

Université Abdelhamid  
Ibn Badis-Mostaganem  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس  
مستغانم  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

N°...../SNV/2017

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

M<sup>elle</sup> SAHNOUN Amira

M<sup>elle</sup> CHENINE Amel

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN BIOLOGIE**

**Spécialité: Microbiologie fondamentale et appliquée**

**THÈME**

Contribution à l'étude de l'effet de la variation saisonnière  
(hiver-printemps) de l'activité antibactérienne et antioxydante  
de différents extraits de l'algue verte *Caulerpa racemosa de*  
*la côte Mostaganémoise*

Soutenu le 28/06/2017

DEVANT LE JURY

Présidente	BENNAMA Rabha	MCB	Université de Mostaganem
Examinatrice	BENOURAD Fouzia	MCB	Université de Mostaganem
Encadreur	BELKACEMI Louiza	MCA	Université de Mostaganem

*Thème réalisé au Laboratoire de technologie alimentaire et nutrition*

# *Remerciements*

*Au terme de ce modeste travail, nous exprimons tout d'abord nos profonds remerciements, notre vive reconnaissance et notre sincère gratitude à Mme BELKACEMI L, maitre de conférence A à la faculté des sciences, Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem pour avoir accepté de nous encadrer et pour ses conseils et ses précieuses orientations qu'elle n'a cessé de nous à apporter tout au long de ce travail.*

*Nous tenons à exprimer notre très grande considération et notre profonde reconnaissance à Mme. BENNAMA, maitre de conférence B à l'Université de Mostaganem, Département de Biologie, nous avoir fait l'honneur de présider le jury de soutenance.*

*Nous tenons également à remercier Mme. BENOUAËD F maitre de conférences B à l'université Abdelhamid Ibn Badis d'avoir accepter d'examiner ce travail.*

*Nous ne saurons oublier Mr. Abed pour son aide et ses conseils*

*Nous tenons vivement à remercier tout le personnel du laboratoire de microbiologie de l'Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.*

*Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à notre famille : nos parents, et tous nos proches et amies, qui nous ont accompagnées, aidés, soutenues et encouragées tout au long de l'élaboration de ce mémoire.*

## *Dédicace*

*J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail,*

*A ma très chère Mère pour tous ses sacrifices, et son amour.*

*A mon Père qui m'a toujours aidé et encouragé.*

*A ma très chère grand-mère pour son soutien,*

*A ma sœur, mes frères, et à tous mes proches*

*A tous mes camarades de promotion*

*A tous mes enseignants*

*A mes aimables amies : Ahlem, Malika, Souad, Hayet*

*Amira*

*A ma très chère **mère***

*A celle qui m'a éclairé les chemins...*

*A celle qui me rappelle toujours que la volonté et le courage est la clé de  
toute réussite.*

*Que Dieu le tout puissant te procure, santé et longue vie.*

*A la mémoire de mon très cher **père***

*A mes très chères **sœur** Pour leurs Présence, leur aide et leur joie de  
vivre qui m'a accompagné tous au long de mes études,*

*Ames très chères **frères** pour leur soutien*

*Un merci particulier à mon cousin **yassine** et mon très cher ami **Hamza**  
pour leur encouragement*

*A mon binôme **Amira** pour le moment extraordinaire passé durant la  
réalisation de ce travail.*

*A mes très chères sœurs et amies : **Hayet, Samia, Asma, Houria soumia,**  
Je remercie Monsieur **Benbouzid** moniteur de plongé pour la récolte des  
algues ainsi toutes les personnes qui m'ont aidée*

*Merci pour tous les moments qu'on a passé ensemble*

*A tous la promo de microbiologie fondamentale et appliquée*

*Amel*

## RÉSUMÉ

Ce travail porte essentiellement sur l'effet de la variation saisonnière de l'activité antibactérienne et le pouvoir antioxydant des extraits de l'algue verte *Caulerpa racemosa* var. *cylindrcea*.

Cette espèce a été récoltée sur la côte de Mostaganem au niveau des plages de Salamandre, Sablette et Stidia entre décembre-février (hiver) et mars - mai 2017 (printemps). Quatre solvants ont été utilisés pour l'extraction au Soxhlet: méthanol, hexane, chloroforme et l'acétone. Un screening phytochimique et une évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne ont été réalisés.

Le rendement de l'extrait brut de l'échantillon au cours des deux saisons a montré que les valeurs les plus élevées sont celles obtenues pour l'extrait méthanolique (19,22 % et 8,82 % pour la saison printemps et hiver, respectivement) ; par contre, l'extrait de l'hexane n'a atteint que 1,69 % et 0,27% pendant la saison de printemps et d'hiver.

Ce sont les extraits « printaniers » de l'algue qui ont démontré la meilleure activité antibactérienne sur la souche *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* et ce pour toutes concentrations testées (100 mg/ml, 200mg/ml et 500mg/ml). Toutefois, cette activité reste inférieure à celle exercée par les antibiotiques cephazoline, gentamicine et chloramphénicol. Ces extraits n'ont cependant eu aucun effet inhibiteur vis-à-vis d'*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* et *Proteus mirabilis*.

Le screening phytochimique révèle la présence des polyphénols dont les flavonoïdes dans tous les extraits surtout dans ceux de la Caulerpe collectées durant l'hiver. L'extrait chloroformique s'est révélé le plus riche en métabolites (polyphénols, alcaloïdes, saponines, stérols, acides aminés et sucres réducteurs). La meilleure capacité de piégeage du radical libre DPPH est celle de l'extrait de chloroforme (IC<sub>50</sub> de 5,22 mg/ml et 1,98 mg/ml pour la saison hiver et printemps, respectivement). Par contre, l'extrait méthanolique de la saison printanière possède le pouvoir de piégeage du DPPH le plus faible (IC<sub>50</sub> de 14,64 mg/ml et 42,06 mg/ml durant la saison hivernale et printanière, respectivement). Enfin, *Caulerpa racemosa* collectée sur la côte de Mostaganem, est une algue potentiellement intéressante pour son activité antibactérienne et surtout antioxydante.

**Mots clés :** *Caulerpa racemosa*, activité antibacérienne, activité antioxydante, DPPH, screening phytochimique.

## ABSTRACT

This work focuses on the seasonal variation of antibacterial and antioxidant activity of the green alga *Caulerpa racemosa* var. *cylindrcea* extracts.

This species was harvested on the Mostaganem coast at the beaches of Salamandre, Sablette and Stidia between December-February (winter) and March-May 2017 (spring). Four solvents were used for soxhlet extraction: methanol, hexane, chloroform and acetone. Phytochemical screening and evaluation of antioxidant and antibacterial activities were carried out.

The yield of the crude extract during the two seasons showed that the highest values are those obtained for the methanol extract (19.22% and 8.82% for the spring and winter season, respectively). On the other hand, the hexane extract reached only 1.69% and 0.27% during the spring and winter season.

It is the "spring" extracts of the alga that have demonstrated the best antibacterial activity on the strain *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *staphylococcus aureus* and this for the all tested concentrations (100 mg/ml, 200mg/ml et 500mg/ml). However, this activity remains lower than that exerted by antibiotics Cefazolin, gentamicin and chloramphenicol. Nevertheless, these extracts had no inhibitory effect against *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* & *Proteus mirabilis*.

Phytochemical screening revealed the presence of polyphenols, including flavonoids, in all extracts, especially those of *Caulerpa* collected during the winter. The chloroform extract was the richest one in metabolites (polyphenols, alkaloids, saponins, sterols, amino acids and reducing sugars). The best antioxydant capacity against the free radical DPPH is that of the chloroform extract (IC<sub>50</sub> of 5.22 mg / ml and 1.98 mg / ml for the winter and spring season, respectively). On the other hand, the methanolic extract of the spring season has the lowest DPPH radicaltrapping ability (IC<sub>50</sub> of 14.64 mg / ml and 42.06 mg / ml during the winter and spring season, respectively).

Finally, *Caulerpa racemosa* collected on the Mostaganem coast is an potentially interesting alga for its antibacterial and especially antioxidant activity.

**Key words:** *Caulerpa racemosa*, Antibacterial activity, Antioxidant activity, DPPH, Phytochemical screening.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

**ATCC:** American Type Culture Collection

**D.M.S.O :** Diméthylsulfoxyde

**°C:** Degré Celsius

**DO :** Densité optique

**DPPH• :** 2,2-Diphényl-2-picrylhydrazyl

**g:** Gramme

**h:** Heure

**IC50 :** Concentration inhibitrice à 50 %

**mg:** Milligramme

**ml:** Millilitre

**mm :** Millimètre

**nm :** Nanomètre

**UFC :** Unité Formant Colonie

**µg :** Microgramme

**µl :** Microlitre

## LISTE DES FIGURES

	<b>Page</b>
<b>Figure 01</b> : Localisation géographique de <i>Caulerpa racemosa</i> sur le littoral algérien	5
<b>Figure 02</b> : Morphologie de <i>Caulerpa racemosa</i> .....	6
<b>Figure 03</b> : thalle frais de <i>Caulerpa racemosa</i> .....	16
<b>Figure 04</b> : thalle sec de <i>Caulerpa racemosa</i> .....	16
<b>Figure 05</b> : Localisation géographique de <i>Caulerpa racemosa</i> de notre zone d'étude	17
<b>Figure 06</b> : Mécanisme d'action d'un antioxydant.....	24
<b>Figure 07</b> : Rendement de différents extraits de <i>Caulerpa racemosa</i> .....	25
<b>Figure 08</b> : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des concentrations des différents extraits de <i>Caulerpa racemosa</i> sur <i>Bacillus cereus</i>	27
<b>Figure 09</b> : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des concentrations des différents extraits sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	28
<b>Figure 10</b> : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des concentrations des extraits testés sur <i>Staphylococcus aureus</i> .....	29
<b>Figure 11</b> : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>Bacillus cereus</i> .....	30
<b>Figure 12</b> : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>Escherichia coli</i> .....	30
<b>Figure 13</b> : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	31
<b>Figure 14</b> : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>Proteus mirabilis</i> .....	32
<b>Figure 15</b> : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur <i>Staphylococcus aureus</i> .....	32
<b>Figure 16</b> : Les IC50 des différents extraits de <i>Caulerpa racemosa</i> .....	34

## LISTE DES TABLEAUX

	<b>page</b>
<b>Tableau 01</b> : Situation géographique des différentes stations d'étude	17
<b>Tableau 02</b> : souches utilisées dans le test antibactérien	19
<b>Tableau 03</b> : Liste des antibiotiques testés sur les bactéries	21
<b>Tableau 04</b> : Aspect, couleur des différents extraits de <i>Caulepa racemosa</i>	26
<b>Tableau 05</b> : tableau représentant la coloration de Gram et test de catalase.	26
<b>Tableau 06</b> : Résultat du screening phytochimique sur les différents extraits de <i>Caulerpa raseмосa</i> .	33

# *INTRODUCTION*

## INTRODUCTION

Les algues occupent une place importante dans le milieu marin avec plus de 1200 espèces appartenant à tous les niveaux évolutifs, ces algues regorgent un énorme réservoir de molécules naturelles potentiellement actives (**Rajeev et Xu, 2004 ; Blunt *et al.*, 2009**). Des études ont permis d'isoler et d'identifier un très grand nombre de molécules nouvelles de grande originalité structurale utilisés dans plusieurs domaines tels que l'agroalimentaire et la pharmacologie (**Naigai et Kimoto, 2003; Li *et al.*, 2007; Matanjun *et al.*, 2008**) et dont beaucoup d'entre elles ont une activité biologique intéressante.

Beaucoup d'algues possèdent des composés bioactifs qui inhibent la croissance de certaines bactéries pathogènes Gram positif et Gram négatif (**Siddhanata *et al.*, 1991**) tels que les stérols, les caroténoïdes terpénoïdes, les vitamines, les acides gras, les acides aminés, les antioxydants comme les polyphénols, des alcaloïdes, des polysaccharides tels que l'agar-agar, carraghénanes, les protéoglycanes et l'alginate (**Paniagua Michel, 2009**).

Etant donné le large éventail d'activités associées aux algues marines particulièrement antimicrobiennes et antioxydantes leur conférant une valeur appréciée en pharmacie et en médecine et face à l'apparition de formes résistantes de plusieurs bactéries à certains antibiotiques, la recherche de nouvelles molécules actives est devenue une nécessité. Ainsi, l'exploration du milieu marin et notamment celui du littoral algérien dans ce sens pourrait être d'un grand intérêt.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de recherche dont l'objectif est d'étudier la variation saisonnière hiver-printemps de l'activité antibactérienne et antioxydante de l'algue verte invasive *Caulerpa racemosa* récoltée sur la côte ouest algérienne.

Notre objectif est de comparer d'une part, l'effet de différents solvants à polarité différentes sur l'extraction de métabolites secondaires et ce à travers un screening phytochimique et une évaluation de l'activité antiradicale de chaque extrait pour chaque saison. D'autre part, nous nous sommes intéressées à comparer le potentiel antibactérien de chaque extrait et pour chaque saison (hiver-printemps) sur des souches pathogènes.

*CHAPITRE I*  
*GÉNÉRALITÉS SUR LES ALGUES*

## 1. Généralités sur les algues

### 1.1. Définition

Les algues sont des organismes autotrophes de structure simples, conventionnellement définies comme des végétaux peuplant le milieu aquatique, les lieux humides et de nombreux milieux terrestres (Ces organismes sont, contrairement aux plantes aquatiques, dépourvus de véritables feuilles, tiges et racines). Leur appareil végétatif relativement simple est appelé « thalle » (**Rivard-Sirois, 2005**).

Les algues présentent aussi une grande diversité morphologique basée sur plusieurs niveaux d'organisation (unicellulaire et pluricellulaire) qui se manifeste au niveau de la taille : de 1 à 100 microns pour les cellules du phytoplancton à plusieurs mètres pour certaines macroalgues (**Person, 2011**).

Les algues marines constituent un énorme réservoir de molécules naturelles potentiellement actives (**Rajeev et Xu., 2004 ; Blunt et al., 2009**),

### 1.2. Les grands groupes des algues

Les algues marines sont classées en trois grands groupes, selon leur pigmentation : les chlorophycées, les rhodophycées et les phéophycées (**Mohamed et al., 2012**).

#### 1.2.1. Les algues vertes:

Les algues vertes sont aussi appelées chlorophycées. Elles désignent un groupe d'organismes variés comprenant au moins 17 000 espèces. Ces algues sont apparues il y a environ 1,3 milliard d'années. Elles jouent un rôle important dans l'oxygénation des eaux et des océans. Les principaux pigments photosynthétiques présents dans les algues vertes sont les chlorophylles a et b (**Perez, 1997**).

#### 1.2.2. Les algues brunes :

Les algues brunes sont également appelées phéophycées. Cette génération d'algues est la dernière à être apparue il y a environ un milliard d'années.

Il existe aujourd'hui près de 1500 espèces d'algues brunes presque entièrement marines. Elles représentent les algues les plus abondantes des mers tempérées et froides. Les algues brunes contiennent principalement les chlorophylles a et c (**Gillaume, 2010**).

### **1.2.3. Les algues rouges**

Les algues rouges sont aussi appelées rhodophycées. Il existe 4000 à 6000 espèces réparties dans environ 680 genres. Ces algues rouges sont apparues il y a environ deux milliard d'années. Cette classe d'algues forment un grand groupe d'algues pour laplupart marines et particulièrement abondantes dans les eaux tropicales et chaudes. Cependant, on en trouve parfois dans les régions froides du globe terrestre (**Lüning, 1990**).

Elles possèdent des pigments photosynthétiques accessoires : phycoérythrine, phycocyanine et allophycocyanine (**Raven et al., 2011**).Ellessont dépourvues de flagelles et centrioles(**Woelkerling, 1990**).

### **1.3. Applications des algues marines**

Il existe plusieurs domaines économiques qui font appel à des algues ou à desphycocolloïdes. Elles présentent actuellement une source nutritionnelle et un produit à valeurmontante, surtout en Asie où elles sont utilisées directement comme aliments, ou indirectementsurtout par l'industrie de phycocolloïdes (agars et alginates). Elles sont utilisées en agriculturecomme engrais et fourrage, dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique, dans le textile, etdans d'autres domaines (**Chopin, 1997**).

En raison des propriétés multiples de leurs éléments, les algues ont été et sont encore utilisées à de nombreuses fins :

#### **1.3.1. En industrie pharmaceutique**

Il existe une diversité de molécules d'intérêt pharmaceutique issues des macro-algues bien plus importante.

Les alginates sont largement utilisés dans l'industrie pharmaceutique en raison de leur capacitéde chélation et de leur capacité à former une solution très visqueuse. On les retrouve dans lespâtes pour empreintes dentaires,comme antiacides pour les brûlures d'estomac ou les reflux gastriques.

Les carraghénanes présentent, quant à eux, plusieurs possibilités d'utilisation comme produits pharmaceutiques en tant qu'anti tumoraux,antiviraux, anticoagulants, et même des activités d'immunomodulationsont actuellement explorées (**Person, 2011**).

#### **1.3.2. En Agriculture**

Les macro-algues sont utilisées comme engrais dans le monde entier au niveau des régions côtières.

Leur teneur en minéraux permet d'améliorer la composition minérale des sols appauvris et leur richesse en colloïdes, d'accroître la capacité de rétention d'eau des sols, de fixer les limons et de réduire l'érosion des terres arables (**Person, 2011**).

### **1.3.3. Dans le traitement des eaux usées**

La technique dite de lagunage représente une alternative économique et efficace à des systèmes de traitement (les rejets des villes, de l'industrie, des fermes aquacoles, des entreprises agricoles). La capacité des algues à absorber les nutriments issus d'élevages piscicoles a été démontrée à partir de cultures d'algues en bassin (**Cohen et Neori, 1991**).

L'intérêt de l'utilisation des macroalgues pour le traitement des eaux usées en eau salée a été démontré dès la fin des années 70 dans des mélanges d'eau usée et d'eau de mer (**Guist et Humm, 1976**).

### **1.3.4. En cosmétique**

L'extrait d'algue est souvent trouvé sur la liste des ingrédients des emballages cosmétiques, en particulier dans les crèmes et lotions du visage ou des mains. En thalassothérapie, les pâtes de macro-algues, préparées par broyage-froid ou sous forme de gel, sont appliquées sur le corps de la personne qui sera après exposée au rayonnement infrarouge.

Il semble y avoir une multitude de produits avec des ingrédients à base de macro-algue : crèmes, masques, shampoings, gels de corps (**Chouikhi, 2013**).

## **2. Présentation de l'espèce *Caulerpa racemosa***

### **2.1. Description botanique**

*Caulerpa racemosa* var. *cylindracea* est une Chlorobionte (« algue verte ») marine de couleur verte, reconnaissable par ses axes rampants (stolons) avec des rhizoïdes et des frondes dressés portant des ramules en forme de vésicules, sa taille peut atteindre entre 1 et 11 cm. Elle a une reproduction sexuée et végétative (**klein, 2007**).

### **2.2. Localisation**

*Caulerpa racemosa* Forsskål J. Agardh est une espèce introduite originaire du Sud-Ouest de l'Australie (**Verlaque et al., 2003**), et a été observée pour la première fois en Méditerranée en 1990 devant le port de Tripoli en Libye (**Nizamuddin, 1991**). La présence de cette algue envahissante a été enregistrée devant les côtes de 14 pays Méditerranéens (Albanie, Algérie, Chypre, Croatie, Espagne, France, Grèce, Italie, Libye, Malte, Monténégro, Tunisie, Monaco et Turquie). Elle est observée pour la première fois en Corse en octobre 2002,

au large de Bastia puis dans le golfe de Sant'Amanza, avec par la suite une vitesse d'expansion extrêmement rapide (**Garrido-Maestracci, 2008**).

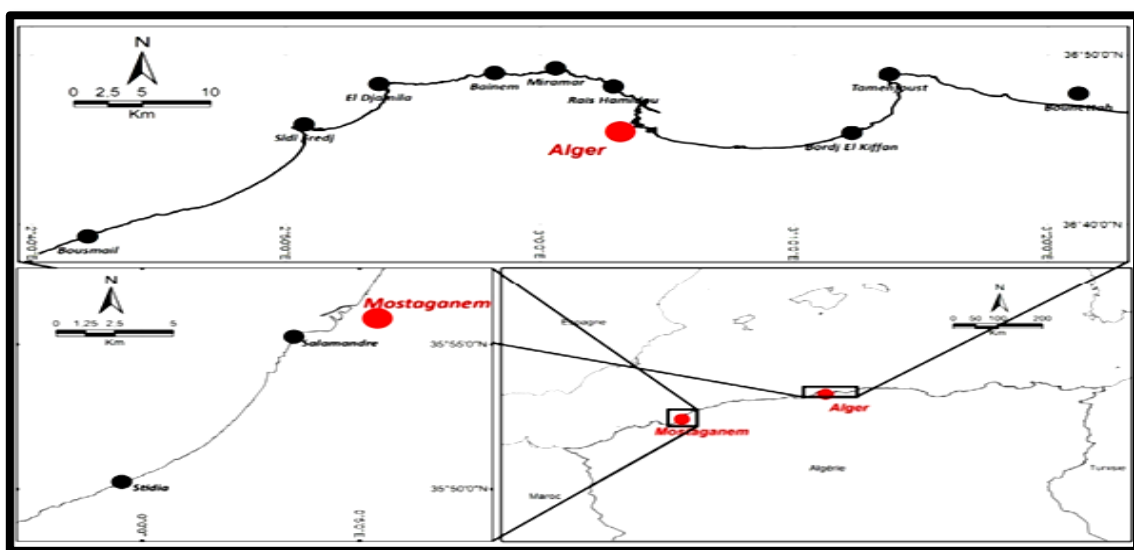
En Algérie, l'espèce a été signalée pour la première fois en 2006 devant le Port d'Alger (**Ould Ahmed et Meinez, 2007**). Elle présente des particularités qui la rendent très compétitive vis-à-vis des peuplements indigènes. En effet, l'extrême rapidité de son expansion est attribuée à la diversité et l'efficacité de ses modes de reproduction, ainsi qu'à la synthèse de métabolites secondaires toxiques pour se défendre des espèces herbivores (**Klein et Verlaque, 2008**).

### 2.2.1. Distribution de *Caulerpa racemosa* sur le littoral algérien

La présence de l'algue invasive *Caulerpa racemosa* dans une localité éloignée des autres zones décrites en Méditerranée en 2006 (**Ould Ahmed et Meinez, 2007**) renforce l'hypothèse de la dissémination anthropique de cette algue en Méditerranée (**Verlaque et al., 2000, 2003, 2004 ; Piazzini et al., 2005**). Elle a été signalée également dans plusieurs localités de la région d'Alger (figure 01) entre les années 2006 et 2009. De nos jours, elle a été identifiée dans neuf zones de la côte algéroise et dans deux autres à Mostaganem, sur la côte ouest algérienne.

L'algue a été identifiée pour la première fois à Bou-Ismaïl en 2006 (**Ould Ahmed et Meinez, 2007**). D'autres travaux ont permis de mentionner sa présence à Bordj El Kiffan à l'est d'Alger (**Seridi, 2007**) et dans différentes zones du littoral d'Alger (**Lamouti et al., 2011**).

Sur la côte ouest algérienne, BOUIADJRA et ses collaborateurs déterminèrent la présence de plusieurs peuplements dans le golfe d'Arzew à Stidia et à proximité du port de Salamandre à l'Ouest de Mostaganem (**Bouidjra et al., 2010-a, 2010-b**).



**Figure 01** : Localisation géographique de *Caulerpa racemosa* sur le littoral algérien  
(**Bachir Bouidjra et al. (2010-a, 2010-b) ; Lamouti et al. (2011)**).

### 2.3. Habitat

*Caulerpa racemosa* se développe sur des substrats durs, sablo-vaseux, elle colonise de larges surfaces sur tous les substrats, de la surface à 40 m de profondeur, à l'exception des herbiers denses de *Posidonia oceanica*. Dans la rade sud, elle domine largement les communautés macrophytiques sur matre morte de *P. oceanica* et sur le Détritique Côtier.

Elle peut être observée entre 2 et 60 m de profondeur, avec une formation de peuplements denses et continus. Elle est constituée d'un axe rampant (stolons), de rhizoïdes et de frondes caractérisées par de petites protubérances arrondies: ramules (Figure 01). Leur longueur moyenne présente une forte plasticité en fonction de la lumière (Klein, 2007).

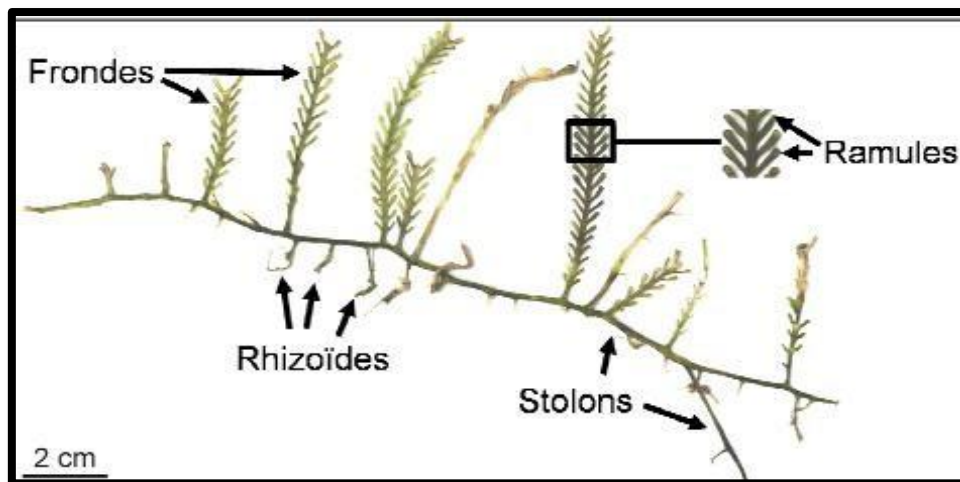


Figure 02 : Morphologie de *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea* (Klein & Verlaque, 2008).

### 2. 4. Position systématique

L'espèce *Caulerpa racemosa* est classée d'après Forsskål J. Agardh (1875) comme suit :

<b>Règne</b>	Plante
<b>Phylum</b>	Chlorophyta
<b>Classe</b>	Ulvophyceae
<b>Ordre</b>	Bryopsidales
<b>Famille</b>	Caulerpaceae
<b>Genre</b>	<i>Caulerpa</i>
<b>Espèce</b>	<i>Caulerpa racemosa</i>
<b>Variété</b>	<i>Caulerpa racemosa</i> var. <i>cylindracea</i>

## **2.5. Reproduction**

La reproduction du genre *Caulerpa racemosa* peut s'exprimer sous deux modes : un sexué et un végétatif. C'est cette dernière stratégie qu'adopte la souche de *Caulerpa racemosa* par fragmentation et bouturage ou par dissémination de ramules transformés en propagules qui peuvent se détacher facilement de l'axe et régénérer un thalle complet (**Véronique, 2017**) Cette algue est également capable de se reproduire sexuellement ; cette reproduction est holocarpique, conduisant à la lyse entière du thalle en gamètes libérés simultanément mais provoquant également la mort de l'individu. Les individus sont monoïques, mais développe cette fois les deux types de gamètes, mâles et femelles. Ceci permet la formation de zygote par fusion des gamètes qui se fixent et produisent après cinq semaines un tube qui s'allongera pour se développer en un nouvel individu (**Piazzì et al., 2005**).

*CHAPITRE II*  
*GÉNÉRALITÉS SUR LES MICROORGANISMES*

## **1. Présentation des espèces étudiées**

### **1.1. *Bacillus cereus***

#### **❖ Caractéristique**

*Bacillus cereus* est une bactérie Gram positif, anaérobies facultatives. Ce sont des bâtonnets, d'environ 4 µm de long et 1 µm de large, possédant une ciliature péri triche (Guinebretiere *et al.*, 2008), capable de former des endospores et de s'adapter à une large gamme de conditions environnementales. Elle est largement distribuée dans la nature et se trouve couramment dans le sol comme un organisme saprophyte (Vilain, 2006).

#### **❖ Le pouvoir pathogène**

*Bacillus cereus* est un pathogène humain opportuniste et est parfois associé à des infections systémiques et locales, responsable de toxi-infections alimentaires caractérisées par des symptômes diarrhéiques et d'intoxications se traduisant par des symptômes émétiques provoquant des maladies parodontales (Hoffmaster, 2006).

### **1.2. *Escherichia coli***

#### **❖ Caractéristique**

*Escherichia coli* (colibacille) à coloration de Gram négative qui appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, en forme de bâtonnet, mobile qui peut se déplacer au moyen de flagelles péritriches ou être non mobile. Ces bactéries sont capables de fermenter le lactose et de produire de l'indole. Elles font parties de la flore commensale de l'homme et des animaux à sang chaud

#### **❖ Le pouvoir pathogène**

Cette bactérie présente la caractéristique unique d'être à la fois un germe commensale de la flore intestinale et le premier germe pathogène responsable d'infection communautaire.

*Escherichia coli* est impliqué dans deux grands types d'infection : les infections intestinales et les infections extra intestinales qui comprennent l'infection urinaire et l'infection néonatale.

### **1.3. *Enterococcus faecalis***

#### **❖ Caractéristique**

Sont des coques Gram positif, anaérobies facultatifs, catalase-négatifs, se présentant de manière isolée, en paires ou en courtes chaînes.

*E. faecalis* font partie de la flore normale du tractus gastro-intestinal, des voies génitales féminines, et de la cavité orale

❖ **Le pouvoir pathogène**

*E. faecalis* peut causer des endocardites, ainsi que des infections de la vessie, de la prostate ou de l'épididyme. Les infections du système nerveux sont plus rares. *E. faecalis* est résistant à de nombreux agents antibiotiques (**Berche, 1988**).

**1.4. *Pseudomonas aeruginosa***

❖ **Caractéristique**

*Pseudomonas aeruginosa* est un bacille pyocyanique « bacille du pus bleu » à coloration de Gram négatif. Les souches de cette espèce sont constituées de bacilles de 0,5 à 0,8 µm de diamètre sur 1,5 à 3,0 µm de longueur, se présentant de manière isolée ou groupée par deux ou en courtes chaînes, mobiles grâce à une ciliature monotriche (**Euzeby, 2005**). Elle est aérobie stricte, oxydase positif, et naturellement très résistante aux antibiotiques. Ces bactéries sont opportunistes vivant normalement à l'état saprophyte dans l'eau, les sols humides et les végétaux, mais qui peut également vivre à l'état commensale sur la peau ou à l'intérieur du système digestif de divers animaux (**Sabin, 2006**).

❖ **Le pouvoir pathogène**

*P.aeruginosa* est un pathogène opportuniste responsable d'infections survenant chez des patients fragilisés. C'est une bactérie opportuniste des circonstances cliniques favorisant les types d'infections : mucoviscidose (infection pulmonaires), brûlure (septicémie), cancer et leucémie (pneumonie), diabète (otite) neurochirurgie (méningite). C'est le premier germe responsable de pneumopathie nosocomiale (environ 20%) avec un important taux de mortalité (**Flandrois et al., 1997**).

**1.5. *Proteus mirabilis***

❖ **Caractéristique**

*Proteus mirabilis* sont des entérobactéries des bacilles à gram négatif polymorphe. aéro-anaérobies, à métabolisme respiratoire et fermentaire, oxydase négative, nitrate réductase positive (**Berche, 1988**). Ces bactéries sont très mobiles grâce à des flagelles péritriches. Cette mobilité est visible macroscopiquement. Les proteus mirabilis sont des germes ubiquitaires largement répandus dans la nature, retrouvés dans les eaux, le sol, ils font parties de la flore commensale de l'intestin de l'homme et de nombreux animaux (**Berche, 1988**).

**Le pouvoir pathogène :**

*Proteus mirabilis* est une bactérie responsable de nombreuses infections chez l'homme, elle est responsable d'environ 90% des infections nosocomiales, des infections des voies respiratoires comme la sphère oto-rhino-laryngologique (ORL) et la septicémie (Berche, 1988).

**1.6. *Staphylococcus aureus***

❖ **Caractéristique**

C'est une bactérie à Gram positif de 0,5 à 1,0 µm de diamètre associé par paires, en chaînettes de 3 à 5 coques, ou en amas irrégulier, en grappe de raisins. Elle est une bactérie immobile, non sporulée, anaérobie facultatif, oxydase négatif et catalase positif. On le trouve sur la muqueuse nasale d'un tiers environ des sujets normaux. Éliminée dans le milieu extérieur, cette bactérie peut survivre longtemps dans l'environnement. (Jouve, 1996)

❖ **Le pouvoir pathogène**

Chez l'homme, *S. aureus* est responsable des infections localisées à la peau et des muqueuses. Elle s'accompagne très souvent d'infection viscérale (Michel, 2005).

*CHAPITRE III*  
*LES MÉTABOLITES SECONDAIRES*

## Les métabolites secondaires

### 1. Définition

Dès la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, le botaniste allemand Julius Von Sachs reconnaît l'existence de molécules produites en dehors des voies métaboliques strictement nécessaires à la survie de la plante (**Hartmann, 2007**). Par la suite, ces composés sont nommés « métabolites secondaires », par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides. Ce sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes extrêmement diversifiées, ces métabolites secondaires existent sous la forme de plus de 200 000 structures chimiques, pouvant être classées en trois grandes catégories (**Bruneton, 1993**).

### 2. Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont divisés principalement en trois grands groupes : les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (**Ravenet *al.*, 2000 ; Krief, 2003**).

#### 2.1. Les composées phénoliques

Les composés phénoliques ou les polyphénols(PP) sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, largement distribués possédant plusieurs groupements phénoliques, avec ou non d'autres fonctions et comportant au moins 9000 structures connues différentes (**Bahorun, 1997**), allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins (**Akowauhetal., 2004**). Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**). Ces corps jouent un rôle fondamental car ce sont des éléments importants de la qualité sensorielle (couleur et caractères organoleptiques) et nutritionnelle des végétaux (**Scalbert *et al.*, 2005**).

Les polyphénols sont doués d'activités antimicrobiennes importantes et diverses, probablement dues à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité (**Cowan, 1999**).

##### 2.1.1. Les flavonoïdes

L'appellation « flavonoïdes » rassemble une très large gamme de composés polyphénoliques formés par un squelette de base à 15 atomes de carbones.

Ces composés représentent le groupe de composés phénoliques le plus diversifié : plus de 4000 flavonoïdes ont déjà été identifiés. Le terme « flavonoïde » est dû à leur couleur jaune (= flavus en latin) qu'ils engendrent. D'ailleurs, leurs fonctions principales chez les végétaux semblent être attribuées à leur coloration ; au-delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bétalaïnes (Akroum, 2011).

Ils ont une activité antibactérienne très vaste et très diversifiée. En effet, ils s'attaquent à un grand nombre de bactéries avec une intensité différente selon le microorganisme et l'écosystème dans lequel il se trouve : les flavonoïdes sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries : *Staphylococcus aureus* (Babayiet al., 2004), *Escherichia coli* (Ulawonska et al., 2006), *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis* (Didrak, 1999).

### 2.1.2. Les tannins

Utilisés depuis l'Antiquité par l'homme pour le traitement des peaux des animaux, les tannins ont une importance économique et écologique considérable et sont responsables de l'astringence de nombreux fruits et légumes et des produits qui en sont dérivés (vin, thé, bière...). En première approximation, les tannins sont considérés comme des formes phénoliques condensées capables de se lier aux protéines en solution et de les précipiter. Il est classique de distinguer deux grands groupes de tannins différents à la fois par leur réactivité chimique et par leur composition : les tannins hydrolysables et les tannins condensés (Macheix et al., 2005).

Les tannins ont une action antibactérienne puissante leur permettant d'inhiber la croissance des bactéries ruminales (dont certaines sont sporogènes) comme *Clostridium aminophilum*, *Clostridium proteoclasterium* (Chatterjee et al., 2004 ; Leitao et al., 2005), ainsi que les bactéries responsables de différentes infections chez l'homme : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* et *Proteus mirabilis*. L'inhibition bactérienne par les tannins est dépendante de leur structure et leur degré de polymérisation (Sivakumaran, 2004).

### 2.1.3. Les coumarines

Les coumarines tirent leur nom de « coumarou », nom vernaculaire de fève tonka (*Dipterix odorata* Wild., *Fabaceae*) d'où ils furent isolés en 1820 (Bruneton, 2009).

Les familles les plus riches en coumarines sont les : Légumineuses, Rutacées, Apiécées et les Thymelacées. Elles se trouvent dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et les huiles essentielles des graines (Guignard, 1998).

Les coumarines possèdent des propriétés physiologiques et antimicrobiennes. Lawarfarine est une coumarine utilisée comme anticoagulant qui posséderait également des propriétés antivirales (Cowan, 1999).

#### 2.1.4. Les quinones

Les quinones sont les plus souvent des hydroquinones. Elles peuvent être combinées à des sucres (anthraquinones). Elles proviennent de nombreux processus par différentes voies de biosynthèse. Le potentiel redox du couple quinone-hydroquinone est très important dans de nombreux systèmes biologiques.

Les polyprényls quinones (quinones terpénoïdes) dérivent de l'acide 4-hydroxybenzoïque, leur noyau benzoquinone porte des chaînes polyisopréniques. Certains dérivés comme la plastoquinone et l'ubiquinone sont des transporteurs d'électrons les quinones sont connues pour complexer irréversiblement avec certains acides aminés, des protéines qu'elles inactivent ou rendent inutilisables. Ceci explique la variété d'effets antimicrobiens potentiels des quinones. Nombre d'entre elles sont anti-appétantes et toxiques. La naphthoquinone juglon de l'écorce de *Carya ovata* inhibe la croissance de différents champignons et bactéries phytopathogènes (Gilbert et Norris, 1968).

#### 2.2. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques hétérocycliques azotées et basiques. Ils sont dérivés des acides aminés tels que l'ornithine, la tyrosine, le tryptophane (Jost & Jost-Tse, 2016). Depuis l'identification du premier alcaloïde en 1806, plus de dix mille alcaloïdes ont été isolés des plantes. En fait, les alcaloïdes forment un groupe hétérogène du point de vue de la structure et des propriétés chimiques que des effets biologiques qu'ils manifestent (Bruneton, 1999).

#### 2.3. Les terpénoïdes et les stéroïdes

Les terpénoïdes sont définis comme étant des matériaux ayant des structures moléculaires contenant un squelette carboné formé des unités d'isoprène (Sell, 2004). Ces composés sont majoritairement d'origine végétale (Malecky, 2005), synthétisés par les plantes, les organismes marins et les champignons. Les stéroïdes sont dérivés de triterpènes tétracycliques et possèdent un squelette cyclopentapérihydro phénanthrène. Beaucoup de stérols se produisent sous forme de glycosides caractérisés par les saponines stéroïdiens (Hanson, 2003). La grande diversité des structures des terpénoïdes et leurs fonctions ont suscité un intérêt accru pour leur usage commercial. Les terpénoïdes sont utiles dans la prévention et le traitement de plusieurs maladies, y compris le cancer. Ils sont

également réputés avoir des propriétés antimicrobiennes, antifongiques, antiparasitaires et antivirales (**Chouikhi, 2013**).

Les terpénoïdes sont doués de propriétés antifongiques et antibactériennes. A titre illustratif, la buteline et l'acide 12-oxohardwickique isolés de l'écorçede *Croton macrostachys*, ont montré des activités antifongiques et antibactériennes (**Cowan, 1999**).

### **2.3.1. Les saponines**

Le nom saponine dérive du mot latin «sapo», qui signifie savon. Les saponines constituent un vaste groupe d'hétérosides très fréquents chez les végétaux. Ils se composent d'aglycones non polaires liés à un ou plusieurs sucres. Ils sont caractérisés par leurs propriétés tensioactives car ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes. Ils sont principalement produits par les plantes mais aussi par les organismes marins (**Bruneton, 2009**).

Les saponines peuvent être classées en deux groupes en se basant sur la nature de leur squelette aglycone. Le premier groupe est constitué par des saponines stéroïdiennes, qui se rencontrent presque exclusivement dans les monocotylédones angiospermes. Le deuxième groupe est les saponines triterpénoïdes, qui sont le plus commun et on le rencontre chez les dicotylédones angiospermes (**Spargetal., 2004**).

La majorité des saponines montrent une activité antimicrobienne contre les champignons pathogènes *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*.

## **3. Pouvoir antioxydant des métabolites secondaires**

Pour lutter contre les effets nocifs des radicaux libres, notre organisme possède des systèmes de défense complexe constitués par des composés appelés « les antioxydants ». Ces systèmes sont capables de bloquer la formation des radicaux libres en les neutralisant ou en les désactivant une fois formés, protégeant ainsi les systèmes biologiques contre tout dommage oxydatif (**Heimeuret al., 2004**).

Actuellement, un grand intérêt est accordé aux composés naturels issus de plantes et possédant des propriétés antioxydantes. Les plus représentés sont les composés phénoliques, les flavonoïdes.

Les composés phénoliques sont capables d'agir comme des antioxydants qui peuvent neutraliser les radicaux libres en donnant un électron ou un atome d'hydrogène. Leurs structures leur confèrent une activité antioxydante aussi importante. Les groupes hydroxyle des polyphénols sont bien des donneurs d'atomes d'hydrogènes ; ils peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactives de l'azote (**Nijveldtet al., 2001**).

Les flavonoïdes sont de puissants antioxydants vis-à-vis des radicaux libres dus à leur propriété de donation d'atomes d'hydrogène disponibles dans les substituants hydroxyles de leurs groupes phénoliques (**Sandharetal., 2011**).

Les coumarines sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Les conditions structurales requises pour l'activité antioxydante des coumarines sont similaires à celles signalées pour les flavonoïdes (**Mogod, 2005**).

Enfin, les tannins sont doués d'une grande capacité antioxydante due à leur noyau phénol (**Peronny, 2005**). ils ont la particularité d'inhiber la peroxydation des lipides, en agissant comme donneur de proton et accepteur de radicaux libres, stoppant ainsi le mécanisme d'auto oxydation (**Perret, 2001**).

# *MATÉRIEL & MÉTHODES*

## Objectif

L'objectif de ce travail est de comparer l'effet de la variation saisonnière (hiver-printemps) sur le potentiel antibactérien et antioxydant de différents extraits de l'algue verte *Caulerpa racemosa* du littoral mostaganémois.

### 1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé au cours de cette étude est une algue verte: *Caulerpa racemosa*. La récolte de cette algue a été effectuée au niveau de la côte rocheuse située sur le littoral de la wilaya de Mostaganem précisément dans les plages de Salamandre, Sablette et Stidia. La récolte a eu lieu pendant le mois de décembre 2016-février 2017 pour la saison de l'hiver, puis de mars jusqu'à mai 2017 pour la saison de printemps.



**Figure 03** : thalle frais de *Caulerpa racemosa*. **Figure 04** : thalle sec de *Caulerpa racemosa*

### 2. Zone d'échantillonnage

Les paramètres géographiques de nos stations d'étude sont représentés dans le (tableau 1) et figure 5.

**Tableau 1** Situation géographique des différentes stations d'étude (**Google Earth, 2017**).

Stations	Latitude N	Longitude E	Altitude (m)
Plage de Salamandre	35°55'41.70"	0°03'16.32"	1.35
Plage de Sablette	35°53'39.46"	0°02'47.62"	1.35
Plage de Stidia	35°50'29.52"	0°00' 01.18"	1.50



**Figure 05** : Localisation géographique de *Caulerpa racemosa* de notre zone d'étude (**Google Earth, 2017**).

### **3. Identification botanique**

L'espèce *Caulerpa racemosa* a été identifiée par Mr Belbachir Nourredine, enseignant-chercheur au niveau du département des sciences de la mer de l'aquaculture de l'Université de Mostaganem

### **4. Récolte du matériel et préparation des échantillons**

Les échantillons de l'algue ont été récoltés mensuellement manuellement au niveau des plages de Salamandre, Stidia et Sablette. Ils ont été lavés avec de l'eau de mer pour débarrasser tous les débris adhérents à leurs thalles, puis placés dans des sacs en plastique fermés hermétiquement contenant l'eau de mer. Au laboratoire, ces échantillons sont à

nouveau rincés avec de l'eau de robinet puis avec de l'eau distillée afin d'éliminer tout corps étranger qui pourrait influencer l'évaluation des activités biologiques.

Les algues sont ensuite mises à l'obscurité et à la température ambiante jusqu'à déshydratation complète. Après le séchage, les échantillons ont été broyés et la poudre obtenue a été conservée dans des sacs en papier jusqu'à leur utilisation ultérieure.

## **5. Préparation des extraits bruts :**

L'extraction a été réalisée selon la méthode Soxhlet, une méthode classique pour l'extraction solide liquide. L'extraction a été effectuée durant 8 heures avec des solvants différents (Acétone, chloroforme, hexane et méthanol) à raison de 1/10. Les extrais obtenus ont été filtrés sur papier Whatman n°1 et le filtrat obtenu a été évaporé à sec à 40 °C sous Pression réduite avec un rotavapeur de type BUCHI R-200. Les extraits bruts obtenus ont été stockés dans des flacons hermétiques bruns à 4°C.

## **6. Détermination du rendement des extraits secs**

La détermination du rendement de l'extrait sec est réalisée en appliquant la formule suivante (Afnor, 1986) :

$$R(\%) = (P2-P1/PE) \times 100$$

**P1:** poids du ballon avant évaporation

**P2:** poids du ballon après évaporation

**PE:** poids de la matière sèche algale

## **7. Etude de l'activité antibactérienne**

### **7.1. Préparation des extraits :**

Différentes concentrations d'extraits bruts ont été préparées dans le DMSO à raison de 100 mg/ml, 200mg/ml et 500mg/ml.

### **7.2. Préparation des disques :**

Des disque de 6 mm de diamètre ont été découpés sur du papier de Whatman n°2, puis ont été mis dans un tube à essai pour subir une stérilisation.

### 7.3. Les souches testées

Six souches bactériennes ont été choisies pour leur haute pathogénicité et leur multi-résistance aux antibiotiques.

Ces souches proviennent de la collection de culture de la collection ATCC (American Type Culture Collection) (**Tableau 02**).

**Tableau 02** : souches utilisées dans le test antibactérien

Microorganismes	Gram	Code
<i>Bacillus cereus</i>	Positif	ATCC 10876
<i>Enterococcus faecalis</i>		ATCC 29212
<i>staphylococcus aureus</i>		ATCC 25923
<i>Echerichia coli</i>	Négatif	ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		ATCC 327853
<i>Proteus mirabilis</i>		ATCC 35659

### 7.4. Confirmation de la pureté des souches :

#### 7.4.1. Coloration de Gram

Après préparation et fixation du frottis nous avons procédé comme suit :

Dans la première étape de la coloration de Gram, le frottis est coloré avec le cristal violet pendant une minute un colorant basique pour obtenir une coloration primaire. Ensuite la coloration est traitée avec une solution d'iode pendant une minute qui agit comme un mordant c'est-à-dire qu'elle augmente les interactions entre la cellule et le colorant pour que la cellule soit plus fortement contrastée. Le frottis est alors décoloré par lavage de l'éthanol pendant 10 secondes. Cette étape engendre l'aspect différentiel de la coloration de Gram. Enfin le frottis est coloré à l'aide de la Safranine qui colore les bactéries Gram- en rose et laisse les bactéries Gram+ en violet. L'observation microscopique à objective  $\times 100$  réalisée avec une goutte d'huile à immersion.

#### 7.4.2. Test de catalase

La catalase est une enzyme respiratoire qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) : Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Si elles possèdent la catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles.

### **7.5. Conservation des souches**

La conservation a été réalisée par ensemencement des souches isolées sur gélose nutritive inclinée. Les cultures pures ont été conservées à 4°C.

### **7.6. Préparation de l'inoculum :**

Les souches, conservées sur gélose nutritive inclinée à 4°C, sont revivifiées dans du bouillon nutritif à 37° C pendant 24 h, puis ensemencées sur boîtes contenant de la gélose nutritive pour vérifier leur pureté. Après 24h d'incubation à 37°C, les souches bactériennes sont ensemencées sur bouillon nutritif puis remises en incubation à 37° pendant 18 h. La densité optique lue à 625 nm est justifiée à 0.08 à 0.10, soit environ 10<sup>8</sup>UFC/ml (**Pessini et al., 2003**).

### **7.7. Méthode de diffusion sur disques (aromatogramme)**

L'aromatogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode de disques est une technique qualitative permettant de déterminer la sensibilité des microorganismes vis-à-vis d'une substance réputée antimicrobienne. Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des extraits d'algues à l'intérieur d'une boîte de Pétri, dans un milieu nutritif solide Mueller Hinton.

Dans des boîtes de Pétri stériles préalablement coulées avec le milieu Müller Hinton, les souches bactériennes sont écouvillonnées sur la surface des géloses à l'aide d'un écouvillon trempés dans le bouillon contenant une charge de 10<sup>8</sup> UFC/ml. Par la suite, des disques Wathman de 6 mm de diamètre, imprégnés de 10 µl de différents extraits acétonique, chloroformique, hexanique et méthanolique aux différentes concentrations 100 mg/ml, 200 mg/ml et 500 mg/ml sont déposés sur la surface de gélose à l'aide d'une pince stérile. Des disques Whatman imprégné de DMSO ont été utilisés comme témoin négatif.

Les boîtes sont incubées après 20 mn afin de permettre aux extrais de diffuser, à 37 °C pendant 24 h. La lecture des résultats se fait par la mesure de diamètre en mm de la zone d'inhibition.

### **7.8. Antibiogramme**

Le but de réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques. Dans cette étude, le but de leur utilisation et de comparer l'effet antibactérien des extrait de l'algue étudiée à celui des antibiotique testés.

La méthode utilisée pour réaliser l'antibiogramme est la technique de standardisation de l'antibiogramme selon la méthode décrite par (**Bauer et al., 1966**)

Dans des boîtes de Pétri préalablement coulée avec le milieu Müller Hinton sont ensemencées avec les six souches bactériennes en présence de disques d'antibiotiques: Céfazoline (30 µg), Gentamicine (10 µg), Pénicilline (10 µg) et Chloramphénicol (10 µg).

**Tableau 03** : Liste des antibiotiques testés sur les bactéries

<b>Antibiotique</b>	<b>Code</b>	<b>Charge</b>
Céfazoline	CZ	30 µg
Gentamicine	CN	10 µg
Pénicilline	P	10 µg
Chloramphénicol	C	30 µg

## **8. Screening phytochimique**

Le screening phytochimique représente l'ensemble des techniques qualitatives permettant la détermination de différentes familles de métabolites secondaires contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physicochimiques qui sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés (**Bruneton, 2009**).

Le screening phytochimique a été réalisé selon les techniques standards décrites par (**Terease et Evans, 1989 ; Harborne, 1998 ; Bruneton, 1999**).

Les résultats ont été évalués comme suit : - : Négative; + : Faiblement positif; ++ : Moyennement Positif; +++ : fortement positif

### **8.1. Les composés polyphénoliques**

#### **8.1.1. Test des flavonoïdes**

1 ml de chaque extrait à tester a été introduit dans un tube à essai auquel est ajouté 1ml d'acide chlorhydrique (HCl) et quelques tournures de magnésium. L'apparition d'une coloration rouge, orange ou jaune révèle la présence des flavonoïdes.

#### **8.1.2. Test des tanins**

Dans un tube à essai, à 1 ml de chaque extrait à tester sont ajoutées quelques gouttes de solution de gélatine à 1%. L'apparition de précipité blanc indique la présence des tanins.

#### **8.1.3. Test des coumarines**

2 ml de chaque extrait est introduite dans un tube auxquelles est ajouté 3ml de NaOH à 10%. La présence des coumarines est indiquée par une coloration jaune.

#### **8.1.4. Test des quinones**

Un millilitre de chaque extrait à analyser est ajouté à 0,5 ml d'une solution aqueuse de NaOH à 10 %. La présence des quinones est indiquée par une coloration jaune, rouge ou violette.

#### **8.1.5. Test des Anthraquinones**

A 5ml de chaque extrait à analyser, sont ajoutées 2 ml de NH<sub>4</sub>OH à 10 %. La présence des Anthraquinones est indiquée par une coloration violette.

#### **8.2. Test des Alcaloïdes**

Les tests sont réalisés par des réactions de précipitation avec les réactifs de Mayer et Wagner. 5ml de chaque extrait est évaporé à sec, 2ml d'HCL (2%) sont ensuite ajoutés. Le mélange est chauffé dans un bain marie puis filtré. Le filtrat est divisé dans deux tubes à essai où dans l'un sont ajoutés quelques gouttes de réactifs de Mayer L'apparition de précipité blanc – jaunâtre indique la présence d'alcaloïdes dans le deuxième quelques gouttes de réactif Wagner. L'apparition de précipité brun indique la présence d'alcaloïdes.

#### **8.3. Test des saponines (Test de mousse)**

Dans un tube à essai, sont introduit 5ml d'extrait à tester et 5ml d'eau distillée chaude. Le tube est agité pendant 15 secondes puis laissé au repos pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante indique la présence des saponines.

#### **8.3.1. Test des Stéroïls et triterpènes**

Un ml de chaque extrait est évaporé à sec. Ensuite, le résidu obtenu est dissout dans 1ml d'anhydride acétique auquel sont ajoutées ensuite quelques gouttes d'acide sulfurique concentré (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). En cas de réaction positive il se forme un anneau rouge -brunâtre ou violet

#### **8.4. Test des composés réducteurs :**

Introduire 1ml d'extrait dans un tube à essai, y ajouter 2ml de liqueur de Fehling (1ml réactif A et 1ml réactif B), l'ensemble est incubé pendant 5 min dans un bain marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs.

## **8.5. Test des acides aminés (Test à la ninhydrine)**

### **8.5.1. Principe :**

La ninhydrine est un composé aromatique utilisé comme réactif pour les acides aminés. Ninhydrine réagissent avec les acides aminés, en produisant une solution colorée. Ce protocole est utilisé pour détecter la présence d'acides aminés dans certaines substances à l'aide d'une solution d'alcool.

### **8.5.2. Mode opératoire :**

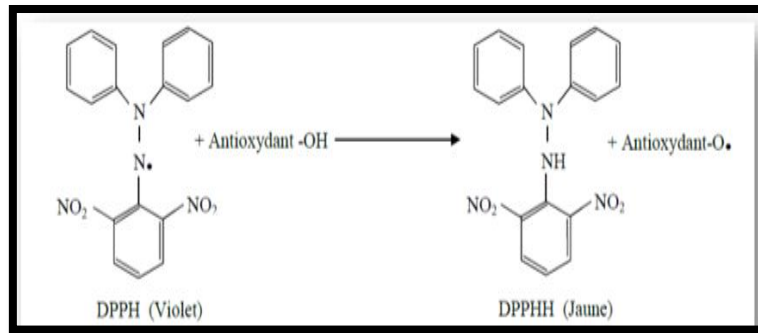
Sur un papier filtre, déposez une goutte de chaque extrait puis l'incuber à 85°C pendant 5 min jusqu'au séchage total de l'extrait puis une goutte de réactif à la ninhydrine (fraichement préparé) est déposée et le papier filtre est chauffé à l'étuve à 110°C pendant 10 min. L'apparition d'une teinte bleue ou violette indique un test positif.

## **9. Evaluation de l'activité antioxydante**

### **9.1. Principe de la méthode DPPH**

Le DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre de couleur violacée utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères. Reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH réduit change de couleur en virant au jaune (figure 06).

Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants est tributaire. Dans le cas des composés phénoliques, le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH alors transformé en une molécule stable DPPH-H. L'absorbance mesurée à 515 nm sert à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH qui est proportionnel au pouvoir anti-radicalaire de l'échantillon (**Brand Williams *et al.*, 1995**).



**Figure 06** : Mécanisme d'action d'un antioxydant

## 9.2. Mode opératoire

La solution du DPPH est fraîchement préparée par solubilisation de 0,005 g de DPPH dans 200 ml de méthanol absolu. 25µl de l'extrait à différentes concentrations sont ajoutés à 975 µl de DPPH. Des dilutions de l'antioxydant de référence l'acide ascorbique sont également préparées dans les mêmes conditions pour servir de contrôle positif.

En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 25 µl du méthanol avec 975 µl d'une solution méthanolique de DPPH. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min jusqu'à décoloration. Le dosage est réalisé par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 515 nm.

Le pourcentage de l'activité anti radicalaire est estimé selon l'équation ci-dessous :

$$\text{D P P H \%} = \left( \text{DO}_{\text{t contrôle}} - \text{DO}_{\text{extrait}} / \text{DO}_{\text{t contrôle}} \right) \times 100$$

**DPPH (%)** : Pourcentage de réduction du DPPH.

**DO témoin**: Densité optique du tube contrôle négatif.

**DO extrait** : Densité optique de l'échantillon.

## 9.3. Détermination IC50

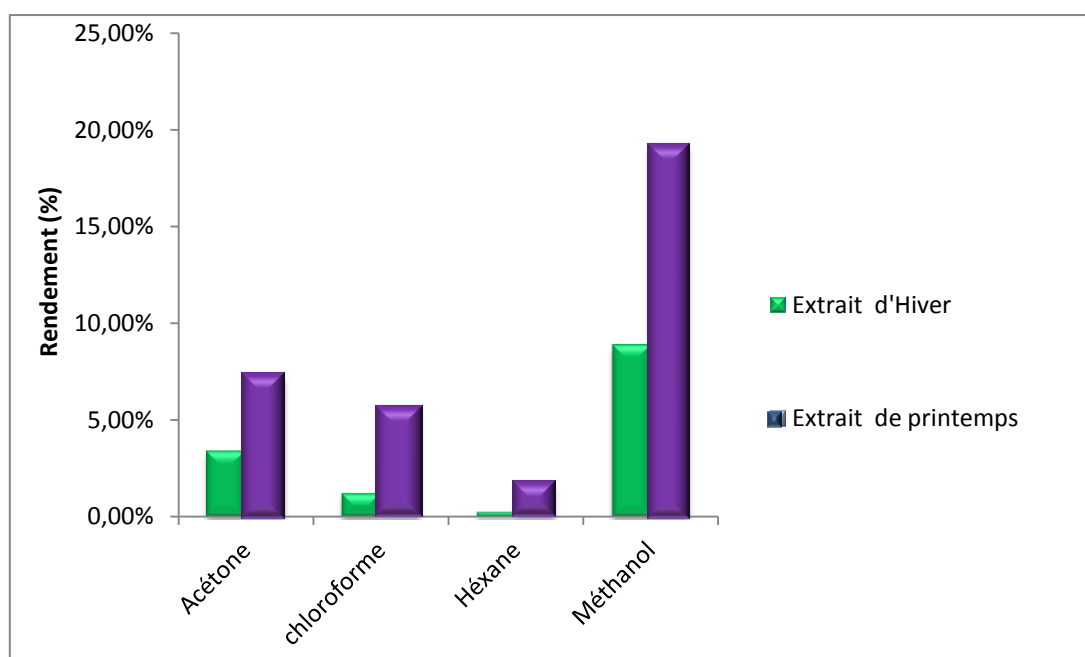
L'IC50 (concentration inhibitrice 50) est la concentration qui assure la réduction de 50% du DPPH. Les IC50 sont calculés graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés (**Samarth et al. , 2008**).

L'étude de la variation de l'activité anti-radicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50 % d'inhibition(CI50). Une valeur de CI50 faible correspond à une grande efficacité de l'extrait.

# *RÉSULTATS*

## 1. Rendement d'extraction

La préparation des extraits bruts de thalle complète de *Caulerpa racemosa* a été effectuée par des différents solvants polaires et apolaires. Cette extraction a permis d'obtenir quatre extraits bruts : l'extrait acétonique, l'extrait chloroformique, l'extrait hexanique et l'extrait méthanolique. Le rendement de ces extraits a été déterminé par rapport au matériel végétal sec. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 07. Les extraits obtenus sont de couleur et d'aspect différents (Tableau 04).



**Figure 07** : Rendement de différents extraits de *Caulerpa racemosa*.

En comparant les rendements des différents extraits bruts durant la saison d'hiver et printemps, nous remarquons que le meilleur rendement est obtenu pendant la saison de printemps avec le meilleur rendement pour l'extrait méthanolique (19,22 %) suivi par l'extrait de l'acétone (7,23%), l'extrait de chloroforme (5,64%) et celui de l'hexane (1,69%). Le rendement le plus faible est celui obtenu par l'extraction à l'hexane « hiver » (0,27%), d'ailleurs, les rendements de l'hiver étaient inférieurs à ceux du printemps.

**Tableau 04** : Aspect, couleur des différents extraits de *Caulepa racemosa*.

Extrait	Aspect	Couleur
Extrait acétonique	pâteux	Vert claire
Extrait chloroformique	Pâteux	Vert foncé
Extrait hexanique	Visqueux	Vert foncé
Extrait méthanolique	Pâteux	Vert foncé

## 2. Etude du pouvoir antibactérien

### 2.1. Confirmation des souches

La coloration de Gram et le test de catalase (tableau 05) ont permis la confirmation des souches utilisées.

**Tableau 05** : tableau représentant la coloration de Gram et test de catalase.

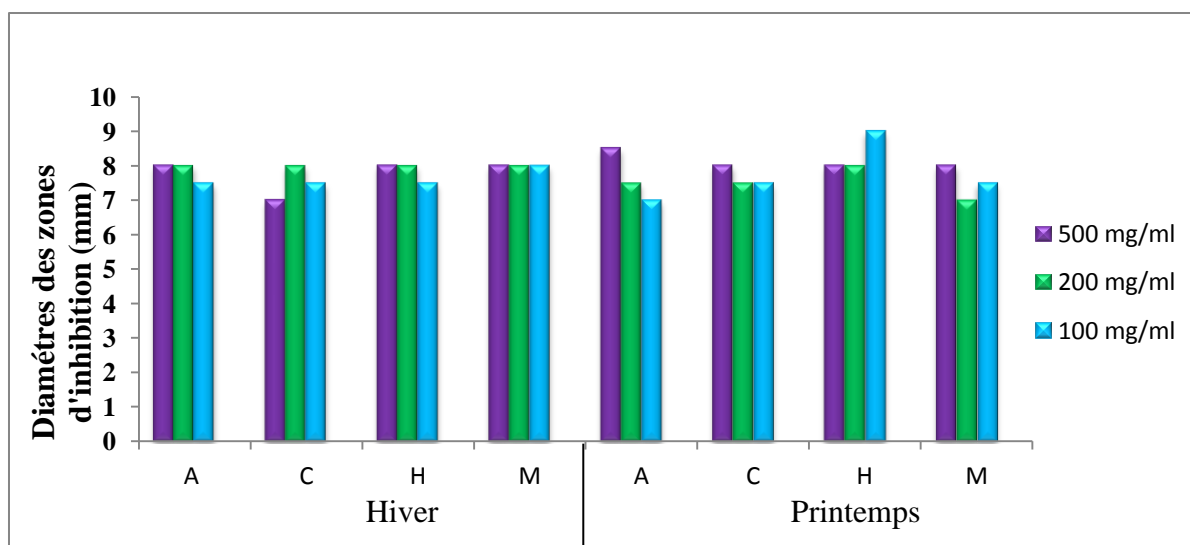
Souches bactériennes	Coloration de Gram	Catalase
<i>Bacillus cereus</i>	+	+
<i>Echerichia coli</i>	-	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+
<i>Proteus mirabilis</i>	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+

Résultat positif : +. Résultat négatif :-

### 2.2. Pouvoir antibactérien des extraits

#### 2.2.1. Effet inhibiteur des extraits sur *Bacillus cereus* ATCC 6538

La variation saisonnière de l'activité antibactérienne des extraits sur *Bacillus cereus* est représentée dans la figure 08.



**Figure 08** : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des concentrations des différents extraits de *Caulerpa racemosa* sur *Bacillus cereus*.

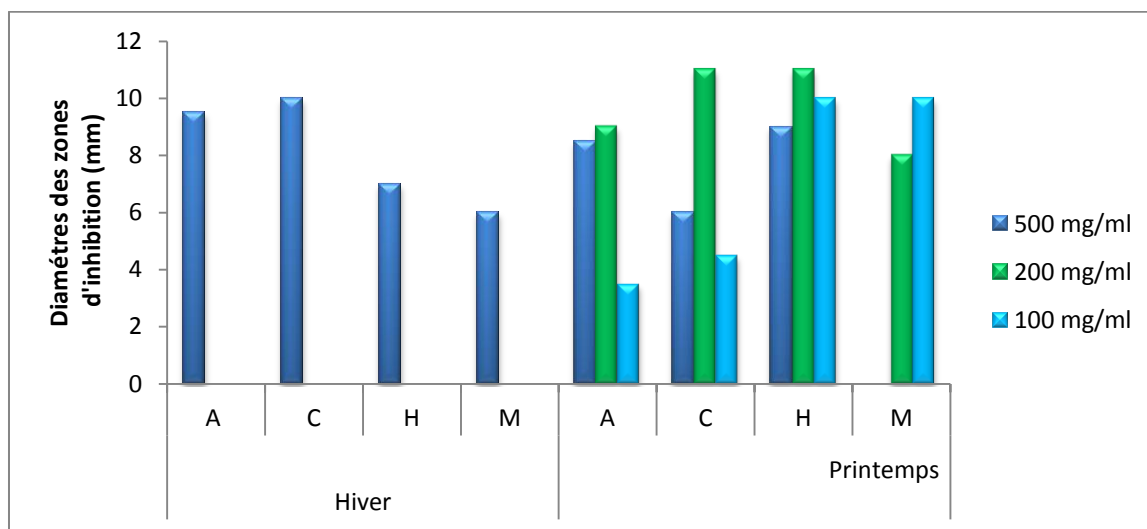
A : extrait acétonique ; C : extrait chloroformique ; H : extrait hénanique ; M : extrait méthanolique.

D'après les résultats obtenus, les différents extraits avec les différentes concentrations (100 mg/ml, 200 mg/ml et 500 mg/ml) montrent un effet inhibiteur sur *Bacillus cereus* et ce pour les deux saisons. Les quatre extraits ont montré une activité antibactérienne moyenne et légèrement différente selon la concentration ou la saison de récolte. En effet :

- Nous notons que l'extrait acétonique, hénanique et méthanolique à la concentration 500 mg/ml de la saison hivernale démontre la zone d'inhibition la plus importante avec un diamètre de 8 mm, alors que pour l'extrait chloroformique, on relève un diamètre de 7mm. Les extraits du printemps ont aussi révélé un pouvoir plus important pour l'extrait acétonique avec une zone d'inhibition de 8,5 mm de diamètre et zone de 8 mm de diamètre pour tous les autres extraits.
- Pour la concentrations 200 mg/ml, Nous avons remarqué que les quatre extraits d'hiver exerçant une inhibition avec un diamètre de 8mm Une variation insignifiante a été constaté entre ces résultats et ce des extraits du printemps qui varient entre 7,5mm, 7,5mm, 8mm et 7mm pour l'extrait acétonique, chloroformique, Hénanique et méthanolique, respectivement.
- A la concentration 100 mg/ml, l'extrait hénanique du printemps marque la meilleure zone d'inhibition avec un diamètre moyen de 9 mm suivis par Des valeurs inférieures ont été enregistrées avec les extraits acétonique (7 mm), méthanolique (7,5mm) et

chloroformique (7,5mm) de la même saison. nous avons remarqué une zone d'inhibition de 7,5 mm pour les extraits acétonique, chloroformique et hénanique de la *Caulerpa racemosa* récoltée durant l'hiver et une zone de 8mm pour l'extrait méthanolique de la même saison. par les quatre extraits d'hiver exerçant une inhibition avec un diamètre de 8mm.

**2.2.2. Effet inhibiteur des extraits sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 327853**



**Figure 09** : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des concentrations des différents extraits sur *Pseudomonas aeruginosa*.

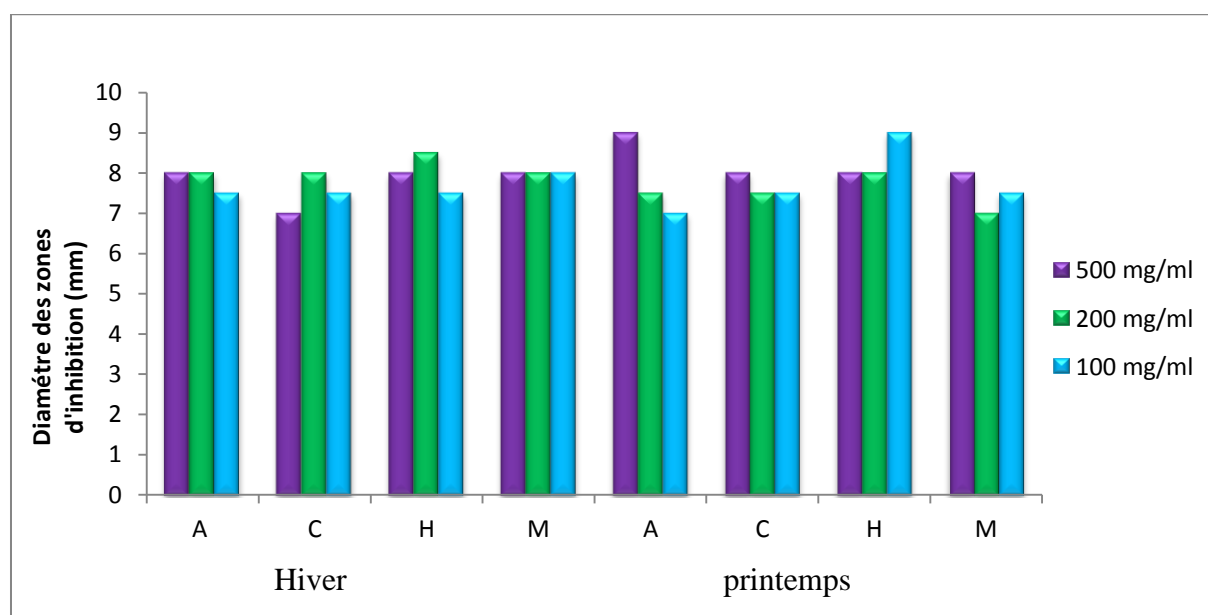
A : extrait acétonique ; C : extrait chloroformique ; H : extrait hénanique ; M : extrait méthanolique. .

Une variation des diamètres des zones d'inhibition a été constatée pour les quatre extraits en fonction de la variation saisonnière et des différentes concentrations (figure 09).

Une bonne activité antibactérienne a été enregistrée pour les extraits de printemps à la concentrations 200 mg/ml avec des zones d'inhibition de 11 mm pour les deux extraits chloroformique et hénanique .

Nous observons que les zones d'inhibition égalent à 10 mm pour l'extrait méthanolique et hénanique à 100 mg/ml pour la saison de printemps et 10 mm à 500 mg/ml, pour la saison d'hiver, respectivement. Tandis les quatres extraits de concentration 200 mg/ml et 100 mg/ml n'exercent aucun effet inhibiteur sur *P.aeruginosa*.

### 2.2.3. Effet inhibiteur des extraits sur *Staphylococcus aureus* ATCC 6538



**Figure 10** : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des concentrations des extraits testés sur *Staphylococcus aureus*.

A : extrait acétonique ; C : extrait chloroformique ; H : extrait héxanique ; M : extrait méthanolique. .

D'après les résultats obtenus, les différents extraits des deux saisons montrent un effet inhibiteur sur *Staphylococcus aureus*. Pour l'extrait d'acétone et d'hexane de la saison de printemps aux concentrations 500mg/ml et 100 mg/ml présentent une activité inhibitrice maximale avec une zone d'inhibition de 9 mm, suivis par l'extrait d'hexane de saison d'hiver à concentration 200mg/ml avec des zone d'inhibition de 8,5 mm.

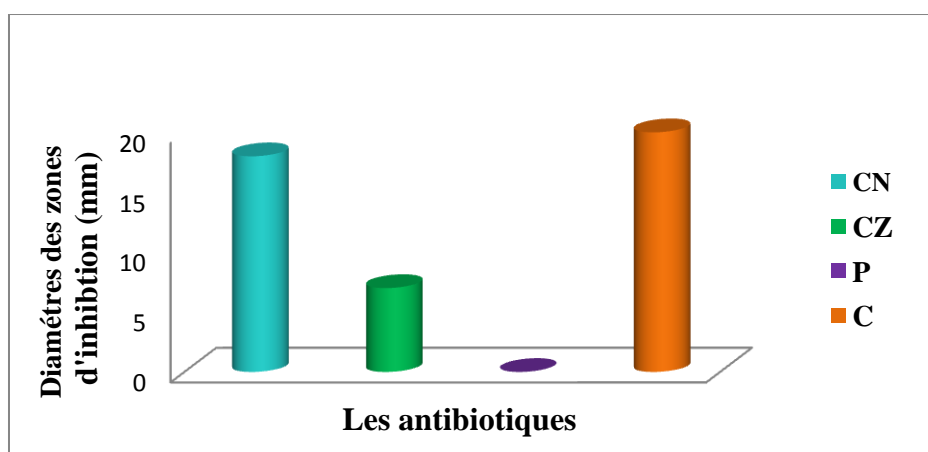
### 2.2.4. Effet des extraits sur *Escherchia coli*, *Enterococcus faecalis* et *Proteus mirabilis*

Les trois bactéries *Escherchia coli*, *Enterococcus faecalis* et *Proteus mirabilis* démontre une résistante vis à vis des différents extraits d'hiver ou de printemps et ce quel que soit la concentration testée.

## 2.3. Résultats de l'antibiogramme

Les diamètres des spectres d'action des antibiotiques observés sur les six bactéries ont été mesurés et ensuite représentés dans les histogrammes qui suivent:

### 2.3.1. *Bacillus cereus* ATCC 10876

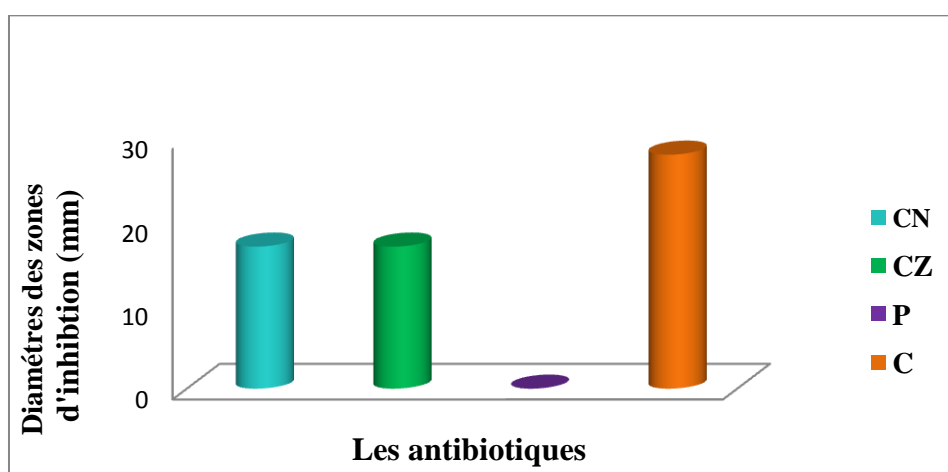


**Figure 11** : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *Bacillus cereus*

CN : Gentamicine CZ : Céfazoline ; P : Pénicilline ; C : Chloramphénicol

D'après La figure 11, *Bacillus cereus* montre une sensibilité très élevée aux deux antibiotiques Gentamicine et Chloramphénicol avec des zones d'inhibition de 18 et 20 mm, respectivement ; tandis que cette souche est résistante à la Pénicilline.

### 2.3.2. *Escherichia coli* ATCC 25922



**Figure 12** : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *Escherichia coli*

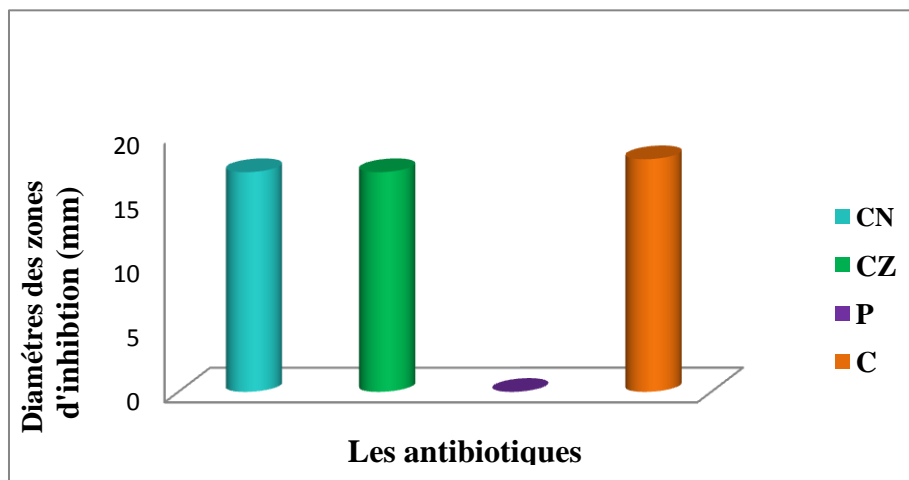
CN : Gentamicine ; CZ : Céfazoline ; P : Pénicilline ; C : Chloramphénicol

La figure montre une grande sensibilité d'*Escherichia coli* envers les antibiotiques et Gentamicine, Cephazoline et chloramphénicol avec une zone d'inhibition très élevée pour le chloramphénicol (28 mm) suivi par les deux autres (17 mm). Cette souche est également résistante envers la pénicilline

### 2.3.3. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

*Enterococcus faecalis* montre une résistance pour tous les antibiotiques testés.

### 2.3.4. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 327853

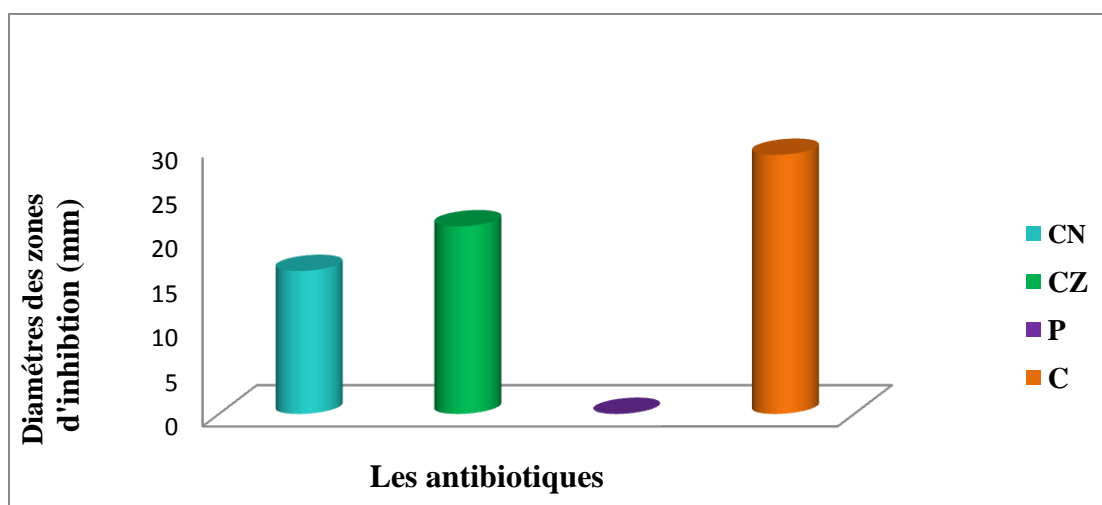


**Figure 13 :** Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *Pseudomonas aeruginosa*

CN : Gentamicine ; CZ : Céfazoline; P : Pénicilline ; C : Chloramphénicol

D'après les résultats de l'antibiogramme présentés dans la figure 13, cette souche à Gram négatif est très sensible à tous les antibiotiques à l'exception de la pénicilline. Les zones d'inhibition sont de 17,17 et de 28 mm respectivement pour Gentamicine, céfazoline, et chloramphénicol.

### 2.3.5. *Proteus mirabilis* ATCC 35659

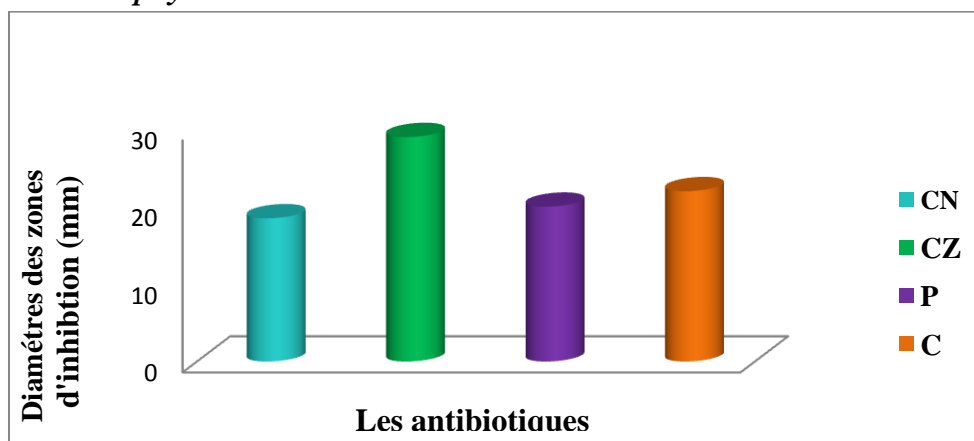


**Figure 14 :** Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *Proteus mirabilis*

CN : Gentamicine ; CZ : Céfazoline ; P : Pénicilline ; C : Chloramphénicol

Cette souche à Gram négatif est sensible à tous les antibiotiques à l'exception de la pénicilline avec des zones d'inhibition de 16 mm 21mm et 29 mm, respectivement pour Gentamicine, céfazoline et chloramphénicol.

### 2.3.6. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



**Figure 15 :** Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur *Staphylococcus aureus*.

CN : Gentamicine ; CZ : Céfazoline ; P : Pénicilline ; C : Chloramphénicol

D'après la figure ci-dessus, *Staphylococcus aureus* montre une sensibilité très élevée vis-à-vis des antibiotiques testés Gentamicine, Céfazoline Pénicilline et Chloramphénicol avec des zones d'inhibition de 18,5 mm, 29 mm, 20 mm et 22 mm, respectivement.

### 3. Screening phytochimique

Les résultats des tests phytochimiques obtenus pour les extraits acétoniques, chloroformique, hexanoïque et méthanolique sont représentés dans le Tableau 06.

**Tableau 06:** Résultat du screening phytochimique sur les différents extraits de *Caulerpa rasemosa*.

Extraits		Extraits d'hiver				Extrait de printemps			
		Acét	Chlorof	Hexane	MétOH	Acét	Chlorof	Hexane	MétOH
	<b>Polyphénols totaux</b>	+++	+++	++	++	++	++	+	+
Composés phénoliques	<b>Flavonoïdes</b>	+	+	+	++	+	+	+	+
	<b>Tanins</b>	-	+	+	-	-	++	++	-
	<b>Coumarines</b>	-	-	-	-	-	+	+	-
	<b>Quinones</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>Anthraquinones</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
Composés azotés	<b>Alcaloïdes</b>	-	-	-	-	-	+	+	+
Stéroïdes et Terpénoides	<b>Stéroïdes</b>	+	+	-	-	-	+	-	-
	<b>Saponines</b>	-	+	-	-	-	++	+	-
			<b>IM : 1,5cm</b>				<b>IM : 2,9cm</b>	<b>IM : 0,2cm</b>	
	<b>Composées réducteurs</b>	-	++	-	-	-	++	-	-
	<b>Les acides aminés</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

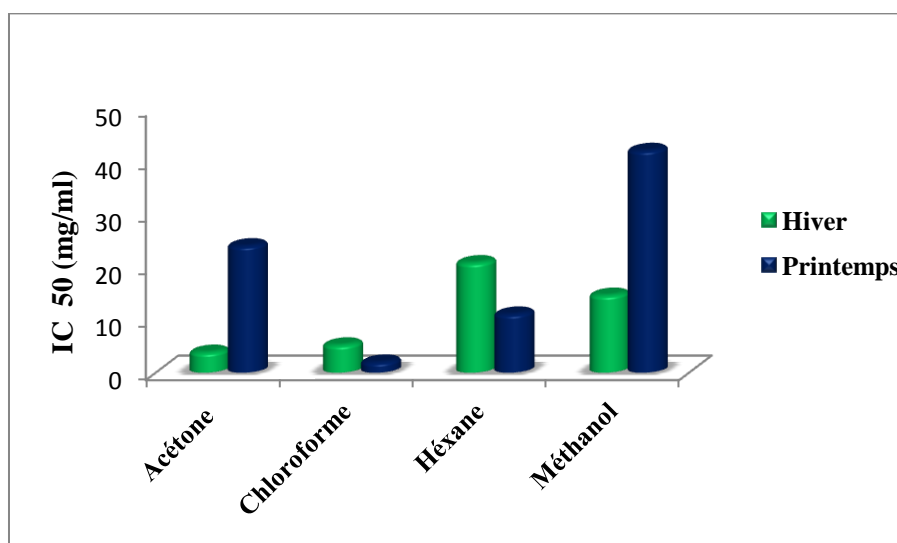
- : Négative; + : Faiblement positif ; ++ : Moyennement Positif; +++ : fortement positif ;  
IM : indice de mousse

Selon les résultats mentionnés dans le tableau 6, on constate la richesse de différents extraits en polyphénols totaux et flavonoïdes, pour les tanins sont présents dans les deux extraits chloroformique et hexanique par une forte présence dans l'extrait du printemps pour les coumarines sont uniquement présents dans l'extrait chloroformique, la présence des

alcaloïdes dans les deux extraits chloroformique et méthanolique les quinones et les anthraquinones révèlent un test négatif dans l'ensemble des extraits,, les stérols sont présents dans l'extrait acétonique En revanche, les saponines sont présentes dans les deux extraits chloroformique et hexanique mais ils sont fortement présents dans l'extrait chloroformique notamment durant la saison printanière. Pour les composés réducteurs, ils sont fortement présents dans l'extrait chloroformique des deux saisons alors qu'ils sont absents dans les autres extraits. Concernant les acides aminés, le test s'est révélé fortement positif pour les quatre extraits des deux saisons.

#### **4. Activités antiradicalaire (DPPH)**

La concentration de l'échantillon nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH, a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition calculés en fonction de différentes concentrations d'extraits préparés. Les résultats sont représentés dans la figure ci-dessous :



**Figure 16 :** Les IC<sub>50</sub> des différents extraits de *Caulerpa racemosa*.

À partir de cette figure, nous constatons que la meilleure capacité de piégeage du radical libre DPPH est celui de l'extrait de chloroforme qui a donné un IC<sub>50</sub> de 5,22 mg/ml et 1,98 mg/ml pour la récolte d'hiver et du printemps, respectivement. Il s'ensuit l'extrait acétonique d'hiver (3,84 mg/ml) et l'extrait hexanique de printemps (11,07 mg/ml) et l'extrait méthanolique avec un IC<sub>50</sub> de 14,64 mg/ml durant la saison hivernale. Par contre, l'extrait méthanolique de la saison printanière possède un pouvoir de piégeage du DPPH le plus faible.

# *DISCUSSION*

Nous nous sommes intéressées à comparer le potentiel antibactérien de chaque extrait et pour chaque saison (hiver-printemps) sur des souches pathogènes résistantes.

La comparaison de l'effet de différents solvants à polarité différente sur l'extraction de métabolites secondaires à partir de l'algue *Caulerpa racemosa*, et ce à travers un screening phytochimique et une évaluation de l'activité antiradicalaire de chaque extrait pour chaque saison a démontré un effet non négligeable sur la nature du solvant/saison non seulement la variabilité de rendement mais également sur la nature des métabolites extraits.

Les rendements étaient fonction de la polarité croissante des solvants utilisés, où l'on a enregistré les meilleurs rendements respectivement pour le méthanol, l'acétone, le chloroforme et l'hexane. Pour tous les extraits, le meilleur rendement a été enregistré pour la saison de printemps avec un plus haut rendement pour l'extrait méthanolique (19.22%) par contre un faible rendement a été remarquer par l'extrait hénanique (1.69%) à la polarité la plus faible. Ceci révèle une influence significative du pouvoir d'extraction du solvant sur le rendement.

La nature du solvant a également généré l'extraction de différents métabolites et ce du point qualitatif et quantitatif. Les tests phytochimiques réalisés pour les différents extraits, ont permis de mettre en évidence les polyphenols totaux dont les flavonoïdes dans l'ensemble des extraits où les tanins étaient faible dans celui de l'hiver. Selon les résultats obtenus, il semble que durant l'hiver, *Caulerpa racemosa* produit plus de polyphenols totaux que durant le printemps. Ceci pourrait s'expliquer par le stress dû à la baisse de température durant cette saison.

Les saponosides étaient présents uniquement dans les extraits apolaires chloroforme et hexane. Les sucres réducteurs, révélés par le test de la liqueur de Fehling, n'a été positif que dans les deux extraits chloroformiques. Une absence totale des quinones, et anthraquinones a été notée dans tous les extraits. Les acides aminés étaient également retrouvés dans tous les extraits pour les deux saisons.

Qualitativement parlant, il semble que c'est le chloroforme qui extrait le plus de métabolites.

Cette divergence dans le contenu en métabolites a un impact sur l'activité antibactérienne des différents extraits des deux saisons sur les bactéries qui y sont sensibles. A cet effet, les bactéries ayant montré une sensibilité aux différents extraits étaient *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, par contre les souches *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* et *Proteus mirabilis* se sont révélées résistantes aux aussi bien à l'extrait acétonique, chloroformique, hénanique et méthanolique de *Caulerpa racemosa*.

D'après les résultats obtenus, l'extrait hénanique a montré une activité antibactérienne meilleure par rapport aux autres extraits. Cet extrait a exercé un meilleur effet inhibiteur sur toutes les bactéries sauf sur *Echerichia coli*, *Enterococcus faecalis* et *Proteus mirabilis* qui y ont résisté.

L'effet d'inhibition est très élevé sur *Pseudomonas aeruginosa* pour toutes les concentrations 500 mg/ml, 200 mg/ml et 100 mg/ml avec respectivement des zones d'inhibition de 9 mm, 11 mm et 10 mm pour la saison printanière et aucun effet inhibiteur pour les concentrations 200 mg/ml et 100 mg/ml des extraits hivernaux de l'hexane. L'extrait hénanique exhibe également un effet inhibiteur sur les deux bactéries Gram positif *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* avec de meilleurs résultats pour la saison printanière avec toutes les concentrations 500 mg/ml, 200 mg/ml et 100 mg/ml (respectivement : 8 mm, 8 mm et 9 mm) par rapport l'extrait hivernal pour lequel les zones d'inhibition variaient entre 7.5 et 8 mm.

Aussi bien l'extrait méthanolique qu'acétonique se sont révélés plus efficace sur la souche *Pseudomonas aeruginosa* par rapport aux souches *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*. L'effet inhibiteur de l'extrait chloroformique a un effet sur les souches *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* et avec un effet très élevé a la concentration 200 mg/ml d'une zone de 11 mm sur la souche *Pseudomonas aeruginosa* pendant la saison printanière.

L'interprétation des résultats de l'antibiogramme montre une grande sensibilité de toutes les souches testées vis à vis les antibiotiques excepté pour la pénicilline qui semble efficace uniquement sur *Staphylococcus aureus*. La souche *Enterococcus faecalis* s'est avérée résistante à tous les antibiotiques utilisés.

L'extrait hénanique aussi bien de l'hiver que du printemps, de l'algue *Caulerpa racemosa* présentent une forte activité vis-à-vis des souches bactériennes *Bacillus cereus*, *staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. *Bacillus cereus* qui est résistant à la pénicilline et moyennement sensible à la cephazoline avec des zones d'inhibition de 7mm se voit inhibé par les extraits de *Caulerpa racemosa* dont les diamètres d'inhibition étaient supérieures à celui du céfazoline avec une zone d'inhibition de 9 mm à concentration minimale de 100 mg/ml.

L'inhibition des extraits *Caulerpa racemosa* reste considérablement plus faible comparée à celle des antibiotiques commerciaux utilisés. Toutefois, elle s'avère plus efficace par rapport à la pénicilline à laquelle *Bacillus cereus* et *P aeruginosa* étaient résistantes.

Les résultats montrent une activité vis-à-vis des Gram positifs que les Gram négatifs. D'après Nikaido (2003), ces résultats pourraient être dus à la composition de la membrane des

bactéries Gram négatifs. En effet, ces dernières possèdent une membrane qui présente une perméabilité sélective; la surface des lipopolysaccharides contient des charges négatives, qui empêchent la diffusion des molécules hydrophobes, et des porines qui bloquent le passage des molécules à haut poids moléculaire (**Garrett et Grisham., 2000**). *Pseudomonas aeruginosa* contient dans sa membrane des porines de faibles perméabilités, ce qui explique probablement sa sensibilité à nos extraits. Contrairement aux Gram négatif, les bactéries à Gram positif se sont montrées plus sensibles.

*Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* sont donc révélés les souches les plus sensibles vis-à-vis des extraits d'algues testés. La sensibilité des souches bactériennes a été mentionnée dans plusieurs travaux (**Rao et Parekh., 1981; (Caccamesse et al., 1981; Vidyathi et Sridhar., 1991; Febles et al.,1995 ; El Kouri et al., 2004)**). Tous ces travaux ont rapporté que les bactéries Gram positif sont plus sensibles que les bactéries Gram négatif. Cette confirmation est en accord avec nos résultats.

La souche *Enterococcus faecalis* montre une résistance vis-à-vis de tous les extraits et des antibiotiques testés, ce qui est alarmant.

L'activité antibactérienne s'explique par les propriétés antibactériennes que possèdent certains métabolites secondaires notamment ceux des algues marines. En effet, les macroalgues marines riches en substances à potentiel antimicrobien, inhibent la croissance de certaines bactéries et les macroalgues vertes (Chlorophyta) ont montré un pourcentage élevé d'espèces (73%) ayant une activité antimicrobienne (**Sukatkar et al., 2006**). Dans notre étude, les extraits de l'algue verte *Caulerpa racemosa* se sont révélés relativement efficaces contre certaines souches, avec les meilleurs résultats obtenus pour la saison de printemps. Dans l'étude de **Farid et al. (2009)**, ces auteurs montrent des fluctuations saisonnières de l'activité antimicrobienne chez les trois classes d'algues qu'ils ont étudiées. Selon ces mêmes auteurs, ceci est dû aux variations des facteurs environnementaux tels que la température, la concentration de l'oxygène dissous et la salinité. Les algues récoltées au cours du printemps sont les plus actives, cette saison doit correspondre à la période où ces facteurs interagissent entre eux donnant les meilleures conditions pour le développement et la croissance des algues (**Farid et al., 2009**).

La capacité des algues marines à produire des métabolites secondaires d'intérêt potentiel a été largement documentée (**Cabrita et al., 2010**). Les polyphénols y compris les flavonoïdes qui représentent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (**Bouakaz, 2006**) et qui possèdent généralement une activité antimicrobienne s'expliquant par la destruction des membranes microbiennes en augmentant la fluidité des

lipides membranaires (**Prasad et al., 2004**). Cependant, il faut comprendre que les extraits sont des mélanges des composés naturels, et leur activité antimicrobienne n'est pas seulement le résultat de différentes activités de composants individuels mais peuvent être le résultat de leurs interactions (**Kosanik et al., 2015**). A cet effet, ce sont les extraits hexanique et chloroformique ayant le plus de métabolites qui exhibent le meilleur pouvoir antibactérien

Il faut préciser que nos résultats sont en accords avec ceux publié par Azhagu *et al.* (**2015**) sur l'étude qualitative de l'extrait de *Caulerpa racemosa* qui a montré la présence d'un grand nombre des métabolites secondaire chez cette espèce.

Les résultats obtenus de notre étude montrent que l'extrait chloroformique est le plus riche en composés polyphénoliques dont les flavonoides, tanins, stéroïde dont les saponines suivie par l'extrait de l'hexane, qui confirme leurs activités antibactérienne vis-à-vis des bactéries pathogène testés. Cette richesse en métabolites se reflète également dans l'activité antiradicalaire qui s'avère plus élevée pour ces deux extraits

En effet, l'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits réalisée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH a été déterminée à partir des IC50. C'est la concentration en extrait nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH. L'IC50 et l'activité antioxydante de l'extrait testé sont inversement proportionnels (**Prakash et al., 2007**).

Nos résultats indiquent que l'extrait brut de chloroforme présente une activité importante de IC50 de 5,22 mg/ml et 1,98 mg/ml durant les saisons d'Hiver et printemps suivi par l'extrait acétonique de saison d'hiver par 3.84 mg/ml et une faible activité antioxydante est remarquée par les extraits hexanique, méthanolique durant les deux saisons et extraits acétonique durant la saison printanière. Cette variabilité de l'activité antioxydante chez *Caulerpa racemosa* est significativement influencée par la nature du solvant (**Bourgou et al., 2008**).

D'après les résultats du screening phytochimique qui révèlent la présence des métabolites secondaires en particulier les polyphénols qui sont connus par leur effet antioxydant en neutralisant les radicaux libres on peut déduire que l'algue verte *Caulerpa racemosa* a un effet antiradicalaire, qui est fort probable lié à sa richesse en polyphénols et en flavonoïdes. Cependant, ceci la richesse de l'extrait acétonique en ces composants le meilleur extrait ayant la meilleure activité antiradicalaire. Il s'agit donc de la synergie entre les substances polyphénoliques entre eux et avec d'autres métabolites qui donnent une meilleure activité antioxydante (**Vermerris et Nicholson, 2006**), ce qui est le cas pour l'extrait chloroformique.

Enfin, on assiste des différences en comparant nos résultats avec ceux d'Azhagu *et al.* (2015) qui a révélé la présence des flavonoïdes, tanins coumarines saponine et composé réducteur dans l'extrait de méthanol dans la même espèce étudiée *Caulerpa racemosa*. Cette variation des résultats due à la différence des méthodes utilisées pour déterminer la présence des métabolites secondaires entre qualitatif et quantitatif (dosage et screening), le choix de solvants, ainsi que l'utilisation de différentes méthodes d'extraction et le mois de récoltes des algues réduisent les possibilités de comparaison entre les études (Trabelsi *et al.*, 2010).

# CONCLUSION

## Conclusion

A la lumière de ce travail dont l'objectif était de comparer la variation saisonnière hiver/printemps sur la composition phytochimique et sur le potentiel antibactérien de différents extraits de l'algue verte invasive *Caulerpa racemosa*, il en ressort que le potentiel antibactérien dépend de la nature du solvant utilisé, de la saison et enfin de la souche testée.

En effet, Seule trois souches se sont révélées sensibles aux différents extraits : *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Ce sont les extraits de l'algue collectée durant le printemps qui ont démontré la meilleure activité antibactérienne. Toutefois, cette activité reste inférieure à celle exercée par les antibiotiques cephazoline, gentamicine et chloramphénicol, mais largement plus efficace comparée à l'effet de la pénicilline qui était absent.

L'effet de saison sur l'activité antibactérienne est le reflet de la diversité des métabolites dans la *Caulerpa* collectée durant le printemps, particulièrement dans les extraits chloroformique et hexanique qui d'ailleurs renferment le plus de métabolites ce qui leur confère un pouvoir antioxydants plus important par rapport aux autres extraits (méthanolique et acétonique).

Enfin, *Caulerpa racemosa* de la côte Mostaganémoise s'illustre comme étant une source potentielle de composés bioactifs d'intérêts non négligeable notamment en tant qu'antioxydant.

Toutes fois, un travail complémentaire s'impose en vue d'identifier les différentes molécules en particulier les composés phénoliques présents dans les extraits bruts secs et les flavonoïdes isolées des fractions et les purifier en utilisant diverses techniques chromatographiques notamment la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et des méthodes spectrales pour l'élucidation structurale.

Enfin, l'évaluation des différentes molécules isolées *in vivo* sur différents modèles biologiques est recommandée en vue de les utiliser à des fins thérapeutiques et de conservation des produits destinés à la consommation.

## *RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

*Références bibliographiques*

*A*

- **Agence nationale de sécurité sanitaire alimentation., 2011.** environnement, travail (page consulté le 15/04/2017) *Bacillus cereus*.  
<https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2011sa0116Fi.pdf>
- **Akowauh G.A., Zhari I., Norgyati I., Sadikun A. & Khamsah S.M., 2004.** The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food chemistry*. **87**: 559-566.
- **Akroume S., 2011.** Etude analytique et biologie des flavonoïdes naturels. *Thèse de doctorat en Physio-Toxicologie*, Université Mentouri-Constantine, Algérie, 125 p.
- **Allen M. B., and Dawson E. Y., 1960.** Production of antibacterial substances by benthic tropical marine algae. *J. Bactériol.* **79**: 459-460.
- **Antwerpen P.V., 2006.** Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système myclopéroxydase / Peroxyole d'hydrogène /Chlorure. *Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Science Pharmaceutiques*, Bruxelles.
- **Association française de normalisation., 1986.** Huiles essentielles. In: *recueil de normes françaises AFNOR*, 2ème Ed. Afnor, Paris. 57p.
- **Azhagu Raj R., Mala k., and Prakasam A., 2015.** PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF MARINE MACROALGA *Caulerpa racemosa* (J. AGARDH) (CHLOROPHYTA - CAULERPALES) FROM TIRUNELVELI DISTRICT, TAMILNADU, INDIA. **4(8)**: 3055-3067.

*B*

- **Babayi H., Kolo I. & Okogum J.I., 2004.** The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. *Biochemistri*. **16 (2)**: 102-5.
- **Bachir Bouiadjra B., Belbachir N., Benkada M.Y., Maarouf A. & Riadi H. (2010-a).** Sur la présence de l'algue marine *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J, Agardh

(*Caulerpales, Chlorophyta*) devant la côte Mostaganemoise (Ouest Algérie). *Acta Botanica Malacitana*. **35** : 1-7.

- **Bachir Bouiadjra B., Taleb M.Z., Benkada M.Y., Maarouf A., Youcef M. & Riadi H. (2010-b)**. First record of the invasive alga *Caulerpa racemosa* (*Caulerpales, Chlorophyta*) in the Gulf of Arzew (western Algeria). *Aquatic Invasions*, vol. **5**, suppl. 1 : 97-101.
- **Bahorun T., 1997**. Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research council Mauritiias* : 83- 94.
- **Berche P., 1988**. proteus-providencia. In: bactériologie : bactéries des infections humaines, flammarion, Paris : 77-88p.
- **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.
- **Bouakaz I., 2006**. Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. Mémoire de magister, Batna.
- **Bourgour S., Serairibeji R., Medini F., Ksouri R., 2008**. Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia* :
- **Boyd B., Ford C., Koepke Michael C., Gary K., Horn E., McAnalley S. et McAnalley B., 2003** : Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. *Glycoscience & Nutrition*, 4, 7.
- **Bruneton J., 1987**. Eléments de phytochimie et pharmacognosie. Tec & doc. éd. Lavoisier. Paris.
- **Bruneton J., 1999**. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3ème Ed. médicales internationales and Tec & Doc Lavoisier, Paris : 1120 p.
- **Bruneton J., 1999**. Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales, 5ème Ed. médicales internationales and Tec & Doc Lavoisier, Paris : 1504p
- **Bruneton J., 2009**. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 4ème Ed. médicales internationales and Tec & Doc Lavoisier, Paris : 1292p.

## C

- **Cabrita T M., Vale C., and Rauter A P., 2010**. Halogenated Compounds from Marine Algae. **8(8)**: 2301-2317

- **Caccamese S., Azzolina R., Furnari G., Cormai M., et Grasso S., 1981.** Antimicrobial and antiviral activities of some marine algae from Eastern Sicily. *Bot Mar* **14**:365–367.
- **Carriere A., Galinier A., Fernander Y., Carmona MC. & Penicaud L., 2006.** les espèces actives de l’oxygène : le yin et le yang de la mitochondrie. *Med. Sci.* **22** : 47-53.
- **Chatterjee A., 2004.** Inhibition of *Helicobacter pylori* ; in-vitro by various berry extracts with enhanced susceptibility of clarithromycine. *Mol. Cell. Biochem.*, **265(1-2)** : 19 – 26.
- **Chopin T., 1997.** Marine biodiversity monitoring. Protocol for monitoring of seaweeds. Environment Canada, Ecological monitoring and Assessment Network. Ottawa : 40 p.
- **Cohen, I., Neori, A., 1991.** *Ulva lactuca* biofilters for marine fishpond effluents I. Ammonia uptake Kinetics and nitrogen content. *Bot. Mar.* **34**, 475-482.
- **Cowan M.M., 1999.** Plant Products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12 (4)**, 564-582.
- **Chouikhi A., 2013.** Les applications potentielles des macroalgues marines et les activités pharmacologiques de leurs métabolites : Revue. USTHB-FBS-4th International Congress of the Populations & Animal Communities — Dynamics & Biodiversity of the terrestrial & aquatic Ecosystems "CIPCA4" TAGHIT (Bechar) – Algeria.

### **D**

- **Didrak M., 1999.** Antimicrobial activities of the extracts of various plants (*Valex*, *Mimosa* bark, *Gallnut* powders, *Salvia* sp and *Phlomis* sp). *J. Biol.*, **23**: 241-8.

### **E**

- **Elkouri A., 2004.** Recherche des propriétés : antibactérienne, antifongique, et anti-inflammatoire de quatre espèces d’algues marines récoltées sur la côte d’El Jadida (Côte Atlantique Marocaine). *Thèse de doctorat en Science*. Fac. Sci. Kénitra, Maroc. Univ. pp 138.

### **F**

- **Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. & Abdelly. C., 2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Compt. Rend. Biol.* **Vol. 331** : 337-379.

- **Farid Y, Etahiri S., Assobhe O., 2009.** Activité antimicrobienne des algues marines de la lagune d'Oualidia (Maroc) : Criblage et optimisation de la période de la récolte. **24**: 1543 – 1552.
- **Febles C. I., Arias A., Hardisson A., and Lopez A. S., 1995.** Antimicrobial activity of extracts from Canary species of Phaeophyta and Chlorophyta. *Phytotherapy Res.* **9**: 385-387.

## G

- **Garait B., (2006),** Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin, *Thèse de doctorat en biologie cellulaire*, Université Joseph Fourier, France.
- **Garrett R. H., Grisham C M., 2000.** Biochimie, 2ème Ed. De Boeck université, Paris: 1254p.
- **Garrido-Maestracci M., 2008.** Suivi de la stratégie régionale durable contre l'invasion de *Caulerpa taxifolia* et *Caulerpa racemosa* en Corse. Rapp. Office. Envir. Corse – Réseau Caulerpes : 51p.
- **Gilbert B. L. & Norris D. M., 1968:** A chemical basis for bark beetle (scolytus) distinction between host and non-host trees. *J. Insect physiol.* **vol. 14** :1063-1068.
- **Guignard J.L., 1998.** Abrégé de botanique. Masson .Ed. Paris : 212 p.
- **Guillaume P., 2010.** Caractérisation biochimique d'exopolymères d'origine algale du bassin de Marennes-Oléron et étude des propriétés physico-chimiques de surface de micro-organismes impliquées dans leur adhésion. *Thèse de Doctorat en biochimie*, l'Université de La Rochelle. *Paris, France* : 325 p.
- **Guist G.G. & Humm J.J., 1976 .**Effect of sewage effluent on growth of *Ulva lactuca* Florida Sci.**39** :267-271.
- **Gutteridge J.M., 1993.** Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence, *Free Radic Res Commun.* **19**:141-158.

## H

- **Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C. & CHaPelle J.P., 2007,** Le stress oxydant, *Rev Med Liège*, **62**: 628-663.

- **Halliwel B. & Gutteridge J.M., 1993.** Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, 2<sup>ème</sup> Ed.12 :93-95.
- **Halliwel B., 1990.** "How to characterize a biological antioxidant".Free Radic Res Commun.9 : 1-32.
- **Hanson J.R., 2003.**Natural products : the secondary metabolites. Ed. Royaume-Uni : Royal society of chemistry, Italy : 137 p.
- **Harbone J.B., 1998.** Phytochemical Methods, A guide to moderne techniques of plant analysis, 3<sup>ème</sup> Ed.Chapman &Hall, London : 309p
- **Hartmann T., 2007.** From waste products to ecochemicals : Fifty years research of plant secondary metabolism. Phytochemistry. **68** : 2831-2846.
- **Heimeur N., Idrissi H., Seghini M. (2004)** Les polyphenols de *Pyrus mamorensis* (*Rustaceae*). Reviews in biology and biotechnology.**3** : 37-42.
- **Hoffmaster A., Hill K., Gee J., Marston C., Popovic T., Sue D., Wilkins P., Avashia S., Drumgoole R., Helma C., Ticknor L., Okinaka R., Jackson J., (2006).** Characterization of *Bacillus cereus* isolates associated with fatal pneumonias: strains are closely related to *Bacillus anthracis* and harbor *B. anthracis* virulence genes, **44**(9):3352-60.

### *J*

- **Jouve J., (1996).** La qualité microbiologique des aliments, maîtrise et critères, Polytechnique, Paris : 23p.

### *K*

- **Klein J. & Verlaque M., 2008.** *Marine Pollution Bulletin* **56**: 205-225.
- **Klein J., 2007.** Impact de *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea* (Caulerpales, Chlorophyta) sur les communautés macrophytiques en Méditerranée nord-occidentale. 312 p.

### *L*

- **Lamouti S., Rebzani C. et Bachari N.E.I., 2011.**Répartition de deux espèces introduites à caractère invasif dans la région centre de la côte algéroise : *Caulerpa racemosa* et *Oculina patagonica*. *Actes de la "Conférence Méditerranéenne Côtière et Maritime"* (Tanger), 2ed : 361-366.

- **Lamprecht M., Greilberger J. & Oettl K., 2004.** Analytical aspects of oxidatively modified substances in sport and exercises. *Nutrition*. **20** : 728-730.
- **Leitao D.P., Polizello A.C., Ito I.Y. & Spadaro A.C., 2005.** Antibacterial screening of anthocyanic and proanthocyanic fractions from cranberry juice. *J. Med. Food*, **8** (1): 36-40.
- **Li H.B., Cheng K. M., Wong C. C., Fan K.W., Chen F., Jiang, Y., 2007.** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, **102**(3): 771-776.
- **Lüning K., 1990.** Seaweeds: Their environment, biogeography, and ecophysiology. Wiley, New York : 544 p.

### *M*

- **Macheix J.J., Fleuriet A. & Jay-Allemand C., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Ed. PPUR presses polytechniques* : 192 p.
- **Malecky M., 2005.** Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins, thèse Pour obtenir le grade de docteur de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Agro Paris Tech : 207 p.
- **Martin S. & Andriantsitohaina R., 2002.** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, **51** : 304-315.
- **Matanjan P., Mohamed S., Mustapha N. M., Muhammad K., Ming C. H., 2008.** Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo. *J. Appl. Phycol.* **20**(4) : 367-373.
- **Michel F., 2005.** Bactériologie alimentaire, 2ème Ed. Economica, Paris : 140p.
- **Mogode D., 2005.** Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* Vahl (Caesalpinaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad. *Thèse Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie*. 166 p.
- **Mohamed S., Hashim, S.N., Rahman, A.H., 2012.** Seaweeds : A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends in Food Science & Technology*. **23** : 83-96.
- **Moreau F., 1964.** Alcaloïdes et plantes alcaloïdères. Série "que sais-je?". point de connaissances actuelles. press universitaires de France .éd n° 276000.

- **Morel Y. et Barouki R., 1999.** Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J.* **342 (3)** : 481-496.

## *N*

- **Naigai T. Y. & Kimoto T., 2003.** Preparation and functional properties of beverages made from sea alga. *Food Chemistry*, **81(3)**: 327-332.
- **Nathan C., Joseph T., Barbieri S., 2014.** *Bacillus cereus* Certhrax ADP-ribosylates Vinculin to Disrupt Focal Adhesion Complexes and Cell Adhesion, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 1120-1536.
- **Nijveldt R. J., Nood E., Hoorn D. E., Boelens P. G., Norren K. & Leeuwen P., 2001.** Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin Nutr*, **74** : 418–425.
- **Nikaido H., 2003.** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**:593–656
- **Nizamuddin M., 1991.** The Green Marine Algae of Libya. Édité. Elga Publisher, Berne : 227 p.

- 

## *O*

- **Ould-Ahmed N. & Meinesz A., 2007.** First record of the invasive alga *Caulerpa racemosa* (Caulerpales, *Chlorophyta*) on the coasts of Algeria *Cryptogamie Algologie* **28 (3)** :303-305.

## *P*

- **Paniagua Michel J., Capa Robles W., Olmos Soto J., Gutierrez Milan L.E., 2009.** The carotenogenesis pathway via the isoprenoid-betacarotene interference approach in a new strain of *Dunaliella salina* isolated from Baja California Mexico. *Mar Drugs*, **7**:45-56.
- **Pastre P., & Rabardel P., (2005).** *Modèles du sujet pour la conception. Dialectiques activités développement.* Toulouse : Octarès. 260 p.
- **Perret C., 2001.** Analysis de tanins inhibiteurs de stilbéne oxydase produite par *Btrytis cinerea*. *Thèse de doctorat.* Université Neuchatel.

- **Perrony S., 2005.** La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (*Lemur catta*) .*Thèse de doctorat* en Eco-Ethologie .Muséum national d'histoire naturelle.
- **Person J., 2011.** Algues, filières du futur \_Livre Turquoise.ed. Adebitech Romainville : 182 p.
- **Pessini G.L., Dias Filho B.P., Nakamura C.V., Cortez D.A., 2003.** Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. Var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. *Mem I Oswaldo Cruz* **98** :1115-1120.
- **Prakash D., Upadhyay G., Brahma N. et Singh H.B., 2007.** Singh antioxidant and free radicalscavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean: *Food Chemistry* **104**: 783-790.
- **Prasad P., Boote K., Allen L., Sheehy J., Thomas J. 2004.**Species, ecotype and cultivar differences in spikelet fertility and harvest index of rice in response to high temperature stress, **95**: 398–411.

*R*

- **Rajeev K.J. & Xu Z., 2004.** Biomedical compounds from marine organisms. *Marine Drug* **2**: 123-146.
- **Rao P. S., Parekh K S., 1981.** Antibacterial activity of Indian seaweed extracts, **Vol 24** :577–582.
- **Raven, P.H., Evert, F.E., Eichhorn, S.E., 2000.** *Biologie végétale*. 6eme Ed. De boeck. Paris, bruxelles. 39 p.
- **Raven P., Johnson., Mason K, Rundell-Singer S.& Losos J., 2011.**biologie.1406p.
- **Rivard-Sirois C., 2005.** les algues. Sherbrooke,Canada : 732p.

*S*

- **Samarth R. M., Panwar M., Kumar M., Soni A., Kumar M. and Kumar A., 2008.** Evaluation of antioxidant and radical- scavenging activities of certain radioprotective plant extracts. *Food Chemistry* **106**: 868-873.
- **Sandhar H.K., Kumar B., Prasher S., Tiwari P., Salhan M. & Sharma P., 2011.** A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, **1 (1)**: 25-41

- **Scalbert A., Manach C., Morand C. & Rémésy C., 2005.** Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **45**: 287–306.
- **Sell C., 2004.** A fragrant introduction to terpenoid chemistry. Royal Society of Chemistry .Great Britain : 410 p.
- **Seridi H., 2007.** *Étude de la flore algale de l'Algérie, Étude phytosociologique des peuplements algaux photophiles de l'infralittoral superficiel de substrat dur*. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB), Alger, 174 p.
- **Siddhanata S.K., Ramavat K. M. & Chauhan V.D., 1991.** Biomedical potential of marine algae. *Journal Seaweed*.15: 149-157.
- **Sivakumaran S., Molan A.L., Meagher L.P. & Kolb B., 2004.** Variation in antimicrobial action of pranthocyamidins from *Dorycrium rectum* against rumen bacteria. *Phys Chem*: **5(3)**:106-111.
- **Souchard J.P., Arnal J.F.& Rochette L., 2002.** Les radicaux Libres et le Stress Oxydatif Radicalaire. Techniques permettant la mise en évidence d'un stress oxydatif en biologie, In. "Biologie et Pathologie du Cœur et des Vaisseaux" *Médecine- Science Flammarion*. 245 p.
- **Sparg S.G., Light M.E. & Van Staden J., 2004.** Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology* 94, 219-243.

*T*

- **Trabelsi N., Megdiche W., Ksouri R., Abdelly C., 2010** Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. **43(4)**:632-639.
- **Trease G.E., Evans W.C., 1989.** Pharmacognosy, 13<sup>ème</sup> Ed. Bailliere Tindall, London : 1204p.
- **Ulanowska K., Traczyk A., Konopa G.& Wegrzym G., 2006.** Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DND, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch. Microbiol.*, **184 (5)**: 271-8.

*V*

- **Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., MazurM. & Telser J., 2007.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44-84.
- **Verlaque M., Boudouresque C.F., Meinesz A. et Gravez V., 2000.** The *Caulerpa racemosa* complex (*Caulerpales, Ulvophyceae*) in the Mediterranean Sea. *Botanica Marina*.vol. **43** : 49-68.
- **Verlaque M., Durand C., Huisman J.M., Boudouresque C.F. & Le piraco ., 2003.** On the identity and origin of the Mediterranean invasive *Caulerpa racemosa* (*Caulerpales, Chlorophyta*). *European Journal of Phycology* **38**: 325-339.
- **Verlaque M., Afonso-Carrillo J., Gil-Rodriguez M.C., Durand C, Boudouresque C.F. et Le Parco Y., 2004.** Blitzkrieg in a marine invasion: *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea* (*Bryopsidales, Chlorophyta*) reaches the Canary Islands (North-East Atlantic). *Biological Invasions*. **6 (3)** : 269-281.
- **Vermerris W., Nicholson R., 2006.** Phenolic Compound Biochemistry, 1ère Ed. Springer Netherlands : 276p.
- **Vilain S., Luo Y., Hildreth M., Brozel V., (2006).** Analysis of the Life Cycle of the Soil Saprophyte *Bacillus cereus* in Liquid Soil Extract and in Soil. *Applied Environmental Microbiology*, **72(7)**:4970–4977.
- **Vincenzo S., 2013.** *Bacillus cereus pneumonia*.In: *Advances. In Medicine and Biology*. Berhardt LV, Italy : 1-19p

*W*

- **Woelkerling W.J., 1990.** An introduction. Pages 1-6 in *Biology of the red algae* (Cole K.M. & Sheath R.G). Cambridge University Press, Cambridge.

# *ANNEXES*

*Annexe 01*

**Bouillon nutritif**

Peptone.....	10g
Chlorure de sodium.....	5g
Extrait de viande.....	10g
Extrait de levure.....	1.5g

Le PH est ajusté à 7,3 puis le milieu stérilisé à 120 C pendant 20 minutes.

*Annexe 02*

**Gélose nutritive**

Peptone.....	10g
Chlorure de sodium.....	5g
Extrait de viande.....	10g
Extrait de levure.....	1.5g
Agar .....	17g

Le PH est ajusté à 7,3 puis le milieu stérilisé à 120 C pendant 20 minutes.

*Annexe 03*

**Gélose Mueller-Hinton**

Composition en g/l

Extrait de viande.....	2 g
Hydrolysate acide de caséine .....	17,5 g
Amidon .....	1.5g
Agar.....	17g

QSP pour 1 litre

Après la préparation du milieu le pH de ce dernier est ajusté à 7,4 puis le milieu stérilisé à 120C° pendant 20 min.

## *Annexe 04*

Les réactifs de Mayer et de Wagner sont préparés comme suit :

### **Réactif de Mayer**

**Solution A** : 1.358 g de chlorure de mercure ( $\text{HgCl}_2$ ) sont dissous dans 60ml d'eau distillée.

**Solution B** : 5g d'iode de potassium (KI) sont dissous dans 10ml d'eau distillée. Les deux solutions sont mélangées et le volume final est ajusté à 100 ml avec l'eau distillée.

**Réactif de Wagner** : Dans 2g de KI et 1.27g de  $\text{I}_2$  sont dissous dans 75 ml d'eau distillée. Le volume obtenu est ajusté à 100ml avec l'eau distillée.

## *Annexe 05*

### **Solution à la ninhydrine**

4 ml d'eau distillée, 1.5 g de la ninhydrine et 40 mg d'acide ascorbique sont dissous dans 120 ml de 2-méthoxyéthanol.