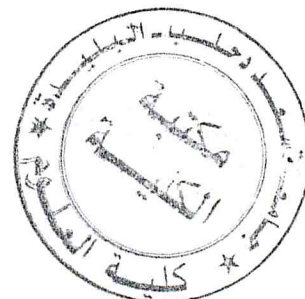


République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université BLIDA 1
Faculté des Sciences
Département de Chimie



Mémoire présenté par

HAMICHE Sonia

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière

Filière : Chimie

Option : Chimie des Substances Naturelles

Titre

**Développement d'un procédé d'extraction vert
appliqué à l'algue brune *Zonaria tournefortii* : Etude
chimique et biologique**

Soutenu publiquement en 09 octobre 2013 devant le jury composé de :

Y. Daghbouche	Pr	Président	Université de Blida
K. Boutemak	MCB	Examineur	Université de Blida
Z. Chemat	MCB	Examineur	Université de Blida
M. El Hattab	Pr	Promoteur	Université de Blida
H. Boutoumi	MCA	Membre CP	Université de Blida
S. Kasmi	MCA	Membre CP	Université de Blida
N. Bouzidi	MCB	Membre CP	Université de Blida
O. Touafak	MCB	Membre CP	Université de Blida
N. Ayachi	MAA	Membre CP	Université de Blida

Promotion 2012-2013



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement Mr M. EL HATTAB, Professeur à l'université Blida 1, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, et qui, durant ces deux années m'a gratifiée de son savoir et son aide scientifique avec générosité. Je lui suis profondément reconnaissante pour avoir accepté de m'encadrer, pour m'avoir orientée et prodiguée ses précieux conseils et critiques qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Mes remerciements vont également au Pr. Y. DAGHBOUCHE, et au Dr. N. BOUZIDI, pour leur gentillesse, leurs aides et leurs précieux conseils.

J'adresse mes remerciements particuliers à Mme S. KASMI, Responsable du Master Chimie des Substances Naturelles, et lui voue tous mes respects pour sa modestie, son aide et sa précieuse présence pour l'accomplissement de mon travail.

Je tiens à exprimer mes remerciements au Pr. Y. DAGHBOUCHE, pour l'honneur qu'elle ma fait en acceptant de présider le jury de soutenance.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres du jury Dr. K. BOUTEMAK et Dr. Z. CHEMAT qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Dr. AMARI et à Mr. CHERIF, de m'avoir permis de réaliser les tests d'activité antimicrobienne et antioxydante au sein de leurs unités. Je leurs suis grée pour leurs aides, leur gentillesse et leur modestie. Je remercie également Mr Taha pour sa disponibilité et son aide dans la réalisation de ces tests.

J'adresse également mes sincères remerciements au personnel du laboratoire d'analyse du Département de Chimie industrielle, et tout particulièrement Mme Nafissa de m'avoir reçue au sein du Laboratoire.

De même, je tien également à adresser mes remerciements à Mme Z. HOUMANI, Professeur à l'Université Blida 1, pour m'avoir accueillie au sein du son Laboratoire des plantes médicinales et aromatiques.

Je voudrais également adresser mes sincères remerciements à Mr BOUTOUMI, maître de conférences à l'université Bida 1, pour sa modestie, sa disponibilité et sa sincérité pour nous avoir transmis son savoir.

Je remercie sincèrement tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont apporté leurs aides en particulier, Dr ABDELGHAFOUR, Mme ISYAKHEM, Mme KASRI, Mme EL HAOUARI, Mr et Mme AIT YAHIA.

En guise de reconnaissance, mes sincères remerciements se dirigent vers les membres de ma famille ainsi que tous mes amis.

Je ne pouvais finir sans remercier très fortement mes parents, pour leurs aides, leur soutien moral et leurs encouragements. Je leur exprime toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude.

Résumé

Le présent travail porte sur le développement d'une technique d'extraction « verte » appliquée à l'algue brune *Zonaria tournefortii*, basée sur l'utilisation d'un « agro-solvant » en l'occurrence le 1,8-cinéole. Un autre extrait a été préparé par la voie classique en utilisant le mélange de solvant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (v/v : 1/1). La composition chimique de l'algue brune *Zonaria tournefortii* est dominée par des composés phénoliques dérivants du phloroglucinol. De ce fait, la nature chimique des extraits obtenus, ainsi que leurs activités biologiques ont été comparées sur la base de plusieurs mesures : (i) la teneur en composés phénoliques totaux mesurée par le test colorimétrique de Folin-Ciocalteu (ii) l'analyse par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) (iii) l'activité antioxydante évaluée par la mesure du pouvoir antiradicalaire par le test DPPH (2,2-diphenyle-1-picrylhydrazyle) et du pouvoir réducteur de fer ferrique (FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power), et en fin (iiii) les activités antimicrobiennes (antibactérienne et antifongique) évaluées par la méthode de diffusion sur gélose.

Mots clés : Zonaria tournefortii, agro-solvant, 1,8-cinéole, composés phénoliques, Folin-Ciocalteu, CLHP, activité antioxydante, DPPH, FRAP, activité antimicrobienne.

Abstract

This present work focuses on the development of a « green » extraction technique applied to the brown algae *Zonaria tournefortii*, based on the use of 1,8-cineole as a « agro-solvent ». Another extract was prepared using classical solvent, in this case CH₂Cl₂/MeOH (v / v: 1/1). The chemical composition of the brown alga *Zonaria tournefortii* is dominated by phenolics compounds deriving from phloroglucinol. Therefore, the chemical nature of the extracts obtained and their biological activities were compared on the basis of several measurements: (i) the total phenolic content measured by the colorimetric Folin–Ciocalteu assay (ii) Analysis by high performance liquid chromatography (HPLC) (iii) antioxidant activities assessed by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay, and ferric reducing power (FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power), and finally (iiii) antimicrobial activities (antibacterial and antifungal) assessed via the diffusion method on agar.

Keywords: *Zonaria tournefortii*, agro-solvent, 1,8-cineole, phenolics compounds, Folin-Ciocalteu, HPLC, antioxidant activity, DPPH, FRAP, antimicrobial activity.

ملخص

يتمحور هذا العمل حول تطوير تقنية خضراء للاستخلاص مطبقة على الطحلب البني "زوناريا توغنيفورتي"، تستند على استخدام مذيب زراعي متمثل في 8,1 سينيول. لقد تم إعداد مستخلص آخر بالاعتماد على الطريقة التقليدية باستعمال مزيج المذيبات (CH₂Cl₂ / MeOH (1/1 : V/V).
تُهيمن المركبات الفينولية المشتقة من "الفلوروقلوسينول" على التركيبة الكيميائية للطحلب البني "زوناريا توغنيفورتي"، ولهذا فلقد تمت مقارنة الطبيعة الكيميائية للمستخلصات المتحصل عليها و انشطتها البيولوجية بالاعتماد على العديد من المعايير:

- مردود المركبات الفينولية الشاملة المقاسة بواسطة الفحص اللوني فولان - سيوكالتو.
- التحليل بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الفعالية.
- النشاط المضاد للأوكسدة المقيم من خلال اختبار DDPH (2,2- دي فينيل -1- بكريل هيدرازيل) و خاصية إرجاع مركب الحديد الفيري (FRAP) .
- النشاطات المضادة للمكروبات (المضادة للبكتيريا و المضادة للفطريات) المقيمة بواسطة طريقة الانتشار على الهلام.

الكلمات الرئيسية: زوناريا توغنيفورتي, مذيب زراعي, 8,1 سينيول, مركبات فينولية, فولان - سيوكالتو, الكروماتوغرافيا السائلة عالية الفعالية, النشاط المضاد للأوكسدة, DDPH, FRAP, النشاطات المضادة للمكروبات.

Liste des abréviations

ABS	: Absorbance
ATCC	: American Type Culture Collection
BHA	: Butyl-hydroxyanisol
BHT	: Butyl-hydroxytoluène
°C	: Degré Celsius
CCM	: Chromatographie sur Couche Mince
CE₅₀	: Concentration effective correspondant à une inhibition de 50% de l'adhésion bactérienne
CLHP	: Chromatographie Liquide à Haute Performance
COV	: Composés Organiques Volatils
CPE	: Extraction de Partition Centrifuge
DAD	: Détecteur à barrette de Diode
DIR	: Détecteur à Indice de Réfraction
DMSO	: Dimethylsulfoxyde
DPPH	: 2,2-Diphenylpicrylhydrazyl
DSR	: Déviation Standard Relative
EAG	: Equivalent en Acide Galique
EAR	: Efficacité Anti-radicalaire
EPG	: Equivalent en Phloroglucinol
EPS	: Extraction en Phase Solide
FC	: Folin-Ciocalteu
FRAP	: Ferric Reducing Antioxydant Power
g	: Gramm
IRTF	: Infrarouge à Transformer de Fourier
L.D	: Limite de Détection
L.Q	: Limite de Quantification
MAE	: Extraction Assistée par Microonde
min	: Minute
nm	: Nanomètre
NP	: Normal Phase
PEG	: Polyéthylène glycol
PG	: Phloroglucinol
pH	: Potentiel Hydrogène

PLE	: Extraction par fluide Pressurisé
Rf	: Facteur de Rétention
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	: Radicaux libres oxygénés
RP	: Reversed Phase
RSA	: Radical Scavenger Activity
SDEP	: Extraction par Distillation Simultanée
SM	: Spectrométrie de Masse
SPE	: Extraction par fluide supercritique
UV	: Ultra - Violet
Vis	: Visible
Vit C	: Vitamine C
W	: Weight : poids
µm	: Micromètre
%	: Pourcent

Liste des figures

Figure 1	<i>Zonaria tournefortii</i>	7
Figure 2	Protocoles de dosage des phénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu	16
Figure 3	Dérivés du phloroglucinol isolés de <i>Zonaria farwolii</i>	18
Figure 4	Dérivés du phloroglucinol isolés de <i>Zonaria tournefortii</i>	19
Figure 5	Dérivés du phloroglucinol isolés de <i>Zonaria diesingiana</i>	19
Figure 6	Dérivés du phloroglucinol isolés de <i>Zonaria crenata</i>	20
Figure 7	Produits isolés des espèces du genre <i>Zonaria</i> possédants des activités biologiques	21
Figure 8	Préparation de l'extrait à partir d'une matière végétale sèche en utilisant un procédé d'extraction classique	26
Figure 9	Préparation de l'extrait à partir d'une matière végétale sèche en utilisant un procédé d'extraction vert	27
Figure 10	Chromatographie sur couche mince des extraits de <i>Zonaria tournefortii</i> obtenus respectivement par extraction classique et par un procédé d'extraction vert	28
Figure 11	Spectres IRTF du 1,8 cinéole préparé dans le CHCl_3 (21,94 mg.ml^{-1})	29
Figure 12	Spectres IRTF du 1,8 cinéole préparé dans le CHCl_3 (21,94 mg.ml^{-1}) (Spectre noir) et des résidus préparés directement dans le CHCl_3 (21,94 mg.ml^{-1}) obtenus après 5 lavages (spectre bleu) et 10 lavages (spectre rose)	30
Figure 13	Spectres IRTF du 1,8 cinéole préparé dans le CHCl_3 (21,94 mg.ml^{-1}) (Spectre noir) et de l'extrait brut obtenu à partir du procédé d'extraction vert après 12 lavages préparé dans le CHCl_3 (26,4 mg.ml^{-1}) (Spectre vert)	31
Figure 14	Diminution de l'intensité de la bande caractéristique du 1,8-Cinéole dans les spectres des résidus obtenus après cinq, dix et douze lavages	31
Figure 15	Spectres IRTF du 1,8 cinéole préparé dans le CHCl_3 (21,94 mg.ml^{-1}) (Spectre noir) et du 1,8 cinéole récupéré après extraction liquide-liquide préparé dans le CHCl_3 (21,94 mg.ml^{-1}) (Spectre rose)	32

Figure 16	Droite d'étalonnage des solutions standards de phloroglucinol allant de 0 à 0,08 mg.ml ⁻¹ obtenue par le test de Folin-Ciocalteu	34
Figure 17	Histogrammes, exprimés en mg d'équivalence de phloroglucinol par grammes d'extrait sec (mg.PGE/g), illustrant la teneur en composés phénoliques totaux (TPC) des extraits obtenus à partir du procédé d'extraction classique et du procédé d'extraction vert	35
Figure 18	Chromatogramme en CLHP de l'extrait classique obtenu avec un détecteur Réfractométrique (DIR)	36
Figure 19	Produits isolés à partir de l'algue brune <i>Zonaria tournefortii</i>	37
Figure 20	Chromatogrammes des fractions 1-6 isolées de l'extrait classique de <i>Zonaria tournefortii</i>	38
Figure 21	Chromatogramme de l'extrait classique	39
Figure 22	Chromatogramme de l'extrait vert	39
Figure 23	Agrandissements de la zone 1 (0 - 3min) des chromatogrammes de l'extrait classique et vert ainsi que celle de la fraction 1 (figure 20)	40
Figure 24	Réduction du radical DPPH• en présence d'un antioxydant	43
Figure 25	Résultats du test antioxydant sur CCM des extraits de <i>Zonaria tournefortii</i> après révélation au DPPH	45
Figure 26	Photographie d'une microplaque obtenue avec le test DPPH	46
Figure 27	Variation du taux de piégeage du DPPH• par l'extrait classique et l'extrait vert de <i>Zonaria tournefortii</i> en fonction des différentes concentrations	47
Figure 28	Variation du taux de piégeage du DPPH• par la vitamine C, BHA et BHT en fonction des différentes concentrations	48
Figure 29	Comparaison des valeurs ARP des extraits de <i>Zonaria tiournefortii</i> et des antioxydants standards	49
Figure 30	Variation du taux de piégeage du DPPH• par les extraits de <i>Zonaria tournefortii</i> obtenus à partir du procédé d'extraction classique, et du procédé d'extraction vert en fonction du temps	50

Figure 31	Histogrammes, exprimés en valeur FRAP, illustrant l'activité antioxydante des extraits de <i>Zonaria tournefortii</i> obtenus à partir du procédé d'extraction classique et du procédé d'extraction vert	53
Figure 32	Aromatogrammes des microorganismes testés avec les extraits classique et vert de <i>Zonaria tournefortii</i>	55
Figure 33	Aromatogrammes des bactéries à Gram positif testées avec l'extrait classique de <i>Zonaria tournefortii</i>	58
Figure 34	Aromatogrammes des bactéries à Gram négatif testées avec l'extrait classique de <i>Zonaria tournefortii</i>	58
Figure 35	Histogrammes illustrant les zones d'inhibition exprimées en millimètre	60
Figure 36	Aromatogrammes des levures testées avec l'extrait classique de <i>Zonaria tournefortii</i>	60

Liste des tableaux

Tableau 1	Solvants d'extraction des composés phénoliques des algues brunes	10
Tableau 2	Séparation des composés phénoliques des algues brunes par CLHP couplée à différents systèmes de détection	14
Tableau 3	Méthodes colorimétriques et d'extractions utilisées dans la quantification des phénols totaux des algues avec la gamme des valeurs mesurées	17
Tableau 4	Caractéristiques organoleptiques des extraits de <i>Zonaria tournefortii</i> obtenus à partir du procédé d'extraction classique et du procédé d'extraction vert	25
Tableau 5	Caractéristiques analytiques de la droite de calibration	34
Tableau 6	Variation des absorbances et du taux de piégeage du DPPH• en fonction des différentes concentrations des extraits de <i>Zonaria tournefortii</i>	47
Tableau 7	Variation des absorbances et du taux de piégeage du DPPH• en fonction des différentes concentrations des standards d'antioxydants	48
Tableau 8	Valeurs CE50 et ARP des extraits de <i>Zonaria tournefortii</i> et des standards antioxydants	49
Tableau 9	Valeurs EAR des extraits de <i>Zonaria tournefortii</i> obtenus à partir du procédé d'extraction classique et du procédé d'extraction vert	51
Tableau 10	Relation entre le diamètre d'inhibition et la sensibilité des souches	56
Tableau 11	Activité antibactérienne de l'extrait classique mesurée à différentes concentrations et exprimée en diamètre d'inhibition (mm)	59

SOMMAIRE

Remerciements	I
Résumé	III
Abstract	IV
ملخص.....	V
Liste des abréviations	VI
Liste des figures	VIII
Liste des tableaux	XI
Introduction	1
Partie I : Synthèse bibliographique	
I. 1 Extraction verte des produits naturels	4
I. 1.1 Définition de la chimie verte	4
I. 1.2 Eco-extraction des produits naturels	4
I. 1.3 Procédés d'extraction verts et solvants alternatifs	5
I. 2 Position systématique de <i>Zonaria tournefortii</i>	7
I. 2.1 Systématique	7
I. 2.2 Description	7
I. 2.3 Biologie	7
I. 2.4 Ecologie	7
I. 3 Etude chimique du genre <i>Zonaria</i>	8
I. 3.1 Généralités sur les produits phénoliques	8
I. 3.2 Extraction, séparation et dosage des produits phénoliques	9
I. 3.2.1 Extraction	9
I. 3.2.2 Séparation	12
I.3.2.2.1 Séparation par chromatographie planaire	12
I.3.2.2.2 Séparation par chromatographie liquide haute performance	12
I. 3.2.3 Dosage	15
I. 3.3 Produits phénoliques des algues brunes du genre <i>Zonaria</i>	18
I. 4 Activités biologiques du genre <i>Zonaria</i>	20

Partie II : Etude expérimentale

II. 1 Introduction	23
II. 2 Extraction et analyse préliminaire par chromatographie sur couche mince	24
II. 2.1 Récolte et traitement du matériel végétal	24
II. 2.2 Extraction.....	24
II. 2.3 Analyse préliminaire par chromatographie sur couche mince (CCM).....	28
II. 3 Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	28
II. 3.1 Spectre infrarouge à transformée de Fourier du 1,8-cinéole.....	29
II. 3.2 Optimisation du nombre de lavages au cours de l'extraction liquide-liquide.....	30
II. 3.2.1 Comparaison des spectres infrarouge à transformée de Fourier des résidus obtenus après cinq et dix lavages.....	30
II. 3.2.2 Détermination de l'absence du 1,8-cinéole dans l'extrait brut obtenu après 12 lavages.....	31
II. 3.3. Spectre infrarouge à transformée de Fourier du 1,8-cinéole récupéré.....	32
II. 4 Estimation du contenu en composés phénoliques totaux (TPC, Total Phenolic Content)	32
II. 4.1 Procédure générale	33
II. 4.2 Résultats et discussions.....	33
II. 5. Analyse par chromatographie liquide à haute performance (CLHP).....	36
II. 5.1. Analyse de l'extrait classique par chromatographie liquide à haute performance couplée à la détection réfractométrique (CLHP-DIR)	36
II. 5.2. Analyse des fractions 1, 3, 4, 5 et 6 par chromatographie liquide couplée à la détection UV-Visible à barrettes diodes (CLHP/DAD-UV)	38
II. 5.3. Analyse des extraits de <i>Zonaria tournefortii</i> obtenus à partir du procédé d'extraction classique, et du procédé d'extraction vert par HPLC/DAD-UV.....	39
II. 6. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de <i>Zonaria tournefortii</i>	42
II. 6.1. Introduction sur l'activité antioxydante.....	42
II. 6.2. Mesure du pouvoir anti-radicalaire par le test DPPH.....	43
II. 6.2.1 Principe de la méthode.....	43
II. 6.2.2 Procédure générale.....	43
II. 6.2.3 Résultats et discussion	45
II. 6.3. Pouvoir réducteur (FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power)	52
II. 6.3.1 Principe de la méthode.....	52
II. 6.3.2 Procédure générale.....	52
II. 6.3.3 Résultats et discussion	53

II. 7 Etude du pouvoir antimicrobien des extraits de <i>Zonaria tournefourtii</i>	53
II. 7.1 Introduction.....	53
II. 7.2 Microorganismes utilisés	54
II. 7.3 Principe de la méthode	54
II. 7.4 Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits classique et vert de <i>Zonaria tournefourtii</i>	54
II. 7.4.1 Procédure générale.....	54
II. 7.4.2 Résultats et discussion	55
II. 7.5 Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait classique de <i>Zonaria tournefourtii</i>	56
II. 7.2.2 Procédure générale.....	56
II. 7.2.3 Résultats et discussion	57
Conclusion	62
Références bibliographiques	65
Annexes.....	77

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

L'importance de l'étape d'extraction dans les procédures analytiques et en particulier dans les industries alimentaire, pharmaceutique et nutraceutique a retenu le plus d'attention au cours des dernières décennies. De ce fait, il est devenu difficile de nos jours de trouver une analyse en recherche ou, une ligne de production en industrie qui, directement ou indirectement, n'utilise pas l'extraction. Toutefois, les méthodes d'extraction classiques existantes souffrent de problèmes technologiques et scientifiques considérables qui sont difficiles à surmonter, tels que la réduction de la consommation d'énergie (l'étape d'extraction nécessite souvent plus de 70% de l'énergie totale du procédé utilisé), et le respect des exigences légales strictes sur les émissions de produits dangereux [1]. Par conséquent, au cours de ces dernières années, la recherche dans ce domaine ne cesse de croître pour trouver ou inventer de nouveaux procédés, et des processus écologiques plus efficaces en terme de qualité du produit, d'efficacité de production et de réduction du temps, mais aussi pour œuvrer vers une chimie « durable » utilisant moins de solvant, moins d'énergie et réduisant la production de déchets dangereux.

Récemment, l'intérêt pour les molécules bioactives a pris un essor considérable aussi bien pour l'industrie pharmaceutique que cosmétique ou alimentaire. Parmi les molécules bioactives, les produits phénoliques naturels sont considérés comme ayant d'excellentes propriétés en tant qu'agents de conservation, et jouent un rôle important dans la protection contre un certain nombre de troubles pathologiques. Par conséquent, un grand intérêt a été démontré dans l'extraction de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles, à savoir, les algues brunes [2]. Cependant, l'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratiquée. Les solvants sont, en effet, des substances très efficaces qui dissolvent les solutés solides et liquides, et leur volatilité facilite leur élimination en fin de procédé. De même, les solvants organiques, sont aussi, pour bon nombre d'entre eux, inflammables, très volatils et toxiques (cancérigènes, mutagènes, etc.). De ce fait, leur utilisation est de plus en plus souvent montrée du doigt pour sa participation à la pollution environnementale et à l'effet de serre. Par ailleurs, l'épuisement progressif des ressources pétrolières et surtout le durcissement de la réglementation obligent les industriels du secteur à s'orienter vers des solutions alternatives plus respectueuses de l'environnement [3].

En effet, les tendances récentes dans les techniques d'extraction ont surtout porté sur la recherche de solutions qui minimisent l'utilisation de solvants ou qui impliquent d'autres solvants tels que l'utilisation de matières premières renouvelables qui pourraient contribuer à la croissance durable de l'industrie chimique et alimentaire.

Les bio- ou agro-solvants, sont une solution de substitution aux solvants d'origine pétrochimique. Ils passent par la mise en œuvre de bio-ressources et permettent un meilleur respect de l'environnement. Bien que ce sujet revête une importance capitale sur le plan environnementale, la littérature n'a mentionné que quelques rapports sur le remplacement des solvants pétroliers par des solvants verts [4].

Notre travail porte sur le développement d'un procédé d'extraction vert appliqué à l'algue brune *Zonaria tournefortii*, basé sur l'utilisation d'un « agro-solvant » en l'occurrence le 1,8-cinéole. Il s'articule autour de deux parties principales :

- La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique dans laquelle nous présentons le concept de l'Eco-extraction des produits naturels, suivi des différents travaux de recherche portant sur les procédés d'extraction verts et les solvants alternatifs. Ensuite, nous décrivons brièvement l'algue étudiée *Zonaria tournefortii*, ainsi que l'étude chimique et biologique des espèces du genre *Zonaria*.
- La seconde partie est réservée à une étude expérimentale qui a pour objectif, le développement d'une nouvelle procédure verte, appliquée à l'algue brune *Zonaria tournefortii*, basée sur l'utilisation du 1,8-cinéole comme un alternatif du solvant pétrolier. Par ailleurs, une étude comparative est réalisée en termes de procédures d'extraction et des analyses chimiques et biologiques.

PARTIE I

Synthèse bibliographique

Sommaire :

- I. 1 Extraction verte des produits naturels
 - I. 1.1 Définition de la chimie verte
 - I. 1.2 Eco-extraction des produits naturels
 - I. 1.3 Procédés d'extraction verts et solvants alternatifs
- I. 2 Position systématique, description, biologie et écologie de *Zonaria tournefortii*
 - I. 2.1 Systématique
 - I. 2.2 Description
 - I. 2.3 Biologie
 - I. 2.4 Ecologie
- I. 3 Etude chimique du genre *Zonaria*
 - I. 3.1 Généralités sur les produits phénoliques
 - I. 3.2 Extraction, séparation et dosage des produits phénoliques
 - I. 3.3 Produits phénoliques des algues brunes du genre *Zonaria*
- I. 4 Activités biologiques des espèces du genre *Zonaria*

I. 1 Extraction verte des produits naturels

I. 1.1 Définition de la chimie verte

La chimie verte est une approche radicalement nouvelle des problèmes posés par les activités chimiques industrielles. Le concept de « chimie verte » (green chemistry) a été développé aux Etats-Unis vers 1990 dans le but d'offrir un cadre à la prévention de la pollution liée aux activités chimiques. « La chimie verte a pour but de concevoir des produits et des procédés chimiques permettant de réduire ou d'éliminer l'utilisation et la synthèse de substances dangereuses » [5].

I. 1.2 Eco-extraction des produits naturels

L'Eco-extraction est basée sur la découverte et la conception de procédés d'extraction permettant la réduction de la consommation énergétique, l'utilisation de solvants alternatifs et de ressources végétales renouvelables, tout en garantissant un produit/extrait naturel sûr et de qualité. En janvier 2010, plus de 60 chercheurs et professionnels travaillant dans le domaine de l'extraction des produits naturels se sont réunis à Grasse, sous l'impulsion de « France Eco-Extraction », pour définir l'Eco-extraction et ses principes présentés ci-dessous :

Principe 1: Favoriser l'innovation par la sélection variétale et l'utilisation de ressources végétales renouvelables.

Principe 2: Privilégier les solvants alternatifs et principalement ceux issus des agro-ressources.

Principe 3: Réduire la consommation énergétique par l'assistance des technologies innovantes et favoriser la récupération d'énergie.

Principe 4: Favoriser la création de coproduits au lieu de déchets pour intégrer la voie de la bio- ou agro- raffinerie.

Principe 5: Réduire les opérations unitaires grâce à l'innovation technologique et favoriser les procédés sûrs, robustes et contrôlés.

Principe 6: Privilégier un produit non dénaturé, biodégradable, sans contaminants et surtout porteur de valeurs : « éco-extrait ».

L'extraction, selon les six principes d'Eco-extraction de produits naturels, est un nouveau concept pour répondre aux défis du 21^{ème} siècle, pour protéger l'environnement et les consommateurs, et en même temps renforcer la concurrence des industries pour être plus écologique, économique et innovante [3,6].

I. 1. 3 Procédés d'extraction verts et solvants alternatifs

Lixiviation, percolation, décoction, infusion, macération, digestion sont autant de termes très anciens qui recouvrent la même opération unitaire, l'extraction solide-liquide. Il s'agit de mettre en contact un solide et un liquide afin de récupérer un ou plusieurs composés solubles, contenus dans le solide [3]. Ces différentes méthodes utilisent généralement des solvants pétroliers pour l'extraction de molécules bioactives à partir du matériel végétal. La faible efficacité d'extraction, la consommation temps/énergie et l'utilisation de grandes quantités de solvants sont les principaux inconvénients générés par ces procédés. Ces inconvénients ont orienté les chercheurs vers l'utilisation de nouvelles techniques et/ou de solvants durables «verts», qui nécessitent moins de solvant et d'énergie, telles que l'extraction par ultrasons ou par micro-ondes, ou qui impliquent d'autres solvants, telles que l'extraction par fluide supercritique, l'extraction par l'eau sous-critique, et l'utilisation de solvants alternatifs [7].

L'extraction innovante et durable qui implique généralement moins d'énergie et des solvants renouvelables, est actuellement une zone de développement dynamique dans la recherche appliquée et de l'industrie. En effet, différents travaux de recherche ont été menés sur le développement de nouveaux procédés pour répondre à de nouvelles exigences réglementaires, environnementales et techniques.

Récemment, des procédés d'extraction efficaces, rapides et nécessitant une faible quantité de solvant ont été rapportés par T. Anaëlle [8], dans le but d'améliorer les processus écologiques pour l'extraction des composés phénoliques des algues brunes. Une étude comparative a été effectuée entre le procédé d'extraction solide/liquide classique et des procédés d'extraction alternatifs comprenant, l'extraction de partition centrifuge (CPE), l'extraction par fluide supercritique (SFE) et l'extraction par fluide pressurisé (PLE), appliqués à *Sargassum muticum*.

Cependant, La réglementation a aujourd'hui un impact direct sur la diminution de la consommation de solvants, et tout particulièrement les solvants pétrochimiques ou Composés Organiques Volatils (COV). Les solvants «verts» ou agro-solvants, issus de sources renouvelables, présentent des caractéristiques techniques leur permettant de se substituer aux solvants d'origine pétrochimique. Ces solvants renouvelables peuvent être produits à partir de biomasse telle que le bois, l'amidon, les huiles végétales, les fruits ou même les plantes aromatiques [3]. Les principaux avantages de l'utilisation de solvants renouvelables pour l'extraction comprennent: l'augmentation de l'efficacité de la production, et la contribution à la préservation de l'environnement en réduisant l'utilisation de solvants pétroliers, de l'énergie fossile, et la génération de substances dangereuses [7].

L'extraction des produits naturels par des solvants terpéniques a fait l'objet de divers travaux. Le terpène le plus couramment utilisé comme solvant est probablement le *d*-limonène qui représente un important sous-produit de l'industrie des agrumes. Il est obtenu à travers une procédure de distillation à la vapeur suivi d'un processus de déterpénation [9]. Ses propriétés physiques ont été comparées avec ceux de l'hexane pour l'extraction des graisses et des huiles à partir de graines oléagineuses, en utilisant un nouveau procédé combinant l'extraction au Soxhlet et la distillation avec un appareil du type Clevenger [10,11]. Le *d*-limonène a également été utilisé comme solvant vert, substitut du dichlorométhane, pour l'extraction de lycopène [9]. En outre, le *d*-limonène a récemment été comparé avec le toluène pour la détermination de l'humidité dans les produits alimentaires, en utilisant un appareil de Dean-Stark [12].

Un autre monoterpène susceptible d'être un solvant alternatif intéressant est l' α -pinène. Il est également utilisé comme un solvant de remplacement du toluène pour la détermination de l'humidité en utilisant un appareil de Dean-Stark [4]. De même, l' α -pinène ainsi que le *d*-Limonène, et le *p*-Cymène ont été utilisés comme solvants alternatifs du *n*-hexane, dans une procédure alternative écologique et originale pour l'extraction de l'huile essentielle à partir de microalgues. Le procédé est réalisé en deux étapes en utilisant l'extraction au Soxhlet suivie par l'élimination du solvant à l'aide d'une hydrodistillation en utilisant un appareil du type Clevenger [13]. Ce dernier procédé a été comparé récemment avec une nouvelle procédure appelé processus d'extraction par distillation simultanée -SDEP- et emploi également l' α -pinène, le *d*-Limonène, et le *p*-Cymène comme solvants alternatifs [14].

La littérature fait état de la présence d'autres solvants renouvelables pour l'extraction des produits naturels ainsi que les solvants terpéniques. Citons comme exemples, l'éthanol et l'eau qui ont été rapportés par S. Rodriguez-Rojo [15] pour l'extraction d'antioxydants de romarin en utilisant différents procédés d'extraction (extraction conventionnelle, extraction assistée par micro-onde -MAE- et l'extraction assistée par ultrasons -USAE-). En effet, l'éthanol est le solvant vert le plus connu actuellement, il est obtenu par fermentation de matières riches en sucres comme la betterave et les céréales. L'éthanol est un solvant utilisé à grande échelle dans l'industrie chimique compte tenu de sa disponibilité, sa pureté, son faible prix, son caractère non toxique et parfaitement biodégradable [3].

Une étude récente sur les caroténoïdes de carottes rapporte l'utilisation de l'huile de tournesol comme un substitut aux solvants organiques, en utilisant l'extraction assistée par ultrasons, en s'inscrivant dans une démarche de l'extraction verte et du concept du bio-raffinerie [16]. De même, l'acétate d'éthyle [17], le polyéthylène glycol (PEG) [18], l'acétone et l'isopropanol [19], ont été également rapportés comme solvants alternatifs aux solvants pétroliers pour l'extraction de différents produits naturels.

I. 2 Position systématique, description, biologie et écologie de *Zonaria tournefortii*

I. 2.1 Systématique

Actuellement appelée *Zonaria tournefortii* (Lamouroux) Montagne (Figure 1), antérieurement, cette espèce portait l'appellation *Fucus tournefortii* (Lamouroux), *Zonaria flava* clément C. Agardh et *Padina tournefortii* (Lamouroux) Montagne [20]. Cette espèce a pour systématique :

Embranchement: Phaeophyceophyta

Classe : Phéophycées

Ordre : Dictyotales

Famille : Dictyotaceés

Tribu : Zonarieae

Genre : *Zonaria*

Espèce : *Tournefortii*



Figure 1 : *Zonaria tournefortii*

I. 2.2 Description

Zonaria tournefortii, est une algue possédant un thalle verticale, fixé au substrat par un crampon, très ramifié, composé de segments linéaires [21]. Les plantes matures sont touffues, de plus en plus en érections, et atteignant une hauteur de 6 à 7 pouces [22]. La couleur normale de l'algue est, en effet, d'un fauve verdâtre tirant sur le brun, et ce n'est que chez quelques individus malades que celle-ci passe au fauve clair jaunâtre [23].

I. 2.3 Biologie

Cette algue à biotopes sciaphiles est présente toute l'année. Elle est gamétophyte et sporophyte, à spores dispersés à la surface du thalle. Elle se trouve de la surface jusqu'à une quarantaine de mètres de profondeur [24].

I. 2.4 Ecologie

Zonaria tournefortii est une algue brune (ordre Dictyotale) trouvant généralement dans les eaux profondes [21]. Elle possède une raie de répartition sur les côtes nord-est de l'océan atlantique (Afrique occidentale), dans l'atlantique nord-est et la méditerranée (à l'exception du golfe du lion et de l'adriatique) [20].

I. 3 Etude chimique du genre *Zonaria*

I. 3.1 Généralités sur les produits phénoliques

Les phénols qui ont été confondus tantôt avec les acides, tantôt avec les alcools, ont été rangés dans une classe spéciale par M. Berthelot, en 1860 [25]. Les dérivés phénoliques constituent un ensemble de molécules très largement répandus dans le règne végétal (supérieur et inférieur). Ces produits sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal.

Les produits phénoliques sont des dérivés non azotés, dont le ou les cycles aromatiques sont obtenus par deux grandes voies d'aromagenèse : La voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate, mais peuvent être également obtenus par une biogenèse mixte avec la participation du shikimate et de l'acétate, ou par le mévalonate avec le shikimate dans la biosynthèse d'autres dérivés mixtes. L'élément structural fondamental qui caractérise les composés phénoliques est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle ainsi que des groupes fonctionnels (ester, méthyle ester, glycoside...) [26].

La nature chimique des composés phénoliques varie du simple à des substances fortement polymérisés [27]. La fonction phénol peut exister 1, 2, 3, 4...n fois dans la même molécule, le composé correspondant est un monophénol, un diphénol, un triphénol, etc. En principe, la réaction génératrice des monophénols répétée plusieurs fois dans la même molécule, conduit aux polyphénols [28].

Les composés phénoliques naturels ont été rapportés d'avoir d'excellentes propriétés comme agents de conservation, ainsi que d'avoir un rôle important dans la protection contre un certain nombre de maladies. Des rapports plus récents ont révélé les **algues** pour être une riche source de composés phénoliques, qui se caractérisent par la présence de phlorotannins en tant que principaux composés phénoliques marins [29]. Les phlorotannins sont des molécules provenant de couplages radicalaires, carbone-carbone ou carbone-oxygène, à partir du phloroglucinol, et biosynthétisés par la voie de l'acétate-malonate, également connu sous le chemin de polycétide [30, 31].

Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles, à savoir, les algues brunes.

I. 3.2 Extraction, séparation et dosage des produits phénoliques

La présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques hydroxylés chez les composés phénoliques est responsable de certaines propriétés communes utilisées pour les extraire à partir du matériel végétal, les caractériser chimiquement et les doser. Cependant, il faut noter que ces propriétés peuvent s'exprimer différemment selon la complexité de la molécule concernée et le nombre de groupements hydroxylés portés par chacun des cycles benzéniques. Les méthodes de séparation, de dosage et d'identification des composés phénoliques ont fait des progrès spectaculaires au cours des trente dernières années, grâce en particulier à l'utilisation quasi systématique de la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) [32].

I. 3.2.1 Extraction

Parmi les différentes étapes que constituent l'analyse et l'identification de molécules bioactives, l'étape d'extraction, qui a pour but la désorption des molécules d'intérêt des sites actifs de la matrice végétale, est primordiale puisqu'elle déterminera la nature et la quantité des molécules extraites, et par conséquent le succès des étapes suivantes.

Dans les dernières années, les travaux sur l'extraction des composés phénoliques présents dans les produits naturels ont attiré un intérêt particulier.

L'extraction des composés phénoliques à partir des matières végétales est influencée par leurs natures chimiques, le procédé d'extraction utilisé, la taille des particules de l'échantillon, la durée de stockage et d'autres conditions telle que la présence de substances interférentes [29]. Il existe plusieurs techniques utilisées pour l'extraction des composés phénoliques. La macération, connue comme une méthode traditionnelle, a été couramment employée. Cette procédure, malgré les temps longs d'extraction et l'utilisation d'une quantité considérable de solvants, est relativement peu coûteuse [33].

La solubilité des composés phénoliques est régie par le type de solvant (polarité) utilisé, le degré de polymérisation des composés phénoliques, ainsi que la formation des complexes insolubles. Par conséquent il n'existe pas de procédure uniforme ou tout à fait satisfaisante qui est appropriée pour l'extraction de tous les composés phénoliques ou à une catégorie spécifique de substances phénoliques dans les matières végétales.

Le méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'eau, l'acétate d'éthyle, et dans une moindre mesure le propanol, le diméthylformamide, et leurs combinaisons sont fréquemment utilisés pour l'extraction des composés phénoliques [29].

Comme ils sont facilement oxydables, il est recommandé de travailler à une température allant de 0 à 4°C et d'assurer une protection en ajoutant un agent réducteur (acide ascorbique ou métabisulfite de sodium) au milieu d'extraction [32].

Dans les dernières années, les travaux sur l'extraction des composés phénoliques présents dans les produits naturels ont suscité un intérêt particulier [2]. Les solvants d'extraction des composés phénoliques des algues brunes, couramment utilisés, décrits par différents auteurs sont indiqués dans le tableau 1.

Tableau 1 : Solvants d'extraction des composés phénoliques des algues brunes

Matrices	Solvants d'extraction	Références
<i>Bifurcaria bifurcata</i> <i>Cystoseira baccata</i>	Méthanol / Eau (50/50, v/v)	[34]
<i>Pelvetia canaliculata</i> <i>Ascophyllum nodosum</i> <i>Bifurcaria bifurcata</i>	Méthanol / Eau (50/50, v/v)	[35]
<i>Fucus vesiculosus</i>	Acétone / Eau (70/30, w/v)	[36]
<i>Desmarestia anceps</i> <i>Desmarestia menziesii</i>	Méthanol	[37]
<i>Eckonia cava</i>	Méthanol	[38]
<i>Cystophora moniliformis</i> <i>Cystophora scalaris</i>	Acétone	[39]
<i>Carpophyllum angustifolium</i>	Ethanol	[40]
<i>Ishige okamurae</i>	Ethanol aqueux	[41]
<i>Sargassum ringgoldianum</i>	Ethanol	[42]
<i>Zonaria diesingiana</i>	CHCl ₃ , MeOH (2 :1)	[43]
<i>Zonaria tournefourtii</i>	CHCl ₃	[44]

Comme c'est indiqué ci-dessus, la macération est une technique classique généralement employée pour l'extraction des composés phénoliques, mais sa sélectivité est faible [45]. Par conséquent, des étapes supplémentaires peuvent être nécessaires pour l'élimination des composés phénoliques non désirés et les substances non phénoliques telles que les cires, les graisses, les terpènes et les chlorophylles [29]. En effet, selon la bibliographie étudiée, la macération est souvent suivie d'une partition (extraction liquide-liquide) et d'un fractionnement sur colonne ou d'une pré-concentration en utilisant l'extraction en phase solide.

❖ Extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide est une opération de transfert de masse, dans lequel une solution liquide contenant initialement un ou plusieurs solutés est intimement mélangée avec un liquide non miscible ou pratiquement non miscible (solvant). Divers solvants comme l'acétate d'éthyle, le n-butanol, le n-hexane et le dichlorométhane [46, 47, 48], ont été souvent utilisés dans différents travaux de recherche menés sur les produits phénoliques, pour le traitement des l'extraits et l'élimination des composés non désirés (composés non phénoliques).

❖ Extraction en phase solide

L'extraction en phase solide est une technique introduite dans les années quatre-vingt [49], utilise de colonnes remplis de phases stationnaires pour l'extraction sélective de composés ou la concentration d'échantillons dilués, à basse pression [50]. Elle est devenue la technique la plus répandue de traitement des échantillons liquides avant analyse. Cette technique permet d'empêcher des problèmes liés à l'extraction liquide-liquide, tels que la séparation de phases incomplètes et l'utilisation de grandes quantités de solvant organique [51]. L'extraction en phase solide est beaucoup plus sensible dans la mesure, et permet en outre d'augmenter la précision des dosages effectués [52].

L'extraction en phase solide est basée sur la rétention sélective de certains analytes et leur élution ultérieure par un solvant approprié [49]. Si le soluté présente une forte affinité vis-à-vis de l'adsorbant, il y reste totalement fixé au cours de la percolation de l'échantillon aqueux. Le soluté est ensuite désorbé par un petit volume de solvant éluant. Les phases solides mettent en jeu des interactions polaires (phases normales), apolaires (phases apolaires ou inverses) ou des interactions par échanges d'ions [53].

I. 3.2.2 Séparation

I. 3.2.2.1 Séparation par chromatographie planaire

La chromatographie planaire, également connue sous le nom de chromatographie sur couche mince (CCM, TLC en anglais), est une technique complémentaire de la chromatographie liquide à haute performance, ayant sa propre spécificité [54].

L'analyse des extraits bruts par CCM permet dans un premier temps de déterminer la présence ou l'absence d'un composé spécifique dans un mélange. Pour cela on compare simplement les comportements du composé pur et du mélange sur un même chromatogramme. Le scientifique s'occupant de produits naturels utilise la méthode chromatographique à tous les stades d'une séparation complexe, jusqu'à la purification finale [55].

La chromatographie sur couche mince est une technique analytique simple, rapide et peu coûteuse. Elle repose principalement sur les phénomènes d'adsorption et de partage, où les molécules à séparer s'adsorbent à la surface d'une couche fine (100-200 μm) de phase stationnaire, généralement à base de gel de silice, déposée sur une plaque rectangulaire de verre, de plastique ou d'aluminium, de quelques centimètres de côté, et seront entraînées à travers la phase stationnaire par un éluant (phase mobile) ; donc la séparation est fonction des différences d'adsorption des composants de l'échantillon sur la phase stationnaire et des différences de leur solubilité dans la phase mobile [53,56]. Les composés qui donnent des taches invisibles doivent être « révélés ».

I. 3.2.2.2 Séparation par chromatographie liquide à haute performance

La chromatographie liquide à haute performance abrégée CLHP (HPLC en anglais) est considérée comme la principale technique chromatographique disponible aujourd'hui pour les substances non volatiles ou sensibles à la chaleur.

La CLHP peut offrir un outil adapté à l'analyse qualitative et quantitative. Les applications de la chromatographie en phase liquide permettent également à grand échelle l'isolement et la purification de composés [57]. D'une manière générale la chromatographie liquide à haute performance, qui fait intervenir une phase stationnaire solide constituée de particules fines et une phase mobile liquide, demeure la technique la plus souvent utilisée car elle présente de nombreux avantages telles que sa simplicité de mise en œuvre, sa reproductibilité, une gamme étendue de phases stationnaires commercialement disponibles permettant de moduler les interactions avec le soluté, et ses diverses possibilités de couplages avec d'autres techniques chromatographiques et/ou des systèmes de détection.

Les systèmes de détection les plus communément utilisés sont les détections par absorption dans l'ultraviolet visible (UV-vis), spectrométrie de masse (MS, Mass Spectrometry) et résonnance magnétique nucléaire (RMN). Outre ces avantages, cette technique peut être utilisée selon plusieurs modes de séparation en fonction des caractéristiques physico-chimiques des analytes à séparer dont le mode dit phase normale (NP, Normal Phase) dans lequel la phase stationnaire est polaire et la phase mobile est apolaire, et le mode dit phase inverse (RP, Reversed Phase) dans lequel les polarités sont inversées, sont les deux principaux modes utilisés dans les travaux antérieurs [58].

❖ Présentation sommaire de CLHP/DAD-UV

La détection UV-vis est le mode de détection couplé à la chromatographie liquide qui est de loin le plus utilisé aujourd'hui pour l'analyse des produits naturels possédant un ou plusieurs chromophores. Les détecteurs UV-vis les plus communément utilisés sont des détecteurs à barrette de diodes (DAD, Diode Array Detector) [59]. Ces derniers sont composés de barrettes constituées de plusieurs centaines de diodes au silicium (un semi-conducteur), mélangés à des éléments du groupe III (p. ex. : Ga) ou V (p. ex. : As) pour améliorer sa conductivité. Plusieurs barrettes de diodes placées dans le plan focal d'un monochromateur à réseau peuvent contrôler simultanément une vaste gamme de longueurs d'ondes et les données d'un spectre complet sont ainsi recueillies en moins d'une seconde. Ce type de détection est d'un apport considérable dans la caractérisation des pics sur un chromatogramme CLHP/UV, car il permet de visualiser le spectre UV de chaque constituant. Ainsi, certaines classes de métabolites secondaires de plantes, ayant un spectre UV caractéristique peuvent être mises en évidence par une simple analyse CLHP/DAD-UV [60].

Plusieurs travaux (Tableau 2) ont été effectués sur la séparation ainsi que l'isolement de composés phénoliques en utilisant la CLHP combinée avec d'autres techniques de détection plus ou moins complexes. En particulier, la détermination de composés phénoliques en utilisant la CLHP couplée à un détecteur à barrette de diodes, a été très employée.

Tableau 2: Séparation des composés phénoliques des algues brunes par CLHP couplée à différents systèmes de détection

Technique	Matrices	Molécules	Réf
RP-HPLC- DAD	<i>Sargassum ringgoldianum</i>	Bifuhalol	[42]
RP-HPLC-MS	{ <i>Anabaena doliolum</i> <i>Spongiochloris spongieux</i>	{ Acides phénoliques Acide cinnamique Hydroxybenzaldéhydes	[61]
RP-HPLC-DAD	<i>Fucus vesiculosus L.</i>	Fucophloréthols	[62]
NP-HPLC-RID	<i>Zonaria tournefortii</i>	Acylphloroglucinols	[63]
RP-HPLC-DAD	<i>Ishige okamurae</i>	Diphlorethohydroxycarmalol	[64]
RP-HPLC- DAD	<i>Eckonia cava</i>	Dieckol	[65]
HPLC-ESI-MS ⁿ	<i>Fucus vesiculosus</i>	Phlorotannins	[66]
RP-HPLC- DAD	<i>Stypocaulon scoparium</i>	{ Acides phénoliques Tannins condensés Flavonols	[67]
RP-3DHPLC-DAD	{ <i>Eisenia bicyclis</i> <i>Ecklonia cava</i> <i>Ecklonia kurome</i>	Phlorotannins	[68]
HPLC-ESI-MS	<i>Ecklonia cava</i>	2,7''-phloroglucinol-6,6'-bieckol	[69]

RP-HPLC, chromatographie liquide haute performance en mode de phase inverse (Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography); **NP-HPLC**, chromatographie liquide haute performance en mode de phase normale (Normal Phase-High Performance Liquid Chromatography); **DAD**, détecteur à barrette de diodes (Diode Array Detector) ; **MS**, spectrométrie de masse (Mass Spectrometry); **RID**, détecteur à indice de réfraction (Refractive Index Detector), **ESI**, ionisation par électrospray (electrospray ionisation).

I. 3.2.3 Dosage

La quantification des composés phénoliques est le plus souvent réalisée par absorptiométrie dans le visible ou par chromatographie liquide haute performance (CLHP) avec une détection spectrométrique dans l'ultraviolet. La méthode absorptiométrique est facile à mettre en œuvre mais n'est pas spécifique et ne permet pas une analyse fine des différents composés phénoliques présents dans les extraits. En revanche, la chromatographie en phase liquide est sensible, spécifique mais demande un appareillage coûteux et se heurte à l'absence de composés commerciaux de référence pour les identifications [70].

Nous nous intéressons dans notre mémoire au dosage des composés phénoliques totaux par une méthode spectrophotométrique, que nous allons développer ci-après.

■ *Méthodes spectrophotométriques*

Un certain nombre de méthodes spectrophotométriques ont été développées pour la quantification des composés phénoliques [2]. Le dosage de Folin-Denis est l'un des tests chimiques les plus couramment utilisés pour la recherche écologique. Ce test est un de ceux qui quantifient les concentrations de composés facilement oxydables, tels que les phénols, par des changements de couleur qui accompagnent une réaction d'oxydoréduction.

Le réactif de Folin-Ciocalteu (FC) apporte une amélioration par rapport au réactif de Folin-Denis avec l'ajout de sulfate de lithium au réactif. Les sels de lithium réduisent les quantités de précipités qui peuvent se former lorsque des fortes concentrations de réactif sont utilisées afin d'augmenter la réactivité de l'essai [71].

Pour effectuer le test, les échantillons de composés phénoliques sont traités avec le réactif de Folin-ciocalteu (mélange d'acides phosphotungstique et phosphomolybdique) qui réagit avec les composés aromatiques hydroxylés. En milieu alcalin (carbonate de sodium), le réactif développe une coloration bleue dont l'absorption est mesurée à 760 nm. La température et le temps de réaction influent sur le développement de la coloration [72]. Cette méthode permet de déterminer la concentration des composés phénoliques en se référant à une courbe d'étalonnage à partir des concentrations connues.

Les conditions expérimentales utilisées pour effectuer le dosage par la méthode de Folin-Ciocalteu proposées par différents auteurs sont représentées dans les organigrammes illustrés par la figure 2.

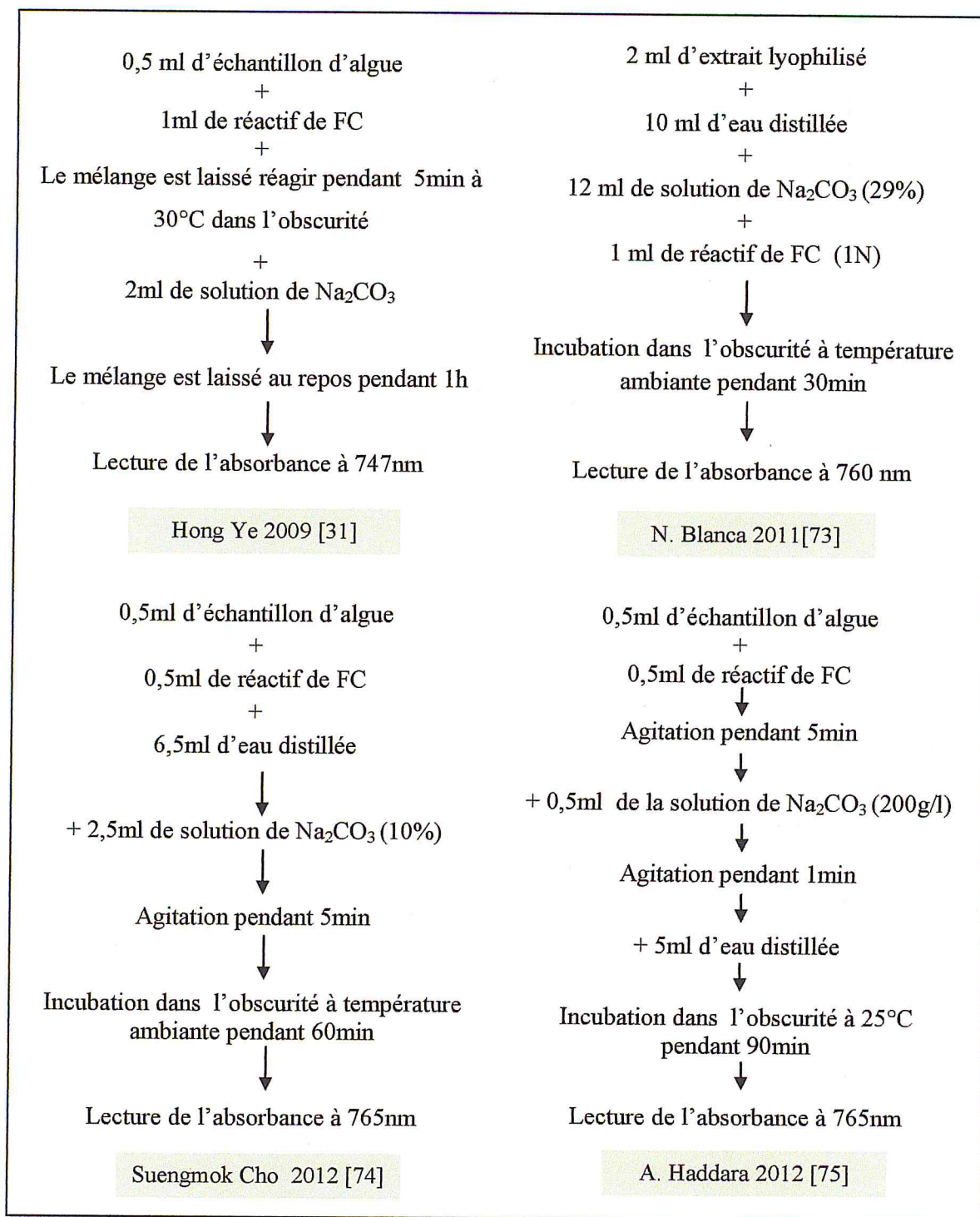


Figure 2 : Protocoles de dosage des phénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu

Plusieurs procédures d'extraction et de purification des composés phénoliques des algues marines, ainsi que leur dosage par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu ont été réalisées à partir des techniques générales décrites dans les ouvrages spécialisés, dont certains d'entre eux sont regroupées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3 : Méthodes colorimétrique et d'extraction utilisées dans la quantification des phénols totaux des algues avec la gamme des valeurs mesurées

Matrices	Solvants d'extraction	Modes d'extraction	Modes de purification	Etalons	λ Mesure nm	Teneurs en phénols totaux	Réf
<i>Sargassum ringgoldianum</i>	Ethanol	Extraction par solvant	/	D (+) catéchine	700	383.0 mg/g	42
<i>Turbinaria ornata</i>	Méthanol	Extraction par Soxhlet	/	Acide gallique	720	43.72 $\pm$ 1.63 (mg GAE/g)	76
$\left\{ \begin{array}{l} \textit{Ascophyllum nodosum} \\ \textit{Ulva lactuca} \\ \textit{Palmaria palmata} \\ \textit{Alaria esculenta} \end{array} \right\}$	Méthanol	Extraction par solvant	1. Extraction liquide-liquide Chloroforme / Eau. 2. Acidification avec l'acide acétique. 3. Préconcentration en phase solide (EPS).	Acide gallique	765	$\left\{ \begin{array}{l} 140.6 \pm 1.7 \\ 28.6 \pm 0.4 \\ 9.5 \pm 0.2 \\ 28.0 \pm 0.5 \end{array} \right\}$ (μ g GAE /g)	77
$\left\{ \begin{array}{l} \textit{Himantalia elongata} \\ \textit{Undaria pinnatifida} \\ \textit{Laminaria sp.} \\ \textit{Laminaria saccharina} \end{array} \right\}$	Acétone	Extraction par solvant	Centrifugation + réextraction par l'acétone	Phloroglucinol	720	$\left\{ \begin{array}{l} 10.0 \pm 0.8 \\ 6.0 \pm 2.2 \\ 1.3 \pm 0.6 \\ 1.4 \pm 1.0 \end{array} \right\}$ (g PGE/kg)	78
<i>Ecklonia cava</i>	Ethanol	Extraction par solvant	Fractionnement par solvants : <i>Ecklonia cava</i> + Eau distillé puis partitionnement avec du n-hexane, acétate d'éthyle, le n-butanol, et l'eau distillée dans l'ordre.	Phloroglucinol	765	138.5 $\pm$ 2.4 (mg PGE/g)	79

I. 3.3 Produits phénoliques des algues brunes du genre *Zonaria*

Différents travaux de recherche ont été menés sur plusieurs espèces du genre *Zonaria*. Ceux-ci concernent l'isolation et l'élucidation des structures de nombreux dérivés de phloroglucinols qu'elles contiennent. Ces derniers sont résultants d'un couplage entre une molécule de phloroglucinol et une oxylipine à 20 ou à 22 atomes de carbone [80].

- V. Amico [44,81], C. Tringalli [82, 83] et M. El Hattab [63] ont effectué des recherches sur l'espèce *Zonaria tournefortii* qui leur ont permis d'isoler sept métabolites dérivés du phloroglucinol à partir de l'extrait lipidique traité par la soude.
- Des travaux menés par W. Gerwick et W. Fenical [43] ont permis d'isoler trois produits à partir des espèces *Zonaria farwolii* récoltée sur les côtes sud de la Californie et *Zonaria diesingiana* de l'herbier Fukuoka du Japon.
- P. Wisespongpan [84] a isolé trois dérivés du phloroglucinol à partir de *Zonaria diesingiana*, lesquels ont été aussi isolés à partir de *Zonaria farwolii* et *Zonaria tournefortii*.
- Une nouvelle structure d'un phloroglucinol avec un résidu acyle C-20 a été également isolée à partir de *Zonaria diesingiana* en 1994 par T. Kusumis [85].
- Blackman & Rogers [86] ont effectué des travaux sur trois espèces du genre *Zonaria*, se trouvant dans les zones subtidales le long de la Tasmanie. Ceux-ci concernent *Zonaria turneriana* J.Agardh, *Zonaria crenata* J. Agardh, et *Zonaria angustata* Kuetz. Ces travaux leurs ont permis d'isoler trois dérivés de phloroglucinol déjà rapportés chez d'autres espèces du genre *Zonaria* [44, 81, 82].

Les structures des dérivés de phloroglucinols isolés à partir de différentes espèces du genre *Zonaria* sont représentées ci-dessous.

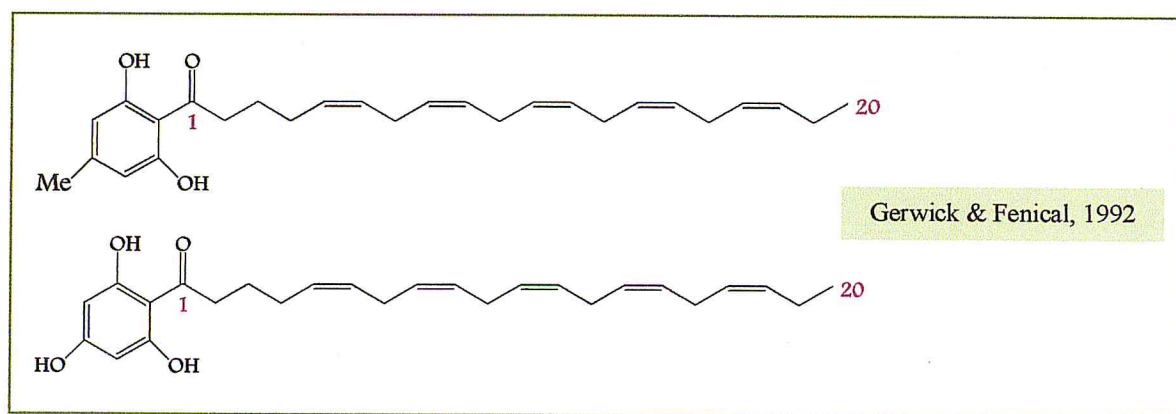


Figure 3 : Dérivés du phloroglucinol isolés de *Zonaria farwolii*

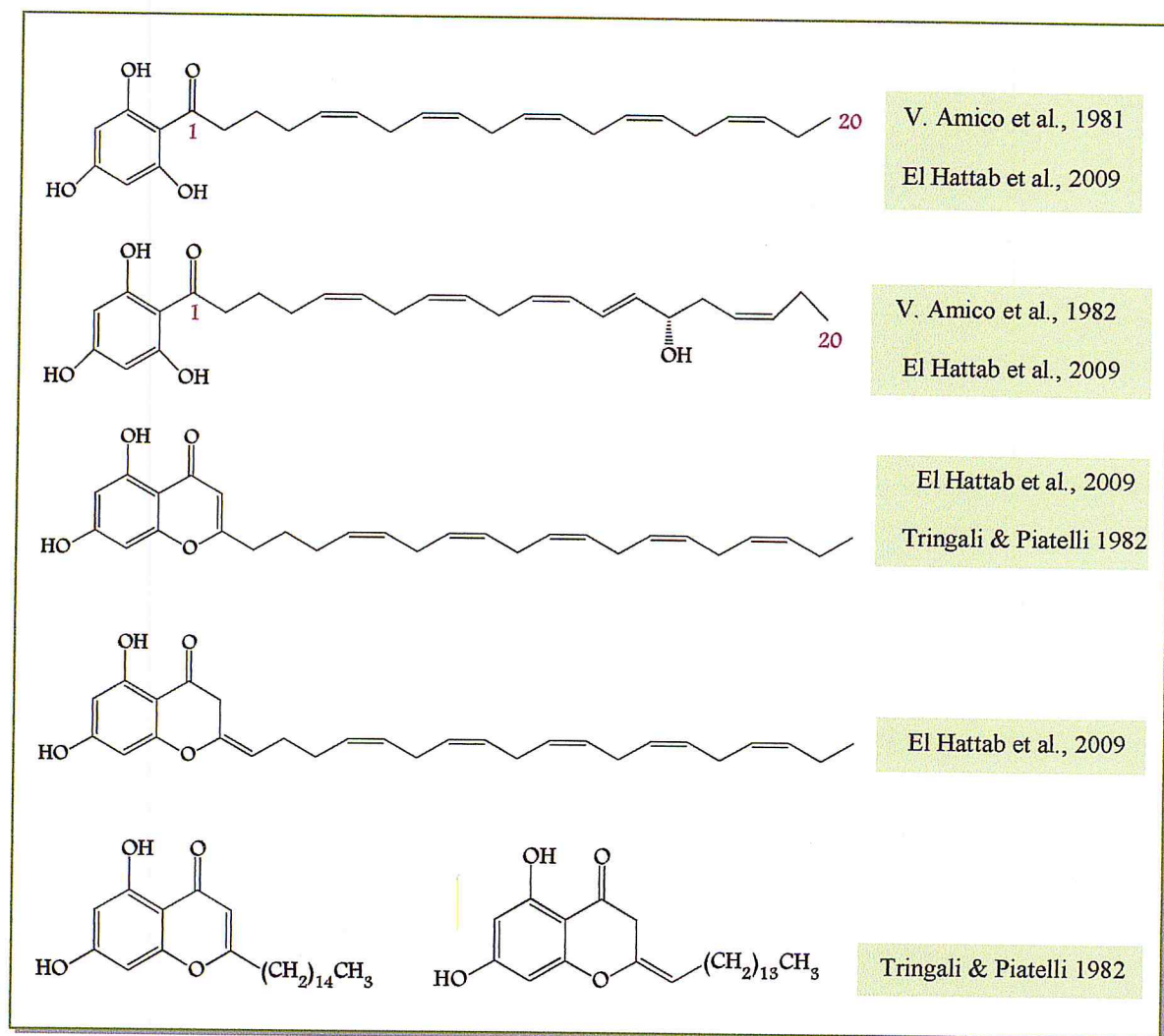


Figure 4 : Dérivés du phloroglucinol isolés de *Zonaria tournefortii*

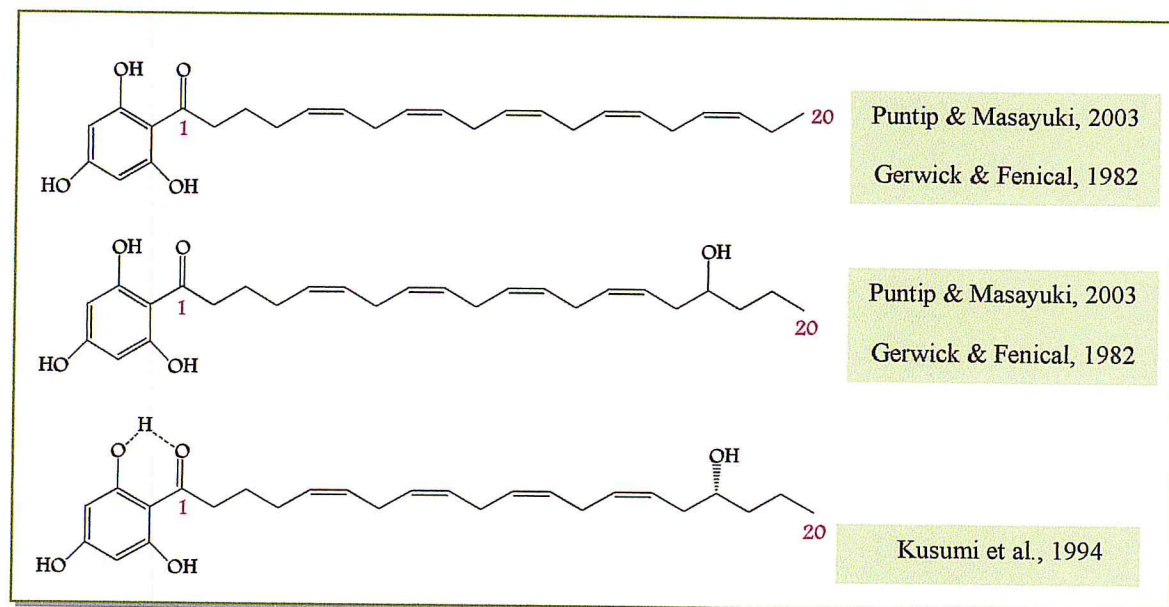


Figure 5 : Dérivés du phloroglucinol isolés de *Zonaria diesingiana*

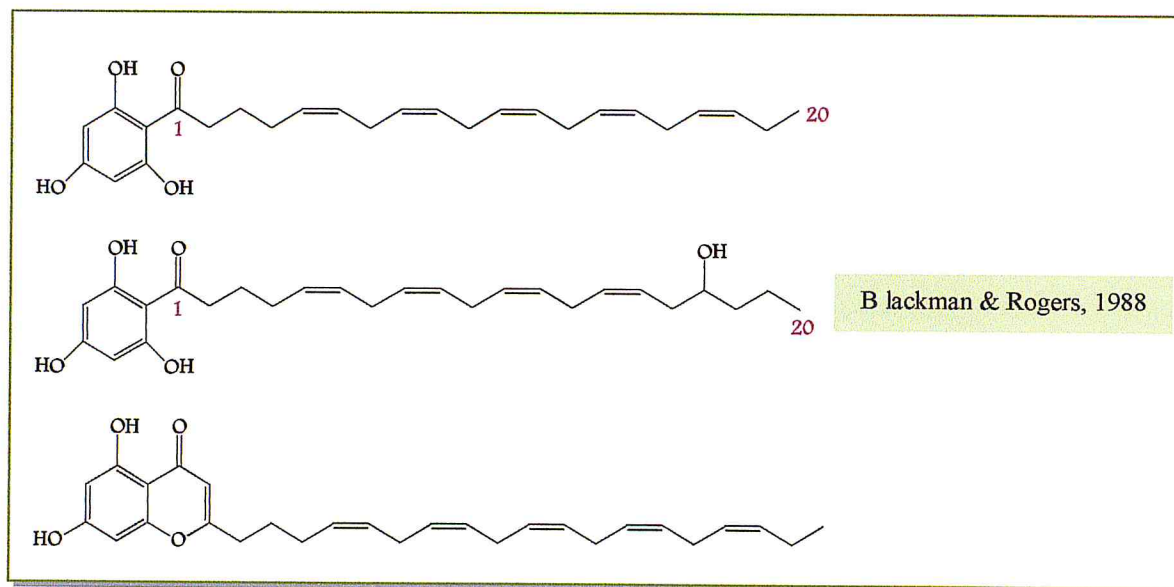


Figure 6 : Dérivés du phloroglucinol isolés de *Zonaria crenata*

I. 4 Activités biologiques des espèces du genre *Zonaria*

Les algues constituent une source très importante en composés bioactifs avec diverses propriétés chimiques et biologiques [86]. En effet, les algues peuvent être exposées à une combinaison de lumière ultraviolette et de l'air qui mène facilement à la formation de radicaux libres et d'autres espèces réactives de l'oxygène (ROS). En dépit de leur exposition à des nuisibles ROS, les algues n'ont pas les dommages oxydatifs dans leurs éléments de structure, et résistent à l'oxydation pendant le stockage, ce qui indique la présence de systèmes de défense antioxydants protecteurs dans leurs cellules [87].

Les produits naturels polyinsaturés ont attiré un intérêt croissant dans les programmes de découverte de médicaments. Par exemple, dans le développement de remèdes contre les maladies neurodégénératives, cette classe de produits naturels est d'un intérêt primordial en raison de leur piégeage des radicaux et de leur forte capacité antioxydante. En effet, l'évaluation de l'activité antioxydante cellulaire du chromone tout-(Z)-5,7-dihydroxy-2-(4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z nonadecapentaenyl) **1**, isolé à partir de plusieurs espèces du genre *Zonaria*, indique qu'il possède un effet antioxydant intéressant avec une valeur d'CE₅₀ de $14 \pm 9 \mu\text{M}$, et suggère qu'il était presque aussi puissant que l'antioxydant standard, la quercétine. En outre, le produit **1** a également présentait des effets protecteurs puissants contre les espèces réactives de l'oxygène avec un CE₅₀ = $160 \pm 25 \mu\text{M}$ [88].

De même, les composés bioactifs dérivés d'algues brunes, à savoir les phlorotannins, ont été signalés d'avoir des effets antimicrobiens, qui peuvent être utiles en tant qu'agents potentiels antimicrobiens pour les industries alimentaires et pharmaceutiques [89]. Les algues brunes du genre *Zonaria* sont connues d'être riches en acylphloroglucinol avec un résidu C-20. A notre connaissance, jusqu'à présent, les seuls rapports d'activités antimicrobiennes des dérivés de phloroglucinol du genre *Zonaria* ont été rapportés par Gerwick & Fenical [43] et Wisespongpan & Kuniyoshi [84].

Les travaux menés par W. Gerwick et W. Fenical ont permis l'isolement de trois produits 2, 3 et 4 à partir des espèces *Zonaria farwolii* et *Zonaria diesingiana* comme décrit ci-dessus. Ces composés ont présenté différents degrés d'activité antibactérienne in vitro contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*. Cependant, Wisespongpan & Kuniyoshi ont également rapporté l'évaluation de l'activité antimicrobienne des produits 3 et 4 ainsi que le produit 5. Les résultats ont indiqué que le composé 5 a montré une puissante activité contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*, tandis que les composé 3 et 4 ont montré moins d'activité. Aucune activité contre les bactéries à Gram négatif n'a été observée.

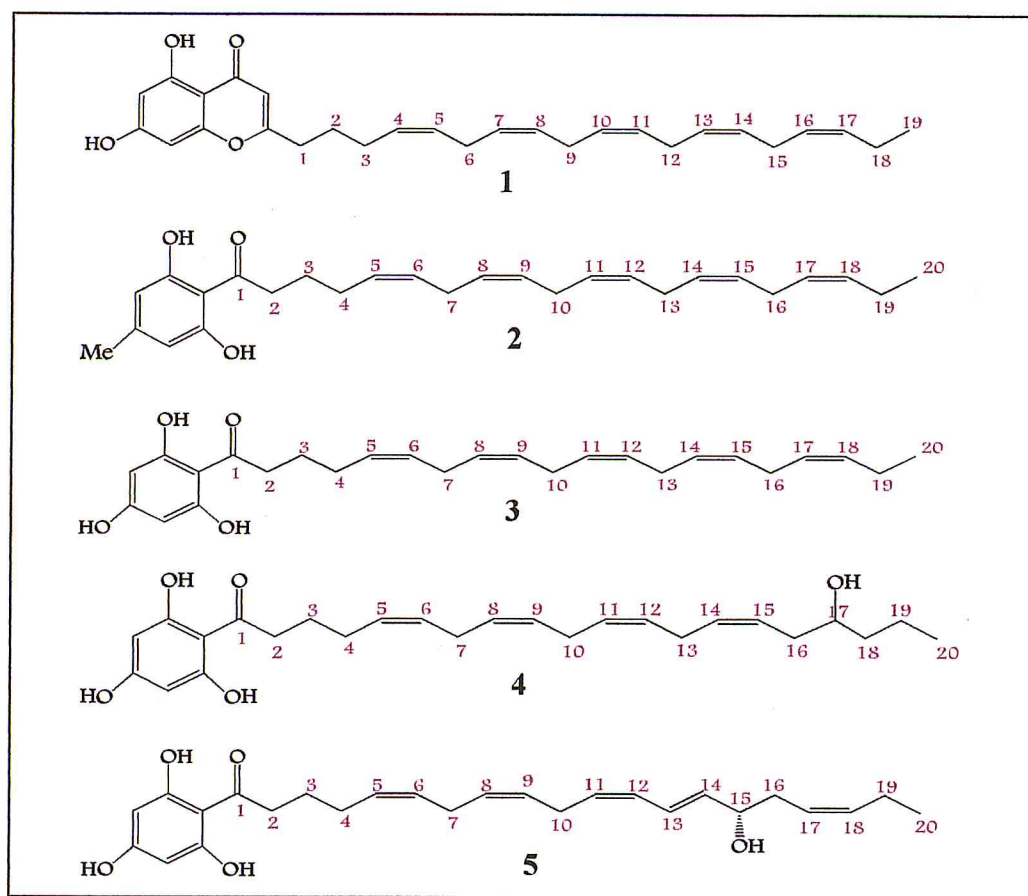


Figure 7 : Produits isolés des espèces du genre *Zonaria* possédants des activités biologiques

PARTIE II

Etude expérimentale

Sommaire : ---

- II. 1. Introduction
- II. 2. Extraction et analyse préliminaire par chromatographie sur couche mince
- II. 3. Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)
- II. 4. Estimation du contenu en composés phénoliques totaux (TPC, Total Phenolic Content)
- II. 5. Analyse par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)
- II. 6. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Zonaria tournefortii*
- II. 7. Etude du pouvoir antimicrobien des extraits de *Zonaria tournefortii*

II. 1 Introduction

Les méthodes classiques d'extraction des produits phénoliques provenant de nombreuses sources utilisent des solvants organiques. Le chloroforme [44], l'éthanol [84], le mélange de solvant chloroforme-méthanol dans différentes proportions [43,63] ont été fréquemment utilisés pour l'extraction des produits phénoliques des algues brunes du genre *Zonaria*. Ces solvants sont obtenus à partir de l'industrie pétrolière, et doivent être manipulés avec précaution en raison de leurs propriétés toxiques. La présence résiduelle de ces solvants peut contaminer le produit final, le rendant impropre à l'alimentation et à l'utilisation pharmaceutique et cosmétique [9]. Pour pallier à ces inconvénients, une méthode verte pour l'extraction des produits phénoliques a été proposée, en utilisant le 1,8-cinéole (solvant vert) comme un substitut du solvant pétrolier.

En effet, une étude comparative a été réalisée en termes de procédures d'extraction et d'analyses chimiques et biologiques. Les procédures d'extraction consistent, d'une part en la préparation d'un extrait par solvant classique $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1/1 : v/v), et d'autre part, en l'obtention d'un extrait « vert » par la mise en œuvre d'une technique basée sur l'utilisation du 1,8-cinéole comme « agro-solvant » et sa séparation par extraction liquide-liquide avec de l'eau. Cette étape est suivie par le recyclage du solvant « vert » par hydrodistillation. Les analyses chimiques consistent à effectuer un dosage des produits phénoliques totaux par le test colorimétrique de Folin-Ciocalteu, et à comparer les profils chromatographiques CLHP. Les analyses biologiques consistent à effectuer des tests d'activité antibactérienne et antifongique, et d'évaluer l'activité antioxydante en procédant à la mesure du pouvoir anti-radicalaire par le test DPPH, et à la détermination du pouvoir antioxydant réducteur du fer ferrique (FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power).

L'extraction et l'analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ont été réalisées au laboratoire de chimie des substances naturelles (département de Chimie de l'Université Blida 1). Le dosage des phénols totaux et le pouvoir réducteur ont été évalués au laboratoire des méthodes physiques d'analyses (Département de Chimie industrielle de l'Université Blida 1), alors que l'analyse des extraits par chromatographie liquide à haute performance a été effectuée au sein du laboratoire des plantes médicinales et aromatiques (Département de l'agronomie de l'Université Blida 1). Les tests d'activité antimicrobienne, et la mesure du pouvoir anti-radicalaire par le test DPPH• ont été réalisés respectivement au sein de l'unité microbiologique, et de l'unité immunologique de l'hôpital CHU Isaad Hassani Beni Messous-Alger.

II. 2 Extraction et analyse préliminaire par chromatographie sur couche mince

II. 2.1 Récolte et traitement du matériel végétal

L'algue étudiée (*Zonaria tournefortii*) a été récoltée en août 2012, à une profondeur de 25 mètre sur le littoral méditerranéen, au niveau du site de la « Corne d'Or » à Tipaza (Algérie). L'identification a été faite par Dr. H. Seridi au niveau du laboratoire de Biologie marine de l'Université des Sciences et de la Technologie d'Alger.

L'algue a été triée manuellement pour éliminer les épiphytes et autres organismes susceptibles de contaminer la nature chimique des extraits, puis elle est séchée à l'ombre, dans un lieu sec et aéré. L'algue est ensuite réduite en petits copeaux. Les échantillons soumis à l'extraction ont été obtenus par échantillonnage.

II. 2.2 Extraction

Deux procédés d'extraction ont été appliqués, à savoir : le procédé d'extraction classique, et le procédé d'extraction vert. Le premier procédé (Figure 8) consiste à effectuer une extraction par le mélange de solvant Dichlorométhane (Ref : Sigma Aldrich 24233) / Methanol (Ref : Panreac 141091) (v/v : 1/1) dans un système statique à une température ambiante pendant une semaine, suivie d'une filtration et de l'évaporation du solvant. Le résidu sec obtenu est traité par la suite avec l'éther diéthylique pour éliminer les traces d'eau et les produits aqueux. L'éther est ensuite évaporé afin d'obtenir un extrait étheré constitué d'un mélange complexe de produits phénoliques et d'autres de nature chimique diverses. Il est conservé au réfrigérateur à 4°C pour les analyses qualitatives et quantitatives ultérieures.

Le second procédé (Figure 9) consiste à utiliser comme alternative du mélange de solvant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (v/v : 1/1), un agro-solvant monoterpénique oxygéné, en l'occurrence le 1,8-cinéole (Ref : Panreac 12269). La macération a été effectuée à une température ambiante pendant une semaine.

L'inconvénient majeur de l'utilisation des monoterpènes comme solvant est la grande consommation d'énergie liée à leur récupération par évaporation en raison de leur point d'ébullition élevé (155 ° C et 176 ° C) [13]. Pour pallier à cet inconvénient, et étant donné que le 1,8-cinéole présente une solubilité relative dans l'eau, l'élimination du solvant (1,8-cinéole) a été effectuée par une série d'extraction liquide-liquide avec de l'eau (Annexe 1(a)) suivie d'une centrifugation (4000 tours (10min)) et élimination de la phase aqueuse (eau + 1,8-cinéole) conduisant à un extrait brut. La phase aqueuse ainsi obtenue est soumise à une hydrodistillation en utilisant un Clevenger (Annexe 1(b)) afin de récupérer le 1,8-cinéole résultant de l'étape d'extraction liquide-liquide.

Le rendement d'extraction est défini comme étant le rapport de la masse d'extrait obtenu sur la masse de la matière végétale sèche. Il est exprimé en pourcentage (%), et calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = \frac{M \text{ Extrait}}{M_{mv}} \times 100$$

R (%) : Rendement en extrait (%)

M Extrait : Masse de l'extrait en grammes

M mv : Masse de la matière végétale en grammes

Une masse de 25,03g d'algue a permis d'obtenir des rendements de 2,16 % et 0,45 % correspondant respectivement aux extraits obtenus à partir du procédé d'extraction classique et du procédé d'extraction vert. Nous constatons que le rendement d'extraction était plus élevé en utilisant le mélange de solvants CH₂Cl₂/MeOH (v/v : 1/1) que le 1,8-cinéole.

L'utilisation du mélange CH₂Cl₂/MeOH (v/v : 1/1) permet d'extraire des produits polaires et apolaires, étant donnée que, le mélange de solvant, grâce à ces propriétés chimiques, couvre tout l'intervalle de polarité. Ce mélange de solvant est non sélectif, ce qui induit une extraction plus « exhaustive ». Néanmoins, le pouvoir solvant du 1,8-cinéole est limité et sélectif (produit pur avec des propriétés physico-chimiques fixes). De même, la faiblesse du rendement dans le procédé d'extraction vert peut être due également aux pertes subies au cours de l'extraction liquide-liquide, ainsi que dans la récupération finale de l'extrait.

Les caractéristiques organoleptiques des extraits obtenus, sont représentées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Caractéristiques organoleptiques des extraits de *Zonaria tournefortii* obtenus à partir du procédé d'extraction classique et du procédé d'extraction vert

<i>Caractéristiques organoleptiques</i>	<i>Extrait classique</i>	<i>Extrait vert</i>
Aspect	Visqueux	Visqueux
Couleur	Verdâtre	Jaunâtre
Odeur	Caractéristique	Caractéristique

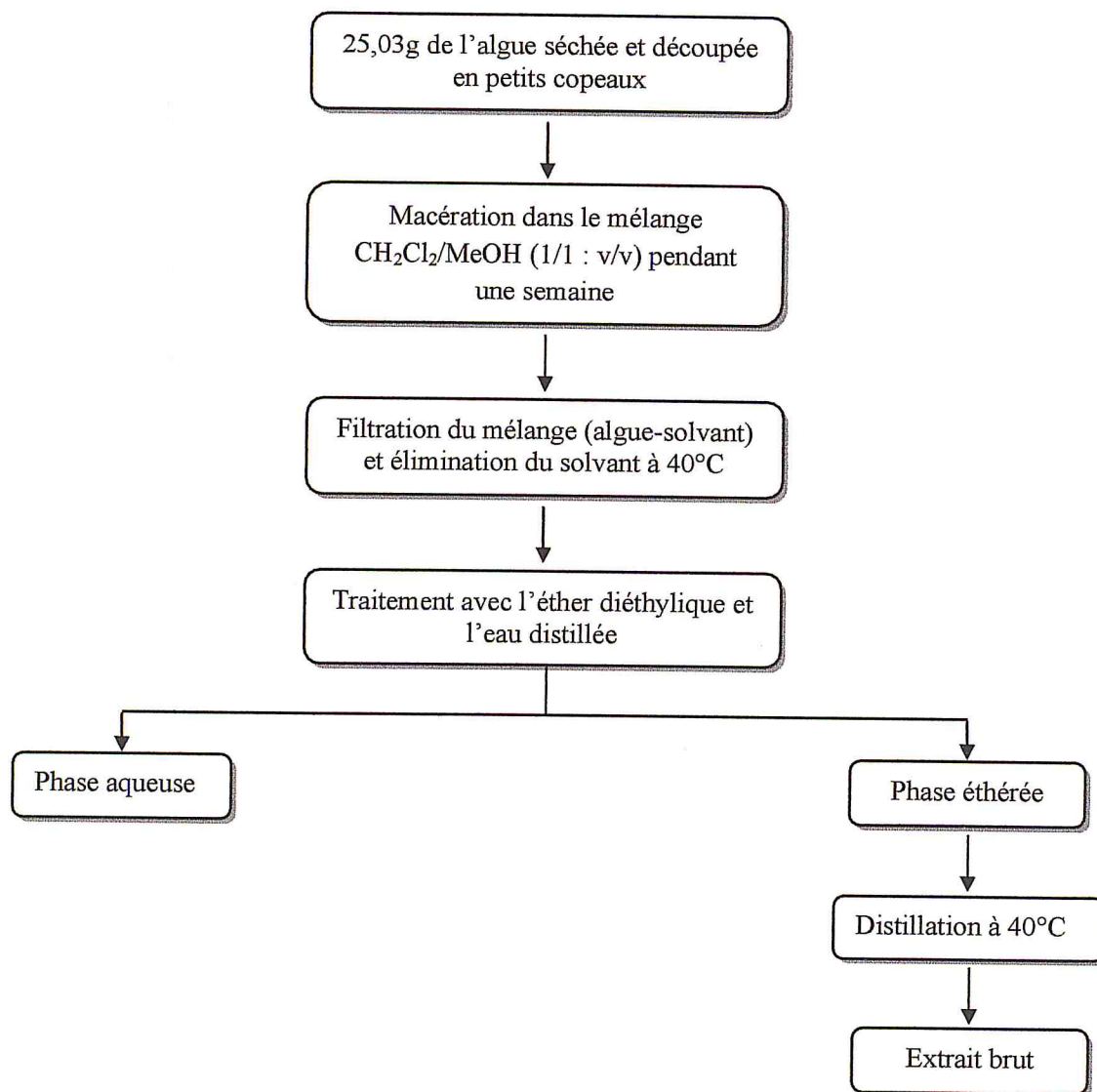


Figure 8 : Préparation de l'extrait à partir d'une matière végétale sèche en utilisant un procédé d'extraction classique

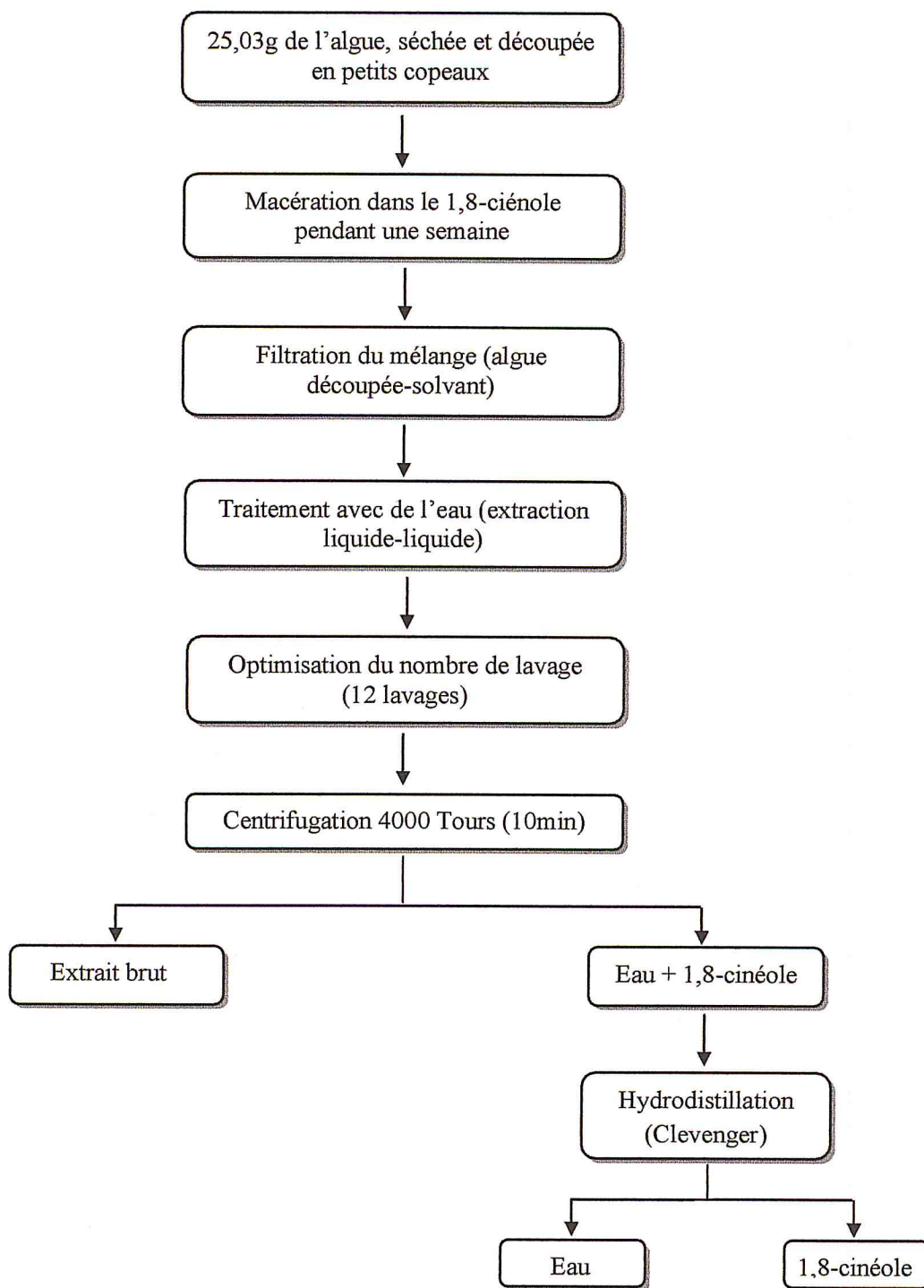


Figure 9 : Préparation de l'extrait à partir d'une matière végétale sèche en utilisant un procédé d'extraction vert

II. 2.3 Analyse préliminaire par chromatographie sur couche mince (CCM)

Un test analytique par chromatographie sur couche mince a été effectué pour avoir une idée préliminaire de la présence des produits phénoliques dans les extraits bruts obtenus à partir du procédé d'extraction classique et du procédé d'extraction vert.

L'analyse sur couche mince est réalisée en phase normale sur une plaque d'aluminium recouverte de gel de silice Si 60 Mesh/F254 de type Merck. L'analyse est effectuée par élution avec le système binaire acétate d'éthyle (Ref : Panreac 141318) / 2, 2, 4-triméthylpentane (Ref : Panreac 172064) (v/v : 1/1), en utilisant le phloroglucinol comme témoin. La révélation est réalisée au diiode.

L'examen de la figure 10, montre l'apparition de tâches jaunes pour les extraits de *Zonaria tournefortii*, obtenus respectivement à partir du procédé d'extraction classique et du procédé d'extraction vert au même niveau que le phloroglucinol, caractérisées par le même facteur de rétention ($R_f = 0,24$).

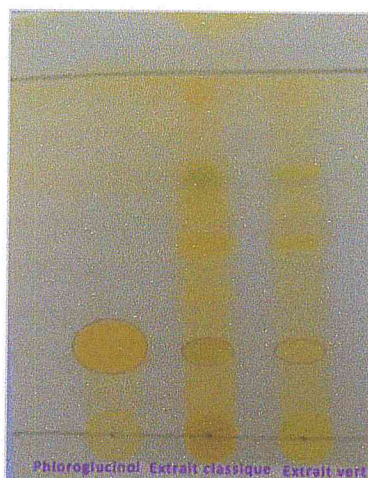


Figure 10 : Chromatographie sur couche mince des extraits de *Zonaria tournefortii* obtenus respectivement par extraction classique et par un procédé « vert »

II. 3 Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Dans le procédé d'extraction vert, des analyses par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ont été réalisées dans le but d'optimiser le nombre de lavages, par le suivi de l'évolution de la teneur du solvant vert en fonction du nombre de lavages.

Les spectres sont enregistrés sur un spectrophotomètre de marque Jasco type IRTF-8900 (Annexe 2 (a)), équipé d'un détecteur sulfate triglicine deutéré (DTGS), d'un rayonnement de laser, d'une séparatrice de radiation en KBr et d'une fente type globalar.

Les fenêtres utilisées sont en chlorure de sodium (NaCl), et une entretoise en téflon de 0.5 mm. L'acquisition des spectres a été effectuée avec une résolution de 4 cm^{-1} et un nombre de balayage égal à 20 spectres.

Les analytes sont dissous dans le chloroforme (Ref : Rectapur 22706.326) et introduits dans la cellule à l'aide d'une pompe péristaltique de marque Desaca (Heidelberg, Allemagne). Une fois la cellule est remplie, le flux est stoppé momentanément, à ce moment un spectre correspondant à l'échantillon est enregistré entre 400 et 4000 cm^{-1} .

II. 3.1 Spectre infrarouge à transformée de Fourier du 1,8-cinéole

Le spectre IRTF du 1,8-cinéole préparé dans le chloroforme avec une concentration de $21,94\text{ mg.ml}^{-1}$ est représenté par la figure 11.

L'examen du spectre infrarouge du 1,8-cinéole indique des bandes d'absorption à 577 cm^{-1} , 840 cm^{-1} , 921 cm^{-1} , 976 cm^{-1} et 1016 cm^{-1} représentant la déformation de groupement C-H. Il montre également des bandes à 1052 cm^{-1} , 1079 cm^{-1} , 1378 cm^{-1} , 1449 cm^{-1} et 1465 cm^{-1} correspondant à l'élongation de groupements C-H. On note également sur le spectre la présence des bandes intenses à 2883 cm^{-1} , 2925 cm^{-1} , 2969 cm^{-1} et 2986 cm^{-1} correspondant à l'élongation des groupes CH_2 et CH_3 . Les deux bandes à 1169 cm^{-1} et 3399 cm^{-1} correspondent respectivement à l'élongation de la liaison C-O d'un époxyde et la déformation de la liaison OH qui peut impliquer une impureté.

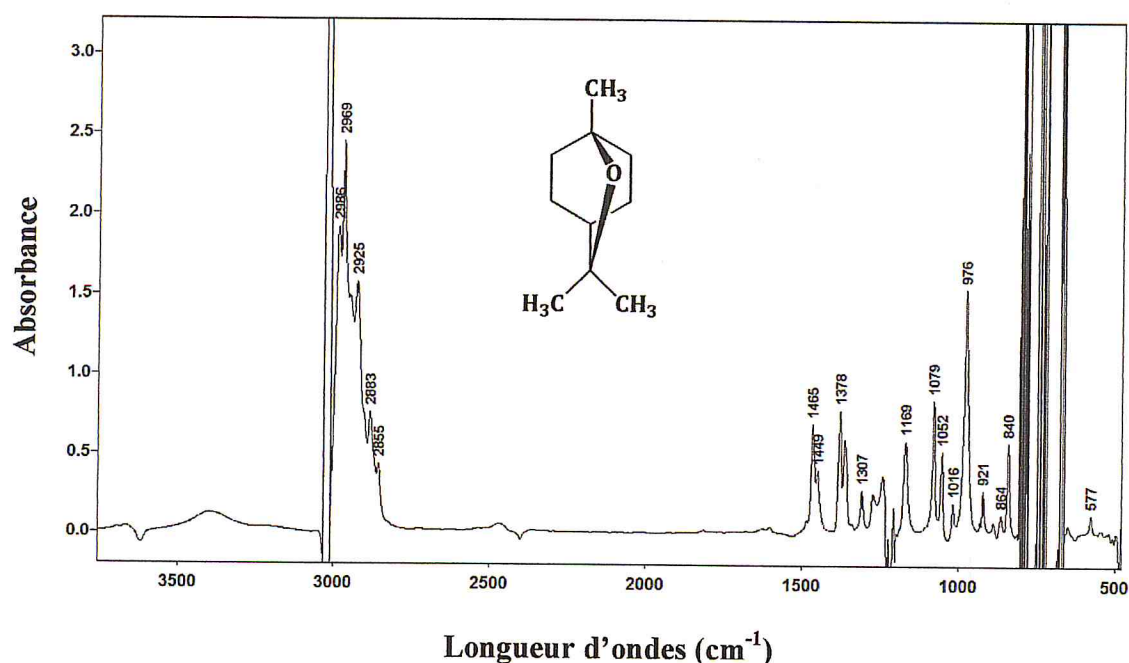


Figure 11: Spectre IRTF du 1,8 cinéole préparé dans le CHCl_3 ($21,94\text{ mg.ml}^{-1}$)

II. 3.2 Optimisation du nombre de lavages au cours de l'extraction liquide-liquide

II. 3.2.1 Comparaison des spectres infrarouge à transformée de Fourier des résidus obtenus après cinq et dix lavages

Des analyses par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier nous ont permis de suivre l'évolution de l'élimination du solvant vert (1,8-cinéole). Les résidus obtenus après cinq et dix lavages ont été exploités, en comparant leurs spectres infrarouge à transformée de Fourier avec celui du 1,8-cinéole.

Le spectre de la figure 12, nous a permis de sélectionner une bande caractéristique du 1,8-cinéole à 1169 cm^{-1} au dessous de la zone des empreintes digitales (1500 cm^{-1}). Une diminution de l'intensité de cette bande caractéristique a été constatée dans les spectres des résidus obtenus respectivement après cinq et dix lavages, notons qu'une même concentration a été utilisée pour la préparation des analytes. Cette diminution indique le taux d'élimination du solvant vert de l'extrait, suite à l'extraction liquide-liquide.

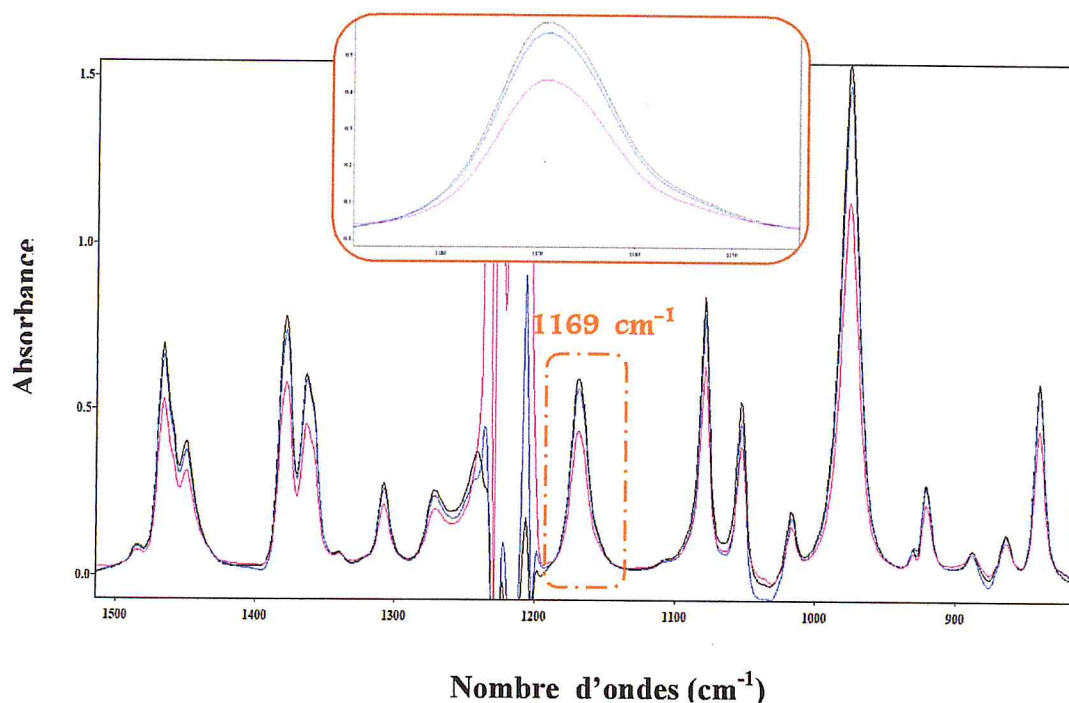


Figure 12: Spectres IRTF du 1,8 cinéole préparé dans le CHCl_3 ($21,94\text{ mg.ml}^{-1}$) (Spectre noir) et des résidus préparés directement dans le CHCl_3 ($21,94\text{ mg.ml}^{-1}$) obtenus après 5 lavages (spectre bleu) et 10 lavages (spectre rose)

II. 3.2.2 Détermination de l'absence du 1,8-cinéole dans l'extrait brut obtenu après 12 lavages

En comparant les spectres du 1,8-cinéole et de l'extrait brut obtenu après 12 lavages à partir du procédé d'extraction vert, préparés directement dans le chloroforme avec des concentrations respectives de $21,9 \text{ mg.ml}^{-1}$ et $26,4 \text{ mg.ml}^{-1}$, nous avons conclu que le procédé d'extraction vert permet d'obtenir un extrait brut exempt du 1,8-cinéole, ceci est démontré par l'absence de la bande caractéristique du 1,8-cinéole à 1169 cm^{-1} dans le spectre d'extrait brut (Figure 13).

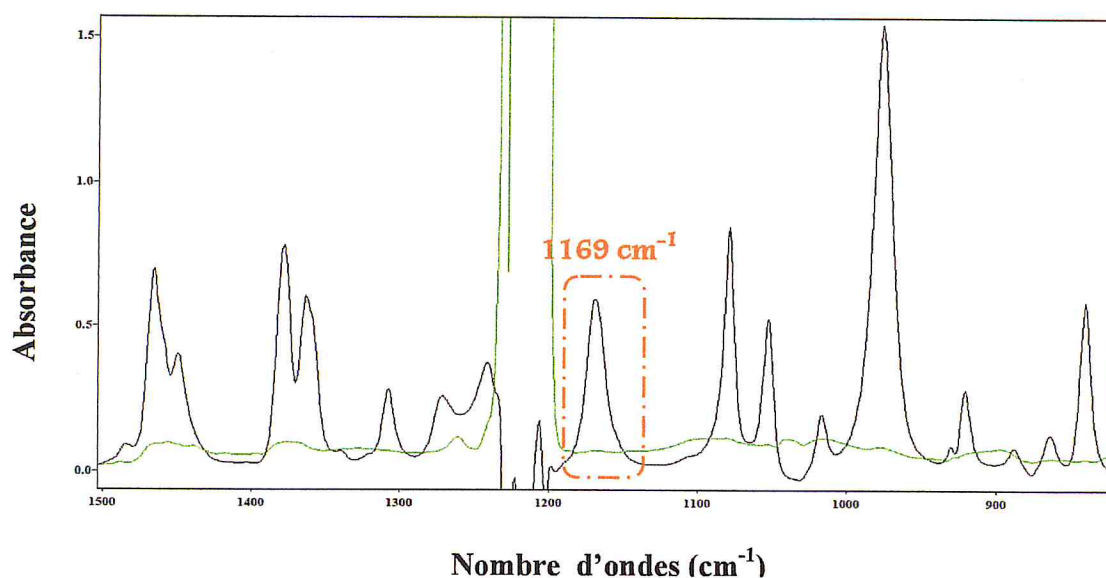


Figure 13 : Spectres IRTF du 1,8 cinéole préparé dans le CHCl_3 ($21,94 \text{ mg.ml}^{-1}$) (Spectre noir) et de l'extrait brut obtenu à partir du procédé d'extraction vert après 12 lavages préparé dans le CHCl_3 ($26,4 \text{ mg.ml}^{-1}$) (Spectre vert)

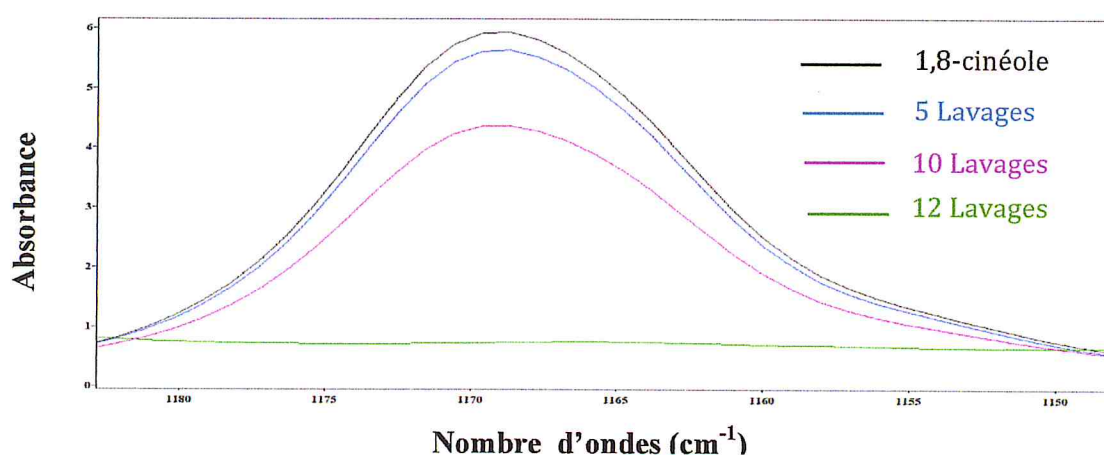


Figure 14 : Diminution de l'intensité de la bande caractéristique du 1,8-cinéole dans les spectres des résidus obtenus après cinq, dix et douze lavages

II. 3.3 Spectre infrarouge à transformée de Fourier du 1,8-cinéole récupéré

En comparant les deux spectres de l'agro-solvant monoterpénique 1,8-cinéole utilisé dans le procédé d'extraction vert et du 1,8-cinéole récupéré après extraction liquide-liquide en utilisant un appareil du type Clevenger, nous avons constaté que le procédé d'extraction vert permet un bon recyclage du solvant, étant donné que nous avons obtenu deux spectres superposables illustrés par la figure 15.

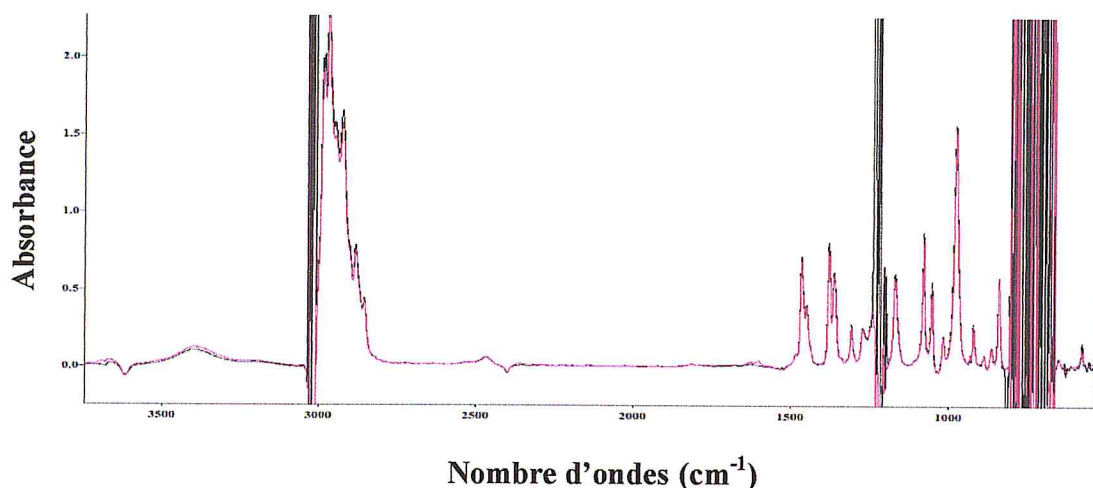


Figure 15 : Spectres IRTF du 1,8 cinéole préparé dans le CHCl_3 ($21,94 \text{ mg.ml}^{-1}$) (Spectre noir) et du 1,8 cinéole récupéré après extraction liquide-liquide préparé dans le CHCl_3 ($21,94 \text{ mg.ml}^{-1}$) (Spectre rose)

II. 4 Estimation du contenu en composés phénoliques totaux (TPC, Total Phenolic Content)

L'extrait brut obtenu par solvant classique à partir de *Zonaria tournefortii* est caractérisé par la présence de métabolites phénoliques dérivés du phloroglucinol [63]. Afin de comparer la nature chimique des extraits bruts obtenus par les deux procédés d'extraction, il nous a paru pertinent de caractériser la qualité des extraits, non plus par le rendement d'extraction, mais par une estimation du contenu en composés phénoliques totaux.

Une estimation rapide de la teneur en phénols totaux peut être obtenue par différentes méthodes, en particulier par utilisation d'un mélange de phosphomolybdate ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) et de phosphotungstate ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) commercialisé sous la dénomination de réactif « Folin-Ciocalteu ». Ce dernier est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène, qui montrent une absorption maximale aux environs des 760 nm permettant de déterminer la concentration des produits phénoliques en se référant à une courbe d'étalonnage à partir des concentrations connues [32].

II. 4.1 Procédure générale

La teneur en composés phénoliques totaux dans les extraits d'algue obtenus à partir du procédé d'extraction classique et du procédé d'extraction vert a été déterminée *via* le test de Folin-Ciocalteu (FC), adapté par Nathalie Blanc [72] avec quelques modifications.

4mg d'extraits d'algue ont été préalablement dissous dans 13 ml d'eau distillée et 2ml du méthanol à la température ambiante. 2 ml de chaque solution d'extrait ont été mélangés à 10 ml d'eau distillée et 12 ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 290 mg.ml^{-1} . 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu a été ajouté, et la coloration a été développée pendant 30min à l'obscurité à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 760 nm avec un spectrophotomètre (UV-1700). La mesure expérimentale est réalisée en triplicata.

Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalence de phloroglucinol (EPG, Phloroglucynol Equivalence) par grammes d'extrait sec (mg.EPG/g) en utilisant une gamme étalon allant de 0,02 à $0,08 \text{ mg.ml}^{-1}$ de phloroglucinol dissous dans de l'eau distillée et du méthanol, et traité de la même manière que l'échantillon réel.

II. 4.2 Résultats et discussion

Le dosage quantitatif des produits phénoliques par le test de Folin-Ciocalteu nécessite tout d'abord l'établissement d'une droite d'étalonnage (Figure 16). La méthode de dosage de Folin-Ciocalteu est basée sur la réactivité entre les extraits phénoliques et le réactif de Folin-Ciocalteu. Cette réactivité doit être comparée et normalisée avec un produit connu, celui-ci devant être le plus proche possible de la structure du monomère principal des produits phénoliques des extraits [90].

Les produits phénoliques de l'algue brune *Zonaria tournefortii* sont des acylphloroglucinol résultants d'un couplage entre une molécule de phloroglucinol et une oxylipine à 20 ou à 22 atomes de carbone [80], c'est pourquoi l'étalonnage a été effectué sur un monomère de phloroglucinol. Le tracé consiste à la réalisation de huit points expérimentaux, chaque point représentant la moyenne de trois analyses.

L'interprétation des résultats de l'étalonnage fait appel à des caractéristiques analytiques, ces dernières sont établies et résumées dans le tableau 5. Les caractéristiques analytiques montrent une très bonne linéarité, une limite de détection de $0,78 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$, une limite de quantification de $2,6 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ et une déviation standard de 0,34%.

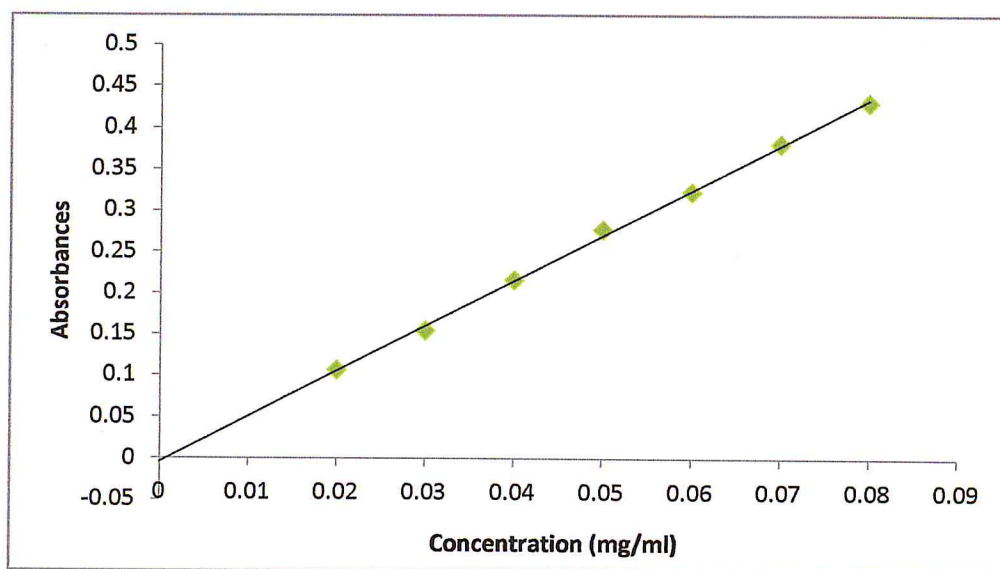


Figure 16 : Droite d'étalonnage des solutions standards de phloroglucinol allant de 0,02 à 0,08 mg.ml⁻¹ obtenue par le test de Folin-Ciocalteu

Tableau 5: Caractéristiques analytiques de la droite de calibration

Equation de la droite d'étalonnage	R	L.D (µg.ml ⁻¹)	L.Q (µg.ml ⁻¹)	D.S.R (%)
$y = 5,475x - 0,004$	0,9995	0,78	2,6	0,34

En nous basant sur les valeurs d'absorbance des deux solutions d'extraits ayant réagi avec le réactif de Folin-Ciocalteu ($A_{\text{Extrait classique}} = 0,3$ et $A_{\text{Extrait vert}} = 0,15$), et comparées à la solution étalon en équivalence de phloroglucinol comme décrit ci-dessus, les résultats de l'analyse colorimétrique des composés phénoliques totaux déterminés selon la relation ci-dessous [88], sont représentés sur la figure 17.

$$T = \frac{C \times V}{M}$$

T : Taux des composés phénoliques (mg EPG / g d'extrait sec d'algue)

C : Concentration d'extrait équivalente au phloroglucinol

V : Volume d'extrait (ml)

M : Poids sec d'extrait d'algue (g).

NB : La concentration d'extrait équivalente au phloroglucinol est obtenue par extrapolation des valeurs d'absorbance obtenues pour les échantillons dans la droite de calibration établie pour le phloroglucinol, traité de la même manière que les échantillons réels.

La détermination des composés phénoliques totaux par le test de Folin-Ciocalteu (Figure 17) met en évidence que la teneur en composés phénoliques d'extrait classique est significativement supérieure à celle de l'extrait vert avec respectivement une teneur de $(225 \pm 0,002)$ et $(112,5 \pm 0,0005)$ mg.EPG/g d'extrait sec. Ce résultat est lié à la méthode de Folin-Ciocalteu qui est connue d'être très sensible, mais malheureusement peu spécifique, car beaucoup d'autres composés réducteurs peuvent interférer, donnant un taux phénolique apparent élevé [92].

En effet, la littérature fournie de nombreuses informations sur la réactivité de Folin-Ciocalteu, dont nous citons à titre d'exemple le travail mené par J.-D. Everette [95], qui a démontré que le réactif de Folin-Ciocalteu réagit aussi bien sur les produits phénoliques que sur d'autres composés tels que les thiols, les protéines, les vitamines, les acides aminés, les sucres et les acides insaturés. Par conséquent, étant donné le caractère peu sélectif de l'extrait obtenu par la méthode classique en comparaison avec celui obtenu par le solvant « vert », la teneur des composés phénoliques est plus importante dans le premier que dans le second. Il est donc vivement recommandé de n'utiliser la méthode de Folin-Ciocalteu que sur des extraits suffisamment purifiés [32].

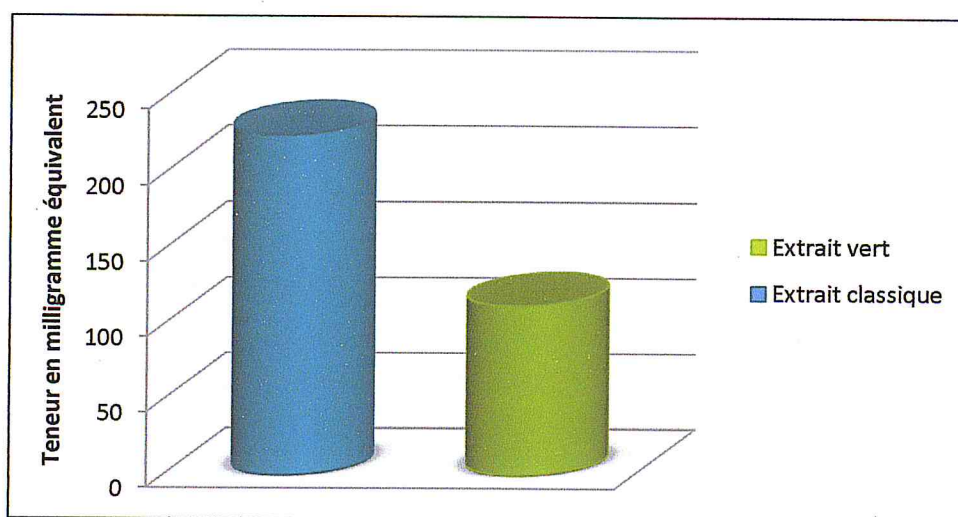


Figure 17 : Histogrammes, exprimés en mg d'équivalence de phloroglucinol par grammes d'extrait sec (mg.EPG/g), illustrant la teneur en composés phénoliques totaux (TPC) des extraits obtenus à partir du procédé d'extraction classique et du procédé d'extraction vert

II.5 Analyse par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

Des analyses par chromatographie liquide à haute performance ont été réalisées afin d'avoir une vision globale de la composition chimique des extraits obtenus à partir du procédé d'extraction classique et du procédé d'extraction vert. En effet, une comparaison des profils chromatographiques des extraits a été réalisée, en nous référant à l'analyse des fractions purifiées précédemment à partir de l'extrait classique de *Zonaria tournefortii*.

II.5.1 Analyse de l'extrait classique par chromatographie liquide à haute performance couplée à la détection réfractométrique (CLHP-DIR)

Une analyse chromatographique de l'extrait classique a été effectuée précédemment (Décembre 2012) au sein du laboratoire MAPIEM de l'Université du Sud Toulon-Var (France) par CLHP semi-préparative à polarité de phase inversée, sur une chaîne chromatographique de type Varian, composé d'un dégazeur, d'une monopompe (modèle Prostar 210) et d'un détecteur réfractométrique (modèle 350 RI Detector). Une colonne semi-préparative (Merck Purospher STAR RP18e; 5 μm ; Φ : 10mm, l = 250 mm), un mélange éluant MeCN/H₂O (95/5 ; v/v) à un débit de 3 ml.min⁻¹ ont été utilisés pour l'analyse. Le profil chromatographique obtenu est donné par la figure 18.

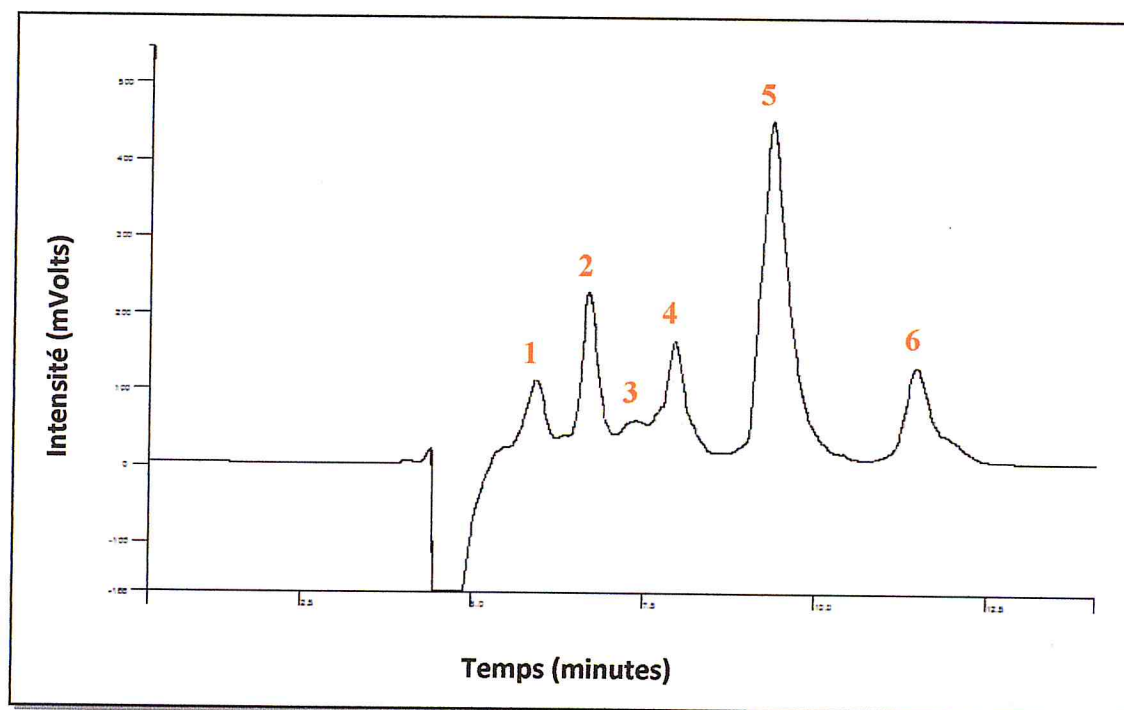


Figure 18 : Chromatogramme de l'extrait classique obtenu avec un détecteur Réfractométrique (DIR)

L'analyse CLHP-DIR (Figure 18) nous a permis d'isoler six produits (fractions de produits). L'analyse de la fraction 1 par RMN du proton a démontré qu'il s'agit d'un produit impur (mélange de produits). L'examen du spectre RMN du proton de la fraction 2 nous a permis de déduire qu'il s'agit d'un mélange de deux produits **Z2** et **Z6**. La fraction 3 a également apparait sous forme de deux produits.

Les analyses par RMN du proton et du carbone 13 des fractions 4, 5 et 6 ont démontré qu'il s'agit de produits purs. Ils sont décrits respectivement comme étant les produits **Z4**, **Z5** et **Z3** isolés à partir de la fraction phénolique de la même espèce par CLHP analytique à polarité de phase inversée avec le système ternaire MeCN/MeOH/H₂O : 47/40/13 (v/v/v) [60].

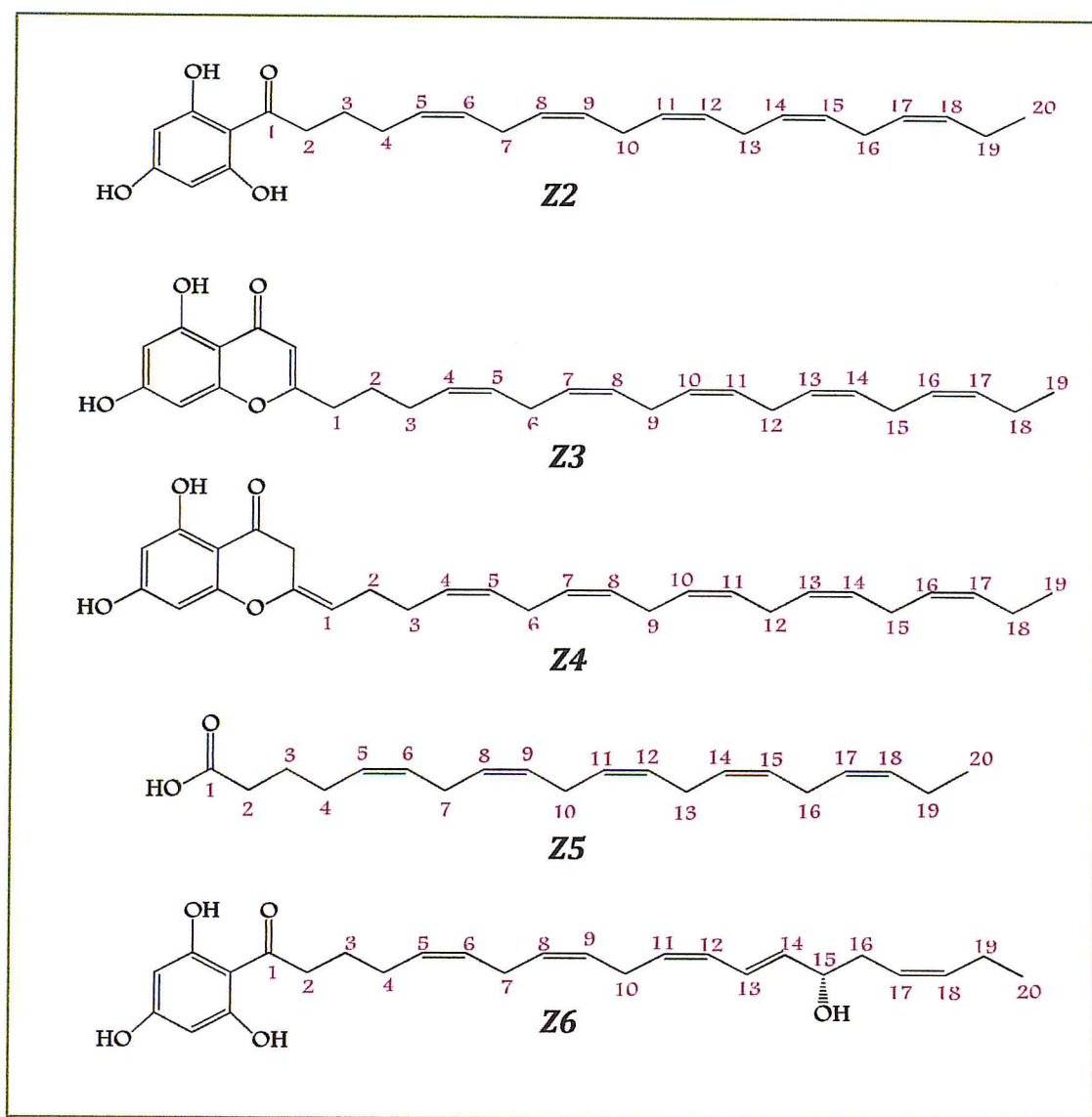


Figure 19 : Produits isolés à partir de l'algue brune *Zonaria tournefortii*

II. 5.2 Analyse des fractions 1, 3, 4, 5 et 6 par chromatographie liquide couplée à la détection UV-Visible à barrettes de diodes (CLHP/DAD-UV)

Les analyses ont été effectuées sur une chaîne chromatographique de type Agilent 1260, muni d'un injecteur automatique (G1329B) avec un module de chauffage des échantillons, d'une pompe quaternaire (G1311B) équipée d'un système de programmation de débit, d'un four pour colonne (G1316A) équipé d'un module de chauffage par effet Peltier, et d'un détecteur UV/Visible à barrettes de diodes (G1315D). Ce dernier permet de détecter les molécules absorbantes pour des longueurs d'onde comprises entre 190 et 950 nm. Cet appareillage, piloté par le logiciel ChemStation Agilent, permet de travailler en mode isocratique (composition constante de la phase mobile) ou en mode gradient (phase mobile de composition variable en cours d'analyse). Les séparations sont réalisées à température ambiante sur une colonne analytique (Agilent RP 18 ; $5\mu\text{m}$; Φ : 4,6mm, 1 : 250mm). Les fractions ont été analysées en mode isocratique, par CLHP à polarité de phase inversée, à l'aide du mélange éluant MeCN/H₂O (95/5:v/v), à un débit de $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, avec un volume d'injection de $10\mu\text{l}$. Les profils chromatographiques enregistrés à 220nm sont regroupés dans la figure 20.

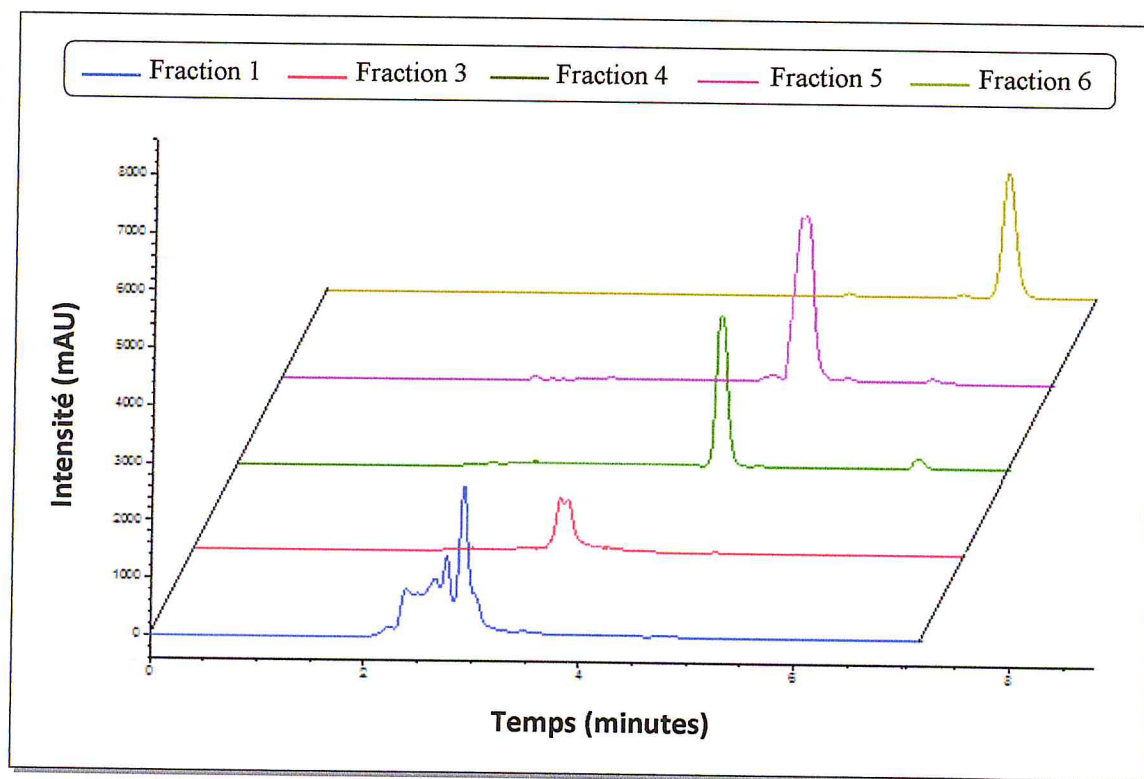


Figure 20 : Chromatogrammes des fractions 1- 6 isolées de l'extrait classique de *Zonaria tournefortii*

Avec le mode de détection DAD-UV, la fraction 1 apparait sous forme d'un mélange de produits, constitué de six pics élués à des temps de rétention ($t_{R1}=2,23\text{min}$, $t_{R2}=2,38\text{min}$, $t_{R3}=2,59\text{min}$, $t_{R4}=2,66\text{min}$, $t_{R5}=2,76\text{min}$ et $t_{R6}=2,92\text{min}$). Nous constatons pour la fraction 3, l'élution de deux produits à des temps de rétention ($t'_{R1}=3,47\text{min}$ et $t'_{R2}=3,59\text{min}$). Ces résultats sont en bon accord avec ceux obtenus par RMN du proton décrit ci-dessus.

Les fractions 4, 5 et 6 correspondant respectivement aux produits purs **Z4**, **Z5** et **Z3**, ont été éluées à des temps de rétention $t'_{R4}=4,49\text{min}$, $t'_{R5}=4,79\text{min}$ et $t'_{R6}=6,34\text{min}$.

II. 5.3 Analyse des extraits de *Zonaria tournefortii* obtenus à partir du procédé d'extraction classique et du procédé d'extraction vert par CLHP/DAD-UV

Les extraits de *Zonaria tournefortii* obtenus à partir du procédé d'extraction classique, et du procédé d'extraction vert ont été traités et analysés par les conditions décrites dans le paragraphe II.5.2, leurs profils chromatographiques sont donnés par les figures 21 et 22.

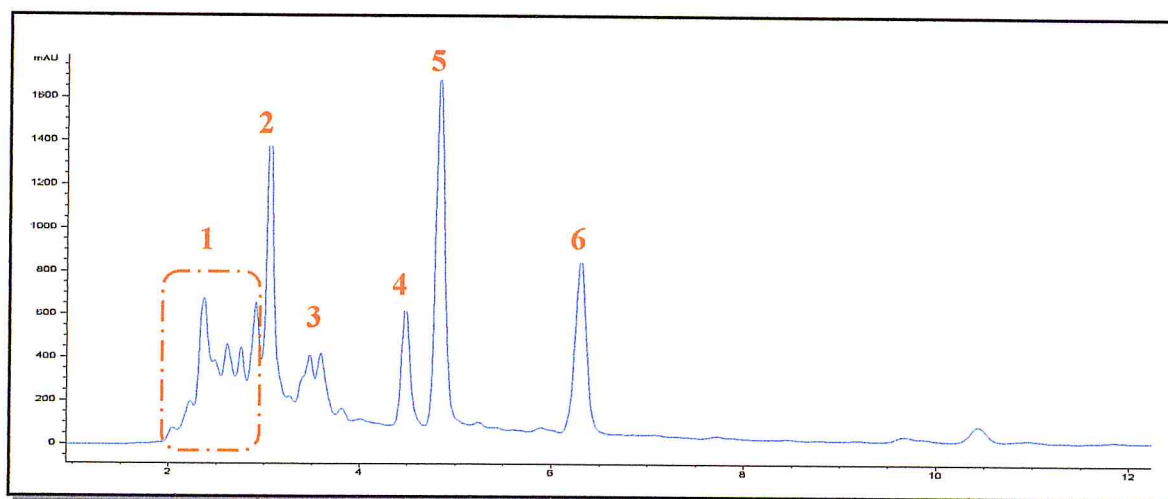


Figure 21: Chromatogramme de l'extrait classique

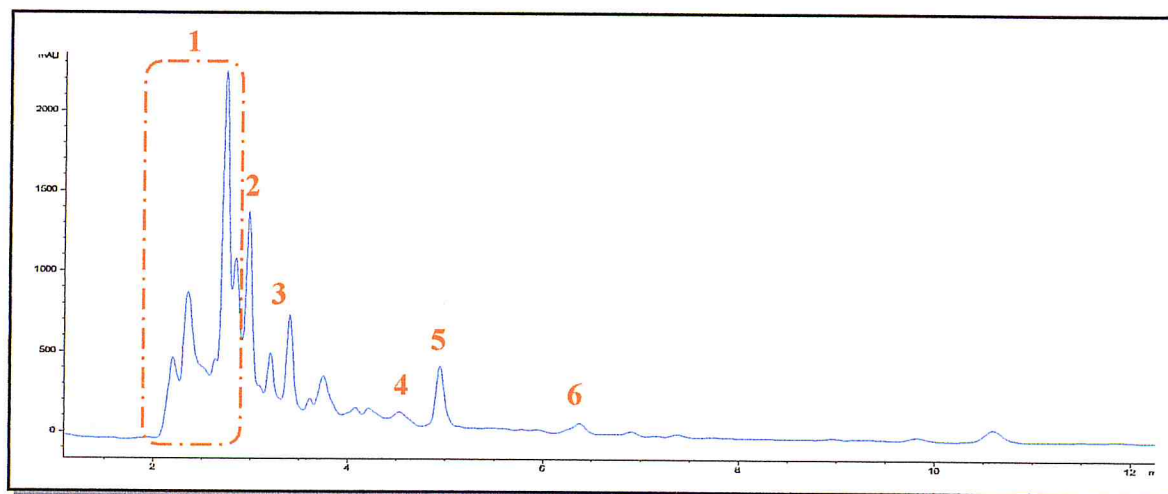


Figure 22 : Chromatogramme de l'extrait vert

L'examen des figures 21 et 22 montre que les profils chromatographiques des deux extraits enregistrés à 220 nm sont relativement semblables. La comparaison des deux chromatogrammes obtenus par CLHP/DAD-UV (Figure 21 et 22) avec celui obtenu par CLHP-DIR (Figure 18), nous a permis de repérer les différentes fractions (1 à 6). Nous avons noté les constations suivantes :

Les agrandissements d'une zone entre 0 et 3 min des chromatogrammes en CLHP/DAD-UV (zone 1), de l'extrait classique et de l'extrait vert (Figure 23), montrent la présence de six pics élués aux temps de rétention ($t_{R1}=2,22$ min, $t_{R2}=2,38$ min, $t_{R3}=2,50$ min, $t_{R4}=2,61$ min, $t_{R5}=2,76$ min $t_{R6}=2,92$ min) pour l'extrait classique, alors que, seulement quatre pics élués à des temps de rétention ($t_{R1}=2,20$ min, $t_{R2}=2,35$ min, $t_{R3}=2,73$ min, $t_{R4}=2,84$ min) ont été observés dans le cas de l'extrait vert. Nous constatons que la zone 1 des deux chromatogrammes de l'extrait classique et vert correspond parfaitement à la fraction 1 (figure 23). L'apparition de plus de composés dans l'extrait classique est probablement liée à sa faible sélectivité, les produits extraits peuvent plausiblement avoir un caractère phénolique, ce qui explique l'augmentation de la teneur en phénols totaux déterminée par le test de Folin-Ciocalteu observée ci-dessus.

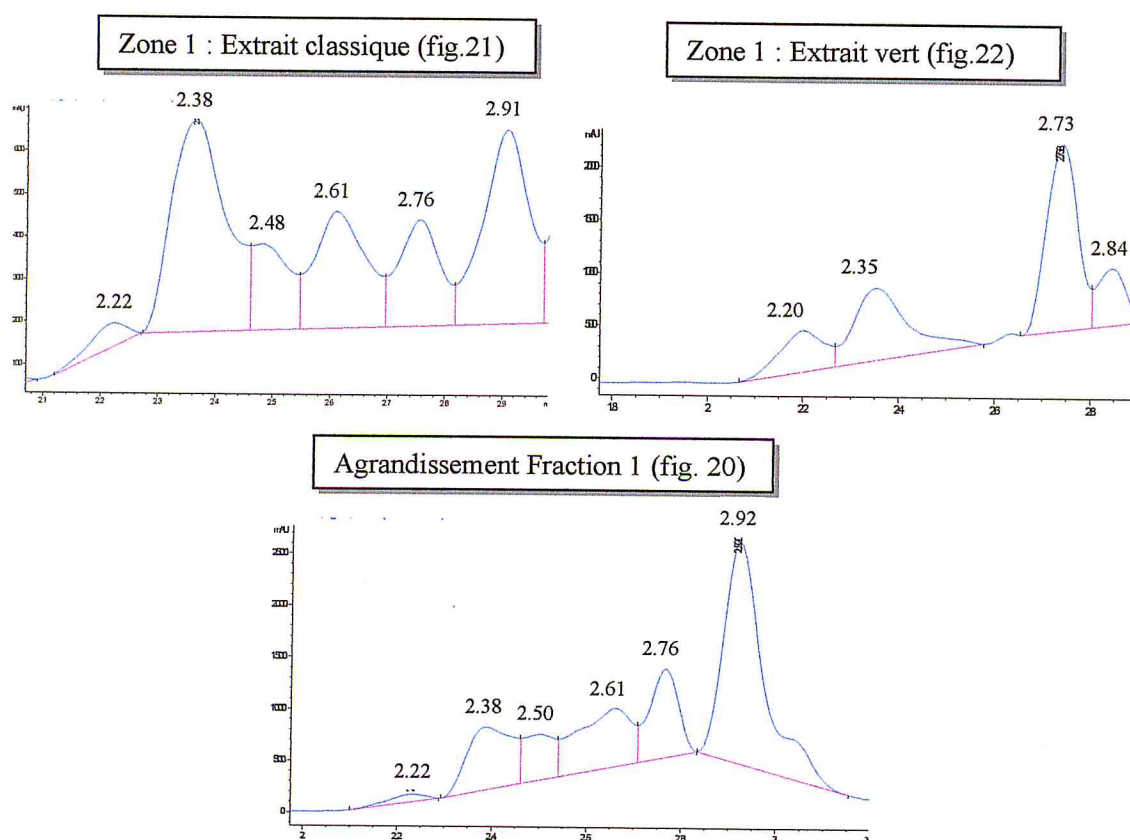


Figure 23 : Agrandissements de la zone1 (0 - 3min) des chromatogrammes de l'extrait classique et vert ainsi que celle de la fraction 1 (figure 20)

La zone 2 correspondant à des temps d'élution s'étalant de 2,9 à 3,2 min, montre l'apparition d'un seul pic, qui probablement se trouve en concentration plus importante dans l'extrait classique que dans l'extrait vert. Le seul produit de cette zone 2 est incontestablement celui de la fraction 2 (figure 18).

La zone 3 est caractérisée par l'élution de deux pics à des temps de rétention compris entre 3,4 et 3,59 min. Les deux pics sont bien résolus dans l'extrait vert ($t_R = 3,2$ et $3,4$ min), et moins bien résolus dans l'extrait classique ($t_R = 3,47$ et $3,59$ min), ceci peut être interprété par l'élution d'autres produits en même temps dans l'extrait classique, ce qui encombre la résolution des deux pics. Ceci est en parfait accord avec les résultats de la RMN pour la fraction 3, qui bien qu'elle apparait sous forme d'un seul pic (figure 18), est constituée d'un mélange de deux produits (figure 20). L'apparition sous forme de deux pics est liée à la bonne efficacité de séparation de la colonne.

La zone du chromatogramme de l'extrait classique et de l'extrait vert (figure 21 et 22), s'étalant de 4 à 8 min, montre la présence de trois pics majoritaires (4, 5 et 6), ces pics sont élués en même temps de rétention que les fractions 4, 5 et 6 (figure 20), c'est-à-dire, à $t_{R4} = 4,49$ min, $t_{R5} = 4,79$ min et $t_{R6} = 6,34$ min. Les pics 4, 5 et 6 correspondent fort probablement aux produits purs **Z4**, **Z5** et **Z3**.

Nous avons constaté que l'intensité relative des trois pics (4, 5 et 6) est nettement plus importante dans l'extrait classique que dans l'extrait vert, ceci peut être interprété par une teneur plus importante dans l'extrait classique. Cette notion de concentration (teneur) est très relative, le seul moyen de comparaison sur le plan quantitatif est le dosage des différents métabolites au sein de l'extrait.

II. 6 Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Zonaria tournefortii*

II. 6.1 Introduction sur l'activité antioxydante

Dans les industries alimentaires et pharmaceutiques, de nombreux antioxydants synthétiques commerciaux tels que le butylhydroxytoluène (BHT) et le butylhydroxyanisole (BHA) ont été utilisés. Cependant, l'utilisation de ces antioxydants de synthèse doit être strictement réglementée en raison des risques potentiels pour la santé.

Récemment, il y a un intérêt considérable dans l'industrie alimentaire ainsi que l'industrie pharmaceutique pour le développement d'antioxydants provenant de sources naturelles, telles que la flore et la faune marines comme des potentielles alternatives. Les organismes marins sont riches en composés bioactifs de structures diverses. Parmi eux, les algues marines représentent l'une des sources les plus riches en antioxydants naturels. Or dans de nombreuses études, l'activité antioxydante a été fortement corrélée à la présence de composés phénoliques.

La capacité antioxydante de molécules, peut être évaluée soit *in vivo* sur des organismes vivants, soit *in vitro*. Pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro* d'extraits naturels, différentes méthodes ont été développées. Ces méthodes impliquent le mélange d'espèces oxydantes, tels que les radicaux libres, avec un échantillon qui contient des antioxydants capables d'inhiber la génération des radicaux. Ces antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes majeurs: soit par transfert d'atome d'hydrogène, soit par transfert d'électron. Les méthodes basées sur le transfert d'atome d'hydrogène mesurent la capacité globale d'un antioxydant à réprimer les radicaux libres par donation d'un atome d'hydrogène, alors que les méthodes basées sur le transfert d'électron mesurent la capacité d'un antioxydant à transférer un électron qui réduira n'importe quel composé, incluant les métaux, les carbonyles et les radicaux. Ainsi, compte tenu des différents facteurs impliqués, tels que les propriétés physico-chimiques des molécules, le type de test employé ou l'état d'oxydation des substrats, il est recommandé d'utiliser au moins deux tests pour confirmer une activité antioxydante [58]. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur l'utilisation de deux tests chimiques : le test évaluant le piégeage des radicaux libres et employant le 2,2-diphenyle-1-picrylhydrazyle sous sa forme radicalaire (DPPH•), impliquant le transfert d'atome d'hydrogène et le transfert d'électron, et le test déterminant le pouvoir réducteur antioxydant (FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power) basé sur le transfert d'électron.

II. 6.2 Mesure du pouvoir anti-radicalaire par le test DPPH

II. 6.2.1 Principe de la méthode

Le DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable ayant au centre de sa molécule deux atomes d'azote. L'utilisation de ce radical offre un moyen facile et rapide d'évaluer l'activité anti-radicalaire d'antioxydants, mais certaines précautions doivent être prises lors de l'utilisation de la méthode et l'interprétation des données [94]. Cependant, la forme radicalaire du DPPH• peut être influencée négativement par des facteurs tels que : la présence de la lumière ou le pH [95].

En effet, la méthode du DPPH utilisée pour déterminer l'activité anti radicalaire des extraits de *Zonaria tournefortii* implique la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire DPPH• en présence d'un donneur d'hydrogène (AH), ce qui conduit à la formation du DPPH-H non-radicalaire (Figure 24). Cette réaction induit une perte de la couleur violette du radical qui peut être facilement suivie par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 517 nm. La rapidité de la perte de la couleur est directement proportionnelle à l'activité antioxydante du donneur d'hydrogène [96].

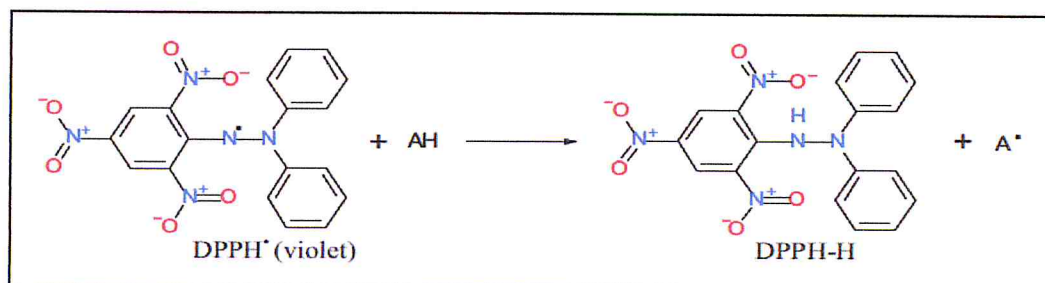


Figure 24 : Réduction du radical DPPH• en présence d'un antioxydant

II. 6.2.2 Procédure générale

II. 6.2.2.1 Test antiradicalaire sur plaque CCM

Le pouvoir antiradicalaire des extraits de *Zonaria tournefortii* a été testé dans un premier temps par la méthode au DPPH appliquée sur plaque CCM, qui a été mise au point par Takao [97], afin d'avoir une idée préliminaire de la présence d'un pouvoir antioxydants des extraits testés.

L'analyse est effectuée avec le mélange binaire AcOEt/TMP (v/v : 1/1), en utilisant l'acide ascorbique comme témoin positif. La révélation est effectuée à l'aide d'une solution de DPPH à 0,2 %. Après un temps de réaction optimal de 30 min, les composés à propriété antiradicalaire sont localisés par l'apparition de zones jaunes sur fond violet.

II. 6.2.2.2 Test antiradicalaire mesuré au spectrophotomètre

La capacité antiradicalaire mesurée au spectrophotomètre de chaque extrait de *Zonaria tournefortii* a été déterminée par la méthode au DPPH [98] avec quelques modifications.

L'activité antiradicalaire a été évaluée en procédant à deux approches à savoir : la détermination de la quantité d'antioxydants nécessaire pour réduire 50% de DPPH• à un temps de référence, et le suivi de la cinétique de la réduction.

La procédure générale d'évaluation de l'activité antiradicalaire est décrite comme suit : 100 µl de chacune des solutions d'extraits à différentes concentrations ont été mélangés avec 100 µl d'une solution méthanolique de DPPH à 0,004%. La réaction est laissée se développer pendant 30 min dans l'obscurité, à température ambiante.

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à des antioxydants de référence [99]. Par conséquent, nous avons effectué plusieurs tests du taux de piégeage de radical libre DPPH• sur la vitamine C, butylhydroxyanisol (BHA) et butylhydroxytoluène (BHT).

En parallèle, une solution exempte d'un antioxydant dite solution témoin ou de contrôle, constituée de 100 µl du méthanol et 100 µl de la solution DPPH a été préparée dans les mêmes conditions opératoires.

Le test antioxydant est réalisé en triplicata sur microplaque. La lecture est effectuée à 517 nm avec un spectrophotomètre multi-puits.

Dans la première approche, l'activité antioxydante est définie par le pourcentage d'inhibition ou l'indice de la réduction de l'activité anti-radicalaire en pourcentage %RSA (Radical Scavenger Activity), où l'absorbance du mélange réactionnel qui contient le radical libre et l'échantillon de l'antioxydant est reliée avec l'absorbance du mélange sans aucun antioxydant (solution témoin ou contrôle) à un temps t:

$$\% RSA = \frac{Abs\ contrôle - Abs\ échantillon}{Abs\ contrôle} \times 100$$

Soit :

Abs : Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm.

Abs échantillon : Absorbance à 517 nm de l'échantillon.

Abs contrôle : Absorbance à 517 nm de la solution méthanol + DPPH.

Pour mieux caractériser le pouvoir anti-radicalaire, dans la deuxième approche, dont laquelle nous avons réalisé un suivi réactionnel par la mesure de l'abaissement de l'absorbance de la concentration CE50, afin d'avoir des renseignements sur la vitesse de réduction du radical libre, et la puissance des extraits de *Zonaria tournefortii*, le paramètre cinétique TCE50 est introduit, il représente le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre à CE50.

II. 6.2.3 Résultats et discussion

II. 6.2.3.1 Test antiradicalaire sur plaque CCM

Les chromatogrammes des extraits de *Zonara tournefortii* (extrait classique et vert), révélés par une solution de DPPH à une concentration de 2 mg.ml⁻¹ dans le méthanol, présentent des taches jaunes sur un fond violet. Ces dernières donnent des indications pour une activité anti-radicalaire des extraits de *Zonaria tournefortii*.

L'extrait classique présente le plus grand nombre de composés actifs avec cinq taches jaunes (Rf : 0,24 ; 0,42 ; 0,55 ; 0,71 ; 0,92), comparant à l'extrait vert qui présente trois taches de composés actifs (Rf : 0,24 ; 0,42 ; 0,92).

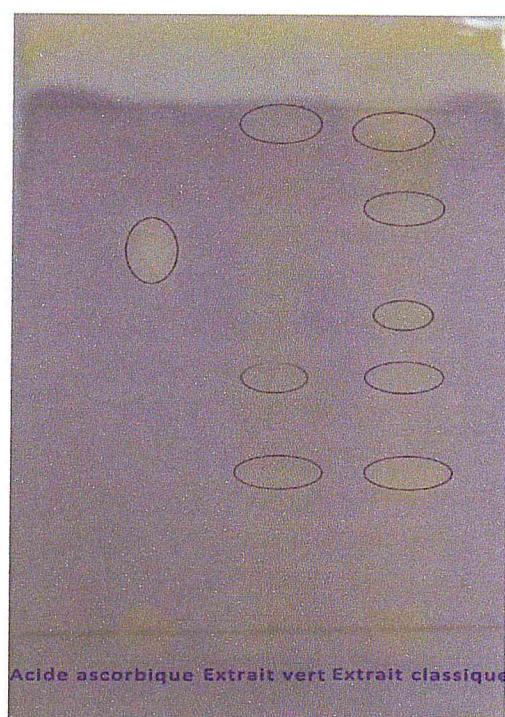


Figure 25 : Résultats du test antioxydant sur CCM des extraits de *Zonaria tournefortii* après révélation au DPPH

II. 6.2.3.2 Test antiradicalaire mesuré au spectrophotomètre

Les antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études car, ils pourraient s'avérer utiles dans le traitement des maladies dans lesquels le stress oxydant est incriminé. De nombreuses études réalisées sur les produits naturels ont prouvé que ce sont particulièrement les composés phénoliques qui sont responsables de leur activité antioxydante [100]. Nous avons donc évalué le pouvoir antioxydant de nos extraits qui se sont montrés riches en acylphloroglucinol [63]. Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode au DPPH•. Ce radical libre de couleur violette est réduit en un composé de couleur jaune en présence de composés anti-radicalaires. L'intensité de la coloration mesurée au spectrophotomètre, est inversement proportionnelle à l'activité antiradicalaire des composés dont on souhaite déterminer l'activité [96].

La figure 26 illustre une plaque 96 puis soumise au test antiradicalaire par la méthode DPPH•, qui montre lisiblement la variation de la coloration du DPPH• en fonction des concentrations des extraits et des témoins.

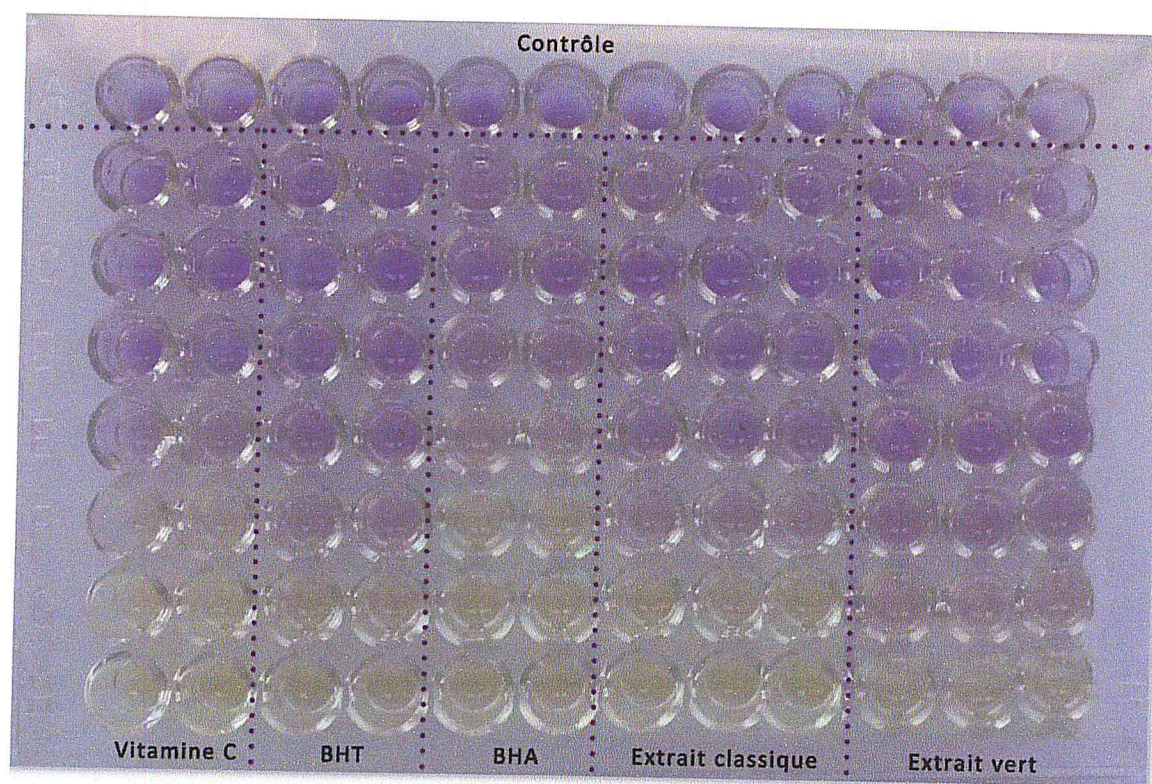


Figure 26: Photographie d'une microplaque obtenue avec le test DPPH

En faisant varier la concentration des extraits et en calculant pour chaque concentration le % d'inhibition correspondant, nous avons établi une courbe d'allure logarithmique entre les différentes concentrations et les % d'inhibition (Figure 27).

Tableau 6 : Variation des absorbances et du taux de piégeage du DPPH• en fonction des différentes concentrations des extraits de *Zonaria tournefortii*

Concentration (mg.ml ⁻¹)	Extrait classique		Extrait vert	
	Absorbance	% d'inhibition	Absorbance	% d'inhibition
0,02	0,480	15,79	0,528	7,37
0,04	0,340	40,35	0,447	21,58
0,06	0,278	51,22	0,379	33,40
0,08	0,210	63,16	0,317	44,38
0,1	0,170	70,17	0,291	48,94
0,2	0,148	74,03	0,274	51,93
0,3	0,142	75,08	0,260	54,38
0,4	0,140	75,44	0,258	54,73

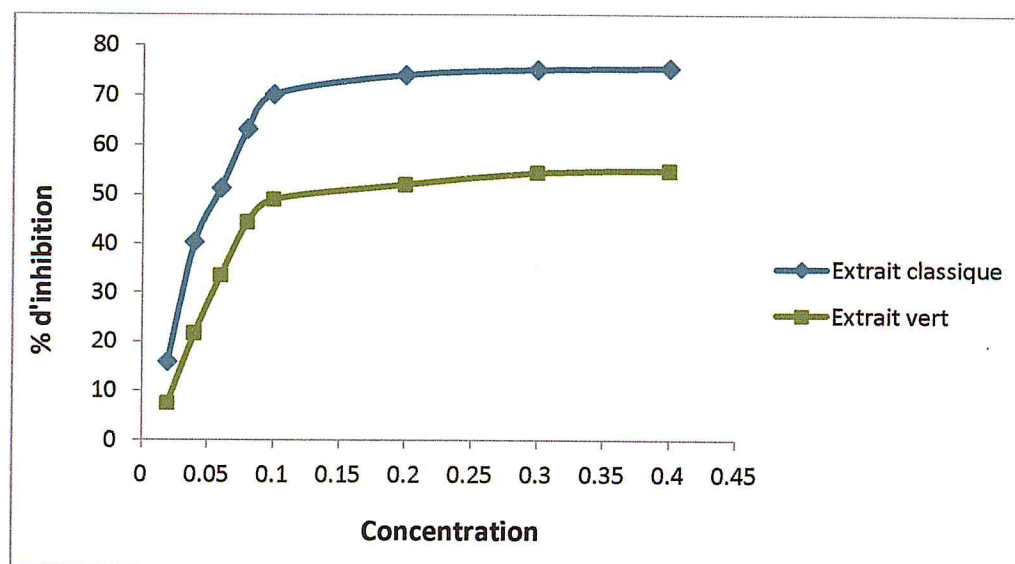


Figure 27 : Variation du taux de piégeage du DPPH• par l'extrait classique et l'extrait vert de *Zonaria tournefortii* en fonction des différentes concentrations

L'évaluation du pouvoir antiradicalaire des extraits bruts de *Zonaria tournefortii* ont été fait en comparaison avec celle des différents antioxydants : Vitamine C, BHA et BHT. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 7, et illustrés par la figure 28.

Tableau 7 : Variation des absorbances et du taux de piégeage du DPPH• en fonction des différentes concentrations des standards d'antioxydants

Concentration (mg.ml ⁻¹)	Absorbance			% d'inhibition		
	Vitamine C	BHA	BHT	Vitamine C	BHA	BHT
0,0005	0,497	0,507	0,521	12,8	10,9	8,5
0,003	0,375	0,332	0,420	34,2	41,7	26,3
0,006	0,207	0,284	0,315	63,7	50,1	44,7
0,008	0,170	0,251	0,293	70,1	55,9	48,6
0,02	0,112	0,176	0,203	80,3	69,1	64,3
0,03	0,078	0,130	0,145	86,3	77,1	74,4
0,05	0,055	0,098	0,102	90,3	82,8	82,1
0,06	0,056	0,096	0,099	90,1	83,1	82,6

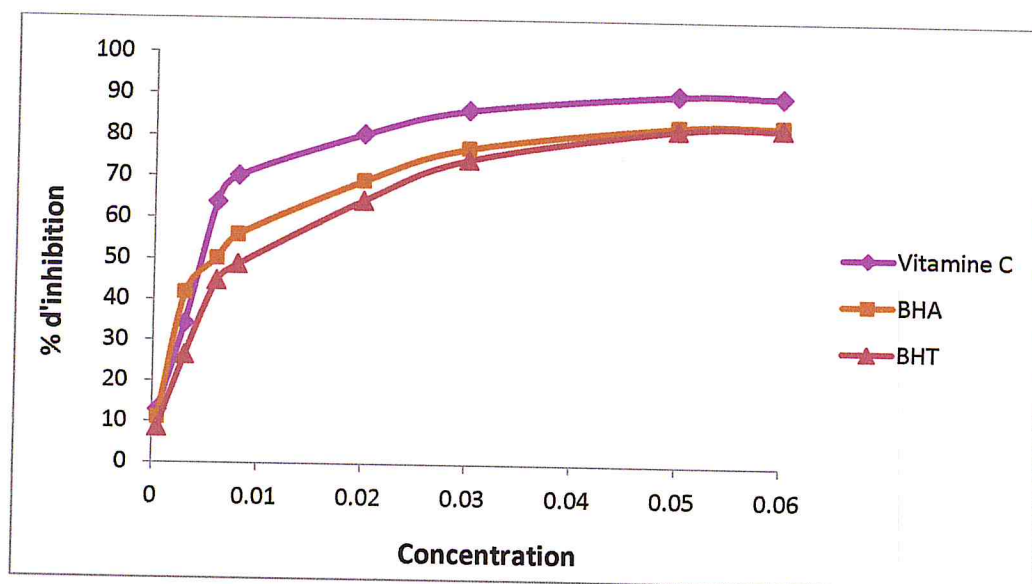


Figure 28 : Variation du taux de piégeage du DPPH• par la vitamine C, BHA et BHT en fonction des différentes concentrations

L'interprétation des résultats de l'activité antioxydante de nos extraits par la méthode de DPPH• est exprimée en « concentration efficace » ou CE50 (Tableau 8). Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant qui provoque une perte de 50% de l'activité de DPPH• [95]. Il a été introduit par Brand-Williams [94], et a été employé par la suite par plusieurs groupes de chercheurs pour la présentation de leurs résultats.

Les concentrations efficaces des extraits et des témoins sont déterminées graphiquement à partir des courbes présentées par les figures 27 et 28. Notons que la capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que sa CE50 est petite [99].

Un autre paramètre exprime la puissance anti-radicalaire a été calculée à partir du premier est noté : "ARP" (pouvoir anti-radicalaire, égale à 1/CE50) [94].

Tableau 8 : Valeurs CE50 et ARP des extraits de *Zonaria tournefortii* et des standards antioxydants

Composés	Vitamine C	BHA	BHT	Extrait classique	Extrait vert
CE50 ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)	4,9	6	8,5	58	140
ARP	0,2	0,17	0,12	0,017	0,0071

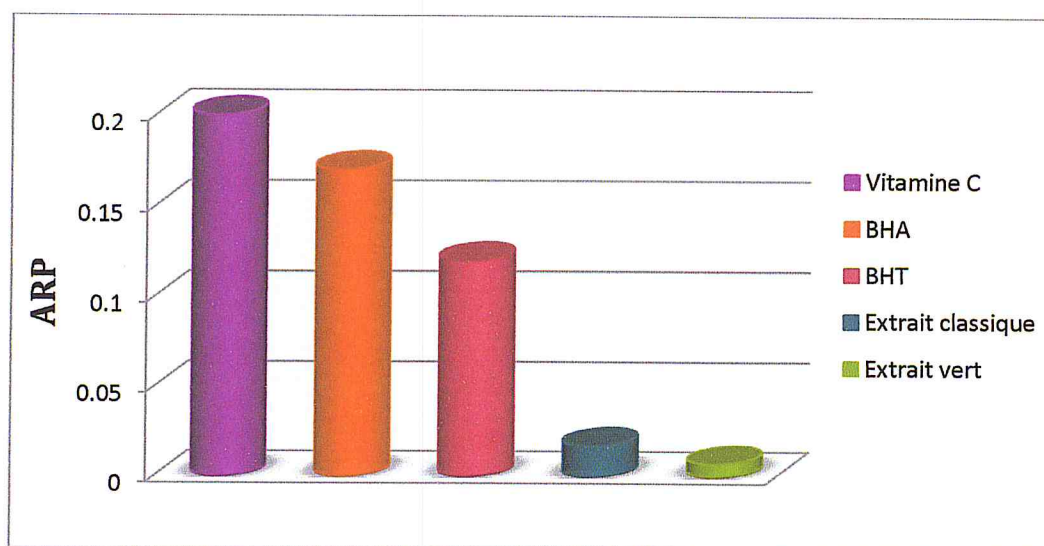


Figure 29 : Comparaison des valeurs ARP des extraits de *Zonaria tiournefortii* et des antioxydants standards



Le temps nécessaire pour atteindre l'état d'équilibre avec CE50 est défini comme TCE50. Ce paramètre est déduit à partir de la courbe illustrée par la figure 30, représentant l'évolution de l'activité antioxydante des extraits de *Zonaria tournefortii* en fonction du temps.

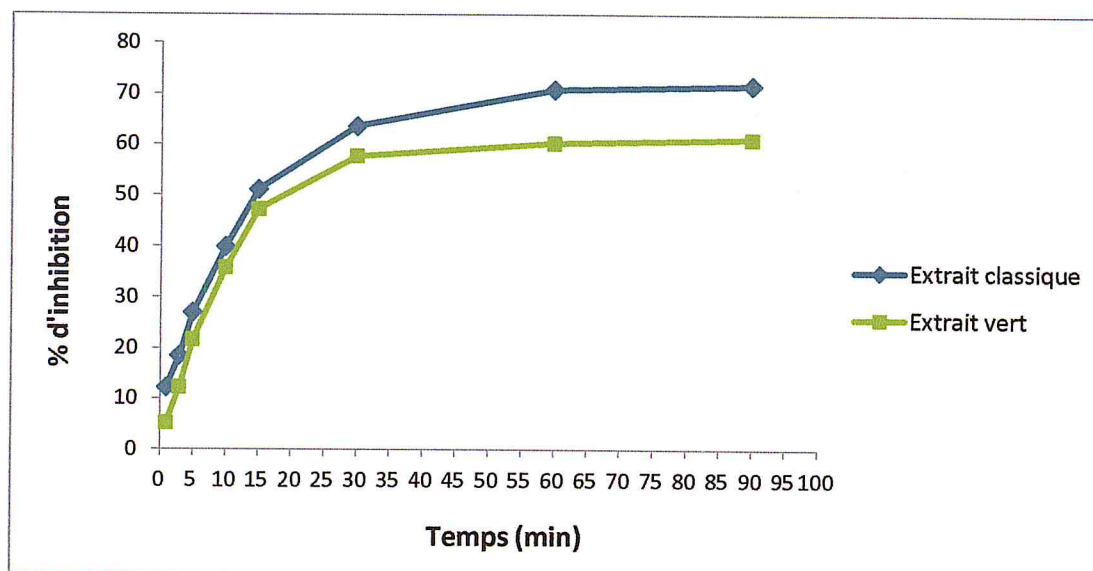


Figure 30 : Variation du taux de piégeage du DPPH• par les extraits de *Zonaria tournefortii* obtenus à partir du procédé d'extraction classique et du procédé d'extraction vert en fonction du temps

L'étude cinétique de piégeage des radicaux libres indique une variation de temps de réaction TCE50 entre 14 et 17 min correspondant respectivement à l'extrait classique et à l'extrait vert afin d'attendre 50% d'activité.

L'estimation simultanée du pouvoir anti-radicalaire $1/CE_{50}$ et du temps de réaction TCE50 permettent d'estimer d'une meilleure façon l'activité antioxydante par l'indice de l'efficacité anti-radicalaire introduit par Sanchez-Moreno [101].

$$EAR = \frac{1}{CE_{50} \times TCE_{50}}$$

Les extraits testées ont été classées selon la méthode proposée par Sanchez- Moreno: L'activité anti-radicalaire est faible pour $EAR < 1.10^{-3}$, intermédiaire entre 1.10^{-3} et 5.10^{-3} , élevée entre 5.10^{-3} et 10.10^{-3} , et très élevée pour $EAR > 10.10^{-3}$.

Tableau 9 : Valeurs EAR des extraits de *Zonaria tournefortii* obtenus à partir du procédé d'extraction classique et du procédé d'extraction vert

Composés	EAR	Classification
Extrait classique	$1,23 \times 10^{-3}$	Intermédiaire
Extrait vert	$4,20 \times 10^{-4}$	Faible

En comparaison avec les antioxydants standards, les deux extraits testés s'avèrent moins actifs, comme c'est illustré par les histogrammes de la figure 29. Ce résultat trouve son explication du fait que les extraits naturels sont composés d'un mélange complexe de produits actifs et inactifs, en comparaison avec les standards antioxydants qui sont des produits purs. Par conséquent, la purification des composés actifs responsables des effets antioxydants, permet d'avoir une activité similaire, et, peut être plus importante que celle des antioxydants standards.

Néanmoins, l'extrait au 1,8-cinéole s'est révélé significativement moins actif que l'extrait classique, ce résultat est en bon accord avec le résultat obtenu sur plaque CCM. Il peut être suggéré que l'activité observée pour l'extrait classique ne semble pas être liée à une forte teneur en composés phénoliques, mais à des antioxydants plus efficaces. De même, ce n'est pas uniquement les composés majoritaires des extraits qui sont responsables de cette activité antioxydante, mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres [102].

II. 6.3 Pouvoir réducteur (FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power)

II. 6.3.1 Principe de la méthode

Le test de la réduction du fer FRAP a été initialement développé par Benzie et Strain [103], pour mesurer la capacité du plasma à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}), mais il a été également adapté et utilisé par la suite pour la mesure d'antioxydants présents dans les extraits botaniques [104].

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}). Lors de la réduction du complexe ferrique en complexe ferreux une coloration bleue verte apparaît avec un maximum d'absorption à 700 nm [105]. Toute augmentation de l'absorbance du mélange réactionnel correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés [106].

II. 6.3.2 Procédure générale

L'activité réductrice de chaque extrait de *Zonaria tournefortii* a été évaluée en procédant par la méthode décrite par T. Kuda [107] avec quelques modifications.

1ml de la solution méthanolique d'extrait et du standard antioxydant BHT à une concentration de 3 mg.ml^{-1} , est mélangé avec 2,5 ml de la solution tampon phosphate (0,2M ; pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) à 1%. Les mélanges sont incubés au bain-marie à 50°C pendant 30 min. Ensuite, 2,5ml d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. 2,5 ml du surnageant de chaque solution est mélangé avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de FeCl_3 (0,1%). La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant la solution testée par de l'eau distillée.

A partir des valeurs d'absorbance lues à 700 nm et mesurées à $t = 30 \text{ min}$, les résultats peuvent être exprimés en valeur FRAP suivant la formule [108]:

$$\text{Valeur FRAP} = \frac{\text{Abs échantillon} - \text{Abs contrôle}}{\text{Abs standard} - \text{Abs contrôle}} \times [\text{Standard}]$$

Soit :

Abs échantillon : Absorbance à 700 nm de l'échantillon à $t=30 \text{ min}$.

Abs standard : Absorbance à 700 nm du standard utilisé à $t=30 \text{ min}$.

[Standard] : Concentration en standard antioxydant utilisé.

II. 6.3.3 Résultats et discussion

Les résultats du test FRAP (Figure 31), exprimés en valeur FRAP, sont en accord de ceux obtenus avec le test DPPH•, et confirment la faible activité observée pour l'extrait vert par rapport à l'extrait classique, avec respectivement des valeurs de 2,4 et 0,73 mg.ml⁻¹.

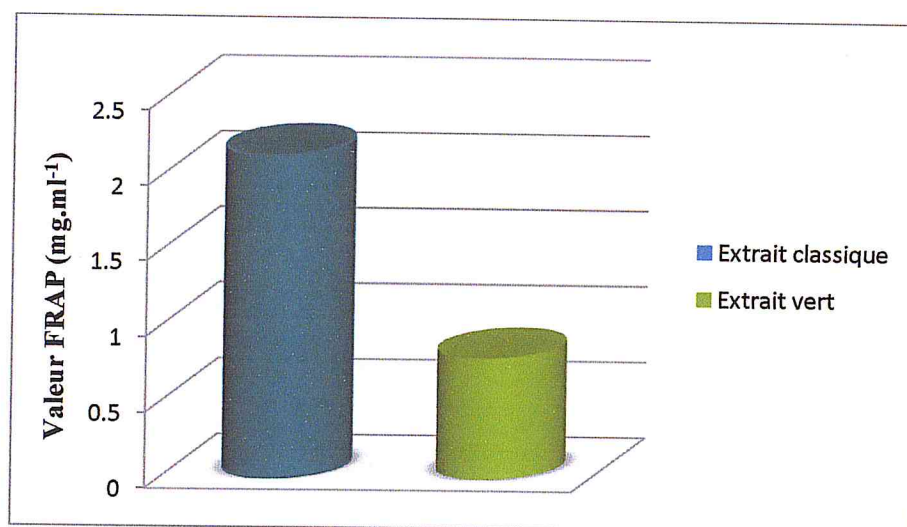


Figure 31 : Histogrammes, exprimés en valeur FRAP, illustrant l'activité antioxydante des extraits de *Zonaria tournefortii* obtenus à partir du procédé d'extraction classique et du procédé d'extraction vert

II. 7 Etude du pouvoir antimicrobien des extraits de *Zonaria tournefortii*

II. 7.1 Introduction

Les produits naturels marins constituent une riche source de composés chimiquement différents qui peuvent être utilisés pour développer de nouveaux, potentiels et utiles agents thérapeutiques. Parmi les ressources marines, les algues ont été signalées comme présentant des effets antimicrobiens contre plusieurs agents pathogènes. Les phlorotannins dérivées d'algues brunes ont été considérés dans la perspective de leur potentielle activité antimicrobienne [87].

A notre connaissance, aucune donnée n'a été publiée sur l'activité antimicrobienne des extraits de *Zonaria tournefortii*. La littérature décrit des approches différentes pour la détermination des activités antimicrobiennes *in vitro* des extraits de plantes continentales ou marines. Ces approches méthodologiques font appel à un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide.

II. 7.2 Microorganismes utilisés

Les extraits de *Zonaria tournefortii* ont été testés sur un panel de micro-organismes d'origine connue, c'est-à-dire identifiés avec un numéro ATCC (*American Type Culture Collection*), provenant du laboratoire d'antibiothérapie et d'hygiène de l'institut Pasteur d'Alger agréé par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), comprenant sept bactéries, cinq à Gram positif, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 43300), *Bacillus subtilis* (ATCC 663), *Micrcccus luteus* (ATCC 9314) et *Entéroccoccus feacalis* (ATCC 51299), et deux à Gram négatif, à savoir *Escherichia coli* (ATCC 25922) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), deux levures, *Candida albicans* (ATCC 10231) et *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763).

II. 7.3 Principe de la méthode

La méthode de diffusion, exclusivement réalisée sur milieu solide, consiste à déposer un disque de papier absorbant préalablement imprégné de l'échantillon sur une gélose ensemencée avec l'inoculum microbien. Les molécules actives diffusent à partir des disques et la présence d'une zone d'inhibition, dans laquelle il n'y a pas eu de croissance, indique la présence de molécules actives à l'égard du micro-organisme testé, inversement, si les colonies se développent normalement, le produit n'a pas d'activité antimicrobienne [109].

II. 7.4 Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits classique et vert de *Zonaria tournefortii*

II. 7.4.1 Procédure générale

Pour les différentes souches à tester, nous avons réalisé une suspension correspondant à une opacité de 0.5 sur l'échelle de Mc. Farland dans 9 ml d'eau physiologique, correspondant à une concentration optimale de 10^7 à 10^8 germes/ml. Les souches sont ensemencées avec l'inoculum microbien à la surface de la gélose (Mueller Hinton pour les bactéries, et Sabouraud pour les levures) préalablement coulée dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre en raison de 15 ml par boîte.

Les disques absorbants sont stérilisés et imprégnés d'une quantité de 20 μ l d'extraits et sont déposés sur la surface de la gélose inoculée avec les souches testées. Notons que chaque extrait brut de *Zonaria tournefortii* est dilué dans le DMSO, et testé aux concentrations de 5, 10 et 20 mg.ml^{-1} . Les boîtes de pétri étaient maintenues à 4°C pendant 4 heures afin de permettre une bonne diffusion de l'extrait dans le milieu et inhiber momentanément la croissance du germe testé, puis incubées à 37°C/24h pour les bactéries et 26°C/48h pour les levures. Chaque essai est réalisé en triplicata.

II. 7.4.2 Résultats et discussion

L'étude du pouvoir antibactérien et antifongique des extraits de *Zonaria tournefortii* a été effectuée par le test « Aromatogramme » qui est une méthode de diffusion sur milieu gélosé ou méthode des disques absorbants. La mesure des diamètres des zones d'inhibition permet la détermination de l'activité antimicrobienne des l'extraits in vitro.

La nécessité de tester les échantillons à faibles concentrations était la difficulté pratique rencontrée lors de la réalisation de ce travail. En effet, les deux extraits de *Zonaria tournefortii* n'ont présenté aucune activité antimicrobienne (Figure 32) aux concentrations de 5, 10 et 20 mg.ml⁻¹. Ceci se traduit par le développement des micro-organismes sur toute la surface de la gélose.

Le résultat négatif obtenu pour les extraits testés ne doit pas exclure la présence de substances actives dans ces extraits. En effet, la concentration de ces substances est peut être très faible et insuffisante pour inhiber la croissance des microorganismes. De ce fait, des tests complémentaires avec des concentrations plus élevées, sont nécessaires pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de *Zonaria tournefortii*. Notons que la quantité nécessaire pour augmenter la concentration d'extrait vert est insuffisante, les tests ont été réalisés seulement avec l'extrait classique.

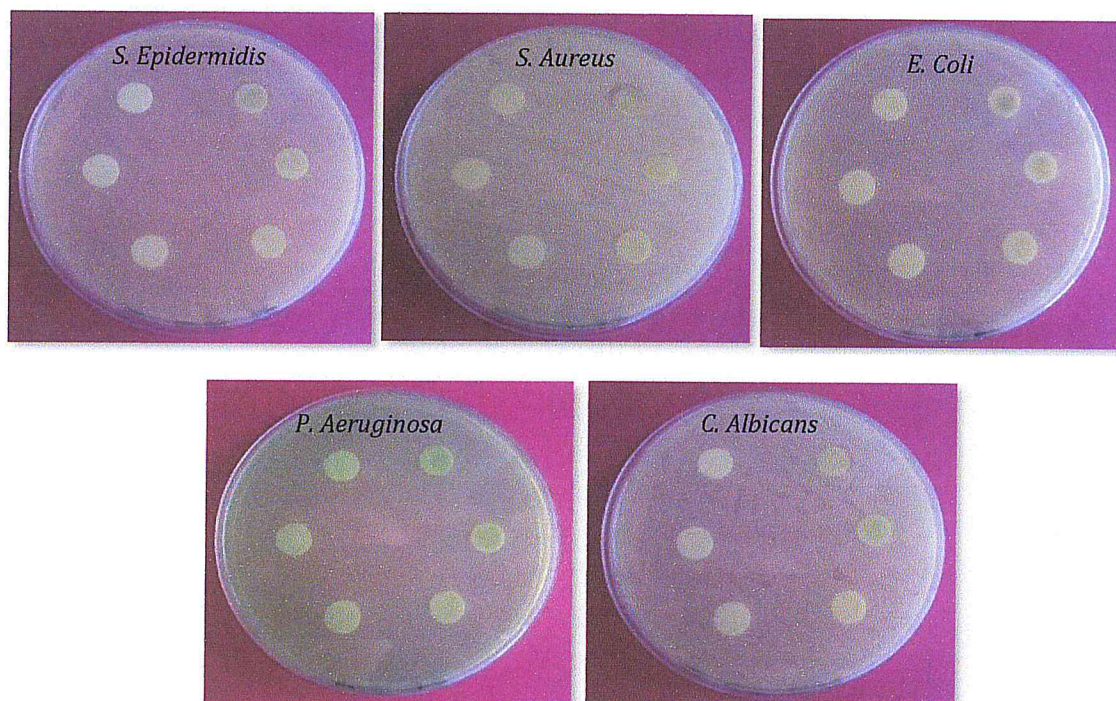


Figure 32 : Aromatogrammes des microorganismes testés avec les extraits classique et vert de *Zonaria tournefortii*

II. 7.5 Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait classique de *Zonaria tournefortii*

II. 7.5.1 Procédure générale

L'extrait classique de *Zonaria tournefortii* est dilué dans le DMSO, et testé aux concentrations de 75 et 100 mg.ml⁻¹. Pour les différentes souches à tester, des suspensions microbiennes correspondants à une opacité de 0.5 sur l'échelle de Mc. Farland, ont été réalisées par prélèvement de quelques colonies bien isolées et identiques d'une culture jeune de 18h pour les bactéries et 48h pour les levures, les émulsionnées dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique et homogénéisées par agitation au vortex.

Les disques absorbants stériles, sont imbibés d'une quantité d'extrait, et déposés sur la surface de la gélose (Mueller Hinton pour les bactéries, et Sabouraud pour les levures et champignons) préalablement coulée dans des boîtes de pétri,ensemencée avec l'inoculum microbien, puis laisser diffuser à 4°C pendant 3 heures. Les boîtes de pétri sont incubées à l'étuve (24h à 37°C pour les bactéries et 48h à 26°C pour les levures).

Des disques imbibés de DMSO ont été appliqués sur chaque boîte de pétri, ces disques ont servi de contrôle *négatif* contre toutes les espèces microbiennes utilisées dans l'étude.

L'activité antimicrobienne est appréciée par la mesure à l'aide d'un pied à coulisse des diamètres des zones d'inhibition (mm) formées autour des disques. La sensibilité des microorganismes cibles envers les différents composés est classée selon les diamètres des halos d'inhibition [110] :

Tableau 10 : Relation entre le diamètre d'inhibition et la sensibilité des souches

Diamètre d'inhibition (mm)	Sensibilité des souches
0-8 mm	non sensible
9-14 mm	Sensible
15-19 mm	très sensible
> 20 mm	extrêmement sensible

II. 7.5.2 Résultats et discussion

II. 7.5.2.1 Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'extrait classique de *Zonaria tournefortii* vis-à-vis de sept bactéries identifiées avec un numéro ATCC est évaluée qualitativement par la méthode de diffusion sur gélose.

Dans un premier temps, les résultats de l'activité antibactérienne des extraits classique et vert ont démontré clairement qu'à des concentrations de 5, 10 et de 20 mg.ml⁻¹, les deux extraits n'ont pas inhibé la croissance des microorganismes testés (Figure 32). De ce fait, des études complémentaires avec des fortes concentrations d'extrait classique variant de 75 et 100 mg.ml⁻¹ ont été effectuées. Les résultats concernant les diamètres des zones d'inhibition en fonction des différentes concentrations en extrait classique de *Zonaria tournefortii* sont illustrés par les figures 33 et 34 et regroupés dans le tableau 11. Les résultats sont exprimés selon les moyennes $\pm$ les déviations standards d'essais indépendants menés en triplicata.

Selon les résultats représentés dans le tableau 11, l'extrait classique a présenté une activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries à Gram positif, à savoir : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrccus luteus* et *Entérococcus faecalis*, tandis que les bactéries à Grams négatif *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* n'ont présenté aucune activité aux concentrations de 75 et 100 mg.ml⁻¹. La bactérie à Gram positif *Staphylococcus epidermidis* n'a présenté également aucune activité antibactérienne. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus pour les produits purs de *Zonaria tournefortii* rapportés dans la littérature par Gerwick & Fenical [43] et Wisespongpan & Kuniyoshi [92] qui ont indiqué que les métabolites phénoliques isolés de *Zonaria tournefortii* ont montré une puissante activité contre les bactéries à Gram positif *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*, et aucune activité contre les bactéries à Gram négatif *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

En effet, la force et le spectre d'activité antimicrobienne varient selon le type d'extrait et le Gram des bactéries. Cependant, les bactéries à Gram positif sont généralement les plus sensibles aux effets des extraits phénoliques. La résistance générale plus élevée chez les bactéries à Gram négatif est attribuée à la présence d'une membrane externe imperméable aux composés lipophiles. L'absence de cette barrière chez les bactéries à Gram positif permet le contact direct des constituants hydrophobes des extraits avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire bactérienne [111].

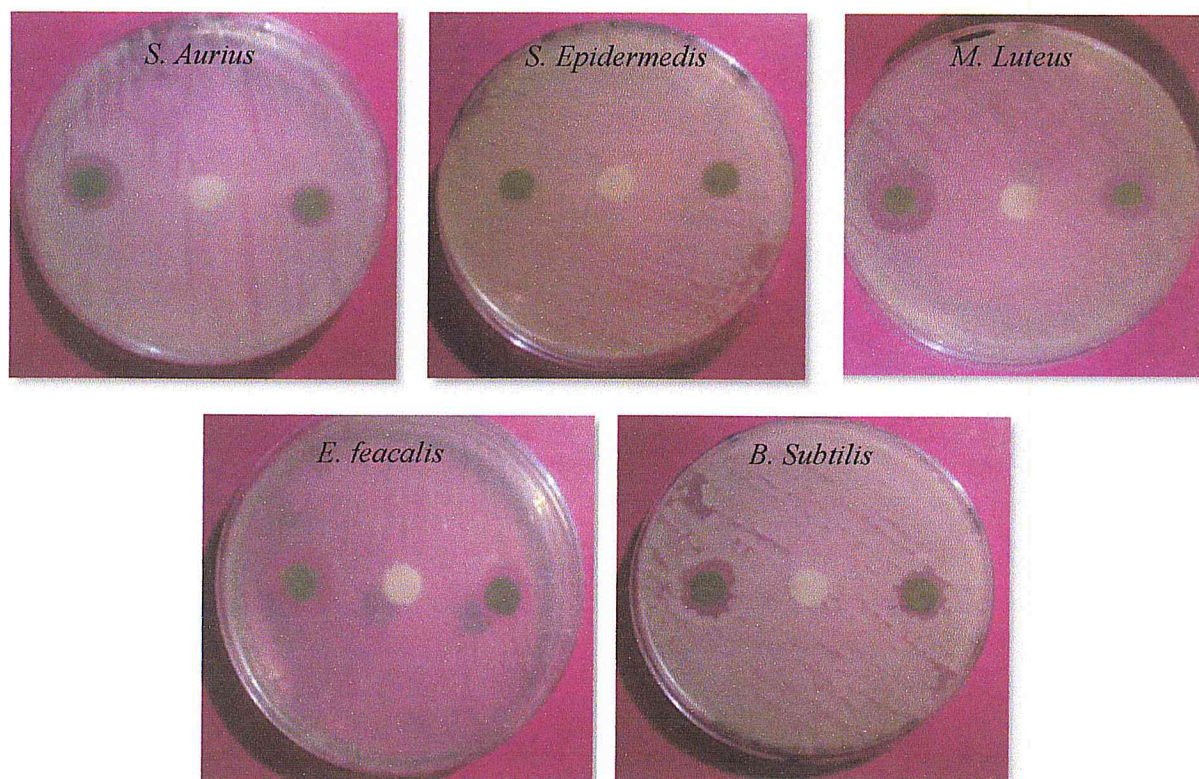


Figure 33 : Aromatogrammes des bactéries à Gram positif testées avec l'extrait classique de *Zonaria tournefortii*

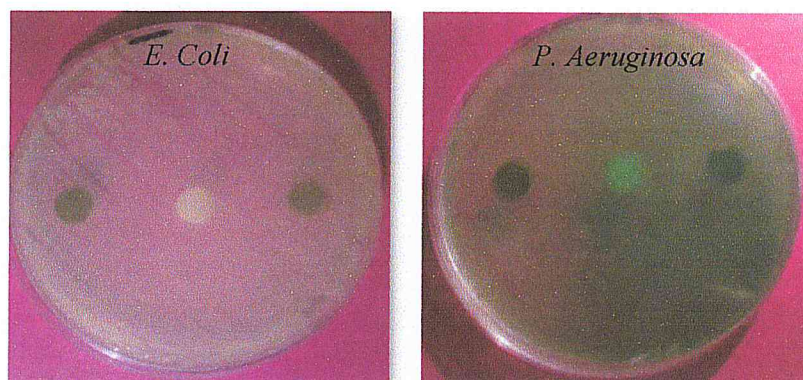


Figure 34 : Aromatogrammes des bactéries à Gram négatif testées avec l'extrait classique de *Zonaria tournefortii*

Tableau 11 : Activité antibactérienne de l'extrait classique mesurée à différentes concentrations et exprimée en diamètre d'inhibition (mm)

Bactéries	75 mg.ml ⁻¹					100 mg.ml ⁻¹				
	Essai (1)	Essai (2)	Essai (3)	ZI ± ET		Essai (1)	Essai (2)	Essai (3)	ZI ± ET	
<i>Gram positif</i>	13	14	13	13,3 ± 0,47		16	15	17	16 ± 0,82	
	na	na	na	na		na	na	na	na	
	12	12	13	12,3 ± 0,47		17	16,5	18	17,2 ± 0,62	
	14	14,5	13	13,8 ± 0,62		18	19	17	18 ± 0,82	
	13	13	13,5	13,2 ± 0,62		17	15,5	18	16,8 ± 1,03	
<i>Gram négatif</i>	na	na	na	na		na	na	na	na	
	na	na	na	na		na	na	na	Na	

ZI : Zone d'inhibition exprimée selon le diamètre autour des disques imprégnés avec les deux concentrations d'extrait. Le diamètre (9 mm) du disque est inclus dans les calculs, **ET** : Ecart type, **na** : non actif

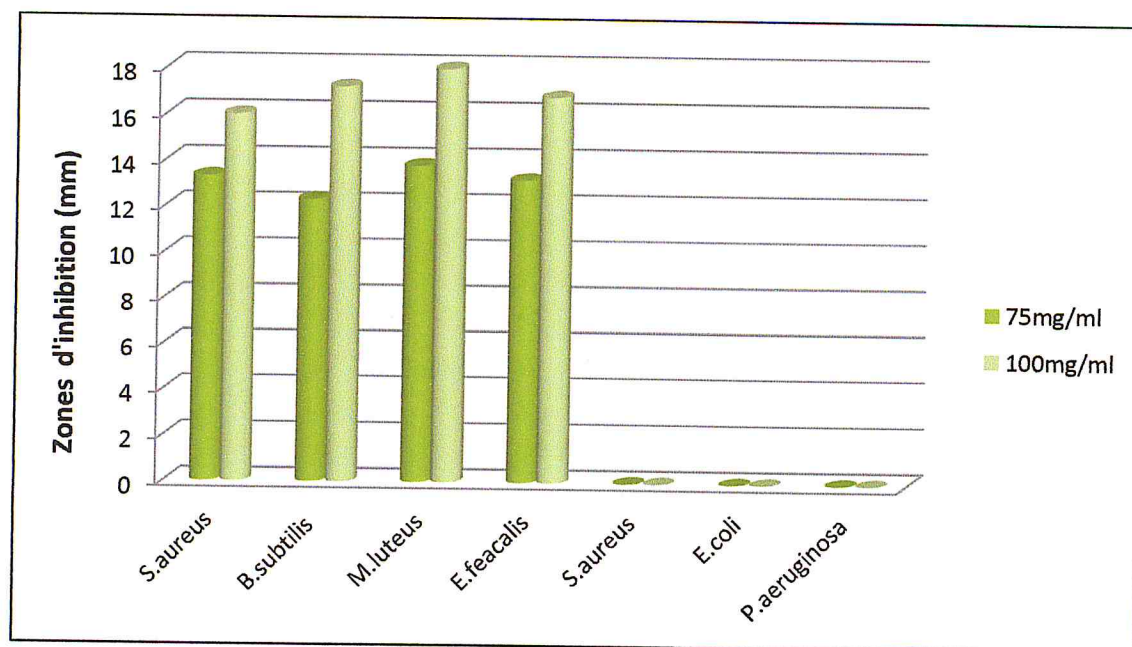


Figure 35 : Histogrammes illustrant les zones d'inhibition exprimées en millimètre

II. 7.5.2.1 Activité antifongique

L'extrait classique de *Zonaria tournefortii* a été testé sur deux levures à savoir, *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae* afin d'évaluer son pouvoir antifongique. Les résultats illustrés par la figure 35 montrent que les organismes testés poussent sur toute la surface de la gélose, ce qui indique que l'extrait classique n'a pas d'activité antifongique, ce qui est attribué principalement à l'absence de molécules actives à l'égard des levures testées.

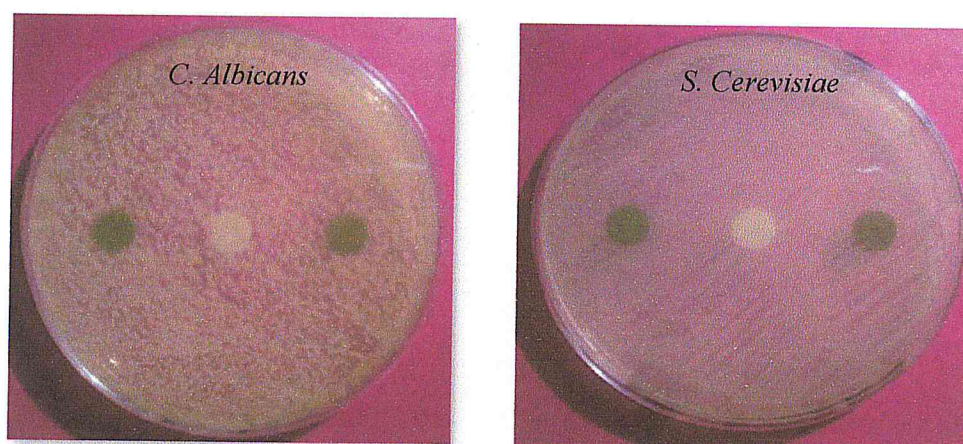


Figure 36 : Aromatogrammes des levures testées avec l'extrait classique de *Zonaria tournefortii*

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

L'objectif de notre mémoire était de développer une technique d'extraction « verte » basée sur l'utilisation d'un « agro-solvant » en l'occurrence le 1,8-cinéole. L'originalité de la méthode repose sur le fait que l'extraction est réalisée avec un solvant « vert », en évitant l'utilisation et la manipulation de solvants organiques toxiques.

La première partie de notre travail a été consacrée à une synthèse bibliographique portant d'une part, sur le concept de l'Eco-extraction des produits naturels, et les différents travaux de recherche menés sur les procédés d'extraction verts et les solvants alternatifs et, d'autre part, sur l'étude chimique et biologique des espèces du genre *Zonaria*. Concernant l'étude chimique, nous avons essayé en premier lieu de donner une approche générale sur les produits phénoliques, par la suite nous avons rapporté les différentes techniques d'analyse employées pour l'extraction, la séparation et le dosage des produits phénoliques. En dernier lieu, nous avons cité les principales études chimiques antérieures concernant l'isolement des métabolites phénoliques à partir des espèces du genre *Zonaria*. Dans l'étude biologique, nous avons tenté de rapporter les potentialités pharmacologiques des espèces du genre *Zonaria*, en particulier, de citer les principaux dérivés phénoliques responsables des activités antioxydantes et antimicrobiennes des espèces du genre *Zonaria*.

La seconde partie de ce travail, a consisté à mettre en œuvre une méthodologie d'extraction «verte». Nous avons pour cela développé un procédé d'extraction basé sur l'utilisation d'un agro-solvant, dans notre cas le 1,8-cinéole. L'intérêt de la technique réside dans la méthodologie de séparation du solvant vert, basée sur une série d'extraction liquide-liquide avec de l'eau. L'optimisation du nombre de lavages (12 lavages) a été effectuée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, par le suivi de l'évolution de la teneur du solvant vert en fonction du nombre de lavages. Un recyclage du solvant vert est en outre effectué par une hydrodistillation en utilisant un Clevenger. La méthode a été appliquée dans la préparation d'un extrait à partir de l'algue brune *Zonaria tournefortii*.

Dans un but comparatif, un autre extrait a été préparé par macération dans un solvant classique ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (v/v : 1/1)). En effet, des rendements d'extraction de 2,16 % et 0,45 % ont été obtenus respectivement à partir du procédé d'extraction classique et du procédé d'extraction vert. Les deux extraits ont été soumis à des analyses chimiques et biologiques. Les analyses chimiques ont porté sur le dosage des produits phénoliques totaux par le test de Folin-Ciocalteu, et sur la comparaison des profils chromatographiques CLHP des deux extraits obtenus.

Les analyses biologiques ont consisté à la réalisation des tests d'activité antibactérienne et antifongique, et à l'évaluation de l'activité antioxydante, en procédant à la mesure du pouvoir anti-radicalaire par le test DPPH, et à la détermination du pouvoir antioxydant réducteur du fer ferrique FRAP.

L'estimation de la teneur en composés phénoliques totaux par le test colorimétrique de Folin-Ciocalteu a mis en évidence que la teneur en composés phénoliques d'extrait classique est significativement supérieure à celle de l'extrait vert avec respectivement une teneur de $(225 \pm 0,002)$ et $(112,5 \pm 0,0005)$ mg.EPG/g d'extrait sec. Par ailleurs, l'analyse par CLHP/DAD-UV, a montré que les profils chromatographiques des extraits de *Zonaria tournefortii* sont relativement semblables.

Le présent travail a en outre indiqué à travers les deux tests d'évaluation de l'activité antioxydante que nos extraits de *Zonaria tournefortii* ont présenté une activité antiradicalaire. Toutefois, cette activité est nettement inférieure à celle des standards utilisés, la vitamine C, BHA et BHT. Cependant, l'activité antioxydante évaluée par la mesure du pouvoir antiradicalaire par le test DPPH, a été mise en évidence par la concentration efficace CE₅₀ et par la cinétique de réduction. Les résultats indiquent une variation de CE₅₀ entre 58 et 140 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ et des temps de réaction TCE₅₀ entre 14 et 17 minutes, correspondant respectivement aux extraits classique et vert. De même, le test du pouvoir réducteur de fer ferrique (FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power) exprimé en valeur FRAP, a confirmé la faible activité observée pour l'extrait vert par rapport à l'extrait classique, avec respectivement des valeurs de 2,4 et 0,73 mg.ml^{-1} . En outre, l'activité antimicrobienne des extraits de *Zonaria tournefortii* a été évaluée par la méthode de diffusion sur gélose, et a montré que les extraits n'ont présenté aucune activité antimicrobienne aux concentrations de 5, 10 et 20 mg.ml^{-1} . Des tests complémentaires avec des concentrations variant de 75 et 100 mg.ml^{-1} ont été réalisés sur l'extrait classique. Ces tests ont démontré que ce dernier possède un pouvoir antimicrobien vis-à-vis des souches bactériennes à Gram positif, et ne possède aucune activité contre les bactéries à Gram négatif et les levures testées.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail sont très encourageant pour la suite de notre étude. Nous comptons généraliser le travail en procédant à l'utilisation d'autres « agro-solvants » et la comparaison chimique et biologique des extraits obtenus avec ceux préparés avec des solvants classiques. Nous allons aborder les différents aspects relatifs aux procédés d'extraction (rendement, faisabilité, efficacité,...) et à l'analyse chimique (composition,...) et biologique (activités,...).

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- [1] A. Farhat, A.-S. Fabiano-Tixier, M. El Maataoui, J. Maingonnat, M. Romdhane, F. Chemat, « Microwave steam diffusion for extraction of essential oil from orange peel: Kinetic data, extract's global yield and mechanism », *Journal of Food Chemistry*, 125, 255-261, (2011).
- [2] I. Ignat, I. Volf, V.-I. Popa, « A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables », *Journal of Food Chemistry*, 126, 1821-1835, (2011).
- [3] F. Chemat, « Éco-extraction du végétal, Procédés innovants et solvants alternatifs », Ed. Technique et Ingénierie, Dunod, (2011), 336p.
- [4] S. Bertouche, V. Tomao, K. Ruiz, A. Hellal, C. Boutekedjiret, F. Chemat, « First approach on moisture determination in food products using alpha-pinene as an alternative solvent for Dean–Stark distillation », *Journal of Food Chemistry*, 134, 602-605, (2012).
- [5] A. Legardez, L. Simonneaux, « Développement durable et autres questions d'actualité », Ed. Martine Poillot, (2011), 401p.
- [6] F. Chemat, M.-A. Vian, G. Cravotto, « Green Extraction of Natural Products : Concept and Principles », *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 8615-8627, (2012).
- [7] S. Chemat, V. Tomao, F. Chemat, « Limonene as Green Solvent for Extraction of Natural Products », Chapitre 5, pp 175-186 - In : «Green Solvents I - Properties and Applications in Chemistry», Ed. Ali Mohammad, Inamuddin Dr., Springer New York London (2012).
- [8] T. Anaëlle, E. SerranoLeon, V. Laurent, I. Elena, J.-A. Mendiola, C. Stéphane, K. Nelly, L.-B. Stéphane, M. Luc, S.-P. Valérie, « Green improved processes to extract bioactive phenolic compounds from brown macroalgae using *Sargassum muticum* as model », *Journal of Talanta*, 104, 44-52, (2013).
- [9] Z. Chemat-Djenni, M.-A. Ferhat, V. Tomao, F. Chemat, « Carotenoid Extraction from Tomato Using a Green Solvent Resulting from Orange Processing Waste », *Journal of Jeobp*, 13 (2), 139-147, (2010).
- [10] M. Virost, V. Tomao, C. Ginies, F. Chemat, « Total Lipid Extraction of Food Using d-Limonene as an Alternative to n-Hexane », *Journal of Chromatographia*, 68, 311-313, (2008).

- [11] M. Virost, V. Tomao, C. Ginies, F. Visinoni, F. Chemat, « Green procedure with a green solvent for fats and oils' determination Microwave-integrated Soxhlet using limonene followed by microwave Clevenger distillation », *Journal of Chromatography A*, 1196-1197, 147-152, (2008).
- [12] S. Veillet, V. Tomao, K. Ruiz, F. Chemat, « Green procedure using limonene in the Dean-Stark apparatus for moisture determination in food products », *Journal of Analytica Chimica Acta*, 674, 49-52, (2010).
- [13] C.-D. Tanzi, M.-A. Vian, C. Ginies, M. Elmaataoui, F. Chemat, « Terpenes as Green Solvents for Extraction of Oil from Microalgae », *Journal of Molecules*, 17, 8196-8205, (2012).
- [14] C.-D. Tanzi, M.-A. Vian, F. Chemat, « New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass : A green clean and scalable process », *Journal of Bioresource Technology*, 134, 271-275, (2013).
- [15] S. Rodriguez-Rojo, A. Visentin, D. Maestri, M.-J. Cocero, « Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents », *Journal of Food Engineering*, 109, 98-103, (2012).
- [16] Y. Li, A.-S. Fabiano-Tixier, V. Tomao, G. Cravotto, F. Chemat, « Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent », *Journal of Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 12-18, (2013).
- [17] D.-V. Bermejo, P. Luna, M.-S. Manic, V. Najdanovic-Visak, G. Reglero, T. Fornari, « Extraction of caffeine from natural matter using a bio-renewable agrochemical solvent », *Journal of Food and Bioproducts processing*, (2012), in press.
- [18] T. Zhou, X. Xiao, G. Li, Z.-w. Cai, « Study of polyethylene glycol as a green solvent in the microwave-assisted extraction of flavone and coumarin compounds from medicinal plants », *Journal of Chromatography A*, 1218, 3608-3615, (2011).
- [19] R. Cardoso de Oliveira, S.-T. Davantel de Barros, M.-L. Gimenes, « The extraction of passion fruit oil with green solvents », *Journal of Food Engineering*, 117, 458-463, (2013).
- [20] F. Debray, « Catalogue des algues du Maroc, de l'Algérie et de la Tunisie », *Librairie A.*, Ed. Jourdan-Alger, (1893), 78p.

- [21] J.-A. Phillips, « Genus and species concepts in *Zonaria* and *Homoeostrichus* (Dictyotales, Phaeophyceae), including the description of *Exallosorus* gen. nov. », *Journal of Phycology*, 32(3), 303-311, (1997).
- [22] C.-J. Hillson, « Seaweeds, A Color-Coded, Illustrated Guide to Common Marine Plants of the East Coast of the United States », Pennsylvania State University, (1977), 194p.
- [23] M.-C. Durieu de Maisonneuve, Delamare, « Exploration scientifique de l'Algérie pendant les années 1840, 1841, 1842... », Imprimerie nationale, (1849), 600p.
- [24] J. Cabioch, J.-Y. Floch, A. Le Toquin, C.-F. Boudouresque, A. Meinesz, M. Verlaque « Guide des Algues des mers d'Europe : Manche/Atlantique », Ed. Delachaux et Niestlé, (1992), 231p.
- [25] M.-P. Chastaing, M.-E. Barillot, « Chimie organique, essai analytique sur la détermination des fonctions », Ed. Octave Doin, (1988), 289p.
- [26] J. Bruneton, « Pharmacognosie : Phytochimie-Plantes médicinales », Ed. Tec & Doc., 3^{ème} édition, Lavoisier, (1999), 1120p.
- [27] M. Naczki, F. Shahidi, « Extraction and analysis of phenolics in food », *Journal of Chromatography A*, 1054, 95-111, (2004).
- [28] C. Moreu, « Notions fondamentales de chimie organique », Ed. Gauthier-Villars, Paris, (1906), 320p.
- [29] H. Ye, C. Zhou, Y. Sun, X. Zhang, J. Liu, Q. Hu, X. Zeng, « Antioxidant activities in vitro of ethanol extract from brown seaweed *Sargassum pallidum* », *Journal of European Food Research and Technology*, 230, 101-109, (2009).
- [30] M.-A. Ragan, K.-W. Glombitza, « Phlorotannins, brown algal polyphenols », *Journal of Prog. Phycol. Res.*, 4, 129-241, (1986).
- [31] B. Quéguineur, L. Goya, S. Romos, M.-A. Martin, R. Mateos, L. Bravo, « Phloroglucinol : antioxidant proprieties and effects on cellular oxidative markers in human HepG2 cell line », *Journal of Food chemical Toxicology*, 50, 2886-2893, (2012).
- [32] J.-J. Machéix, A. Fleuriet, C. Jay-Allemand, « Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique », PPUR, Presses polytechniques et Universitaires Romandes, (2005).

- [33] M. Estrella Garcia Perez, « Caractérisation de composés phénoliques des extraits de ramilles du bouleau jaune : étude de leur capacité antioxydante », Mémoire pour l'obtention du grade de maître es sciences (M.Se.), Université Laval, (2008).
- [34] K. Le Lann, S. Connan, V. Stiger-Pouvreau, « Phenology, TPC and size-fractioning phenolics variability in temperate Sargassaceae (Phaeophyceae, Fucales) from Western Brittany: Native versus introduced species », *Journal of Marine Environmental Research*, 80, 1-11, (2012).
- [35] S. Connan, E. Deslandes, E. Ar Gall « Influence of day–night and tidal cycles on phenol content and antioxidant capacity in three temperate intertidal brown seaweeds », *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 349, 359-369, (2007).
- [36] V. Jormalainen, T. Honkanen, O. Vesakoski, R. Koivikko, « Polar extracts of the brown alga *Fucus vesiculosus* (L.) reduce assimilation efficiency but do not deter the herbivorous isopod *Idotea baltica* (Pallas) », *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 317, 143-157, (2005).
- [37] V.-A. Fairhead, C.-D. Amsler, J.-B. McClintock, Bi. J. Baker, « Variation in phlorotannin content within two species of brown macroalgae (*Desmarestia anceps* and *D. menziesii*) from the Western Antarctic Peninsula », *Journal of Polar Biology*, 28, 680-686, (2005).
- [38] S.-J. Heo, S.-C. Ko, S.-H. Cha, D.-H. Kang, H.Sik Park, Y.-U. Choi, D. Kim, W.-K. Jung, Y.-J. Jeon, « Effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on melanogenesis and their protective effect against photo-oxidative stress induced by UV-B radiation », *Journal of Toxicology in Vitro*, 23, 1123-1130, (2009).
- [39] D.-W. Laird, S. Bennett, B. Bian, B. Sauer, K. Wright, V. Hughes, I.-A. van Altena, «Chemical investigation of seven Australasian Cystophora species: New chemistry and taxonomic insights», *Journal of Biochemical Systematics and Ecology*, 38, 187-194, (2010).
- [40] K.-W. Glombitza, A. Schmidt, «Trihydroxyphlorethols from the brown alga *Carpophyllum angustifolium* », *Journal of Phytochemistry*, 51, 1095-1100, (1999).
- [41] M. Ahn, C. Moon, W. Yang, E.-J. Ko, J.-W. Hyun, H.-G. Joo, Y. Jee, N.-H. Lee, J.-W. Park, R.-K. Ko, G.-O. Kim, T. Shin, « Diphlorethohydroxycarmalol, isolated from the brown algae *Ishige okamurae*, protects against radiation-induced cell damage in mice », *Journal of Food and Chemical Toxicology*, 49, 864-870, (2011).

- [42] M. Nakai, N. Kageyama, K. Nakahara, W. Miki, « Phlorotannins as Radical Scavengers from the Extract of *Sargassum ringgoldianum* », Journal of Marine biotechnology, 8, 409-414, (2006).
- [43] W. Gerwick, W. Fenical, « Phenolic lipids from related marine algae of the order dictyotales », Journal of Phytochemistry, 21, 633-637, (1982).
- [44] V. Amico, R. Currenti, G. Oriente, M. Piattelli, C. Tringali, « A phloroglucinol derivative from the brown alga *Zonaria tournefortii* », Journal of Phytochemistry, 20, 1451-1453, (1981).
- [45] M.-L. Soto, A. Moure, H. Dominguez, J.-C. Parajo, « Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption », Journal of Food Engineering, 105, 1-27, (2011).
- [46] S.-M. Kang, S.-H. Cha, J.-Y. Ko, M.-C. Kang, D. Kim, S.-J. Heo, J.-S. Kim, M.-S. Heu, Y.-T. Kim, W.-K. Jung, Y.-J. Jeon, « Neuroprotective effects of phlorotannins isolated from a brown alga, *Ecklonia cava*, against H₂O₂-induced oxidative stress in murine hippocampal HT22 cells », Journal of Environmental Toxicology and Pharmacology, 34, 96-105, (2012).
- [47] R.-R. Kannan, M.-A. Aderogba, A.-R. Ndhlala, W.-A. Stirk, J.-V. Staden, « Acetylcholinesterase inhibitory activity of phlorotannins isolated from the brown alga, *Ecklonia maxima* (Osbeck) Papenfuss », Journal of Food Research International, (2012), In Press.
- [48] Y. Li, Z.-J. Qian, B. Ryu, S.-H. Lee, M.-M. Kim, S.-K. Kim, « Chemical components and its antioxidant properties in vitro: An edible marine brown alga, *Ecklonia cava* », Journal of Bioorganic and Medicinal Chemistry, 17 (5), 1963-1973, (2009).
- [49] R. Castro, R. Natera, E. Durán, C. García-Barroso, « Application of solid phase extraction techniques to analyse volatile compounds in wines and other enological products », European Journal of Food Research and Technology, 228, 1-18, (2008).
- [50] P. gulgan. S.-E. Ebeler, J.-D. Ebeler, « SPE methodologies for the separation of lipids », Inform. , 7, 1094-1103, (1996).
- [51] H. Qi, J. Lv, B. Li, « Determination of phenol at ng l⁻¹ level by flow-injection chemiluminescence combined with on-line solid-phase extraction », Spectrochimica Acta Part A. ,66, 874-878, (2007).

- [52] S.-E. Gamaoun, S. Saguem, « Extraction sur phase solide et analyses par HPLC du 5-fluorouracile plasmatique », C. R. Chimie, 8, 1688-1693, (2005).
- [53] N. Bouzidi, « Détermination des stérols de l'algue rouge *Asparagopsis armata* par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier en employant l'extraction en phase solide : Etude comparative avec la chromatographie liquide à haute performance », Mémoire de Magister, (2003).
- [54] F. Rouessac, A. Rouessac, « Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes », Masson 3^{ème} édition, Paris, Milan, Barcelone, (1997).
- [55] J.-M. Bobbitt, A.-E. Schwarting, R.-j. Gritter, « Introduction à la chromatographie », Ed. Gauthier-Villars, Paris, (1972), 189p.
- [56] A. Braithwaite, F.-J. Smith, « Chromatographic Methods », 5^{ème} édition, Kluwer Academic Publishers, London, (1999).
- [57] R. Koivikko « Brown algal phlorotannins improving and applying chemical methods », Annales universitatis Turkuensis, Turun Yliopisto, (2008).
- [58] T. Michel, « Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*) », Thèse de Doctorat: Chimie Analytique - Phytochimie, Université d'Orléans, (2011).
- [59] F. Rouessac, A. Rouessac, « Chromatographie liquide haute performance. In Analyse chimique-Méthodes et techniques instrumentales modernes », Paris, (2004).
- [60] A.-L. Cavin, « Contribution à la connaissance taxonomique et chimique de fruits africains du genre *Detarium* (Fabaceae - Caesalpinioideae) : *D. microcarpum* Guill. et Perr. et des formes comestibles et toxiques de *D. senegalense* J.F. Gmel. », Thèse de Doctorat, Sciences pharmaceutiques, (2007).
- [61] L. Onofrejovaa, J. Vašíčková, B. Klejdus, P. Stratil, L. Mišurcova, S. Kračmar, J. Kopecky, J. Vacek, « Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques », Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 51, 464-470, (2010).
- [62] S. Parys, S. Kehraus, A. Krick, K.-W. Glombitza, S. Carmeli, K. Klimo, C. Gerhäuser, G.M. König, « In vitro chemopreventive potential of fucophlorethols from the brown alga *Fucus vesiculosus* L. by anti-oxidant activity and inhibition of selected cytochrome P450 enzymes », Journal of Phytochemistry. 71, 221-229, (2010).

- [63] M. El Hattab, N. Bouzidi, A. Ortalo-Magné, Y. Daghbouche, M. Richou, S.-E. Chitour, B. Reviers, L. Pioveti, « Eicosapentaenoic acid: Possible precursor of the phloroglucinol derivatives isolated from the brown alga *Zonaria tournefortii* (J.V. Lamouroux) Montagne », *Biochemical Systematics and Ecology*, 37, 55-58, (2009).
- [64] S.-J. Heo, Y.-J. Jeon, « Evaluation of diphlorethohydroxycarmalol isolated from *Ishige okamurae* for radical scavenging activity and its protective effect against H₂O₂-induced cell damage », *Journal of Process Biochemistry*, 44, 412-418, (2009).
- [65] S.-H. Lee, M.-H. Park, S.-J. Heo, S.-M. Kang, S.-C. Ko, J.-S. Han, Y.-J. Jeon, « Dieckol isolated from *Ecklonia cava* inhibits α -glucosidase and α -amylase in vitro and alleviates postprandial hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice », *Journal of Food and Chemical Toxicology*, 48, 2633-2637, (2010).
- [66] H. Liu, L. Gu, « Phlorotannins from Brown Algae (*Fucus vesiculosus*) Inhibited the Formation of Advanced Glycation Endproducts by Scavenging Reactive Carbonyls », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 1326-1334, (2012).
- [67] A. López, M. Rico, A. Rivero, M. Suárez de Tangil « The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts », *Journal of Food Chemistry*, 125, 1104-1109, (2011).
- [68] T. Shibata, K. Ishimaru, S. Kawaguchi, H. Yoshikawa, Y. Hama, « Antioxidant activities of phlorotannins isolated from Japanese *Laminariaceae* », *Journal of Applied Phycology*, 20, 705-711 (2008).
- [69] S.-M. Kang, S.-J. Heo, K.-N. Kim, S.-H. Lee, Y.-J. Jeon, « Isolation and identification of new compound, 2,7''-phloroglucinol-6,6'-bieckol from brown algae, *Ecklonia cava* and its antioxidant effect », *Journal of Functional Foods*, 4, 158-166, (2012).
- [70] D. Ollivier, E. Boubault, C. Pinatel, S. Souillol, M. Guérère, J. Artaud. « Analyse de la fraction phénolique des huiles d'olive vierges », *Annales des falsifications, de l'expertise chimique et toxicologique*, 169-196, (2004).
- [71] K.-L. Van Alstyne, « Comparison of three methods for quantifying brown algal polyphenolic compounds », *Journal of Chemical Ecology*, 21, 45-58, (1995).
- [72] T. Kusumi, T.Ooi, H. Uchimura, « The conformation of the 17-*O*-MTPA-Eicosatetraenoyl chain of a marine acylphloroglucinol », *Journal of Tetrahedron Letters*, 35, 3127-3128, (1994).

- [73] N. Blanca, D. Haucharda, L. Audibertb, E. Ar Gall, « Radical-scavenging capacity of phenol fractions in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*: An electrochemical approach », *Journal of Talanta*, 84, 513-518, (2011).
- [74] S. Cho, H. Yang, Y.-J. Jeon, C. Justin Lee, Y.-H. Jin, N.-I. Baek, D. Kim, S.-M. Kang, M. Yoon, H. Yong, M. Shimizu, D. Han, « Phlorotannins of the edible brown seaweed *Ecklonia cava* Kjellman induce sleep via positive allosteric modulation of gamma-aminobutyric acid type A-benzodiazepine receptor: A novel neurological activity of seaweed polyphenols », *Journal of Food Chemistry*, 132, 1133-1142, (2012).
- [75] A. Haddara, S. Sellimia, R. Ghannouchia, O.-M. Alvarezb, M. Nasria, A. Bougatefa, « Functional, antioxidant and film-forming properties of tuna-skin gelatin with a brown algae extract », *International Journal of Biological Macromolecules*, 51, 477-483, (2012).
- [76] P. Vijayabaskar, V. Shiyamala, « Antioxidant properties of seaweed polyphenol from *Turbinaria ornata* (Turner) J. Agardh, 1848 », *Journal of Tropical Biomedicine*, S90-S98, (2012).
- [77] F. Nwosu, J. Morris, V.-A. Lund, D. Stewart, H.-A. Ross, G.-J. McDougall « Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae », *Journal of Food Chemistry*, 126, 1006-1012, (2011).
- [78] A. Rodriguez-Bernaldo de Quiros, S. Frecha-Ferreiro, A. M. Vidal-Pe'rez, J. Lopez-Hernandez, « Antioxidant compounds in edible brown seaweeds », *Journal of European Food Research and Technology*, 231, 495-498, (2010).
- [79] S. Cho, H. Yang, Y.-J. Jeon, C. Justin Lee, Y.-H. Jin, N.-I. Baek, D. Kim, S.-M. Kang, M. Yoon, H. Yong, M. Shimizu, D. Han, « Phlorotannins of the edible brown seaweed *Ecklonia cava* Kjellman induce sleep via positive allosteric modulation of gamma-aminobutyric acid type A-benzodiazepine receptor: A novel neurological activity of seaweed polyphenols », *Journal of Food Chemistry*, 132, 1133-1142, (2012).
- [80] J.-M. Kornprobst. « Substances naturelles d'origine marine, chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologie », Ed. TEC & DOC, (2005), 598p.
- [81] V. Amico, G. Nicolosi, G. Oriente, M. Piatelli, C. Tringali, « A novel acylphloroglucinol from the brown alga *Zonaria tournefortii* », *Journal of Phytochemistry*, 21, 739-741, (1982).
- [82] C. Tringali, M. Piatelli, « Two chromane derivatives from the brown alga *Zonaria tournefortii* », *Journal of Tetrahedron Letters*, 23, 1509-1512, (1982).

- [83] C. Tringali, M. Piatelli, « Further metabolites from the brown alga *Zonaria tournefortii* », Journal of Gazette Chimica Italiana, 112, (1982).
- [84] P. Wisespongpan, M. Kuniyoshi, « Bioactive phloroglucinols from the brown alga *Zonaria diesingiana* », Journal of Applied Phycology, 15, 225-228, (2003).
- [85] A.-j. Blackman, G.-I. Rogers, « Phloroglucinol derivatives from three Australian marine algae of the genus *Zonarza* », Journal of Natural products, 51, 158-160, (1988).
- [86] Y. Li, I. Wijesekara, S. Kim, « Phlorotannins as bioactive agents from brown algae », Journal of Process Biochemistry, 46, 2219-2224, (2011).
- [87] D. Kelman, E.-K. Posner, K.-J. McDermid, N.-K. Tabandera, P.-R. Wright et A.-D. Wright, « Antioxidant Activity of Hawaiian Marine Algae », Journal of Marine. Drugs, 10, 403-416, (2012).
- [88] Y.-M. A. Mohamed, A. Vik, T. Hofer, J.-H. Andersen, T.-V. Hansen, « Polyunsaturated fatty acid-derived chromones exhibiting potent antioxidant activity », Journal of Chemistry and Physics of Lipids, 170-171, 41-45, (2013).
- [89] S.-H. Eon, Y.-H. Kim, S. Kwonkim, « Antimicrobial effect of phlorotannins from marine brown algae », Journal of Food and chemical Toxicology, 50, 3251-3255, (2012).
- [90] R. Keyrouz, M.-L. Abasq, C. Le Bourvellec, N. Blanc, L. Audibert, E. ArGall, D. Hauchard, « Total phenolic contents, radical scavenging and cyclic voltammetry of seaweeds from Brittany », Journal of Food Chemistry, 126, 831-836, (2011).
- [91] S.-A. Adesegun, A. Fajana, C.-I. Orabueze, H.-A. B. Coker, « Evaluation of Antioxidant Properties of *Phaulopsis fascisepala* C.B.Cl. (Acanthaceae) », Journal of Evidence based complementary and alternative medicine, 6 (2), 227-231, (2009).
- [92] K. Tawaha, , F.-Q. Alali, M. Gharaibeh, M. Mohammad, T. El-Elimat « Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species », Journal of Food Chemistry, 104, 1372-1378, (2007).
- [93] J.-D. Everette, Q.-M. Bryant, A.-M. Green, Y.-A. Abbey, G.-W. Wangila, R.-B. Walker, « Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin-Ciocalteu Reagent », Journal of Agricultural Food Chemistry, 58, 8139-8144, (2010).
- [94] W. Brand-Williams, M.-E. Cuvelier, C. Berset, « Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity », Journal of Lebensmittel-Wissenschaft and Technology, 28, 25-30, (1995).

- [95] P. Molyneux, « The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant Activity », *Songklanakain Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219, (2004).
- [96] A. Boudier, J. Tournebize, G. Bartosz, S. El Hanic, R. Bengueddourc, A. Sapin-Minet, P. Leroy, « High-performance liquid chromatographic method to evaluate the hydrogen atom transfer during reaction between 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical and antioxidants », *Journal of Analytica Chimica Acta*, 711, 97-106, (2012).
- [97] T. Takao, F. Kitatani, N. Watanabe, A. Yagi and K. Sakata, « A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish », *Journal of Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 58, 1780-1783, (1994).
- [98] A.-Y. Loo, K. Jain, I. Darah, « Antioxydant activity of compound isolated from the pyroligneous acid, *Rhizophora apiculata* », *Journal of Food Chemitry*, 107, 1151-1160, (2008).
- [99] C. Popovici, I. Saykova, B. Tylkowski, « Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH », *Revue de génie industriel*, 4, 25-39, 2009.
- [100] J. Kouamé, C. Gnoula, E. Palé, H. Bassolé, I.-P. Guissou, J. Simporé, J.-B. Nikiéma, « Etude des propriétés cytotoxiques et anti-radicalaires d'extraits de feuilles et de galles de *Guiera senegalensis* J. F. Gmel (Combretaceae) », *Science et technique, Sciences de la santé*, 32, (2009).
- [101] C. Sanchez-Moreno, J.-A. Larrauri, F. Saura-Calixto, « A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols », *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276, (1998).
- [102] K. Sidi Boulouar, A. Ziane. « Etude phytochimique des huiles essentielles de *Lavandula stoechas* L. de la région de Tlemcen ». Mémoire de DES en Biochimie, Université Abou Baker Belkaid, Tlemcen, (2003).
- [103] I.-F. F. Benzie, J.-J. Strain, « The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power the FRAP Assay », *Journal of Analytical biochemistry*, 239, 70-76, (1996).
- [104] R.-L. Prior, X. Wu, K. Schaich, « Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302, 2005.

- [105] M. Oyaizu, « Studies on products of browning reaction Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine », Japanese Journal of Nutrition, 44, 307-315, (1986).
- [106] M. Zubia, M.-S. Fabre, V. Kerjean, K.-Le Lann, V. Stiger-Pouvreau, M. Fauchon, E. Deslandes, « Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts », Journal of Food Chemistry, 116, 693-701, (2009).
- [107] T. Kuda, M. Tsunekawa, T. Hishi, Yoko Araki, « Antioxidant properties of dried kayamonori, a brown alga *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonales, Phaeophyceae) », Journal of Food Chemistry, 89, 617-622, (2005).
- [108] I.-F. F. Benzie, « An Automated, Specific, Spectrophotometric Method for Measuring Ascorbic Acid in Plasma (EFTSA) », Journal of Clinical Biochemistry, 29 (2), 111-116, (1996).
- [109] E. Jawetz, J.-L. Melnick, E.-A. Adelberg, « Microbiologie médicale », Presses Université Laval, (1973), 629 p.
- [110] A.-G. Ponce, R. Fritz, C. Valle, S.-I. Roura, « Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard », Journal of LW- University of Technology, 36, 679-684, (2003).
- [111] C.-N. Wendakoon, M. Sakaguchi, « Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices », Journal of Food Products, 58, 280-283, (1995).

ANNEXES

ANNEXE 1

Annexe 1 (a) : Méthodologie de séparation du solvant vert « extraction liquide-liquide »



Annexe 1 (b) : Recyclage du solvant vert « hydrodistillation par un Clevenger »

