

COMPOSANTE 2C - Projet 2C3

Substances Actives Marines

Juin 2006

CRISP

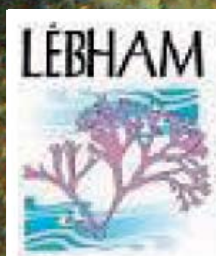


Coral Reef InitiativeS for the Pacific
Initiatives Corail pour le Pacifique

MEMOIRE DE MASTER

Variations interspécifiques des composés phénoliques chez des sargasses des Îles Salomon et test de leur activité antibactérienne

Photo : J.-L. MENOU



Auteur : Marie Lhuillery

CRISP



Le CRISP est un programme mis en œuvre dans le cadre de la politique développée par le Programme Régional Océanien de l'Environnement afin de contribuer à la protection et la gestion durable des récifs coralliens des pays du Pacifique.

L'initiative pour la protection et la gestion des récifs coralliens dans le Pacifique (CRISP), portée par la France et préparée par l'AFD dans un cadre interministériel depuis 2002, a pour but de développer une vision pour l'avenir de ces milieux uniques et des peuples qui en dépendent, et de mettre en place des stratégies et des projets visant à préserver leur biodiversité et à développer dans le futur les services économiques et environnementaux qu'ils apportent tant au niveau local que global. Elle est conçue en outre comme un vecteur d'intégration entre états développés (Australie, Nouvelle-Zélande, Japon et USA), Collectivités françaises de l'Outre-Mer et pays en voie de développement du Pacifique.

Cellule de Coordination CRISP
Chef de programme : **Eric CLUA**
CPS - BP D5
98848 Nouméa Cedex
Nouvelle-Calédonie
Tél./Fax : (687) 26 54 71
E-mail : ericc@spc.int
www.crisponline.net

Le CRISP est structuré en trois composantes comprenant respectivement divers projets :

Composante 1 : Aires marines protégées et gestion côtière intégrée

- Projet 1A1 : Analyse éco-régionale
- Projet 1A2 : Aires Marines Protégées (AMP)
- Projet 1A3 : Renforcement institutionnel
- Projet 1A4 : Gestion intégrée des zones lagunaires et des bassins versants

Composante 2 : Connaissance, gestion, restauration et valorisation des écosystèmes coralliens

- 2A : Connaissance, valorisation et gestion des écosystèmes coralliens
- 2B : Restauration récifale
- 2C : Valorisation des Substances Actives Marines
- 2D : Mise en place d'une base de données régionale (Reefbase Pacifique)

Composante 3 : Appui institutionnel et technique

- 3A : Capitalisation, valorisation et vulgarisation des acquis du programme CRISP
- 3B : Coordination, promotion et développement du programme CRISP

COMPOSANTE 2C

Substances Actives Marines (SAM)

Responsable de composante :
Cécile DEBITUS
IRD - UMR 152
Université Paul Sabatier
Toulouse II
Faculté des Sciences
31062 Toulouse cedex 9
France
Tél. : (33) 5 62 25 98 11
Fax : (33) 5 62 25 98 02
E-mail : cecile.debitus@ird.fr

■ PROJET 2C-1 :

Volet juridique - Proposition d'amélioration des législations des pays insulaires pour le partage des bénéfices issus de la valorisation des SAM

■ PROJET 2C-2 :

Volet taxonomique - Amélioration de la connaissance des invertébrés benthiques récifaux

■ PROJET 2C-3 :

Volet technologique - Isolement et identification de SAM

■ PROJET 2C-4 :

Volet de renforcement institutionnel - Formation de personnes ressources du Pacifique insulaire

LE PROGRAMME CRISP EST FINANÇÉ PAR LES ORGANISATIONS SUIVANTES :



Variations interspécifiques des composés phénoliques chez des sargasses des îles Salomon (Pacifique Sud) et test de leur activité antibactérienne



Marie LHUILLERY

Master 1 Sciences de la Mer et du Littoral mention Sciences Biologiques Marines

2005/2006

Maître de stage : Valérie Stiger



Laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues Marines

Remerciements

Je remercie tout d'abord le Professeur Eric Deslandes, directeur du LEBHAM, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire durant ce premier stage en laboratoire.

Je tiens à remercier le Docteur Valérie Stiger pour m'avoir prise en stage, pour sa gentillesse, sa passion contagieuse pour son travail et pour les algues. Merci pour tous ses conseils.

Merci au Professeur Eric Deslandes, aux Docteurs Valérie Stiger et Erwan Ar Gall pour m'avoir fait découvrir et aimer les algues l'an dernier.

Je remercie aussi toute l'équipe du laboratoire pour leur aide, leurs conseils.

Merci aussi aux autres stagiaires et particulièrement Klervi pour son aide. Merci aussi à Charlotte, Nolwenn et Clara, sans qui je me serais parfois sentie un peu seule.

Merci enfin à Mesdames Nelly Kervarec (Service RMN, analyse des spectres) et Isabelle Bihannic (Département de Biologie, souches bactériennes), pour leur précieuse aide à l'UBO. Je remercie aussi Dr. Claire Hellio de l'université de Portsmouth pour avoir réalisée les tests d'activité antibactérienne sur les extraits phénoliques.

Sommaire

Introduction.....	1
Matériel et Méthodes.....	3
1. Matériel biologique.....	3
2. Sites d'échantillonnage.....	3
3. Méthodes.....	4
3.1 Mises au point.....	4
- Optimisation du conditionnement des algues en vue du dosage des composés phénoliques.....	4
- Antibiogrammes.....	5
3.2 Extraction et dosage des composés phénoliques.....	6
- Extraction des composés phénoliques.....	6
- Dosage des composés phénoliques extraits.....	7
3.3 Purification des composés phénoliques par dialyse.....	8
3.4 Analyses antibactériennes.....	10
- Tests sur des bactéries terrestres.....	10
- Tests sur des bactéries marines.....	10
3.5 Analyses statistiques des données.....	11
Résultats.....	12
1. Optimisation.....	12
1.1 Conditionnement.....	12
1.2 Antibiogrammes.....	13
2. Variations.....	13
2.1 Variations interspécifiques des teneurs en composés phénoliques.....	13
2.2 Activité antibactérienne.....	14
- Terrestre.....	14
- Marine.....	15
Discussion.....	16
Conclusion.....	18
Bibliographie.....	19
Annexe.....	I

Introduction

L'exploitation des algues à des fins alimentaires ou industrielles est une activité très ancienne. De nos jours, cette exploitation s'est surtout tournée vers le monde industriel avec des filières telle que celle des phycocolloïdes (ou polysaccharides de paroi) (agars, carraghénanes, alginates), utilisés notamment pour leurs propriétés gélifiante et stabilisante. On observe aussi une constante augmentation de l'emploi de composés algaux en pharmacie, parapharmacie et même cosmétique.

Les composés phénoliques, ou tannins, sont présents dans tous les végétaux vasculaires et les algues brunes. Ce sont des métabolites secondaires, donc non essentiels au métabolisme de l'organisme dont le rôle est encore mal connu. On leur prête notamment des propriétés antioxydante, antibactérienne, antifongique... les rendant intéressants aux yeux des industriels.

On trouve les phlorotannins en quantités variables selon les espèces d'algues brunes, généralement entre 1 et 10 % de la matière sèche (MS). Parmi les plus riches, on compte les Fucales et les Dictyotales, avec respectivement jusqu'à 20 et 30 % MS (Connan, 2004). Chez les Fucales tropicales, les teneurs peuvent varier entre 0,26 chez *Sargassum spp* et $4,60 \pm 1,75$ chez *Sargassum hystrix* (Zubia, 2003).

Au sein de l'organisme, ces composés auraient pour rôle de protéger, dans une certaine mesure, le végétal contre certaines agressions de l'environnement : le broutage par les herbivores (Pavia et al, 1997), les radiations UV (Pavia et al, 1997) et les pathogènes (Hellio, 2000a,b ; Vlachos et al, 1999).

De nombreuses études ont déjà été menées sur ces composés, essentiellement sur *Ascophyllum nodosum* (Pavia et al, 1997 ; Pavia & Aberg, 1996) et *Fucus vesiculosus* (Ilvessalo & Tuomi, 1989 ; Tuomi, 1989), ainsi que d'autres espèces d'algues brunes de l'hémisphère nord (Connan, 2004 ; Van Alstyne, 1990). Depuis plus récemment, quelques études sont menées sur des Sargassaceae tropicales (Arnold & Targett, 2000 ; Stiger et al, 2004 ; Vlachos et al, 1999).

La présente étude, menée au LEBHAM sur des espèces de Sargassaceae tropicales, a été effectuée dans le cadre d'un programme de valorisation de la faune et de la flore sous-marines du Pacifique Sud : programme général de l'Initiative régionale pour la protection et la gestion des récifs coralliens dans le Pacifique Sud (Coral Reef Initiative for South Pacific, CRISP). Plus particulièrement, l'étude répond en partie à l'objectif 4 de ce programme et

contribue donc à la découverte de substances à activités pharmacologiques au sein des pays partenaires de ce programme.

Dans un premier temps, des extraits méthanoliques ont été réalisés et les teneurs en composés phénoliques ont été déterminées sur les différents échantillons de Sargassaceae. Des tests ont ensuite été effectués sur ces extraits pour déterminer notamment si les composés phénoliques pouvaient avoir une activité antibactérienne intéressante.

Matériel et Méthodes

1. Matériel biologique

Les espèces étudiées sont des algues brunes qui appartiennent à la famille des Sargassaceae et à l'ordre des Fucales.

Les échantillons étudiés ont été prélevés dans les îles Salomon (Pacifique Sud). Elles vivent généralement sur un substrat dur (pâté corallien, dalle volcanique ou encore débris).

Ce sont des algues généralement de couleur marron à vert foncé. Elles sont constituées d'un axe principal court duquel partent des latérales plus ou moins longues selon l'âge et l'espèce et qui peuvent être fertiles à certains moments de l'année. Ces espèces possèdent des vésicules aérifères leur permettant de se maintenir dans la colonne d'eau.

Plusieurs espèces ont été étudiées durant ce stage :

- *Sargassum echinocarpum* (S 848 – 686)
- *Sargassum crassifolium* (S 852 – 742)
- *Sargassum cristaefolium* (S 852 – 748)
- *Sargassum oligocystum* (S 842 – 562)

Avant de traiter ces échantillons, une optimisation du protocole de conditionnement a été effectuée sur *Sargassum muticum*, qui est la seule espèce de sargasses que l'on trouve en Bretagne, introduite accidentellement et qualifiée d'invasive. Cette étape nous a permis de choisir une méthode optimale de conditionnement des algues pour un acheminement du Pacifique sud à la France.

2. Sites d'échantillonnage

Les échantillons de Sargasses des îles Salomon ont été reçus avec une fiche signalétique, récapitulant les conditions environnementales pour chaque site d'échantillonnage (Tableau I)

Tableau I : Lieux de récolte des différents échantillons de *Sargassum* dans les îles Salomon et conditions environnementales (Payri, com. pers.)

n° d'échantillon	Lieu de Récolte	Milieu	Mode d'hydrodynamisme	Profondeur
S 848 - 686	Malaita Nord. Lau Lagoon	Bord de platier. Zone interne à la passe. Herbier à phanérogames.	Calme	1,5 à 3 m
S 852 - 742	Malaita. Côte est. Anuta Paina Island	Zone côtière du platier corallien	Agité	1 m
S 852 - 748	Malaita. Côte est. Anuta Paina Island	Zone côtière du platier corallien	Agité	1 m
S 842 - 562	Nggela NW	Platier frangeant côtier. Haut des rochers. Zone de ressac.	Plus ou moins agité	0,5 à 0,8 m

Les échantillons de *Sargassum muticum* ont été récoltés le 30 janvier 2006 à la Pointe du Diable à Plouzané, dans une mare découverte uniquement lors de forts coefficients. Environ 1 kg de matière fraîche a été récolté.

3. Méthodes

3.1 Mises au point

- Optimisation du conditionnement des algues en vue du dosage des composés phénoliques

Avant de recevoir les échantillons de sargasses, il avait semblé essentiel de déterminer comment les algues allaient être conditionnées avant l'envoi afin d'avoir le moins de variations des teneurs en composés phénoliques par rapport à un échantillon frais.

Pour cela, des échantillons de *Sargassum muticum* ont été traités de plusieurs façons avant extraction et détermination des teneurs en composés phénoliques.

Quatre lots de 50 g ont été isolés et conditionnés différemment en vue des dosages (frais, étuve (72h), lyophilisation (72h), congélation (1 mois)). N'ont été extraits et dosés que 3 fois 10 g.

Après les extractions (Figure 1) et les dosages (Figure 2), les teneurs ont été comparées statistiquement afin de tester si les différents conditionnements avaient un effet sur les teneurs en composés phénoliques par rapport au lot frais.

- Antibiogrammes

Lors des tests antibactériens, un témoin est nécessaire afin de déterminer si l'extrait à tester a un effet sur la bactérie. Pour cela, des antibiogrammes ont été réalisés au préalable. Dix antibiotiques ont été testés sur douze souches bactériennes (Tableaux II et III). Le plus efficace des antibiotiques, pour chaque souche, est choisi comme témoin pour le test antibactérien.

Tableaux II et III : Souches testées et antibiotiques utilisés avec leur code

Souches testées
<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Echerischia coli</i>
<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Salmonella st paul</i>
<i>Micrococcus sp</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Streptococcus faecium</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>

Antibiotiques utilisés	Code
Penicilline	P
Ampicilline	AMP
Erythromycine	E 15
Polymyxine B	PB 300
Colistine	CS
Sulfamides	SSS
Amoxicilline	AMX
Streptomycine	S
Chloramphénicol	C 30
Oxacilline	Ox 5

3.2 Extraction et dosage des composés phénoliques

- Extraction des composés phénoliques

Le protocole de l'extraction est présenté Figure 1.

En ce qui concerne les algues venant du Pacifique Sud, nous sommes partis directement de la matière sèche (3 g), les algues ayant été au préalable lyophilisées pour l'envoi (*cf.* résultat du conditionnement). En revanche, concernant *Sargassum muticum*, nous sommes partis de 10 g de matériel frais.

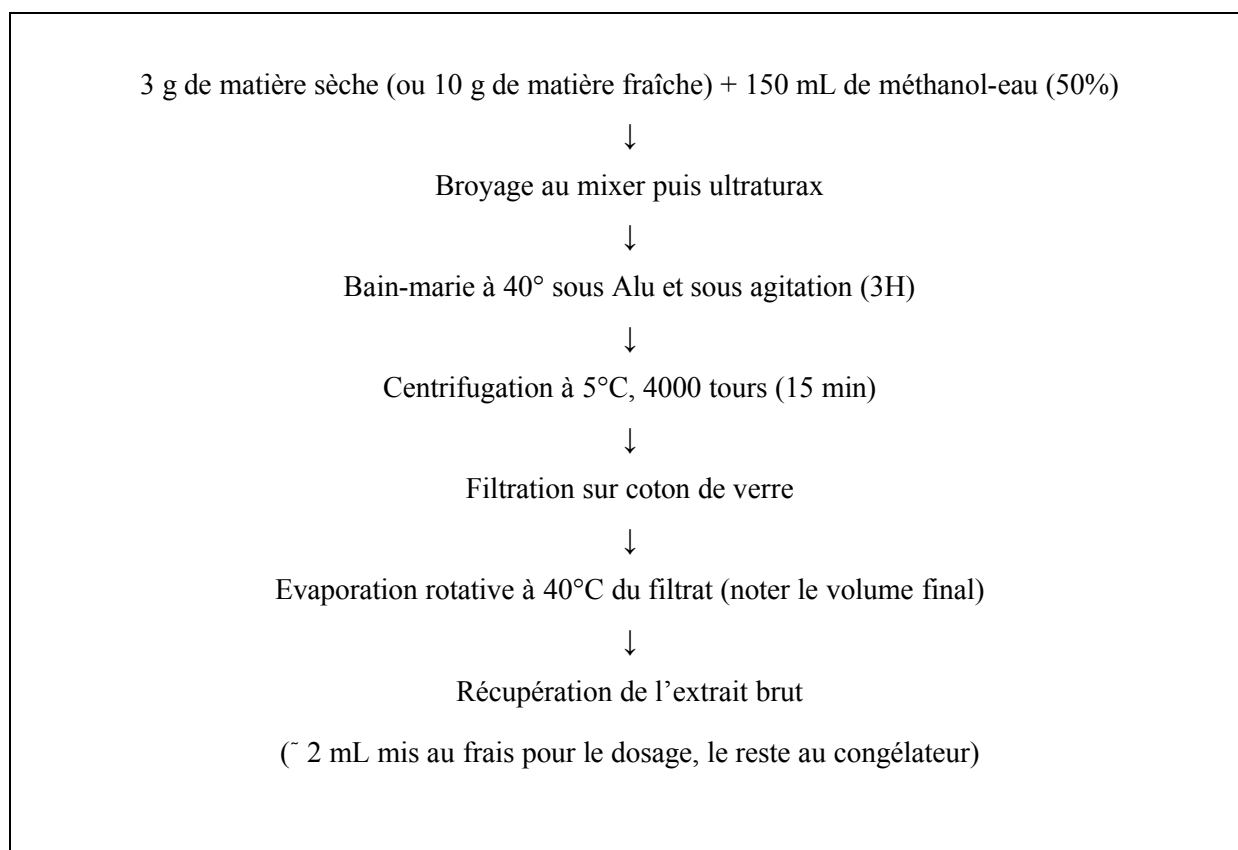


Figure 1 : Protocole d'extraction des composés phénoliques

Il est important, pour l'extraction comme pour toutes les manipulations effectuées sur les composés phénoliques, de travailler dans le minimum de lumière possible. En effet, du fait de leur rôle photoprotecteur, les composés phénoliques sont sensibles à la lumière et peuvent donc être dégradés s'ils reçoivent une lumière trop directe. De plus, ces composés ne doivent pas être exposés à des températures trop importantes (pas plus de 40°C).

Du fait du solvant (méthanol-eau à 50%), il ne faut surtout pas oublier de travailler constamment sous une hotte ventilée.

Après extraction, environ 130 mL de filtrat sont récupérés avant de passer à l'évaporateur rotatif afin d'éliminer le solvant. Sont ensuite récupérés environ 30 mL dont 2 mL sont conservés au réfrigérateur dans des tubes à hémolyse en vue du dosage. Le reste des 30 mL est conservé au congélateur à -25°C dans des tubes falcon.

- Dosage des composés phénoliques

Le protocole du dosage est présenté Figure 2.

La méthode de dosage des composés phénoliques utilisée est celle de Folin-Ciocalteu adaptée par Van Alstyne (1995) de la méthode de Folin-Denis adaptée par Harrison & Durance (1989).

Cette méthode repose sur l'oxydation des cycles phénoliques, couplée à la réduction d'acide phosphomolybdique. Dans la méthode de Folin-Ciocalteu, du lithium sulfate est ajouté au réactif de Folin-Ciocalteu, afin de diminuer la formation de précipité, permettant ainsi de faciliter la lecture de l'absorbance. Cette méthode a été utilisée en raison de sa rapidité.

La méthode de Folin-Ciocalteu est basée sur la présence de cycles aromatiques hydroxylés, caractéristiques du phloroglucinol, dont les polyphénols algaux sont des polymères mais aussi d'acides aminés dits aromatiques, comme la tyrosine, le tryptophane ou encore la phénylalanine qui peuvent être présent dans certaines protéines (Connan, 2004). Toutefois, ces acides aminés peuvent être négligés. Ils constitueraient moins de 5% des composés réagissant au réactif de Folin-Ciocalteu se trouvant dans les algues brunes (Connan, 2004)

Ce réactif de Folin-Ciocalteu, préparé de façon industrielle, à l'origine de couleur jaune, donne après réaction avec des polyphénols, une coloration bleue à la solution.

On utilise, comme référence pour le dosage colorimétrique, une gamme étalon au phloroglucinol, avec des concentrations de 0 à 25 µg/mL, à partir d'une solution mère à 100 µg/mL. Les résultats sont donnés en pourcentage de composés phénoliques par gramme de matière sèche.

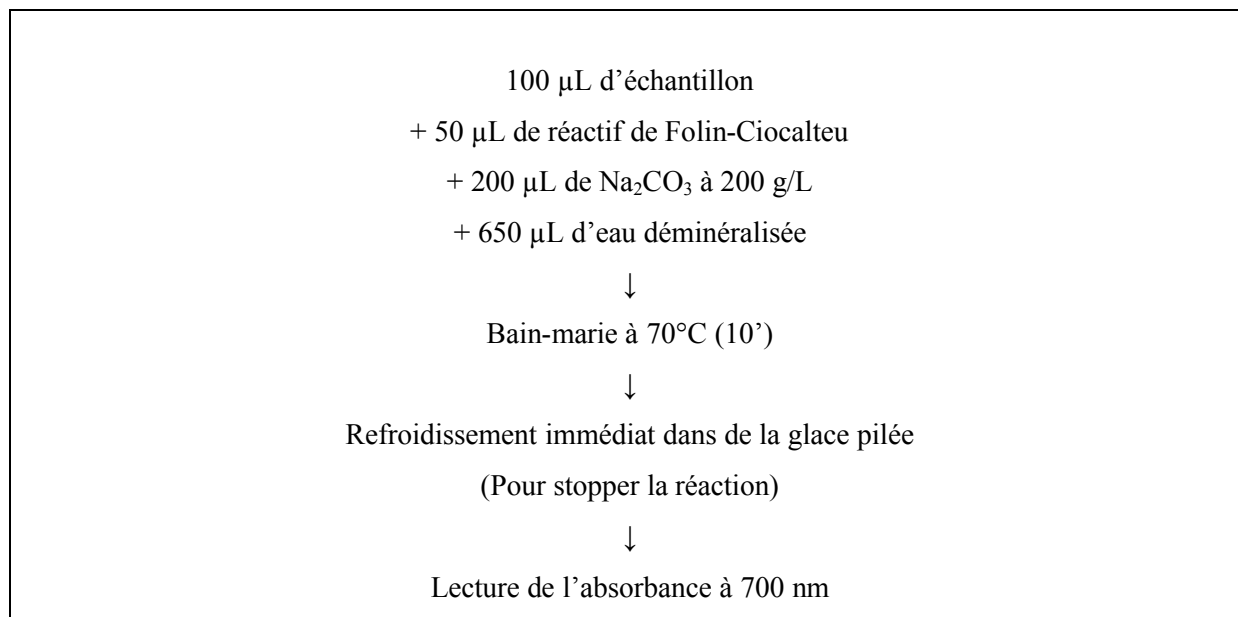


Figure 2 : Protocole de dosage des composés phénoliques

3.3 Purification des composés phénoliques par dialyse

Le protocole de purification par dialyse est présenté Figure 3.

Cette étape consiste à épurer les extraits de façon à ne garder que les composés phénoliques. Etant des molécules généralement de grande taille, en raison du grand nombre de cycles phénoliques, une méthode de séparation des molécules selon leur taille comme la dialyse, permet d'éliminer les molécules plus petites, comme par exemple le mannitol, petite molécule très hydrosoluble et très abondante, dont la présence pourrait éventuellement biaiser les résultats des tests à venir. Des teneurs en mannitol de 1 à 34 % de matière sèche ont été mesurées pour des espèces tropicales du genre *Sargassum* (Zubia, 2003)

Les extraits sont mis dans des boudins de dialyse dont la membrane en cellulose peut avoir différentes tailles de pore selon les molécules à éliminer. Les boudins sont ensuite plongés dans de l'eau distillée ou de l'eau du robinet (Running Tap Water) à l'obscurité, sous agitation et à 4°C, pendant plusieurs jours. Les bains d'eau distillée sont renouvelés régulièrement. Les molécules inférieures à la taille des pores des boudins passent alors au travers de la membrane.

Une première série de dialyses a été effectuée avec des boudins de 12-14 000 Da. Mais après avoir perdu 90% des composés phénoliques totaux dosés au départ, nous avons refait une série de dialyses à partir de boudins de 5 000 Da.

Après chaque série de dialyse, un dosage au Folin-Ciocalteu a été effectué pour déterminer la quantité de polyphénols restants et quelques mL d'extraits ont été passés en RMN (Résonance Magnétique Nucléaire, Service Commun de l'UBO) pour s'assurer que le mannitol avait bien été éliminé.

La résonance magnétique nucléaire ou RMN est une technique permettant l'analyse des structures moléculaires et l'étude de l'environnement physico-chimique des édifices moléculaires.

L'étude est menée sur des extraits bruts et dialysés, solubilisés dans du D₂O, dans le but de s'assurer de l'élimination effective du mannitol. Ceci a été fait grâce à une sonde détectant les ions ¹H, rendus très sensibles en RMN de par leurs propriétés électromagnétiques. On obtient ainsi une multiplicité de signaux qui, selon les fréquences de résonance, renseignent sur l'environnement des différents noyaux au sein de la molécule.

On peut, grâce à cette méthode de purification, appréhender la composition des extraits mais aussi valider le protocole de purification. Ainsi, on a pu voir que, lors de la première série de dialyses, nous avons perdu 90% des composés phénoliques totaux dosés au départ. Ce qui nous a amené à recommencer nos dialyses, cette fois avec des boudins plus spécifiques. Des spectres RMN sont présentés en annexe.

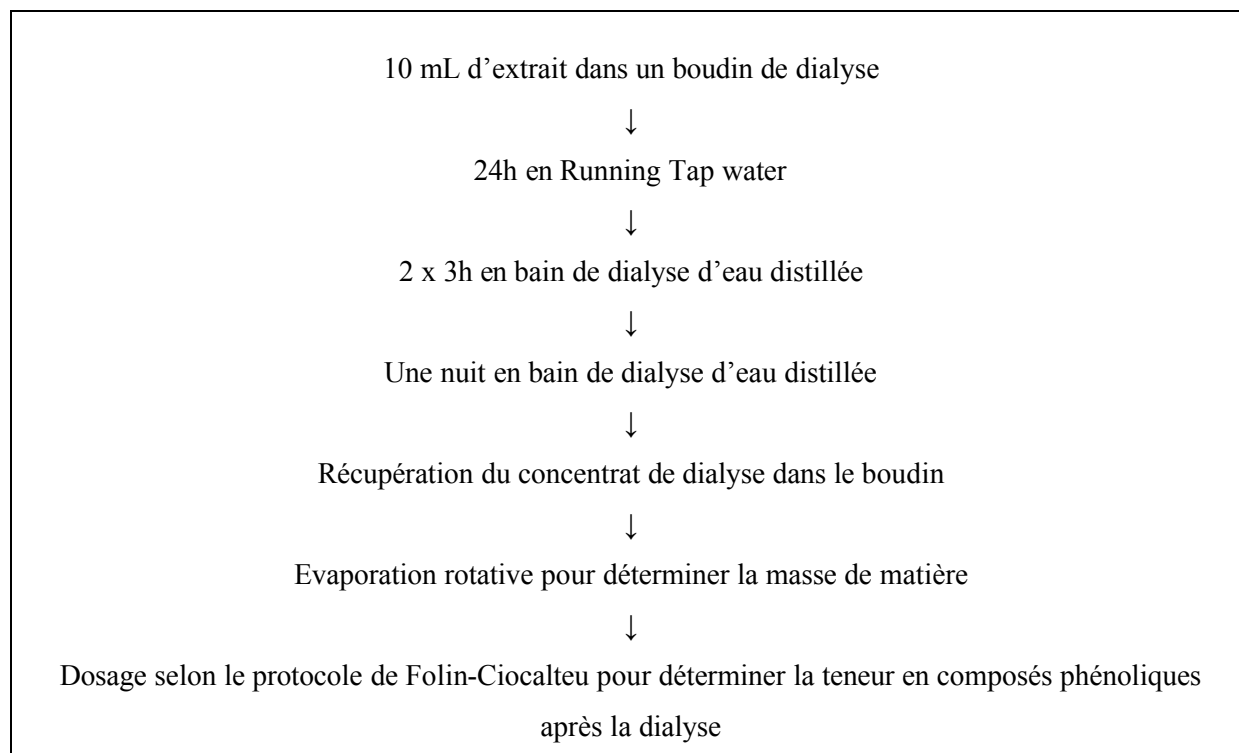


Figure 3 : Protocole de purification par dialyse des extraits phénoliques

3.4 Analyses antibactériennes

- Tests sur des bactéries terrestres

Lors de cette série de tests, les extraits purifiés ont été testés sur des souches bactériennes terrestres. Des douze souches utilisées pour les antibiotiques, seule *Pseudomonas fluorescens* n'a pas été testée puisqu'elle n'avait pas poussé lors des antibiogrammes (Tableau IV), ainsi que les souches pour lesquelles les antibiogrammes n'étaient pas satisfaisants (Tableau VI)

En plus des extraits, l'eau de mer autoclavée, le mannitol, le méthanol et le phloroglucinol, sont également été testés afin de savoir si ces molécules ont une activité antibactérienne.

Chaque disque contenait 50µmol d'extrait, qu'il soit brut ou dialysé.

Tableau IV : Souches antibactériennes terrestres testées au laboratoire

Souches testées
<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Echerischia coli</i>
<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Salmonella st paul</i>
<i>Micrococcus sp</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Streptococcus faecium</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>

- Tests sur des bactéries marines

Pour ces tests, des extraits ont été envoyés à Portsmouth (Angleterre), où l'activité antibactérienne des extraits a été testée sur cinq souches bactériennes marines (Tableau V).

Les tests se sont faits par dilution, sur des microplaques comprenant 90 cuves à fond plat. Dans ces cuves, ont été déposés 100 µL d'extrait sec et 100 µL de souche bactérienne. Comme témoin était utilisée une cuve contenant uniquement la souche bactérienne. La densité optique des souches bactériennes avant et après ajout d'extrait est mesurée. La diminution de cette absorbance après incubation permet d'établir l'activité inhibitrice de l'extrait sur la croissance bactérienne. Quatre concentrations d'extrait brut ont été choisies (d'après la littérature) et testées sur les souches bactériennes : C1 = 0,01 µg/10 µL ; C2 = 0,1µg/10 µL ; C3= 1 µg/10 µL et C4 = 10 µg/10 µL

Tableau V : Souches antibactériennes marines testées à Portsmouth (Angleterre)

Souches testées
<i>Cobetia marina</i>
<i>Vibrio aestuarianus</i>
<i>Polaribacter irgensii</i>
<i>Shewanella putrefaciens</i>
<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>

3.5 Analyses statistiques des données

Les résultats obtenus ont été traités avec le logiciel statgraphics 5 sous windows. Les tests des variances ont été effectués à partir des données brutes.

Avant l'analyse des variances, l'homogénéité des variances a été testée par les tests de Cochran, Bartlett, Hartley et Levene (si la plus petite des probabilités est supérieure ou égale à 0,05, l'ANOVA peut être menée). Lors de la violation d'un ou plusieurs critères de l'ANOVA (normalité des données, homogénéité des variances ou indépendance des données), même après transformation des données, le test non paramétrique de Kruskal-Wallis (KW) a été appliqué en plus du test des étendues multiples (LSD).

Résultats

1. Optimisation

1.1 Conditionnement

Trois modes de conservation des algues ont été testés : l'étuve, la lyophilisation et la congélation. En témoin a été utilisé un lot de matériel frais.

Les teneurs en composé phénoliques obtenues pour chaque conditionnement sont présentées à la figure 4.

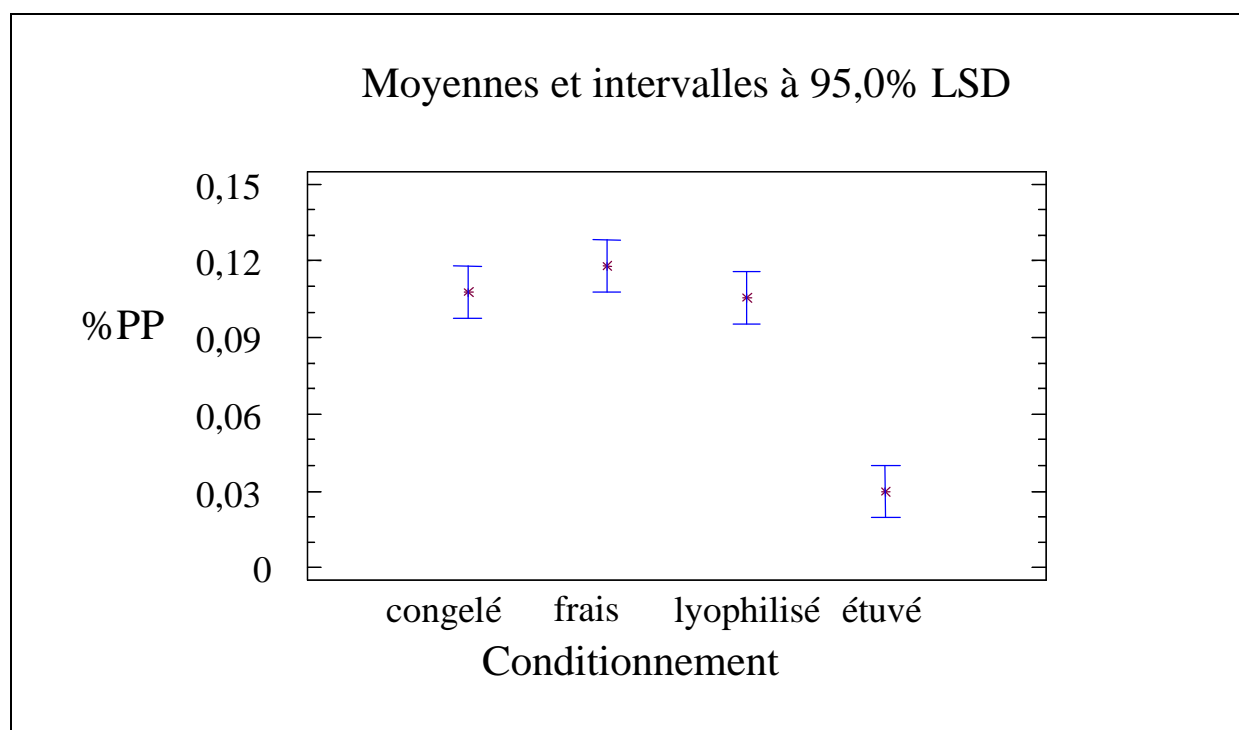


Figure 4 : Teneur en composés phénoliques (% de composés phénoliques par gramme de matière sèche) des différents échantillons de *Sargassum muticum* après différents traitements (frais, étuve, lyophilisateur, congélateur)

Le conditionnement a un effet significatif sur les teneurs en composé phénoliques ($p < 0,001$). Le test a posteriori a permis de regrouper les lots congelé, lyophilisé et frais, qui possèdent respectivement des teneurs en composés phénoliques de $0,108 \pm 0,010$; $0,106 \pm 0,010$ et $0,118 \pm 0,010$ (Figure 4). La plus faible teneur en composés phénoliques ($0,030 \pm 0,010$) est obtenue pour le lot étuvé.

1.2 Antibiogrammes

Grâce à cette série de tests, nous avons pu définir un antibiotique témoin pour chaque souche bactérienne terrestre avant de tester les extraits. Le Tableau VI présente les résultats de cette série d'antibiogrammes. Pour seulement quatre souches, nous n'avons pas obtenu de résultats permettant de définir un antibiotique témoin pour les tests d'activité antibactérienne.

Tableau VI : Résultats des antibiogrammes

Souche bactérienne	Antibiotique
<i>Bacillus subtilis</i>	Résultat non satisfaisant
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Chloramphénicol
<i>Escherichia coli</i>	Ampicilline
<i>Citrobacter freundii</i>	Colistine
<i>Salmonella st paul</i>	Résultat non satisfaisant
<i>Micrococcus sp</i>	Résultat non satisfaisant
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Résultat non satisfaisant
<i>Streptococcus faecium</i>	Ampicilline
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Polimyxine
<i>Proteus mirabilis</i>	Ampicilline
<i>Staphylococcus aureus</i>	Oxacilline

Ces antibiotiques serviront de témoin lors des tests d'activité des extraits afin de déterminer par comparaison, s'il existe réellement ou pas une activité antibactérienne.

2. Dosage et activité antibactérienne des composés phénoliques

2.1 Variations interspécifiques des teneurs en composés phénoliques

Sont présentées dans la Figure 5, les teneurs moyennes en composés phénoliques des différents échantillons, ainsi que leurs écarts-types respectifs.

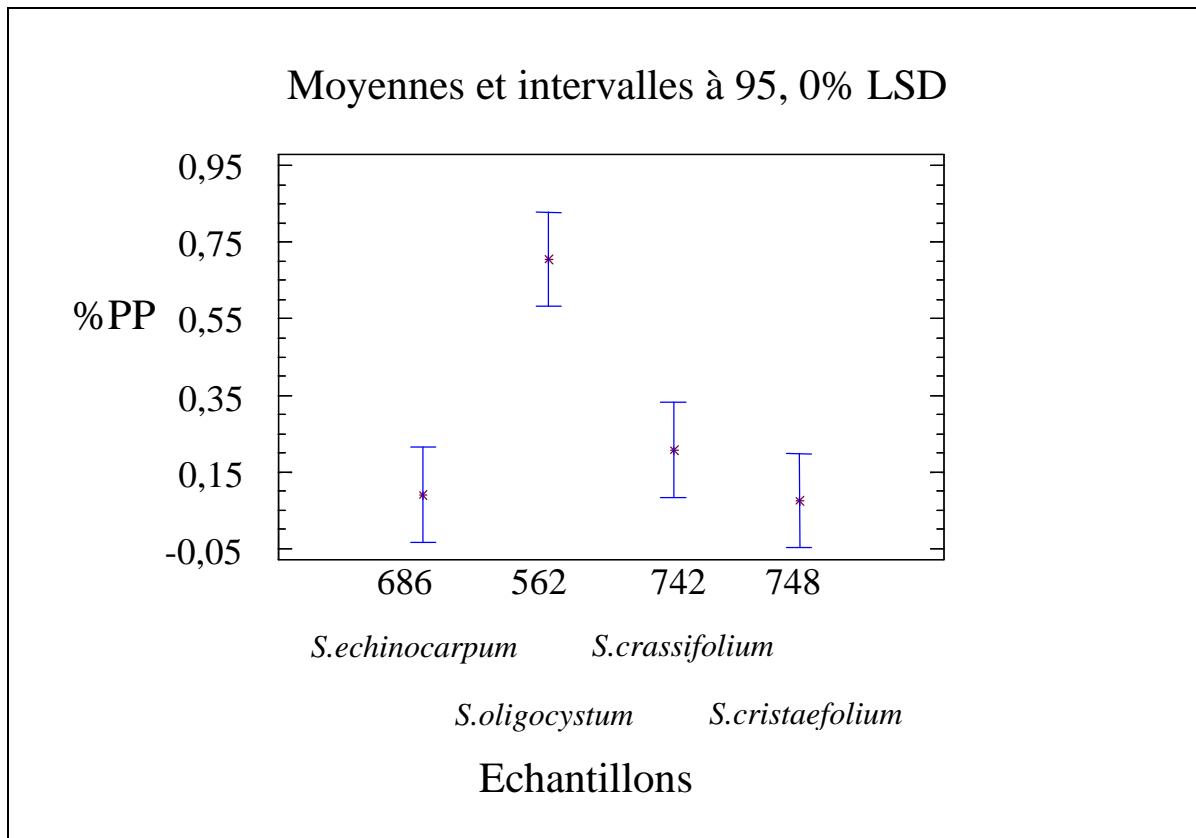


Figure 5 : Teneur en composés phénoliques (% de composés phénoliques par gramme de matière sèche) des différents échantillons de *Sargassum* des îles Salomon

On observe ici une différence significative entre S.852-562 et les trois autres échantillons ($p = 0,02$). En revanche, un groupe homogène est formé des échantillons S.848-686, S.852-742 et S.852-748 (Test a posteriori LSD).

L'échantillon S.852-562 possède la teneur moyenne la plus forte ($0,710 \pm 0,250$) alors que les échantillons S.848-686, S.852-742 et S.852-748 ont des teneurs en composés phénoliques respectivement de $0,090 \pm 0,009$; $0,207 \pm 0,03$ et $0,0751 \pm 0,03$ (Figure 5).

2.2 Activité antibactérienne

- Terrestre

Sur les sept souches testées, aucune souche bactérienne n'a présenté d'inhibition de la croissance face aux extraits algaux. Seul l'antibiotique avait une activité antibactérienne, validant l'expérience.

- Marine

Les résultats ont été reçus de Portsmouth sous forme de tableau. Seuls les extraits bruts ont été testés pour chaque espèce (Tableau VII).

Tableau VII : Résultats des tests antibactériens réalisés à Portsmouth (Angleterre) sur différentes souches bactériennes marines. C1 = 0,01 µg/10 µL ; C2 = 0,1µg/10 µL ; C3= 1 µg/10 µL et C4 = 10 µg/10 µL

algues (sp.)	concentrations	Microorganismes				
		<i>Cobetia marina</i>	<i>Vibrio aestuarianus</i>	<i>Polaribacter irgensii</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i>	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>
<i>S.cristaeifolium</i> Anuta Paina Island	C1	-	-	+	-	+
	C2	-	-	+	-	-
	C3	-	-	+	+	+
	C4	-	-	-	+	-
<i>S.echinocarpum</i> Lau Lagon (passe)	C1	-	-	+	-	-
	C2	-	-	+	-	+
	C3	-	-	+	-	-
	C4	-	-	-	-	-
<i>S.oligocystum</i> Nggela NW	C1	-	-	+	-	-
	C2	-	-	+	-	-
	C3	-	-	+	-	-
	C4	-	-	-	-	+
<i>S.crassifolium</i> Anuta Paina Island	C1	-	-	+	-	-
	C2	-	-	+	-	-
	C3	-	-	-	-	+
	C4	+	+	+	+	-

La souche *Polaribacter irgensii* présente le plus de sensibilité aux extraits testés.

L'extrait le plus actif est celui de *Sargassum crassifolium* (S.852 – 742) à la concentration de C4 = 10 µg/10 µL.

Discussion

Suite à l'optimisation du protocole de conditionnement il a été décidé de travailler sur des échantillons lyophilisés. Ces échantillons ont ensuite été reçus directement conditionnés des îles Salomon (Pacifique Sud). De ces échantillons, ont ensuite été extraits et dosés les composés phénoliques. On a ainsi obtenu les teneurs en composés phénoliques des différentes espèces d'algues récoltées.

Des études portant sur les composés phénoliques ont montrés que les teneurs en ces composés pouvaient varier d'une espèce à l'autre (Connan et al, 2004 ; Stiger et al, 2004). Hors ici, nous avons pu regrouper trois échantillons d'espèces différentes comme ayant des teneurs moyennes en composés phénoliques similaires.

Les teneurs en ces composés peuvent être mises en relation avec les conditions environnementales du site où les algues ont été prélevées. En effet, les paramètres du milieu peuvent avoir un impact sur les teneurs en composés phénoliques. Il a notamment été remarqué qu'un fort éclaircissement, et donc une forte radiation aux rayons ultra-violets, induisait une augmentation des teneurs moyennes en composés phénoliques (Pavia et al, 1997).

Si l'on regarde les résultats obtenus dans cette étude, on s'aperçoit que c'est l'échantillon S.842-562 qui possède la plus forte teneur en composés phénoliques. Hors, cet échantillon correspond à l'espèce *Sargassum oligocystum* qui a été prélevée dans une zone de ressac, relativement agitée et peu profonde (moins d'un mètre de profondeur). Ces algues sont donc régulièrement exondées, se retrouvant exposées aux radiations solaires. Ce qui expliquerait cette forte valeur. Les trois autres espèces vivent dans une profondeur d'eau un peu plus importante. On observe aussi des teneurs différentes pour les deux échantillons vivants dans les mêmes conditions (S.852-742 et S.852-748). La différence est ici due à la variabilité interspécifique des teneurs en composés phénoliques puisque nous avons affaire ici à deux espèces différentes : *Sargassum crassifolium* et *Sargassum cristaefolium*.

On peut noter que pour *Sargassum echinocarpum* (S.848-686) la faible teneur en composés phénoliques peut être expliquée par le fait que cette espèce vive plus profond que les autres espèces échantillonnées ainsi que par le mode d'hydrodynamisme calme.

Il se trouve aussi que cette espèce se développe dans un herbier à phanérogames. Ces herbiers sont l'abri de nombreux jeunes animaux (invertébrés et poissons). Le broutage y ait donc assez important. Il a été montré que les composés phénoliques pouvaient gêner le broutage (Stiger et al, 2004 ; Pavia et al, 1997 ; Van Alstyne & Paul, 1990), même en faible

quantité. Ceci impliquerait qu'il y ait différents types de composés phénoliques et qu'on ait donc un rôle de la qualité en plus de la quantité dans la défense chimique de l'algue (Steinberg et al, 1991). Ceci expliquerait aussi une faible teneur de composés phénoliques des algues tropicales vivant dans un milieu où le broutage est important.

En ce qui concerne les activités antibactériennes, on peut remarquer qu'aucune activité n'a été détectée sur les souches terrestres testées. Les composés phénoliques extraits ont une activité plus ou moins forte sur les souches marines, notamment sur *Polaribacter irgensii* qui est la plus sensible. Toutefois, seulement sept souches terrestres et cinq souches marines ont été testées. D'autres tests sont en cours afin de voir si les extraits phénoliques ont une activité sur les souches de champignons et de microalgues de milieu marin.

Conclusion

La première partie de cette étude, sur la détermination des teneurs en composés phénoliques de quatre espèces de Sargassaceae, nous a permis de démontrer que ces teneurs pouvaient varier selon les espèces mais aussi selon les conditions environnementales. On a pu voir aussi que ne jouait pas seulement la quantité mais aussi la qualité des composés phénoliques. C'est-à-dire qu'on peut avoir une activité de protection efficace alors que de faibles pourcentages en composés phénoliques sont notés. Il serait donc intéressant d'étudier la nature de ces composés phénoliques. Des composés efficaces en faible quantité seraient plus intéressants aux niveaux biologique et pharmacologique notamment.

En ce qui concerne la seconde partie, sur les activités antibactériennes, on a pu détecter des extraits actifs sur des souches marines. L'étude s'étant portée que sur quelques souches marines et terrestres, il serait intéressant de tester ces extraits sur un panel de souches bactériennes plus large. Pour ce qui est des extraits actifs, il serait bon, à présent, de tenter d'identifier précisément la molécule responsable de l'activité et de l'isoler.

On a pu voir aussi que parmi les facteurs influençant les teneurs en composés phénoliques, pouvait agir la lumière, puisque les algues les plus exposées semblaient avoir une teneur plus élevée. Il serait alors judicieux de mesurer les activités antioxydantes de ces extraits afin de savoir si ces espèces ont développé des stratégies de défense contre les forts rayonnements. De plus, il serait intéressant de savoir si la lumière a réellement un effet négatif sur la teneur en composé phénolique en ajoutant un lot « lumière » au conditionnement. Dans le cas d'un résultat négatif, cela faciliterait les extractions qui jusque là se faisaient dans le noir, à l'abri de la lumière.

Bibliographie

- Arnold TM, and Targett NM. 2000.** Evidence for metabolic turnover of polyphenolics in tropical brown algae. *Journal of chemical ecology* **26**: 1393-1410.
- Connan S. 2004.** Etude de la diversité spécifique des macroalgues de la Pointe de Bretagne et analyse des composés phénoliques des phéophycées dominantes. Thèse de Doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale. 280p.
- Connan S, Goulard F, Stiger V, Deslandes E, and Ar Gall E. 2004.** Interspecific and temporal variation in phlorotannin levels in an assemblage of brown algae. *Botanica Marina* **47**: 410-416.
- Hellio C, Bremer G, Pons AM, Le Gal Y, and Bourgougnon N. 2000a.** Inhibition of the development of microorganisms (bacteria and fungi) by extracts of marine algae from Brittany, France. *Applied Microbiology and Biotechnology* **54**: 543-549.
- Hellio C, De La Broise D, Dufossé L, Le Gal Y, and Bourgougnon N. 2000b.** Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: potential use for environmentally friendly antifouling paints. *Marine Environmental Research*: 1-17.
- Iivessalo H, and Tuomi J. 1989.** Nutrient availability and accumulation of phenolic compounds in the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Marine Biology* **101**: 115-119.
- Pavia H, and Aberg P. 1996.** Spatial variation in polyphenolic content of *Ascophyllum nodosum* (Fucales, Phaeophyta). *Hydrobiologia* **326/327**: 199-203.
- Pavia H, Cervin G, Lindgren A, and Aberg P. 1997.** Effect of UV-B radiation and simulated herbivory on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Marine Ecology Progress Series* **157**: 139-146.

- Steinberg PD, Edyvane K, De Nys R, Birdsey R, and Van Altena IA. 1991.** Lack of avoidance of phenolic-rich brown algae by tropical herbivorous fishes. *Marine Biology* **109**: 335-343.
- Stiger V, Deslandes E, and Payri CE. 2004.** Phenolic contents of two brown algae *Turbinaria ornata* and *Sargassum mangarevense* on Tahiti (French Polynesia): interspecific, ontogenic and spatio-temporal variations. *Botanica Marina* **47**: 402-409.
- Tuomi J, Ilvessalo H, Niemelä P, Sirén S, and Jormalainen V. 1989.** Within-plant variation in phenolic content and toughness of the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Botanica Marina* **32**: 505-509.
- Van Alstyne KL, and Paul VJ. 1990.** The biogeography of polyphenolic compounds in marine macroalgae: temperate brown algal defenses deter feeding by tropical herbivorous fishes. *Oecologia* **84**: 158-163.
- Vlachos V, Critchley AT, and Von Holy A. 1999.** Differential antibacterial activity of extracts from selected southern African macroalgal Thalli. *Botanica Marina* **42**: 165-173.
- Zubia M., 2003.** La valorisation industrielle des algues brunes invasives (Fucales) de la Polynésie française : étude prospective pour lutter contre leur prolifération et contribuer à la gestion durable de l'environnement récifal. Thèse de doctorat de l'Université de Polynésie française, spécialité : écologie marine. 359p

Annexe

La figure présente un spectre RMN avant (A) et après (B) purification par dialyse. On note un ensemble de pics sur les deux figures, aux alentours de la valeur 3,8 ppm, représentant le mannitol. Le pic à gauche représente le signal de l'eau. Il est très important et empêche ici la visualisation des composés phénoliques, qui se situent autour de 6 ppm.

