l'exception de la fraction éther de pétrole qui donne la meilleure valeur de 14.75 mm à 100 mg/ml.

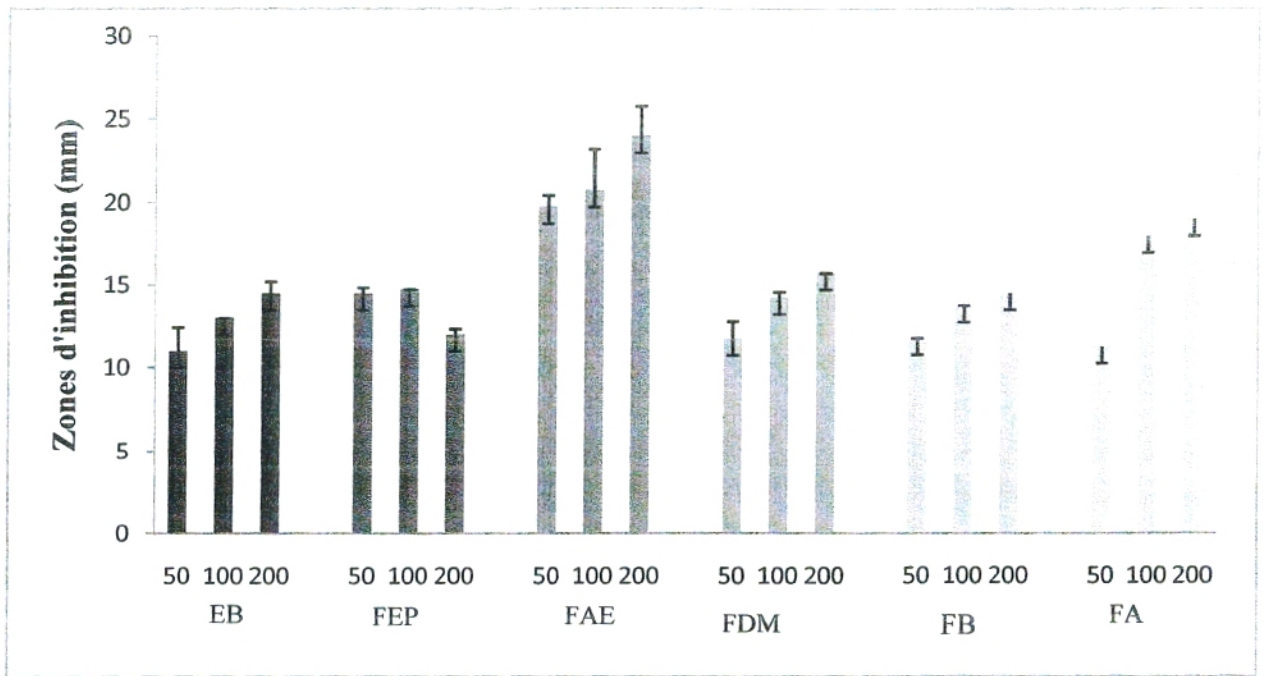
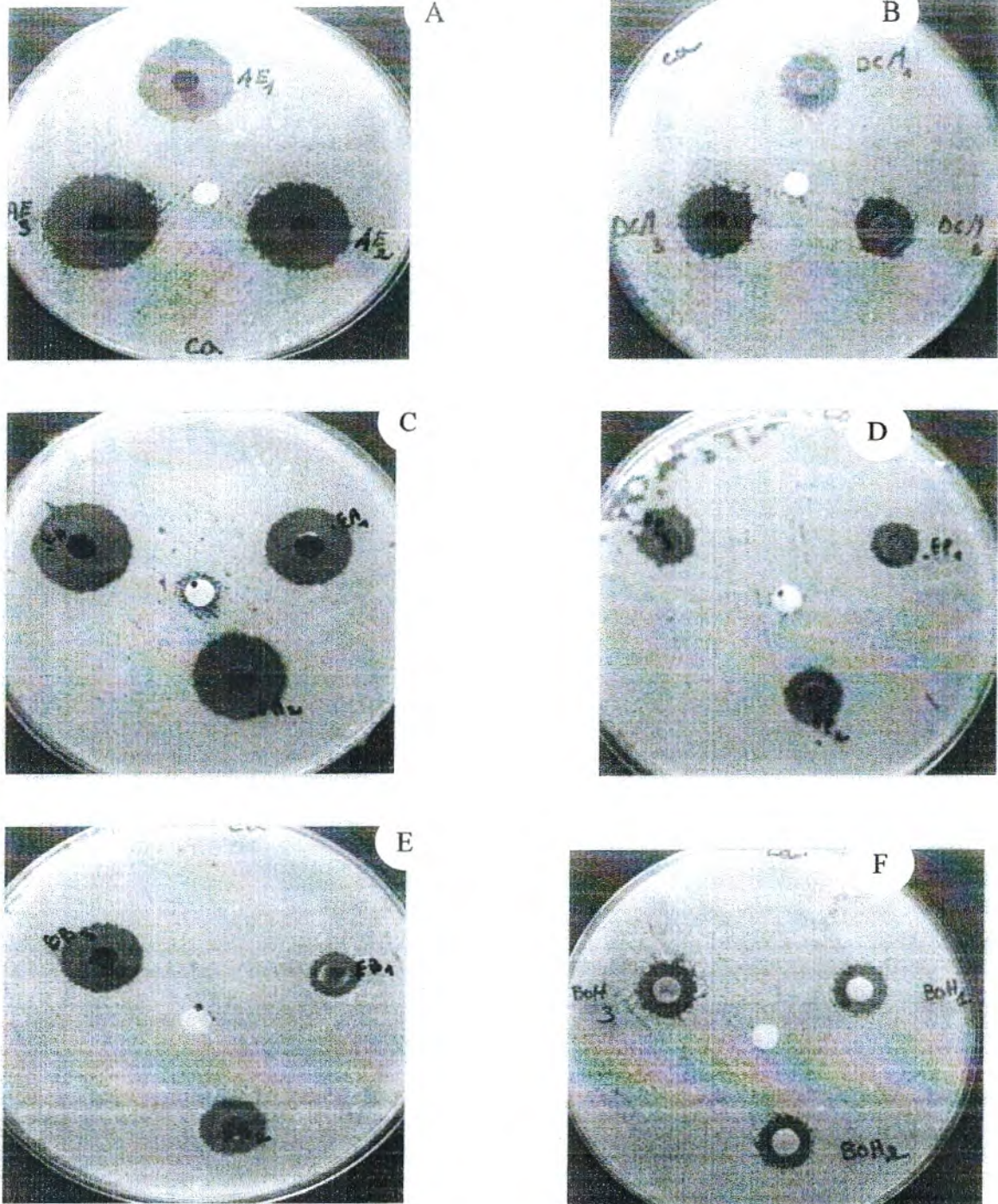


Figure 28 : Zones d'inhibition de *Candida albicans* ATCC 10231 en fonction des concentrations.



Photos 04 : Effet antifongique des extraits algaux sur *Candida albicans* ATCC10231.

A : Effet de la fraction acétate d'éthyle (FAE) sur la croissance de *C. albicans* selon les trois concentrations (FAE₁ : 50 mg/ml ; FAE₂ : 100 mg/ml; FAE₃ : 200 mg/ml) ;

B : Effet de la fraction dichlorométhane (FDM) sur la croissance de *C. albicans* selon les trois concentrations (FDM₁ : 50 mg/ml ; FDM₂ : 100 mg/ml; FDM₃ : 200 mg/ml) ;

(C) : Effet de la fraction aqueuse (FA) sur la croissance de *C. albicans* selon les trois concentrations (FA₁ : 50 mg/ml ; FA₂ : 100 mg/ml; FA₃ : 200 mg/ml) ;

D : Effet de la fraction éther de pétrole (FEP) sur la croissance de *C. albicans* selon les trois concentrations (FEP₁ : 50 mg/ml ; FEP₂ : 100 mg/ml; FEP₃ : 200 mg/ml).

(E) : Effet d'extrait brut (EB) sur la croissance de *C. albicans* selon les trois concentrations (EB₁ : 50 mg/ml ; EB₂ : 100 mg/ml; EB₃ : 200 mg/ml) ; **F** : Effet de la fraction n-butanol (FB) sur la croissance de *C. albicans* selon les trois concentrations (FB₁ : 50 mg/ml ; FB₂ : 100 mg/ml; FB₃ : 200 mg/ml).

Conclusion et perspectives

Ce travail a pour but d'évaluer les activités antioxydante et antimicrobienne d'une algue brune *Cladostephus hirustus*, récoltée de la plage de Madrid, de la wilaya d'Ain Témouchent.

L'extraction par Soxhlet et le fractionnement de l'extrait brut par des solvants de polarité différente donnent cinq fractions qui sont l'éther de pétrole (FEP), l'acétate d'éthyle (FAE), le dichlorométhane (FDM), le n-butanol (FB) et la phase aqueuse (FA). Le rendement élevé est celui de l'extrait brut avec un pourcentage de 2.483%.

L'étude phytochimique basée sur la quantification des composés phénoliques révèle une teneur élevée en phénols totaux dans l'extrait brut de l'ordre de 1.042 ± 0.003 mg EAG/g MS par rapport aux autres fractions. Le dosage des flavonoïdes et des tanins condensés a montré des teneurs élevées dans l'extrait brut et la fraction acétate d'éthyle dont les concentrations sont de l'ordre de 0.428 ± 0.004 et 0.278 ± 0.004 mg EC/ g MS pour les flavonoïdes et 2.739 ± 0.008 et 2.783 ± 0.034 mg EC/g MS pour les tanins condensés, respectivement.

Ensuite, la détermination de l'activité antioxydante par le test de la capacité antioxydante totale démontre que tous nos extraits possèdent un pouvoir antioxydant modéré en particulier l'extrait brut (1.631 ± 0.008 mg EAA/g MS) et la fraction acétate d'éthyle (1.383 ± 0.008 mg EAA/g MS).

Concernant l'étude du pouvoir antibactérien par la méthode de diffusion sur agar, les souches *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* ont révélé sensible à tous les extraits à l'exception des fractions aqueuse et butanolique. Par contre, aucun effet n'a été signalé contre les autres souches testées (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus* et *Klebsiella pneumoniae*).

Contrairement au pouvoir antibactérien, tous les extraits possèdent un effet inhibiteur remarquable en fonction de concentration vis-à-vis la levure *Candida albicans*.

Pour mieux exploiter ces propriétés antioxydantes et antimicrobiennes de l'espèce *Cladostephus hirustus*, une recherche plus poussée de ses principes actifs doit être investiguée. Pour cela, un travail complémentaire s'impose en vue d'identifier et purifier les différentes molécules présentes dans l'extrait brut sec et/ou ses différentes fractions (acétate d'éthyle, butanol, éther de pétrole, dichlorométhane et résidu aqueux) par des méthodes spectrales et chromatographiques.

Une évaluation des activités biologiques *in vitro* et *in vivo* de ces molécules isolées est très souhaitable en vue de les utiliser à des fins thérapeutiques et complémentaires et de renforcer l'antibiothérapie en pathologie médicale.

De même l'étude des activités biologiques d'autres espèces algales d'Algérie représente un sujet d'intérêt thérapeutique.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- ‡ **AFNOR.** (1986). Recueil des Normes Françaises huiles essentielles. AFNOR Paris. 57p.
- ‡ **Ahoyo, A.L., Baba-Moussa, L., Anago, A.E., Avogbe, P. Missihoun, T.D.** (2007). Incidence d'infections liées à *Escherichia coli* producteur de bêta lactamase à spectre élargi au Centre hospitalier départemental du Zou et Collines au Bénin. *Médecine et maladies infectieuses* (37) : 746–752.
- ‡ **Ananou, et al.,** (2005) . In **Boudjani, W.** (2009). Action de la flore lactique sur les bactéries de contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. 73 p.
- ‡ **Atwal, R.** (2003). In vitro antimicrobial activity assessment of Zymox Otic solution against a broad range of microbial organisms. *Int. J. Res. Vet Med*, 1 (3) : 240-252.
- ‡ **Bakus, G.J., Targett, N.M., Schulte, B.** (1986) .Chemical ecology of marine organisms: an overview. *J. Chem. Eco.*(12): 951–987.
- ‡ **Barlow, S.M.** (1990) .Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. Ed. Hudson, B.J.F, Food Antioxidants. 253-307.
- ‡ **Bennett, R.J., Johnson, A.** (2005). Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu rev Microbiol* , (59) : 233-255.
- ‡ **Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H., orthcote, P.T., Prinsep, M.R.** (2006). Marine natural products. *Naturals Products Reports*, (22): 15-61.
- ‡ **Blunt, J.W., Copp, R.B., Hu, W.P., Munro, M.H., Northcote, P.T., Prinsep, M.R.** (2008). Marine natural products. *Naturals Products Reports*, (25): 35-94.
- ‡ **Blunt, J.W., Copp, R.B., Hu, W.P., Munro, M.H., Northcote, P.T., Prinsep, M.R.** (2009). Marine natural products. *Naturals Products Reports*,(26): 170-244.
- ‡ **Boizot, N., Charpentier, J.P.** (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour d'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, *INRA*, 79-82.
- ‡ **Bonnet, R., Caron, F., Cavallo, J.D., Chardon, H., Chidiac, C., Courvalin, P., Drugeon, H., Dubreuil, L., Jarlier, V., Jehl, F., Lambert, T., Leclercq, R., Nicolas Chanoine, M.H., Plesiat, P., Ploy, M.C., Quentin, C., Soussy, C.J., Varon, E., Weber, P.** (2012).Comite de l'antibiogramme de la société française de microbiologie recommandations Edition de Janvier 2012.

- ‡ **Bouattoura, N.** (1988). Les ressources phytogénétiques. Importance Préservation-Utilisation. *Annales, INA, El Harrach-Alger*, 12 (1), T 1: 43-63.
- ‡ **Boulekbache-Makhlouf, L., Slimani, S., Madani, K.** (2012). Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. *Industrial Crops and Products*, (41):85– 89.
- ‡ **Bourdonnec, A., Hamon, D., Jouan, Y., L’hostis, M., matret, J.L., perchee, C.** (2011). Le goémon ses richesses à l’origine et au service du monde vivant. Jack. 22700 Louannec :128 -21.
- ‡ **Borowitzka, M.A.** (1992) .Vitamins and fine Chemicals from micro algae. In: Microalgal Biotechnology. *Cambridge University presss*. Great Britain pp 179.
- ‡ **Broadasky, T.F., Lewis, C., Eble, T.E.**(1976). Bioautographic thin layer chromatophic analysis of antibiotics and their metabolites in the whole animal. I Clindamycin in the rat. *J. Chromatogr*, (123): 33-44.
- ‡ **Burnichon, N., Texier, A.** (2003). L’antibiogramme :la détermination des sensibilités aux antibiotiques. DES bactériologies.
- ‡ **Cabioc’h, J., Floc’h, J.Y., Le toquin, A., Boudouresque, C.F., Meinesz A., Verlaque, M.** (1992). Guide des algues des mers d’Europe : *Manche/Atlantique*.
- ‡ **Cacamesse, S., Azzolina, R., Rurnari, G., Gormaci, M., Grasso, S.** (1980). Antimicrobial and antiviral activities of extracts from Mediterranean algae. *Bot. Mar.* (23): 285-288.
- ‡ **Chbani,A., Mawlawi, H., Etahiri, S., Delarras,C.** (2007). *Micrbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire*. Ed: TEC.
- ‡ **Deslandes, E., Pondaven, E., Auperin, T., Roussakis, C., Guézennec, J., Stiger, V., Payri, C.** (2000). Preliminary study of the in vitro anti-proliferative effect of a hydroethanolic extract from the sub- tropical seaweed *Turbinaria ornata* Turner J. Agardh) on a human non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line (NSCLC-N6), *J of Applied Phycol.* (12): 257–262.
- ‡ **Djebaili, S.** (1984). *Steppe algérienne. Phytosociologie et écologie*. Ed. OPU, Ben-Aknoun, Alger. 177.
- ‡ **Duan, X.J., Zhang, W., Li, X.M., Wang, B.G.** (2006). Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chemistry*, (95): 37-43.

- ‡ Ely, R., Supriya, T., Naik, C.G. (2004). Antimicrobial Activity of marine organisms collected off the coast of south east India. *J. Exp. Biol. Ecol.* (309): 121-127.
- ‡ Engel, S., Jensen, P.R., Fenical, W.(2002). Chemical ecology of marine microbial defense. *J. Chem. Ecol.* (28): 1971 - 1985.
- ‡ Etahiri, S.,Bultel-Poncé, V., Caux, C., Guyot, M. (2001). New bromoditerpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*, *Journal of Natural Products.* 64(1-2): 1024- 1027.
- ‡ Etahiri, S., Bultel- Ponce, V., Assobhei, O. (2004). Une nouvelle molécule à activité antibiotique à partir de l'algue rouge *Pterosiphonia complanata*, Brevet Marocain N°27732.
- ‡ Etahiri, S., El kouri, A., Bultel-Ponce, V., Guyot, M., Assobhei, O. (2007). Antibacterial bromophenol from the marine red alga *Pterosiphonia complanata*, *Natural Product communication* (2):749-752.
- ‡ Evans, R.J., Reynhout, G.S. (1992). Alternates to synthetic antioxidants, *Food Science andhuman Nutrition.* (29): 27-42.
- ‡ Evert, R.P.H.F., Eichhorn, S.E., Evrardt, C., François, D., Ploy, M.C. (2007). Biologie végétale Bactériologie médicale : techniques usuelles. *Elsevier Masson*, 139: 573.
- ‡ Glombitza, K.W., Stoffelen, H., Murawiski, U., Bielaczek, J., Egge, H. (1974). Antibiotics from algae Bromophenols from *Rhodomelaecia*, *Planta Medica*, (25):105-114.
- ‡ Gonzales, J.(1997). Initiation à l'histoire de la médecine , Editions Heures de France, pp 190.
- ‡ GonzalezDelVal, A., Platas, G., Basilio, A. (2001). Screening of antimicrobial activities in red, green and brown mroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *Int. Microbiol*, 35-40.
- ‡ Greenblatt, C.L., Baum, J., Klein, B.Y., Nachshon, S., Koltunov, V., Cano, R.J. (2001). *Micrococcus luteus* – Survival in Amber. *Microbial Ecology*, 48 (1): 120–127.
- ‡ Guérin-Faubleé, V., carret, G. (1999). L'antibiogramme: princies, méthodologie, intérêt et limites. *J nationals GTV-INRA.* 5-12.
- ‡ Guyot, M. (1998). Les molecules marines modèles et outils, *Biofutur*, 179- 5254.

- ‡ **Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.** (1999). *Free radicals in biology and medicine*, Oxford, UK.
- ‡ **Hardalo, C., Edberg, S. C.** (1997). *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Crit. Rev. Microbiol.*, (23):47-75.
- ‡ **Hay, M. E., Steinberg, P.D.** (1992). The chemical ecology of plant herbivore interactions in marine versus terrestrial communities In: Rosenthal J, Berenbaum M *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites, II. Evolutionary and ecological processes*. Academic Press, New York. 317 – 413.
- ‡ **Hay, M.E.** (1996). Marine chemical ecology: what's known and what's next. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* (200): 103 - 134.
- ‡ **Herbert, R.B.** (1989). *The biosynthesis of secondary metabolites*. 2^{ème} édition Chapman and Hall. (2): 11-115.
- ‡ **Heo, S. J., Hwang, J. Y ., Choi, J. I . , Han, J. S., Kim, H. J., Jeon, Y.J.** (2009). Diphlorethohydroxycarmalol isolated from *Ishige okamurae*, a brown algae, a potent α -glucosidase and amylase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *European Journal of Pharmacology*. (615):252–256.
- ‡ **Hill, R.T., EL Murphy, P.** (1998). *Drugs from the sea (L'océan pharmacien)*. In French. *Biofutur*. (179): 34-37.
- ‡ **Joffin, J.N., Leyral, G.** (2005). *Catalytic oxidation and Antioxidant Properties of Thyme collection Biological Technique*. 3^{ème} édition. CNDP: 312.
- ‡ **Julkunen-Titto, R.** (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows methods for the analysis of certain phenolics. *J of Agricultural and Food chemistry*, (33): 213-217.
- ‡ **Khan, S., Kong, C., Kim, J., Kim, S.** (2010). Protective effect of *Amphiroa dilatata* on ROS induced oxidative damage and MMP expressions in HT1080 cells. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. (15): 191–198.
- ‡ **Kim, S., Wijesekara, I.** (2010). Development and biological activities of marine derived bioactive peptides A review. *Journal of Functional Foods*. (2): 1–9.
- ‡ **King, A., Young, G.** (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J of the American dietetic association*. (99) :213-218.
- ‡ **Koba, K., Sanda, K., Raynaud, C., Nenonene, Y.A., Millet, J., Chaumont, J.P.** (2004). Activités antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois *Cymbopogon* sp.

africains vis-à-vis de germes pathogènes d'animaux de compagnie *Manuscrit Méd. Vét.* (148): 202-206.

‡ **Kornprobst, J.M., Potier, P.** (2005). Substances naturelles d'origine marine : chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologies. 118 - 39 .

‡ **Kubanek, J., Jensen, P.R., Keifer, P. A., Sullards, M.C., Collins, D.O., Fenical, W.** (2003). Seaweed resistance to microbial attack a targeted chemical defense against marine fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (100): 6916 - 6921.

‡ **Kuda, T., M. Tsunekawa, H., Goto, Y., Araki,** (2005). Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. *Journal of Food Composition and Analysis*, (18): 625-633.

‡ **Ktari, L., Guyot, M. A.** (1999). cytotoxic oxysterol from the marine algae *Padina pavonica*, *Journal of Applied Phycology.* (11): 511-513.

‡ **Paul, V.J., Puglisi, M.P.** (2004).Chemical mediation of interactions among marine organisms. *Nat Prod Rep.*(21): 189-209.

‡ **Lawlor, M.S., Hsu, J., Rick, P.D., Miller, V.L.** (2005).Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. *Mol Microbiol, PubMed* ,(58):1054-1073.

‡ **Leclerc, V., Floc'h, J.Y., Nasser, S., Staley, J., Lory, S.** (2004). Les secrets des algues Microbiologie. Éditions Dunod .Carnets de sciences, ISSN 2110-2228.

‡ **Leclerc, V., Floc'h, J.Y.** (2010). Secrets des algues. Edition quae. 978-2-7592-0347-5.

‡ **Lesueur, D., Serra, D., de Rocca-Bighelli, A., Hoi, T.M., Ban, N.K., Thai, T.H.,Casanova, J.** (2007).Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Michelia faveolata* Merryll ex Dandy from Vietnam. *Flavour and Fragrance J.* (22): 317-321.

‡ **Lim, S.N., Cheung, P.C.K., Ooi, V.E.C.**(2002).Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (50):3862-3866.

‡ **Macheix, J.J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C.** (2005). Les composés phénoliques des végétaux un exemple de métabolites secondaires d'importance

économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. CH, Lausanne 1015.

‡ **Mack, R., Simberloff, D., Lonsdale, W., Evans, H., Clout, M., Bazzaz, F.** (2000). Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences and control. *Ecol. Appl.* (10):689-710.

‡ **Madigan-Martinko, J.N.** (2005). Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall ISBN 0-13-144329-1.

‡ **Mann, J.** (2000). Murder, Magic, and Medicin ,Oxford University Press, 2nd edition, pp 256.

‡ **Maizak, K., Brac, De La Perriere ., Hammiche, V.** (1993). Pharmacopée traditionnelle:Sahara septentrional. Actes du 2e colloque européen d'*ethnopharmacologie, Heidelberg* p169-181.

‡ **Marchal, N., Bourdon, J.L., Richard, CL.** (1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. 3^{ème} Ed., Doin éditeurs, Paris.

‡ **Mika, A., Minibayeva, F., Beckett, R., Lüthje, S.** (2004). Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews*,. 3: 173-193.

‡ **Nagle, D.G., Paul, V.J.** (1999). Production of secondary metabolites by filamentous tropical marine cyanobacteria: ecological functions of the compounds. *Journal Phycol*: 35: 1412 - 1421.

‡ **Nasser, S., Staley, J., Lory, S.** (2004). Microbiologie. Éditions Dunod. *Nature* 406, 959-964 .

‡ **Ochiai, K., Valentine, A ., Altschul, M.** (2000). Intestinal candidiasis in a dog. *Veterinary Record*.,(146):228-229.

‡ **Onawumi,G.O ., Ysak, W.A., Oguiana, E.O.**(1984). Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citrates*. *J. Ethnopharmacol*, 12(3):279-86.

‡ **Occhipinti-Ambrogi, A.** (2007).Global change and marine communities: Alien species and climate change. *Mar. Pollut. Bull.* 55:342-352.

‡ **Park, P.J., Shahidi F., Jeon, Y.J.** (2004). Antioxidant activities of enzymatic extracts from and edible seaweed *Sargassum horneri* using ESR spectroscopy. *J of Food Lipids*,(11): 15-27.

- ‡ **Paul, V.J., Fenical, W.** (1987). Natural products chemistry and chemical defence in tropical marine algae of the phylum chlorophyta, *Bioorganism Marina Chemistry*, 11-29.
- ‡ **Pérez, R., Barbaroux, O.** (1997). *Ces algues qui nous entourent : conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisations, culture.*
- ‡ **Prescott, L.M., Harley, J.P., Donald, A.** (2003). *Microbiologie*, De boeck université, 2eme édition française. 128 : 28-29.
- ‡ **Price, M.L., Van scoyoc, S., Butler, L.G. A.** (1978). Critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain, *J. Agric. Food Chem*, 26: 1214-1218.
- ‡ **Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M.** (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex : specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*, 269: 337–341.
- ‡ **Prud'homme van Reine WF.** (1982). A taxonomic revision of the European Sphacelariaceae (Sphacelariales, Phaeophyceae). EJ Brill/Leiden University Press (Leiden Botanical Series No. 6).
- ‡ **Ragan, M.A., Glombitza, L.N.** (1986). *Prog. Phycol. Res.* 2:(4) 130-241
- ‡ **Rahal, K., Benslimani, A., Tali-Maamar, H., Missoum, M.F.K., Kechih-Boumar, S., Ammari, H.** (2011). Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire). 6^{ème} édition. Document édité avec la collaboration de l'OMS. P192.
- ‡ **Rajeev, K.J., Xu, Z.** (2004). Biomedical compounds from marine organisms. *Marine Drug*. 2: 123-146.
- ‡ **Rajeev, Xu Z.** (2004), Blunt et al. (2006; 2008; 2009).
- ‡ **Reichelt, J.L., Borowitzka, M.A.** (1984). Antimicrobial activity from marine algae: Result of a large screening programme, *Hydrobiol.* 1: 116/117 158-168.
- ‡ **Ren, D., Sims, J.J., Wood, T.K.** (2001) . Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)- 3-butyl-2(5H)-furanone. *Environ. Microbiol*: 3: 731-736.
- ‡ **Ribereau, G.P.** (1968). *Les composés phénoliques des végétaux*, Dunod, Paris, p254.

- ‡ **Roussillon, L.** (2011). Guide de reconnaissance et de suivi des macrophytes. Ifremer, Cépralmar, Réseau de Suivi Lagunaire .Agence de l'Eau RMetC, Région Languedoc-Roussillon, 147 p
- ‡ **Salvador, N., Garreta, A.G., Lavelli, L., Ribera, M.A.** (2007). Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. *Sci. Mar.* 71 101-113.
- ‡ **Shahnaz, L., Shameel, M.** (2009). Chemical composition and bioactivity of some benthic algae from Karachi coast of Pakistan. *International Journal of Algae*, 11,377–393.
- ‡ **Shahidi, F., Janak Kamil, Y.** (2001). Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 12,435–464.
- ‡ **Shahidi, F.** (2008). Bioactives from marine resources. In ACS symposium series pp. 24–34). ACS Publications.
- ‡ **Shahidi, F., Alasalvar, C.** (2011). Marine oils and other marine nutraceuticals. In Handbook of seafood quality, safety and health applications *Wiley Online Library*. pp. 444-454.
- ‡ **Singleton, V. L., Rossi, J. R.** (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic –phosphothungstic acid. *Am. J. Enol. Vitic* 16 : 144–15.
- ‡ **Smit, A.J.** (2004). Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products, *Journal of applied Phycology*, 254-262.
- ‡ **Steinberg, P.D., Kjelleberg, S.S.** (1997). Chemical defences of seaweeds against microbial colonization, *Biodegradation*, 8 211–220.
- ‡ **Steinberg, P.D., et de Nys R.** (2002). Chemical mediation of colonization of seaweed surfaces. *J. Phycol.* 38: 621-629.
- ‡ **Sükran, et al.** (1998). Tr. *J. of Botany*.22 13-17© TÜBITAK Sükran DERE Uludag University, Faculty of Arts and Science, Department of Biology, BURSA-TURKEY Tohit GÜNES Gazi University, Faculty of Education, Department of Biology, Kırşehir TURKEY Rıdvan SIVACI Cumhuriyet University, Faculty of Arts and Science, Department of Biology, Sivas-TURKEY.
- ‡ **Tapiero, H., Tew K.D., Nguyen Ba G., Mathé G.** (2002). Poly phenol : do they play a role in the prevention of human pathologies , *Biomed Pharmacother* .56 :200-207.
- ‡ **Taskin, E., Ozturk, M., Kurt., O.** (2001). Türkiye'nin yararlanilabilir denizelalg potansiyeli. XI. Ulusal Su Urunleri Sempozyumu pp. 225-232

- ‡ **Tatsuo, H.** (1981). *Marine Natural Products Phenolic Substances*, London: Academic, pp. 93-145.
- ‡ **Vanstns, G.** (2004). Rqdicux libres et antioxydqnts:principles de base .sy;posiu; Antioxydants et alimentaire. Institut danone.
- ‡ **Wayne, P.A.** (2003).Reference method for disk diffusion antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard m44 - p, national committee for clinical laboratory standards,
- ‡ **Waterman, P.G., Mole, S.** (1994). *Analysis of Phenolic Plants Metabolites*, Oxford: Academic, , pp. 30—34.
- ‡ **Xavier, D.R., Shanmugavel, S., Kuppu, R., Sundaram, J.** (2012). Asian Pacific.Screening of selected marine algae from the coastal Tamil Nadu, South India for antibacterial activity Asian Pacific, *Journal of Tropical Biomedicine*. S140-S146.
- ‡ **Younes, F., Etahiri, S., Assobhei, O.** (2009). Laboratoire de Biotechnologies Marine et de l'Environnement, Université Chouaib Doukkali-Faculté des Sciences BP 20, El Jadida, Maroc *journal of applied biosciences* 24: 1543 – 1552 I. ISSN 1997–5902 J. Appl. Biosci. Activité antimicrobienne des algues marines.
- ‡ **Zhang, S.Y., Zheng, C.G., Yan, X.Y., Tian, W.X.** (2008). Low concentration of condensed tannins from catechu significantly inhibits fatty acid synthase and growth of MCF-7 cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*371: 654-658.
- ‡ **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, D., Robledo, D., Freile-Pelegrin, Y.** (2007). Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan peninsula Mexico, *Journal of Applied Phycology*, 19 449-458.
- ‡ **Sitographie :**
<http://www.mybiolumix.com>
<http://upload.wikimedia.org>
<http://www.algaebase.org>
www.futura-sciences.com
<http://www.mybiolumix.com>
<http://cdn.shopify.com>
<http://www.bioquell.com>

Annexes

Annexes

Annexe 1

Densité optique moyenne de phénols totaux

Do fraction	DO ₁	DO ₂	DO ₃
Extraie brut(EB)	0.5076	0.5126	0.5046
Ether de pétrole (FEP)	0.1858	0.1698	0.1809
Acétate d'éthyle (FAE)	0.6114	0.6149	0.6131
Dichlorométhane(FDM)	0.2690	0.2722	0.2754
n-butanol (FB)	0.3765	0.3719	0.3740
Résidu aqueux(FA)	0.5613	0.5643	0.5591

Annexe 2

Densité optique moyenne de tanin condensée

DO fractions	DO1	DO2	DO3
Extraie brut (EB)	0.2652	0.2656	0.2641
Ether de pétrole (FEP)	0.9451	0.9422	0.9502
Acétate d'éthyle (FAE)	0.6397	0.6552	0.6441
Dichlorométhane (FDM)	0.3034	0.3094	0.3100
n-butanol (FB)	0.1333	0.1381	0.1264
Résidu aqueux(FA)	0.1924	0.1896	0.1980

Annexe 3

Densité optique moyenne de flavonoïde

DO Fractions	DO1	DO2	DO3
Extraie brut (EB)	0.7324	0.7301	0.7207
Ether de pétrole (FEP)	0.4889	0.4743	0.4806
Acétate d'éthyle(FA)	0.5732	0.5588	0.5718
Dichlorométhane(FDM)	0.2031	0.2284	0.2025
n-butanol (FB)	0.3904	0.4186	0.4041
Résidu aqueux (FA)	0.1242	0.1176	0.1160

Annexes

Annexe 4

Capacité antioxydants totale (CAT) trouvés pour les déférentes fractions

Do fraction	DO ₁	DO ₂	DO ₃
Extraie brut (EB)	0.6365	0.6375	0.6315
éther de pétrole (FEP)	0.4298	0.4396	0.4358
acétate d'éthyle (FA)	0.6476	0.6494	0.6419
Dichlorométhane (FDM)	0.5137	0.5214	0.5187
n-butanol (FB)	0.6398	0.6447	0.6474
Résidu aqueux (FA)	0.3679	0.3717	0.3702

Annexe 5

Listes des antibiotiques utilisés

Antibiogrammes	Code	charge
Ampiciline	AMP	10 µg
Bacitracine	B	10 UI
Cefotaxime	CTX	30 µg
Lincomycine	L	15 µg
Penicilline	P	6 µg
Tetracycline	TE	30 µg
Vancomycine	VA	30 µg

Annexes

Annexe 6

Diamètres des zones d'inhibition en mm.

Bactéries Antibiogramme	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
AMP	18	0	0	0	0	0
BAC	0	0	0	0	0	0
CTX	30	0	18	27	31	40
L	40	27	0	0	0	0
P	50	0	0	0	0	0
TE	33	21	13	15	31	29
VAN	24	21	0	0	0	9

Annexes

Annexe 7

Activité antimicrobienne de fractions algales.

fractions	concentration mg/ml	DMSO	Diamètres des zones d'inhibition de croissance microbienne *(mm)						
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Candida albicans</i>
EB	50mg/ml	-	-	10 ± 0	-	8 ± 0	-	-	11 ± 1.4142
	100mg/ml	-	-	10,5±0,7071	-	8,5±0,7071	-	-	13 ± 0
	200 mg/ml	-	-	10.5±0,7071	-	7,5±0,3535	-	-	14,5±0,7071
EP	50mg/ml	-	-	7± 0	-	7,5±0	-	-	14,5±0,7071
	100mg/ml	-	-	7± 0	-	7,5± 0	-	-	14,75±0,3535
	200 mg/ml	-	-	7,5±0,7071	-	7,25±0,3535	-	-	12± 0
AE	50mg/ml	-	-	13± 0	-	9,75±0,3535	-	-	19,75±0,3535
	100mg/ml	-	-	14,5± 0,7071	-	10,75 ±0,3535	-	-	20,75± 0,3535
	200 mg/ml	-	-	14 ± 0	-	10,75 ±0,3535	-	-	24±0,7071
DCM	50mg/ml	-	-	10 ± 0,7071	-	7± 0	-	-	11,75± 2,4748
	100mg/ml	-	-	11,5± 0,7071	-	7± 0,7071	-	-	14,25± 1,7677
	200 mg/ml	-	-	11,5± 0,7071	-	7±0,7071	-	-	15,75± 0,3535
BOH	50mg/µl	-	-	-	-	-	-	-	11,75± 1,0606
	100mg/µl	-	-	-	-	-	-	-	13,75± 0,3535
	200 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-	14, 5± 0
RA	50mg/ml	-	-	-	-	-	-	-	11,25± 0,3535
	100mg/ml	-	-	-	-	-	-	-	18 ± 0
	200 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-	19 ± 0

* : Diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques (diamètre du disque inclus).
Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions.

(-) : pas d'inhibition.

Annexe 8

Composition de différents milieux de culture

Mueller-Hinton

Infusion de Viande de Bœuf	4
Peptone de Caséine	17,5 g
Amidon de Maïs.....	1,5 g
Agar.....	15g
Eau distillé	1000 ml
pH	7.4

Culture des bactéries sur gélose nutritive dont la composition est la suivante :

Meat extract	1 g/l
Yeast extract	2 g/l
Peptone	5 g/l
Sodium chloride	5 g/l
Agar	15 g/l

Les deux milieux sont réalisés en du plicats dans lesquels sont ajoutés du NaCl à 30g/L.

Culture des champignons sur milieu Sabouraud dont la composition est la suivante :

Casein peptone	5 g/l
Meat peptone	5 g/l
D(+) glucose	40 g/l
Chloramphenicol	0,5 g/l
Agar	15 g/l
pH final	7,4 +/- 0,2

Ces milieux sont stérilisés par autoclave 20 min à 120 °C puis coulés sur boitede Pétri.

Resumé

Ce travail a pour objectif d'étudier les activités antioxydantes et antimicrobiennes de l'extrait brut et ses fractions de l'espèce algale *Cladostephus hirsutus*, appartenant à la famille des *Cladostephacées*, récoltée de la plage de Madrid (Ain Témouchent).

Le rendement élevé est obtenu avec l'extrait brut de 2.483 ± 0.164 %. Les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés sont élevées dans l'extrait brut de 1.042 ± 0.004 mg EAG/g MS, 0.428 ± 0.004 mg EC/g MS et 2.739 ± 0.008 mg EC/g MS, respectivement.

Les propriétés antioxydantes utilisant le test de la capacité antioxydante totale révèlent que la fraction acétate d'éthyle et l'extrait brut ont des valeurs élevées de l'ordre de 1.3834 ± 0.008 mg EAA/g MS et 1.631 ± 0.008 EAA/g MS, respectivement.

L'activité antibactérienne vis-à-vis trois bactéries Gram-négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*), trois bactéries Gram-positif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*) et une levure (*Candida albicans*) par la méthode de diffusion sur agar montre que l'acétate d'éthyle présente une sélectivité d'activité antimicrobienne vis-à-vis les deux souches *S. aureus* et *B. cereus* observée à 100 mg/ml avec des diamètres des zones d'inhibition de 14,5 et 10,5 mm, respectivement. En ce qui concerne le pouvoir antifongique, tous les extraits possèdent un effet inhibiteur sur la levure *Candida albicans*, dont le plus élevé est illustré par la fraction acétate d'éthyle avec la zones d'inhibition de 24 mm à la concentration 200 mg/ml.

Mots clés : Algues brunes, *Cladostephus hirsutus*, composés phénoliques, activité antioxydante, activité antimicrobiennes,

ملخص

يهدف هذا العمل إلى دراسة مضادات الأكسدة والأنشطة المضادة للميكروبات من استخراج النفط الخام وجزيناته من أنواع الطحالب *Cladostephus hirsutus*، الذي ينتمي إلى عائلة من *Cladostephacées*، المحصودة من شاطئ مدريد (عين تموشنت).

يتم الحصول على الأداء العالي مع استخراج النفط الخام من محتويات مجموع الفينول، 0.164 ± 2.483 % مكثف أعلى في استخراج النفط الخام من مركبات الفلافونويد

والعص 1.0424 ± 0.004 ملغ EAG / MS غرام، 0.428 ± 0.004 ملغ م / ز و 2.739 ± 0.008 MS EC ملغ / غ DM، على التوالي.

الخصائص المضادة للأكسدة باستخدام اختبار من إجمالي القدرة المضادة للأكسدة تبين أن خلاص الإيثيل ومستخلص الخام لديهما قيم عالية والتمثلة 1.3834 ± 0.0084 ملغ

EAA / ز و 1.631 ± 0.008 MS EAA / غ DM، على التوالي.

النشاط المضاد للبكتيريا ضد ثلاث بكتيريا ذات الجرام السلبية (*Escherichia coli*)، وثلثة

بكتيريا إيجابية الجرام (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*) والخميرة (*Candida albicans*) من خلال طريقة أجار يبين أن نشر خلاص

الإيثيل فيه الانتقائية من النشاط البكتيري وجها لوجه مع اثنين من سلالات بكتيريا المكورة العنقودية البرتقالية وحظو B. الشمعية عند 100 ملغ / مل مع أقطار مناطق التثبيط من 14 و 5

و 5 و 10، مم، على التوالي. بخصوص فعالية المضادة للفطريات، وجميع العينات يكون لها تأثير مثبط على الخميرة (*Candida albicans*)، والذي يتضح من ارتفاع جزء خلاص

الإيثيل مع مناطق تثبيط 24 مم في تركيز 200 ملغ / مل.

الكلمات المفتاحية: الطحالب البحرية البنية، *Cladostephus hirsutus*، ومركبات الفينول، والنشاط المضادة للأكسدة، والنشاط المضادة للميكروبات،

Abstract

This work aims to study the antioxidant and antimicrobial activities of the crude extract and its fractions of the algal species *Cladostephus hirsutus*, belonging to the family of *Cladostephaceae*, collected from the beach of Madrid (Ain Témouchent).

High yield is obtained with the crude extract of 2.4832 ± 0.1640 %. The contents of total phenolic contents, flavonoids and condensed tannins are higher in the crude extract of 1.0424 ± 0.0036 mg GAE / g DM, 0.4277 ± 0.0036 mg CE / g and 2.7387 ± 0.0080 mg CE / g DM, respectively.

The antioxidant properties using the test of total antioxidant capacity show that the ethyl acetate fraction and the crude extract have high values of the order of 1.3834 ± 0.0084 mg AAE / g and 1.6315 ± 0.0083 mg AAE / g DM, respectively.

The antibacterial activity against three Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*), three Gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*) and a yeast (*Candida albicans*) by the agar diffusion method shows that ethyl acetate has a selectivity of antimicrobial activity against the two strains *S. aureus* and *B. cereus* observed at 100 mg/ml with diameters of inhibition zones of 14, 5 and 10, 5 mm, respectively. Regarding the antifungal potency, all samples have an inhibitory effect on the yeast *Candida albicans*, which the highest is illustrated by ethyl acetate fraction with the inhibition zones of 24 mm at the concentration 200 mg / ml.

Keywords: Algae Brown, *Cladostephus hirsutus*, Phenolic compounds, antioxidant activity, antimicrobial activity,