



Activité antimicrobienne des algues marines de la lagune d'Oualidia (Maroc) : Criblage et optimisation de la période de la récolte.

Younes FARID, Samira ETAHIRI *et Omar ASSOBEI

Laboratoire de Biotechnologies Marine et de l'Environnement, Université Chouaib Doukkali-Faculté des Sciences BP 20, El Jadida, Maroc

Corresponding author e-mail: setahiri@hotmail.com

Published at www.biosciences.elewa.org on December 8, 2009

RESUME:

Objectif : Ce travail a pour objectif le criblage de l'activité antimicrobienne des algues marines de la lagune d'Oualidia (côte Atlantique Marocaine) et la détermination de la période de récolte où ces algues présentent le maximum d'activité.

Méthodologie et résultats : Pour cela, l'activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries Gram-positive et Gram-négative et l'activité antifongique vis-à-vis d'un champignon *Cryptococcus neoformans* ont été évaluées chez 19 espèces d'algues. 11 espèces d'entre elles ont montré une activité antibactérienne intéressante, par contre seule l'espèce *Laminaria ochroleuca* a montré une activité antifongique significative. Dans un deuxième temps, les activités antibactérienne et antifongique de ces algues bioactives ont été évaluées au cours des quatre saisons, nous avons observé que les plus importantes activités ont été trouvées dans les extraits d'algues récoltées au printemps.

Conclusion et application : Par ailleurs, la récolte des algues présentant une activité antimicrobienne intéressante destinées par la suite à la purification des molécules actives doit avoir lieu pendant le printemps.

Mots clés : algues marine, activités antibactérienne, activité antifongique, lagune, côte Atlantique Marocaine.

ABSTRACT:

Objective: This work aims at the screening of the antimicrobial activity of the marine algae of the lagoon of Oualidia (Moroccan Atlantic coast) and the determination of the period of collection when these algae present the maximum activity.

Methodology and results: The antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria and the antifungal activity against *Cryptococcus neoformans* were evaluated for 19 species of algae. An interesting antibacterial activity was observed in 11 species; in contrast a significant antifungal activity was showed only in the species *Laminaria ochroleuca*. In order to optimize the period of harvest, the antibacterial activity and antifungal was evaluated all along the year, the most important activity was observed in the extracts of algae collected in spring. **Conclusion and Application:** thus the collection of the algae destined for the purification of the active compounds must take place during spring.

Keywords: algae, antibacterial activity, antifungal activity, lagoon, Moroccan Atlantic coast.

INTRODUCTION :

Les algues occupent une place importante dans le milieu marin avec plus de 1200 espèces appartenant à tous les niveaux évolutifs, capables de produire des substances dont l'action constitue dans certains cas, un élément de protection contre les prédateurs naturels. Les algues marines constituent un énorme réservoir de molécules naturelles potentiellement actives (Rajeev. and Xu Z. 2004, Blunt *et al.* 2006; 2008; 2009), des études ont permis d'isoler et d'identifier un très grand nombre de molécules nouvelles de grande originalité structurale et dont beaucoup d'entre elles ont une activité biologique intéressante. Sur le plan pharmacologique, la présence de différentes activités a été mise en évidence depuis longtemps chez plusieurs espèces d'algues marines (Bhakuni et Silva 1974; Hodgson, 1984 ; Ballesteros *et al.* 1992, Arisawa, 1997). L'activité antibactérienne, antivirale, antitumorale et d'autres propriétés comme celle qui entre dans la régulation du taux du cholestérol sanguin ou dans la régulation du système immunitaire ont été également étudiées (Faulkner, 2001; Newman *et al.* 2003; Park *et al.* 2005; Mayer 2007). L'un des premiers produits isolés à partir des algues est l'acide kaïnique de l'algue rouge *Digenea simplex*, qui a montré une activité contre certains vers parasites (Ueno *et al.* 1955).

MATERIEL ET METHODES

Présentation du site de récolte : La récolte des algues a eu lieu dans la lagune d'Oualidia pendant le mois de mars 2006 dans un premier temps, puis durant l'année 2007 pour l'étude de la variation saisonnière. La lagune d'Oualidia (9°02'50" de longitude Ouest, 32°44'42" de latitude Nord) est située sur la façade atlantique marocaine, sa largeur est d'environ 0,5 Km, sa longueur de 7 Km et sa profondeur moyenne à marée haute est de 5 m. La superficie totale de la lagune est estimée à 3 Km² (Orbi *et al.* 1995). Elle communique avec l'océan par deux passes : l'une principale est permanente, l'autre secondaire n'est active qu'en pleine mer de vive eau. Le régime hydrodynamique de la lagune est soumis au rythme des marées semi-diurnes et influencé par les upwellings côtiers.

L'origine végétale des principes actifs isolés à partir des algues constitue par ailleurs, un avantage réel et important à une époque où les ingrédients d'origine animale ne sont plus réellement d'actualité.

La grande diversité de la flore marine et la richesse spécifique font des côtes et des lagunes marocaines un véritable réservoir d'espèces végétales et animales dont le potentiel et l'intérêt économique sont considérables.

Les résultats des recherches sur les propriétés pharmacologiques des algues marines de la côte d'El Jadida (Bultel *et al.* 2002; Etahiri *et al.* 2001, 2003, 2004, 2007; El Kouri *et al.* 2004), constituent des pistes prometteuses de développement, notamment dans les domaines des antibactériens, des anti-inflammatoires, voir des anti tumoraux à plus long terme. Dans le but d'élargir cette étude, les algues de la lagune Oualidia (70 Km vers le sud de la côte d'El Jadida) ont été récoltées. L'activité antibactérienne et antifongique de 19 espèces d'algues a été évaluée, l'effet de la période de récolte sur le degré de ces activités est également étudié afin d'optimiser la période de récolte. Cette étude rentre dans le cadre d'un programme de recherche de nouvelles substances naturelles d'origines marines et biologiquement actives que nous avons entamé depuis L'année 2000.

Récolte du matériel algal et préparation des extraits

: Pour cette étude, 19 espèces d'algues ont été récoltées de la lagune d'Oualidia, elles appartiennent aux trois classes de macroalgues : Rhodophycées, Phéophycées et Chlorophycées.

Rhodophycées: *Asparagopsis armata* Harvey, *Corallina officinalis* Ellis and Solander, *Gelidium sesquipedale*, (Turner), *Gelidium spinolosum*, Kutzing, *Gigartina acicularis* (Roth) Lamouroux, *Gracillaria multipartida* (Clemente y Rubio) Harvey, *Halopityis incurvus* (Hudson) Batters, *Laurencia pinatifida*, Hudson et *Plocamium coccineum*, P.S. Dixon.

Phéophycées: *Bifurcaria bifurcata* Ross, *Cystoseira humilis* Kutzing, *Cystoseira tamariscifolia* (Hudson) Papenfuss, *Fucus spiralis* Linnaeus, *Sacchoriza polyschides* = *S. bulbosa* (Lightfoot) Batters et *Laminaria ochroleuca* de la Pylaie,

Chlorophycées: *Codium tomentosum* Stackhouse, *Enteromorpha linza* (Linnaeus) J. Agardh, *Ulva crispa* Lightfoot et *Ulva lactuca* C. Agardh,

Après la récolte, les algues sont lavées plusieurs fois à l'eau distillée afin d'éliminer tout corps étranger qui pourrait influencer l'évaluation des activités biologiques. Les algues sont ensuite séparées, identifiées puis séchées. Pour chaque espèce, la poudre d'algue préparée est extraite dans un mélange dichlorométhane /méthanol : 50/50 à raison de 5g de poudre d'algue/ml de solvant selon le protocole d'extraction décrit par Caccamese *et al.* (1979). Les extraits sont ensuite filtrés sur papier wattman N°1 puis évaporés dans un évaporateur rotatif. Les extraits secs obtenus sont conservés à 4°C jusqu'à utilisation pour les tests biologiques.

Recherche de l'activité anti-microbienne : *Micro-organismes utilisés :*

Les germes qui ont fait l'objet des tests antimicrobiens font partie des microorganismes rencontrés en pathologie humaine. Il s'agit de souches bactériennes et fongiques répertoriées dans des centres de culture. Ces souches proviennent de la collection de culture de l'institut Pasteur de Strasbourg en France (CIP) et de la collection ATCC (American Type Culture Collection). Les espèces bactériennes à Gram positif testés sont : *Bacillus cereus* CIP 783, *Staphylococcus aureus ssp aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 10536 comme bactérie à Gram négatif et *Cryptococcus neoformans* ATCC11576 comme champignon.

RESULTATS

Ce résultat montre l'abondance au niveau de la lagune des algues rouges par rapport aux algues brunes et algues vertes, ce même ordre de distribution a été observé lors de l'étude réalisée sur la côte d'El Jadida par Berdy (1989). Toutefois de nombreuses espèces présentes au niveau de la côte d'El Jadida (143 espèces ont été répertoriées) sont absentes au niveau de la lagune. D'autre part, des espèces telles que : *Chondrus crispus*, *Palmaria palmata*, *Sacchoriza polyschides*, *Enteromorpha linza* et *Ulva crispa* ont été retrouvées uniquement au niveau de la lagune. Cette différence au niveau de l'abondance et la diversité des espèces peut être expliquée par la différence de la situation géographique des deux sites de récolte.

La côte d'El Jadida présente une façade maritime importante s'étendant sur plus de 40 km de longueur, avec des eaux constamment renouvelées et enrichies en sels minéraux et en oxygène apportés par les cou-

Le choix de ces germes est basé sur les résultats obtenus lors de l'étude réalisée sur les algues récoltées de la côte des Doukkala (Etahiri *et al.* 2003).

Mesure de l'activité antimicrobienne : La détermination des propriétés anti-microbiennes des algues marines est effectuée par le biais d'antibiogrammes réalisés en boîte de pétri sur gélose nutritive préalablement ensemencée par inondation avec chacun des germes tests. L'activité antimicrobienne est ensuite quantifiée selon la méthode décrite par Bauer *et al.* (1966) en utilisant des disques de cellulose. Ainsi, des quantités de 100 µg à 500 µg de l'extrait à analyser sont déposées sur le disque de papier cellulose, après évaporation du solvant ces disques sont appliqués directement sur une boîte de pétri préalablement ensemencée par la souche-test concernée. Après 16 h d'incubation à 37°C, l'activité antibactérienne est mesurée comme étant le diamètre (en mm) de la zone d'inhibition qui apparaît autour des pastilles. L'activité antifongique est évaluée de la même façon après 24 h d'incubation à 27°C. Des disques imprégnés d'antibiotiques standard tels que le chloramphénicol, la streptomycine ou la tétracycline sont utilisés (à 50 ou à 100 µg/ml) comme témoins dans les tests de l'activité antibactérienne. L'amphotéricine B (à 200 µg/ml) est utilisée comme témoin dans les tests de l'activité antifongique. D'autre part, des disques imprégnés du solvant seul sont utilisés comme référence.

rants favorisant ainsi une production primaire très importante en comparaison à celle existante dans la lagune qui ne communique avec l'océan que par deux passes dont une n'est active qu'en pleine mer de vive eau.

D'un autre côté, cette répartition serait également sous l'influence de divers facteurs écologiques tels que le substratum, la température de l'eau, la lumière, l'action des vagues, la salinité et le pH (Fang *et al.* 1996).

Evaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits d'algues : L'ensemble des extraits d'algues a été soumis à un test antibactérien vis-à-vis de *B. cereus* CIP 783, *S. aureus ssp aureus* ATCC 653 et *E. coli* ATCC 10536. Une activité d'un diamètre d'inhibition supérieur à 10 mm a été observée chez 11 espèces dont :

6 Algues rouges : *Asparagopsis armata*, *Gelidium sesquipedale*, *Gelidium spinolosum*, *Gigartina acicularis*, *Halopityx incurvus* et *Plocamium coccineum*,

3 Algues brunes: *Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira humilis* et *Laminaria ochroleuca*

2 Algues vertes: *Enteromorpha linza* et *Ulva lactuca*.

Une activité antifongique significative vis-à-vis de *C. neoformans* a été observée uniquement dans le cas de *Laminaria ochroleuca*. Une faible activité a été détectée pour *Gelidium sesquipedale*, *Gelidium spinolosum*, *Halopityx incurvus*, *Plocamium coccineum*, *Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira humilis*, *Cystoseira tamariscifolia*, *Sacchoriza polyschides*, *Codium tomentosum* et *Enteromorpha linza* (tableau 1).

Pour certaines espèces, les activités évaluées sont identiques à celles obtenues pour ces mêmes algues récoltées sur la côte d'El Jadida, c'est le cas de *Halopityx incurvus* et *Bifurcaria bifurcata*, par contre pour *Cystoseira tamariscifolia*, *Cystoseira humilis* et *Fucus spiralis* l'activité obtenue est inférieure à celle évaluée chez celles récoltées de la côte d'El Jadida.

La différence dans les résultats obtenus pour l'activité antimicrobienne chez ces algues marines montre l'implication des facteurs intrinsèques de l'espèce et des facteurs environnementaux dans le métabolisme des algues et qui affectent de façon notable la présence de tel ou tel composé bioactif responsable de ces activités.

Tableau 1 : Evaluation de l'activité antimicrobienne dans les différents extraits d'algues

Algues étudiées	Activité antimicrobienne des extraits d'algues évaluée vis-à-vis des différents microorganismes			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. neoformans</i>
Rhodophycées				
<i>Asparagopsis armata</i>	++	++	-	-
<i>Corallina officinalis</i>	+	+	-	-
<i>Gelidium sesquipedale</i>	+++	++	+	+
<i>Gelidium spinolosum</i>	+++	++	+	+
<i>Gigartina acicularis</i>	++	+	-	-
<i>Gracillaria multipartida</i>	+	+	-	-
<i>Halopityx incurvus</i>	++	+++	-	+
<i>Laurencia pinnatifida</i>	-	-	-	-
<i>Plocamium coccineum</i>	++	+	-	+
Phéophycées				
<i>Bifurcaria bifurcata</i>	+++	+++	+	+
<i>Cystoseira humilis</i>	++	+	-	+
<i>Cystoseira tamariscifolia</i>	+	+	-	+
<i>Fucus spiralis</i>	+	+	-	-
<i>Laminaria ochroleuca</i>	++	+	-	++
<i>Sacchoriza polyschides</i>	-	-	+	+
Chlorophycées				
<i>Codium tomentosum</i>	-	-	-	+
<i>Enteromorpha linza</i>	++	+	-	+
<i>Ulva crispa</i>	-	-	-	-
<i>Ulva lactuca</i>	++	+	-	-

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

Effet de certains paramètres physicochimiques sur l'activité antimicrobienne : Dans le milieu naturel, la

lumière, la température, les sels minéraux et les mouvements de l'eau constituent les paramètres écologi-

ques essentiels dans la détermination de la fertilité des algues, la lumière et la température sont à l'origine d'une variation saisonnière et spatiale de la flore algale, elles agissent aussi bien sur la croissance des algues que sur leurs caractères morphologiques. La température dont les fluctuations sont essentiellement liées aux saisons, constitue un facteur déterminant du cycle saisonnier de la flore marine. Dans ce contexte, il a été montré que la croissance des algues n'est pas identique tout au long de l'année, elle est maximale quand les conditions de lumière et de température sont favorables, c'est le cas dans les régions tempérées où la fertilité d'un grand nombre d'espèces est maximale au printemps et en automne (Viyavathi & Sridar, 1991), toutefois quelques espèces sont connues pour leur fertilité toute l'année.

Cette phase de croissance active et de maturité sexuelle de l'algue correspond à la période de synthèse des métabolites secondaires responsables des activités biologiques (Hornsey & Hide, 1985). Par conséquent l'influence des paramètres écologiques sur la biologie et la physiologie des algues peut atteindre également la production des métabolites secondaires.

Afin d'étudier cette relation entre l'activité antibactérienne, la saison de récolte et certains paramètres physicochimiques tels que la température, la concentration d'oxygène dissous et la salinité, l'activité antibactérienne vis-à-vis de *B. cereus* et antifongique vis-à-vis de *C. neoformans* ont été évaluées tout le long de l'année pour les espèces ayant montré une activité inhibitrice supérieure à 10mm, les résultats obtenus sont rapportés dans les figures: 1a, 1b; 2a, 2b et 3a, 3b.

Dans les figures 1a et 1b, l'évolution de la température des eaux de surface au cours de l'année 2007 montre une variation saisonnière : l'hiver ou les eaux sont plus fraîches, la température de l'eau de mer est faible environ 16°C et augmente progressivement pendant le printemps pour atteindre des maxima pendant l'été d'environ 19°C. Le maximum d'activité antibactérienne vis-à-vis de *B. cereus* et antifongique contre *C. neoformans* est atteint quand la température de l'eau est d'environ 17°C, valeur enregistrée pendant le printemps pour les trois classes d'algues, pour les chlorophycées cette activité est maintenue au même niveau au cours de la période d'été et chute en automne.

Figure 1a: Variation de l'activité anti-*B. cereus* en fonction de la température

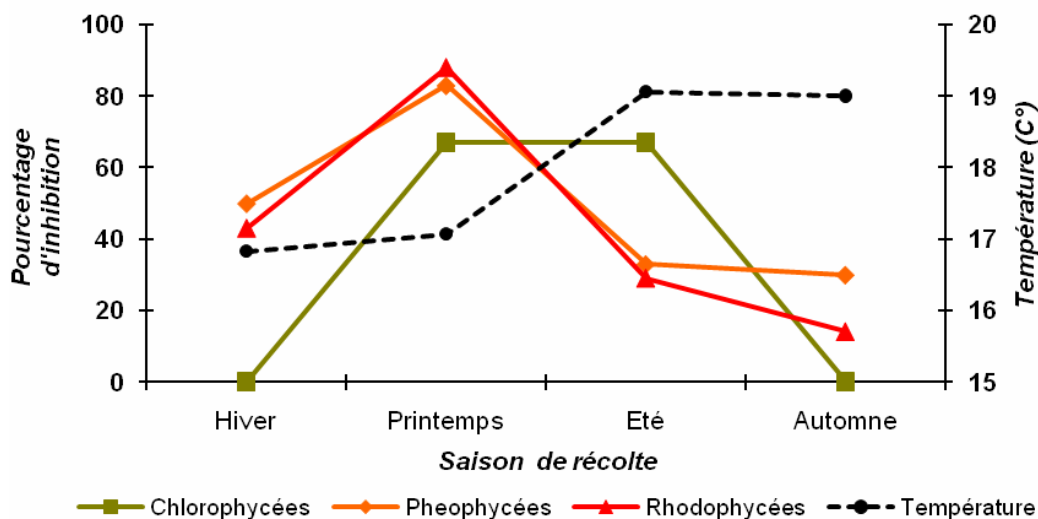
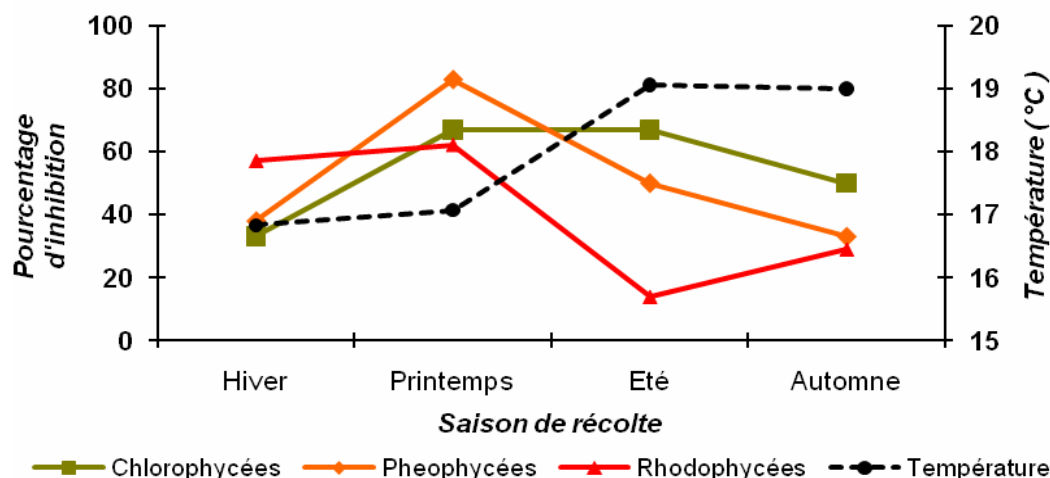


Figure 1b: Variation de l'activité anti-*C. neoformans* en fonction de la température



Dans les figures 2a et 2b, on constate que les eaux de la lagune d'Oualidia ne présentent pas de valeurs en oxygène dissous inférieur à 8 mg.l⁻¹, la plus basse concentration est enregistrée pendant l'automne avec une valeur de 8,2mg.l⁻¹. Les valeurs maximales de

13,93 mg.l⁻¹ sont enregistrées pendant le printemps. Une variation des activités parallèle à la variation de la concentration de l'oxygène dissous est observée avec également un maximum pendant le printemps.

Figure 2a: Variation de l'activité anti-*B. cereus* en fonction de la concentration de l'oxygène dissous

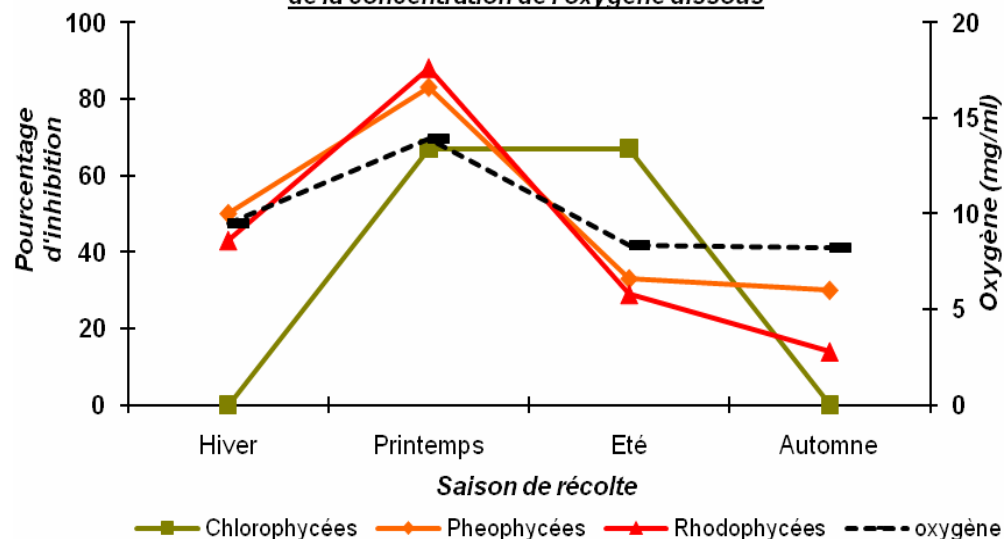
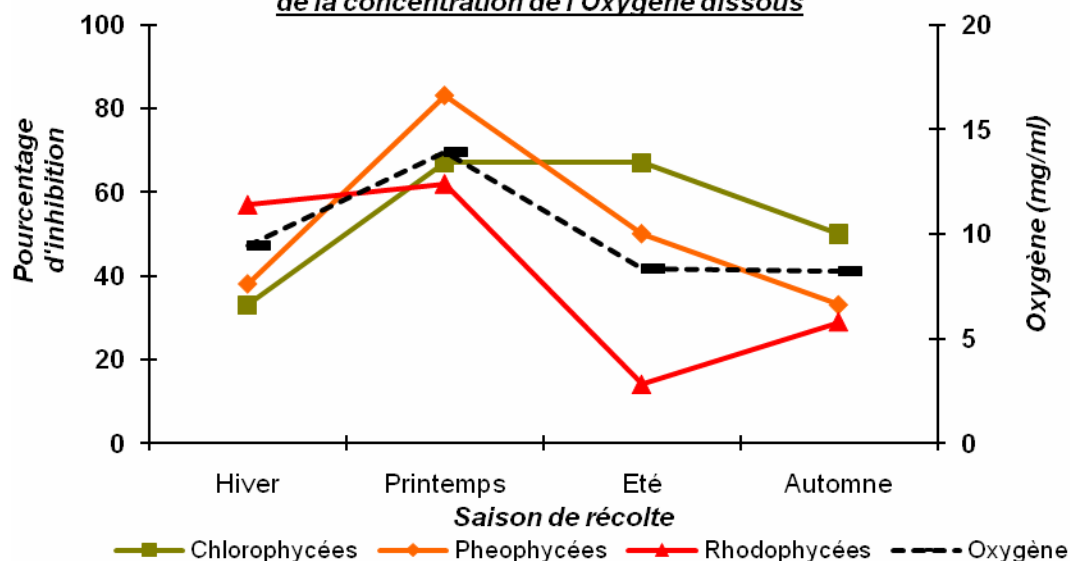


Figure 2b: Variation de l'activité anti-*C. neoformans* en fonction de la concentration de l'Oxygène dissous



Les figures 3a et 3b montrent la variation de l'activité anti *B. cereus* et l'activité anti *C. neoformans* en fonction de la salinité. La salinité la plus faible est enregistrée

pendant le printemps avec une valeur maximale de 37,3 pendant l'été, le maximum d'activité est enregistré quand la salinité est à son minimum.

Figure 3a : Variation de l'activité anti-*B. cereus* en fonction de la salinité

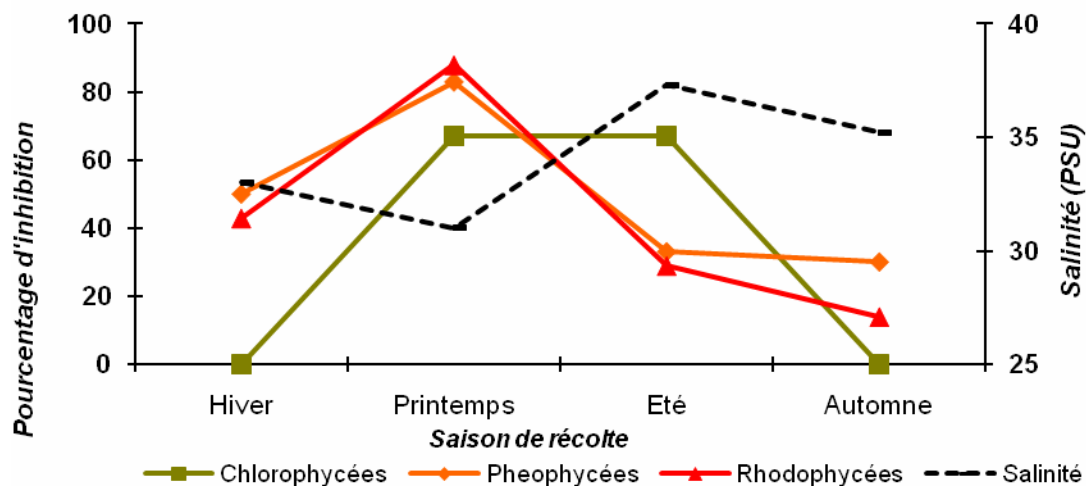
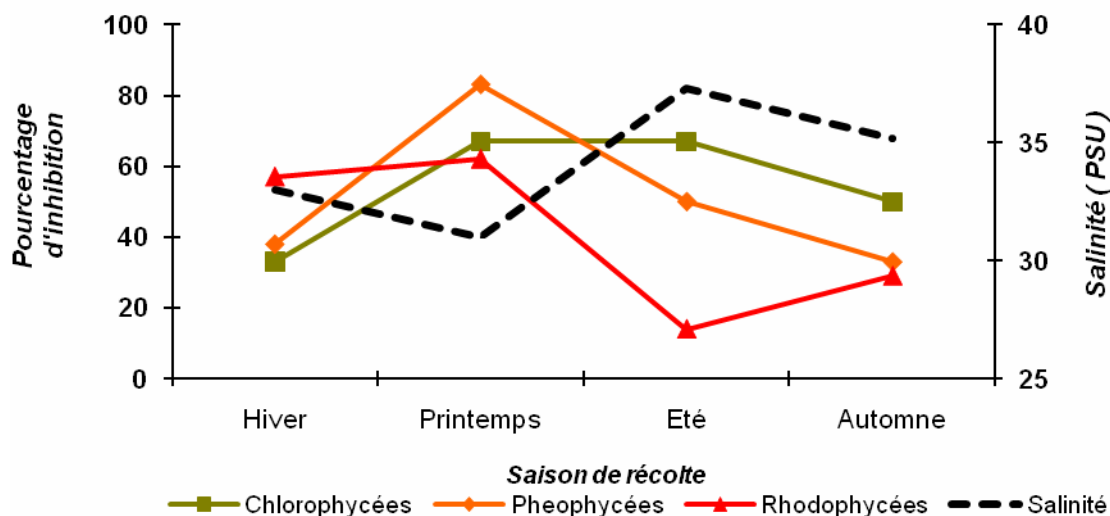


Figure 3b: Variation de l'activité anti-*C. neoformans* en fonction de la salinité



Ce résultat confirme l'influence des paramètres physicochimiques sur l'activité antimicrobienne des algues, des résultats similaires ont été signalés dans les travaux réalisés par Moreau *et al.* (1988) et par Padmakumar *et al.* (1997). Dans ces travaux, plusieurs causes ont été évoquées et en premier lieu le rôle des paramè-

tres écologiques induits par les facteurs climatiques sur la biologie et la physiologie des espèces, spécialement sur la production des métabolites secondaires (Hornsey & Hide, 1985). Pour les algues récoltées de la lagune d'Oualidia, ces produits sont synthétisés pendant le printemps

CONCLUSION

Cette étude montre des fluctuations saisonnières de l'activité antimicrobienne chez les trois classes d'algues dues 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.

En conclusion, certaines espèces d'algues de la lagune d'Oualidia constituent une bonne source de molécules

actives. La récolte des algues destinées à cette utilisation doit avoir lieu pendant le printemps et ne doit pas dépasser le mois de juin, car après cette période la température et la salinité augmentent et les algues dégénèrent et deviennent moins actives.

REMERCIEMENTS :

Nous remercions " International Fondation for Science " IFS (bourse F/3275-2) et l'Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons (OPCW), pour le cofinancement de ce travail.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- Arisawa M, Hayashi K, Nikaido T, Koike K, Fujita D, Nunomura N, Tanaka M, Sazaki T, 1997. Screening of some Marine organism extracts for cAMP phosphodiesterase inhibition, cytotoxicity and antiviral activity against HSV-1. International Journal of pharmacognosy 35 (1): 6-11.
- Ballesteros E, Martin D, Uriz MJ, 1992. Biological activity of extracts from some Mediterranean macrophytes. Botanica Marina 35: 481-485.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck C, 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized disk method. American Journal of Clinical Pathology 45: 493 -495.
- Berdy N, 1989. Contribution à l'étude écologique du phytobenthos de la zone littorale de la région

- d'El Jadida. Thèse de 3^{ème} cycle, Faculté des sciences Rabat- Maroc 170 pages.
- Bhakuni DS, and Silva M, 1974. Biodynamic substances from Marine Flora. *Botanica Marina* 17: 40-51.
- Blunt JW, Copp BR, Munro MH, Northcote PT, Prinsep MR, 2006. Marine natural products. *Naturals Products Reports* 22: 15-61.
- Blunt JW, Copp RB, Hu WP, Munro MH, Northcote PT, Prinsep MR, 2008. Marine natural products. *Naturals Products Reports* 25: 35-94.
- Blunt JW, Copp RB, Hu WP, Munro MH, Northcote PT, Prinsep MR, 2009. Marine natural products. *Naturals Products Reports* 26: 170-244.
- Bultel-Poncé V, Etahiri S, Guyot M. 2002. New ketosteroids from the red alga *Hypnea musciformis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12: 1715-1718.
- Caccamese S and Azzolina R, 1979. Screening for antimicrobial activities in marine algae from Eastern Sicily. *Planta Medica* 37: 333-339.
- El Kouri A, Bultel-Ponce V, Assobhei O, Etahiri S, 2004. Etude de la variation saisonnière de l'activité antimicrobienne et anti-inflammatoire chez quelques espèces d'algues marines de la côte Atlantique Marocaine. *Review of Biology and Biotechnology* 3 (1): 29-36.
- Etahiri S, Bultel-Ponce V, Assobhei O, 2004. Une nouvelle molécule à activité antibiotique à partir de l'algue rouge *Pterosiphonia complanata*. *Brevet Marocain N° 27732*.
- Etahiri S, Bultel-Ponce V, Elkouri A, Assobhei O, Zaoui D, Guyot M, 2003. Antibacterial Activities of Marine algae from the Atlantic Coast of Morocco. *Marine life* 13 (1-2):3-9.
- Etahiri S, Bultel-Poncé V, Caux C, Guyot M, 2001. New bromoditerpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*. *Journal of Natural Product* 64: 1024-1027.
- Etahiri S, El Kouri A, Bultel-Ponce V, Guyot M, Assobhei O, 2007. Antibacterial bromophenol from the marine red alga *Pterosiphonia complanata*. *Natural Product communication* 2 (7): 749-752.
- Fang P, Boyer KE, Desmond JS, Zedler JB, 1996. Salinity stress, nitrogen competition, and facilitation: what controls seasonal succession of two opportunistic green macroalgae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol* 206: 203-221.
- Faulkner DJ, 2001. Marine natural products. *Naturals Products Report* 18: 1-49.
- Hornsey IS. and. Hide D, 1985. The production of antimicrobial compounds by British marine algae IV. Variation of antimicrobial activity with algal generation. *British Phycology Journal* 20: 21-25.
- Hodgson LM, 1984. Antimicrobial and antineoplastic activity in some South florida seaweed's. *Botanica Marina* 27: 387- 390.
- Mayer AMS, 2007. Marine pharmacology in 2003-4: marine compound with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology* 145: 553-581.
- Moreau J, Pesando D, Bernard P, Caram B, Pionnay JC, 1988. Seasonal variations in the production of antifungal substances by some dictyotales (brown algae) from the French Mediterranean Coast. *Hydrobiologia* 162: 157-162.
- Newman DJ, Crag GM, Snader KM, 2003. Natural Products as sources of new drugs over the period 1982-2002. *Journal of Natural Product* 66: 1022-1037.
- Orbi A, Lakhdar J, Rharbi N, 1995. Etude de l'écosystème de la lagune de Oualidia. *Tra-vaux de documentation de l' INRH*, 82: 70 p.
- Padmakumar K. and Ayyakkannu K, 1997. Seasonal Variation of antibacterial and antifungal activities of the extracts of marine algae from Southern Coasts of India. *Botanica. Marina* 40: 507-515.
- Park HJ, Kurokawa M, Shiraki K, Nakamura N, Choi JS, Hattori M, 2005. Antiviral active of the marine alga *Symphyocladia latiuscula* against herpes simplex virus (HSV-1) in vitro and its therapeutic efficacy against HSV-1 infection in mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28: 2258-2262.
- Rajeev KJ. and Xu Z, 2004. Biomedical compounds from marine organisms. *Marine Drug* 2: 123-146.
- Ueno NH, Ueganagi J, Morimoto H, Nakamori R, Matsuoka T, 1955. Studies on the active compounds of *Digenea simplex* ag and related compounds. *J. Pharmacol. Soc. Jpn.* 75: 807-844.

Vidyavathi N. and Sridhar KR, 1991. Seasonal and geographical variations in the antimicrobial activity of seaweeds from the Mangalore coast of India. *Botanica Marina* 34: 279- 284.