

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de BLIDA
Faculté des Sciences
Département de Chimie



Mémoire présenté par
Melle YEKDAH Hadjer Yamina
En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière
Filière : Chimie
Option : Chimie des Substances Naturelles

Titre

**Détermination des acides phénoliques dans la microalgue
bleue-verte *Spirulina platensis* par spectrométrie IRTF**

Soutenu publiquement le 10 Octobre 2013 devant le jury composé de :

S. Kasmi	MCA	Présidente	Université de Blida
N. Bouzidi	MCB	Examinatrice	Université de Blida
K. Boutemak	MCB	Examinatrice	Université de Blida
M. El Hattab	Pr	Membre de CP	Université de Blida
H. Boutoumi	MCA	Membre de CP	Université de Blida
A. Badis	Pr	Membre de CP	Université de Blida
N. Ayachi	MAA	Membre de CP	Université de Blida
Z. Chemat	MCB	Membre de CP	Université de Blida
O. Touafak	MCB	Membre de CP	Université de Blida
Y. Daghbouche	Pr	Promotrice	Université de Blida

Promotion 2012-2013

Remerciements

Je remercie ALLAH pour m'avoir donné le courage et la patience pour achever mon travail et accomplir mes études.

Ce travail a été réalisé principalement entre le laboratoire de Chimie des Substances Naturelles de la faculté des Sciences département de Chimie, le laboratoire des Plantes Aromatiques et Médicinales (LPAM) de la faculté des sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques département d'Agronomie à l'université de Blida.

Je tiens à remercier vivement ma promotrice Mme Y. DAGHBOUCHE professeur au niveau du département de chimie de m'avoir encadré dans ce travail ainsi que sa patience, sa disponibilité, ces encouragements et lui exprimer ma profonde gratitude pour le temps consacré ... Merci

J'exprime ma reconnaissance à Mme N. BOUZIDI pour sa disponibilité, ses conseils et son aide durant mon travail.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur M. El HATTAB pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail et pour son aide.

Je suis également très reconnaissante envers Monsieur H. BOUTOUMI pour le suivi et les conseils qu'il m'a sans cesse prodigué.

Je tiens à remercier Mme S. KASMI pour ses conseils et son aide afin de réaliser ce travail.

Je suis très reconnaissante envers Monsieur A. HIRI pour son aide en m'envoyant l'algue brut bleue-verte Spiruline de Tamanrasset.

J'adresse mes vifs remerciements à Monsieur le président et aux membres de jury pour l'honneur qu'ils me font de juger ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements au personnel que je n'oublierai jamais du laboratoire de contrôle physico-chimique de l'industrie pharmaceutique EL KENDI.

Je remercie également les membres du laboratoire des plantes aromatiques et médicinales pour leur accueil et leur aide.

Mes remerciements vont aussi à tous les enseignants et les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

J'exprime ma gratitude à toutes les personnes rencontrées lors des recherches que j'ai effectuées et qui m'ont fait partager leurs expériences personnelles.



Dédicaces

Je dédie ce travail à l'âme de mon grand père, qu'ALLAH l'accueil en son vaste Paradis

A mes très chers Parents, qui m'ont énormément aidé et permis de continuer mes études dans les meilleures conditions

A mes chers ainés Frères et Sœurs, Nassima, Mohamed Es Sadek, Adnane et Saïda, qui m'ont soutenu depuis ma première scolarité à ce jour

A mes chères belles sœurs Souhila et Nadjat pour leur soutien et aide

A mes deux merveilleuses nièces Alaa et Tasnim et leur adorable frère Idriss

A toute ma famille

A toutes mes copines et amies

A tout ce monde merveilleux ...

Je présente ce travail

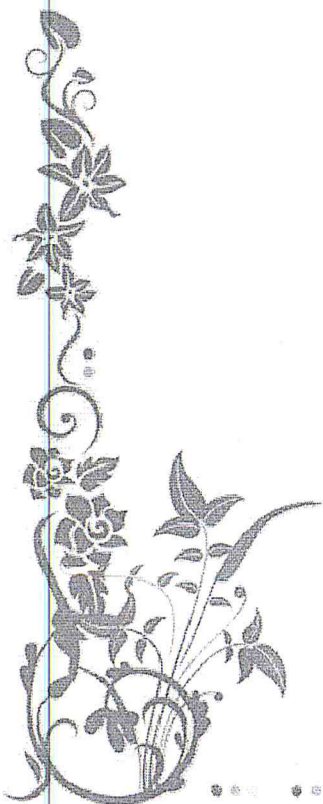


TABLE DES MATIERES

Résumé (Arabe, Français, Anglais)	i
Liste des abréviations	iv
Liste des figures	vi
Liste des tableaux	ix
Objectif du travail	01

Chapitre I Introduction générale

I.	Généralité sur les algues	04
I.1	Classification des algues	04
I.1.1	Algues eucaryotes	04
I.1.2	Algues procaryotes	05
I.2	Les algues bleues vertes	05
I.2.1	Les cyanobactéries	06
II.	Généralités sur les composés phénoliques	06
II.1	Les composés phénoliques	06
II.1.1	Généralités sur les acides phénoliques	08
II.1.1.a	Acides benzoïques	08
II.1.1.b	Acides cinnamiques	09
III.	Généralités sur les méthodes d'extraction utilisées	10
III.1	Chromatographie sur couches minces CCM	10
III.1.1	Principe de la CCM	10
III.1.2	Technique de la CCM	11
III.2	Extraction en phase solide EPS	12
III.2.1	Principe de l'EPS	12
III.2.2	Procédure générale de l'EPS	12

III.3	Extraction assistée par micro-ondes	13
III.4	Spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier IRTF	13
III.4.1	Principe de la spectrométrie IRTF	13
III.4.2	Analyse qualitative	14
III.4.3	Analyse quantitative	14

Chapitre II Synthèse bibliographique

I.	Travaux antérieurs réalisés sur les procédés d'extractions et les méthodes de dosage des phénols dans la matière végétale	16
I.1	Procédés d'extraction des composés phénoliques à partir de matière végétale	16
I.1.1	Influence du solvant d'extraction sur la teneur de composés phénolique	16
I.1.1.a	Procédés d'extraction classique	16
I.1.1.b	Procédés d'extraction élaborés	20
I.2	Méthodes de dosage des composés phénoliques dans la matière végétale	27
I.2.1	Dosage par spectrophotométrie	28
I.2.1.1	Principe de la méthode de Folin-Ciocalteu	28
I.2.2	Dosage par chromatographie	30
II.	Présentation de l'espèce <i>Spirulina platensis</i>	33
II.1	Histoire de la Spiruline	33
II.2	Les étapes de la recherche	33
II.3	Description de <i>Spirulina platensis</i>	34
II.4	Classification systématique de <i>Spirulina platensis</i>	34
II.5	Composition chimique de <i>Spirulina platensis</i>	35
II.6	Potentialités et utilisations de la spiruline	35
III.	Travaux antérieurs réalisés sur la microalgue bleue-verte spiruline	35

Chapitre III

Partie expérimentale

I.	Partie expérimentale	42
I.1	Appareillage	43
I.1.1	Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier IRTF	43
I.1.1.a	Analyse par spectrométrie en phase liquide	43
I.1.1.b	Analyse par spectrométrie infrarouge en phase solide	44
I.2	Réactifs	44
I.3	Identification de l'acide salicylique par chromatographie sur couches minces CCM	45
I.4	Méthode de calibration externe	45
II.	Procédure générale	46
II.1	Caractéristiques de l'extrait des comprimés de l'algue <i>Spirulina platensis</i>	47
II.2	Identification de l'acide salicylique par chromatographie sur couches minces CCM	48
III.	Résultats et discussions	49
III.1	Choix de l'étalon pour le dosage des acides phénoliques par spectrométrie IRTF	49
III.2	Spectre IRTF de l'acide salicylique	52
III.3	Spectre IRTF des comprimés et de l'algue Spiruline préparés directement dans le chloroforme	53
III.4	Caractéristiques analytiques de l'acide salicylique préparé directement dans le chloroforme	56
III.5	Caractéristiques analytiques de l'acide obtenu après extraction et dilution dans CHCl_3	58
III.6	Détermination du taux d'équivalent d'acide salicylique dans l'extrait réel	60
III.6.1	Solvant de récupération	60
III.6.2	Caractéristiques analytiques de l'acide salicylique en considérant l'aire des pics	62

III.7	Détermination du taux d'équivalent d'acide salicylique en considérant l'aire des pics	64
IV.	Extraction et préconcentration des acides phénoliques par une technique élaborée	65
IV.1	Extraction assistée par micro-ondes	65
IV.2	Procédure de préconcentration des acides phénoliques	66
IV.2.1	Sélection de la phase solide	67
IV.3	Extraction et préconcentration des acides phénolique	70
Conclusion générale		74
Références bibliographique		77

الملخص

يتمثل الهدف الرئيسي من هذا العمل في تطوير طريقة التحليل الكمي لتحديد الأحماض الفينولية القابلة للإستخراج في مستخلص الأقراص المعدة من الطحالب الدقيقة الزرقاء المخضرة "سبيرولينا بلاتونسيس"، و في مستخلص الطحالب الخام عن طريق مطيافية الأشعة تحت الحمراء بتحويل فورييه بإستخدام عملية الإستخلاص التقليدية.

و قد تم إعتبار حمض الساليسيليك في هذا العمل كمعيار قياسي، و مقدار الأحماض الفينولية القابلة للإستخراج في المستخلصات تم تقييمه بنسب مكافئة من حمض الساليسيليك.

و على هذا، فقد استخدمت قيم الإمتصاص بإعتبار مساحة الذروات التي تسمح منطقة بين 1460 – 1800 سم⁻¹. النسبة المحددة بواسطة المعايير الخارجية هي 6% لمستخلص الأقراص التي أعدت من الطحالب الدقيقة الزرقاء المخضرة "سبيرولينا بلاتونسيس"، و 4.7 % لمستخلص الطحالب الخام نفسها.

الكلمات الدالة: الطحالب الزرقاء المخضرة ، سبيرولينا بلاتونسيس، والأحماض الفينولية، القياس الطيفي بالأشعة الحمراء بتحويل فورييه، حمض الساليسيليك.

Résumé

L'objectif principal de ce travail porte sur le développement d'une méthode analytique quantitative, pour la détermination des acides phénoliques extractibles dans les extraits des comprimés préparés à base de la microalgue bleue-verte *Spirulina platensis* et de l'algue brut cultivée dans la région de Tamanrasset au sud algérien, par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) en employant l'extraction par une procédure classique.

Dans ce travail, l'acide salicylique a été considéré comme étalon et la teneur des acides phénoliques extractibles dans les extraits a été évaluée comme étant le taux d'équivalent d'acide salicylique.

Pour cela, les valeurs d'absorbance en considérant l'aire des pics balayant la zone de 1800-1460 cm^{-1} ont été employées.

Le taux déterminé par calibration externe est de 6% pour l'extrait des comprimés à base de la microalgue et de 4.7% pour l'extrait de l'algue même.

Mots clés : Algue bleue-verte, *Spirulina platensis*, Acides phénoliques, Spectrométrie IRTF, Acide salicylique.

Abstract

The main objective of this work, is the development of a quantitative analytical method, for the determination of extractable phenolic acids in extracts prepared from the blue-green microalga "*Spirulina platensis*" tablets and crude alga grown in the region of Tamanrasset in Algerian south, by infrared Fourier transform spectroscopy (FTIR) using a conventional extraction procedure.

In this work, salicylic acid has been considered as the standard and content of extractable phenolic acids in the extracts was measured as the rate of salicylic acid equivalent.

For this, the absorbance values considering the peak area sweeping the area 1800-1460 cm⁻¹ were used.

The rate determined by external calibration was 6% for the extract of the tablets made from the microalga "*Spirulina platensis*" and 4.7% for the extract of the alga itself.

Keywords: blue-green alga, *Spirulina platensis*, phenolic acids, FTIR spectrometry, salicylic acid.

LISTE DES ABREVIATION

λ : Longueur d'onde en nm

Ac Sal: Acide salicylique

BaF₂ : fluorure de baryum

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CHCl₃: Chloroforme

CLHP: Chromatographie Liquide à Haute Performance

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

DAD : Détecteur à barrette de diodes

DC: Domaine de Concentration

DSC18 : Cartouche de silice greffée en C18

DSR: Déviation Standard Relative

DTGS : détecteur sulfate triglicine deutéré

EAM: Extraction Assistée par Micro-ondes

EPS: Extraction en Phase Solide

ESA : Extraction par Solvant Accélérée

Et coll. : Et collaborateurs

EtOH: Éthanol

FIR : lointain infrarouge (Far infrared)

$h R_f$: Valeur du rapport frontal multipliée par 100

H₂O: Eau

IR : Infrarouge

IRTF: Infrarouge à Transformée de Fourier

KBr : bromure de potassium

LD : Limite de Détection

MeOH: Méthanol

min: Minute

MIR : moyen infrarouge (Mid Infrared)

Na_2CO_3 : carbonate de sodium

Na_2SO_4 : Sulfate de sodium anhydre

NaHCO_3 : bicarbonate de sodium

NaNO_3 : nitrate de sodium

NIR : proche IR (Near-Infrared)

nm: nanomètre

R_f : Rapport frontal

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

RP: phase inverse (reversed phase)

sec: Seconde

Si : Silice

SM : Spectroscopie de Masse

t.a : température ambiante

UV : ultraviolet

W: Watt

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Comparaison anatomique d'une algue et d'une plante	04
Figure 2.	Classification des algues	05
Figure 3	Représentation schématique des principales classes de la famille de phénols	07
Figure 4	Structure de quelques dérivés de l'acide hydroxybenzoïque	08
Figure 5	Structure de quelques dérivés de l'acide hydroxycinnamique	09
Figure 6	Principe de la CCM	11
Figure 7	Mesure de R_f sur une plaque CCM	11
Figure 8	Les quatre principales étapes de l'EPS	12
Figure 9	Schéma d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier IRTF	14
Figure 10	Procédé d'extraction des composés phénoliques en considérant différentes proportions éthanol-eau	17
Figure 11	Procédé d'extraction de composés phénoliques par des solvants de polarités différentes	18
Figure 12	Procédé d'extraction des composés phénolique par des solvants à différentes polarités	19
Figure 13	Procédure d'extraction assistée par ultrasons par l'éthanol et le méthanol	21
Figure 14	Procédé d'extraction des composés phénoliques par solvant	22
Figure 15	Procédé d'extraction des composés phénoliques par micro-ondes	23
Figure 16	Procédé d'extraction des composés phénoliques par solvant	23
Figure 17	Procédé de dosage selon Nathalie et coll.	28
Figure 18	Procédé de dosage selon Andrew et coll.	29
Figure 19	Procédé de dosage selon Bellebcir	29
Figure 20	Procédé de dosage selon Swain et coll.	30

Figure 21	Spiruline vu au microscope (agrandissement x100)	34
Figure 22	<i>Spirulina platensis</i>	34
Figure 23	Montage de flux utilisé pour la détermination de l'acide salicylique par IRTF	43
Figure 24	Montage IRTF pour les préparations des échantillons en phase solide	44
Figure 25	Protocole d'extraction de la fraction riche en composés phénoliques à partir du matériel végétal	46
Figure 26	Algue bleue-verte <i>Spirulina platensis</i> brut et sous forme de comprimés	47
Figure 27	Identification de l'acide salicylique par CCM	48
Figure 28	Spectre IRTF en phase solide comparatifs de l'acide salicylique (vert), et les dérivés cinnamiques : acide caféïque (rose) et l'acide férulique (bleu) préparés à 1.5%	50
Figure 29	Spectre IRTF en phase solide comparatifs de l'acide salicylique (vert), et les dérivés benzoïques : acide gallique monohydraté (rose), acide syringique (bleu) et acide gallique (orange) préparés à 1.5%	51
Figure 30	Spectre IRTF de l'acide salicylique dans la gamme spectrale de 4000-400 cm^{-1}	52
Figure 31	Spectre IRTF de l'acide salicylique 20 mg.mL^{-1} préparé directement dans CHCl_3	52
Figure 32	Protocole de la préparation directe des comprimés et de l'algue dans le chloroforme	53
Figure 33	Spectre IRTF d'absorbance du comprimé dans CHCl_3 en phase liquide (a), et du résidu du comprimé en phase solide (b)	54
Figure 34	Spectre IRTF d'absorbance de l'algue dans CHCl_3 en phase liquide (c), et du résidu de l'algue en phase solide (d)	55
Figure 35	Spectres d'absorbances de l'acide salicylique préparé directement dans CHCl_3	56
Figure 36	Spectres d'absorbances de la série d'étalonnage d'acide salicylique traitée et diluée dans CHCl_3	58

Figure 37	Spectres IRTF comparatifs de l'acide salicylique (vert) et l'extrait brut (bleu) récupéré avec CHCl_3	60
Figure 38	Spectres comparatifs de l'acide salicylique (rose) et l'extrait brut du comprimé (vert) et de l'algue brut (bleu) obtenus après traitement récupérés avec CHCl_3 à 20% MeOH	61
Figure 39	Utilisation de l'aire des pics en considérant la zone entre $1800\text{-}1460\text{ cm}^{-1}$	61
Figure 40	Spectre IRTF en phase solide du résidu obtenu après évaporation lors d'extraction assistée par micro-ondes	65
Figure 42	Extraction des acides phénoliques par l'EPS	66
Figure 43	Spectres IRTF comparatifs de l'acide salicylique de concentration 5mg.mL^{-1} (bleu) avec l'extrait obtenu par l'EPS Silice (vert) et l'extrait obtenu par l'EPS DSC18 (rose)	69
Figure 44	Protocole de l'extraction et de préconcentration des acides phénoliques	71
Figure 45	Spectre IRTF de l'acide salicylique de concentration 5mg.mL^{-1} (bleu) de l'extrait traité sans ajout d'acide salicylique (rose) et de l'extrait traité avec ajout de 5mg.mL^{-1} d'acide salicylique (vert)	72

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Principaux acides hydroxybenzoïques	09
Tableau 2	Principaux acides hydroxycinnamiques	10
Tableau 3	Le rendement d'extraction des résidus solides et de l'évaporation à partir de 10g de plantes séchées	19
Tableau 4	Rendement d'extrait de <i>Stypocaulon scoparium</i> préparé en utilisant différents solvants	20
Tableau 5	Teneurs en phénols totaux dans les feuilles de Romarin déshuilées et broyées en utilisant la méthode méthode de Folin-Ciocalteu	24
Tableau 6	Résultats de l'extraction depuis les feuilles de Romarin déshuilées	24
Tableau 7	Résultats de l'extraction depuis les feuilles fraîches de Romarin	24
Tableau 8	Les différents solvants utilisés pour l'extraction de composés phénoliques	27
Tableau 9	Travaux de recherches réalisés avec la technique CLHP	31
Tableau 10	Travaux de recherches réalisés sur la microalgue bleue-verte Spiruline	39
Tableau 11	Caractères organoleptiques des extraits des comprimés et de l'algue brut	48
Tableau 12	Caractéristiques analytiques de l'acide salicylique préparé directement dans CHCl_3	57
Tableau 13	Caractéristiques analytiques de l'acide salicylique préparé après traitement dans CHCl_3	59
Tableau 14	Pourcentage de récupération	60
Tableau 15	Caractéristiques analytiques de l'acide salicylique obtenu directement dans CHCl_3 en considérant l'aire des pics	62
Tableau 16	Caractéristiques analytiques de l'acide salicylique obtenu après traitement en considérant l'aire des pics	63
Tableau 17	Taux d'équivalent d'acide salicylique de l'extrait brut de l'algue brut et de l'extrait de comprimé de l'algue <i>Spirulina platensis</i> déterminé par calibration externe	64

Objectif du Travail

Objectif du travail

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis au profit de l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermopharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. La Pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi-synthèse.

On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. L'isolement de principes actifs datant du XIX^{ème} siècle, en améliorant la connaissance des structures, a fait progressivement se séparer et parfois s'opposer une phytothérapie traditionnelle souvent empirique avec une thérapeutique officielle incluant les principes chimiques et végétaux dont la pharmacologie était mieux connue. Cette thérapeutique officielle accepte parfois avec une certaine méfiance l'emploi de végétaux ou d'extraits complexes de végétaux dont l'action est confirmée par l'usage sans être attribuée de façon certaine à une molécule type ^[1].

Les algues occupent une place importante dans le milieu marin avec plus de 1200 espèces appartenant à tous les niveaux évolutifs, capables de produire des substances dont l'action constitue dans certains cas, un élément de protection contre les prédateurs naturels. Les algues marines constituent un énorme réservoir de molécules naturelles potentiellement actives. Des études ont permis d'isoler et d'identifier un très grand nombre de molécules nouvelles de grande originalité structurale et dont beaucoup d'entre elles ont une activité biologique intéressante.

L'origine végétale des principes actifs isolés à partir des algues constitue par ailleurs, un avantage réel et important à une époque où les ingrédients d'origine animale ne sont plus réellement d'actualité ^[2].

Parmi les ressources alimentaires non conventionnelles a été adoptée une algue bleue qui offre jusqu'à 70 % de protéines, de sels minéraux, des oligo-aliments et de nombreuses vitamines. Cette algue : c'est la Spiruline.

La spiruline grâce à ses qualités nutritionnelles exceptionnelles nous est proposée dans l'alimentation humaine notamment comme complément protéique d'une alimentation suffisamment énergétique par ailleurs [3]. Outre des propriétés nutritionnelles avérées, la spiruline connaît aujourd'hui un regain d'intérêt de la part de la communauté scientifique internationale du fait de sa possible utilisation comme source de produits à vertus thérapeutiques [4]. Elle présente une source prometteuse de phénols [5].

Les métabolites secondaires peuvent être quantifiés par diverses techniques et méthodes analytiques. Notre étude s'inscrit dans ce cadre de recherche qui vient contribuer au développement des applications analytiques quantitatives de la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) et offre un outil complémentaire disponible facile à manipuler et rapide aux utilisateurs travaillant dans différentes disciplines.

Le contenu de ce mémoire est subdivisé en trois chapitres :

- Le premier chapitre présente une introduction générale sur tout le travail
- Le deuxième chapitre comporte la synthèse bibliographique importante qui regroupe tous les travaux antérieurs réalisés sur les procédés d'extraction et les méthodes de dosage des phénols dans la matière végétale en générale, et les travaux réalisés sur la microalgue bleue-verte Spiruline en particulier.
- Le troisième chapitre décrit la partie expérimentale qui a pour objet l'étude d'une nouvelle méthode de dosage des composés phénoliques dans les comprimés à base de l'algue bleue-verte *Spirulina platensis* ou dans l'algue même, produite dans la région du sud Algérien de Tamanrasset, par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF), en utilisant la méthode de calibration externe et en considérant l'acide salicylique comme étalon.

Dans ce travail, l'extrait riche en composés phénoliques a été obtenu par la macération classique du matériel végétal dans un mélange de solvant. Des expériences préliminaires faisant appel à une extraction assistée par micro-ondes suivie d'une préconcentration sur un support solide ont été testées.

Chapitre I

Introduction Générale

I. Généralités sur les algues

Les algues regroupent un ensemble d'organisme très variant. Toutes possèdent de la chlorophylle et, en ce sens ce sont des végétaux ^[6]. Ce sont des organismes chlorophylliens se développant dans l'eau ou dans les milieux humides ^[7]. Leur appareil végétatif est constitué d'un thalle dépourvu de racines, tiges et feuilles (figure1.) contrairement aux plantes ^[8].

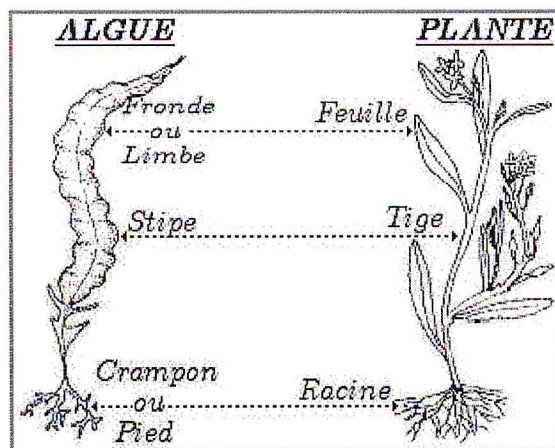


Figure 1. Comparaison anatomique d'une algue et d'une plante

I.1. Classification des algues

I.1.1. Algues eucaryotes

Les algues eucaryotes regroupent toutes les algues où la photosynthèse se produit dans des structures entourées d'une membrane, les chloroplastes.

Elles se distinguent essentiellement par les différences de structure de leurs chloroplastes et par la nature de leurs chlorophylles. Trois grands groupes peuvent être distingués:

- Les algues vertes (Chlorophycées) ;
- Les algues rouges (Rhodophycées) ;
- Les algues brunes (Phéophycées) ^[9].

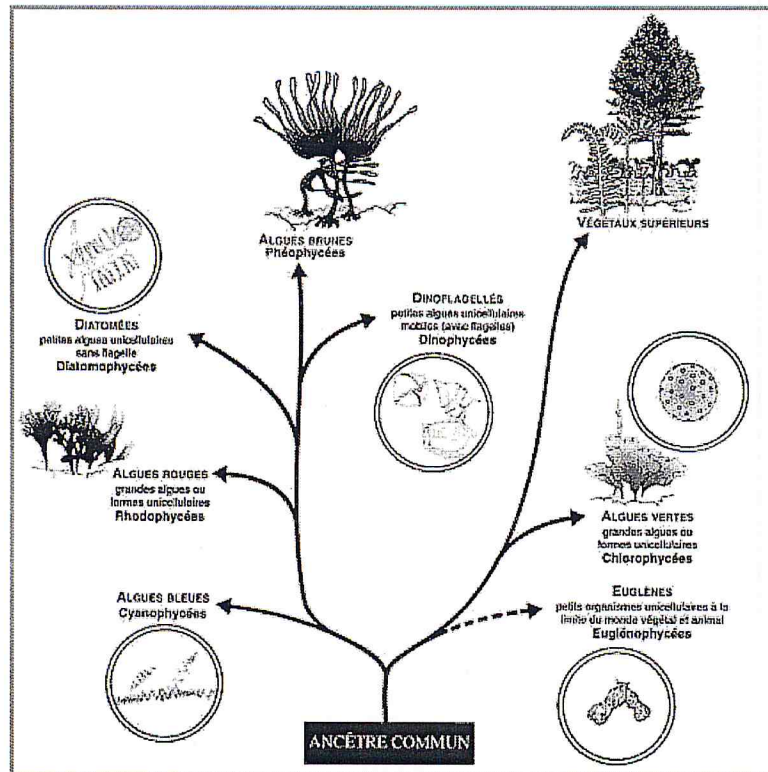


Figure 2. Classification des algues

I.1.2. Algues procaryotes

Traditionnellement, on classait les Cyanobactéries parmi les algues, référencées comme cyanophytes ou algues bleu-vert. Elles auraient joué un grand rôle dans la production de l'oxygène de l'atmosphère. Leurs cellules ont une structure procaryote typique des bactéries. La photosynthèse se produit directement dans le cytoplasme ^[9].

I.2. Les algues bleues vertes

Comptant parmi les premiers organismes vivants microscopiques apparus sur terre, les algues bleues-vertes ressemblent beaucoup aux bactéries, sauf qu'elles ont des propriétés photosynthétiques comme les végétaux. Les algues bleue - verte sont de vrais procaryotes et sont en fait les organismes les plus concentrés sur la planète en pigments de chlorophylle. Le taux de chlorophylle de l'Aphanizomenon, par exemple, est trois fois plus élevé que celui de la luzerne, source commune de chlorophylle dans notre alimentation ^[10].

I.2.1. Cyanobactérie

Apparues il y a environ 3,8 milliards d'années durant le précambrien, les cyanobactéries sont, avec les bactéries, les êtres vivants les plus anciens connus sur Terre. Il en existe au moins 2000 espèces réparties dans plus de 150 genres. Elles représentent une sous-classe bactérienne majeure tant par leur diversité morphologique et physiologique que par le rôle qu'elles ont joué en créant l'atmosphère aérobie nécessaire au développement de la vie. Encore de nos jours, les cyanobactéries jouent un rôle dans l'équilibre des proportions entre le gaz carbonique et l'oxygène. Les genres principaux reconnus pour produire des toxines sont *Anabaena*, *Aphazinomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis*, *Nodularia* ^[4].

II. Généralités sur les composés phénoliques

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire ^[11]. Des analyses quantitatives portées sur les métabolites dans une série d'algues marines ont été menées par notre équipe de recherche ^[12-13].

II.1. Composés phénoliques

Les phénols sont des métabolites secondaires qui constituent l'un des groupes le plus nombreux et largement distribué des substances dans le royaume des végétaux avec plus de 8000 structures phénoliques présents dans tous les organes de la plante. Ils résultent bio génétiquement de deux voies synthétiques principales : la voie shikimate et acétate. L'élément structural de base est un noyau benzoïque auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylque, ester, sucre...) ^[14]. La figure 3 représente les principales classes des phénols.

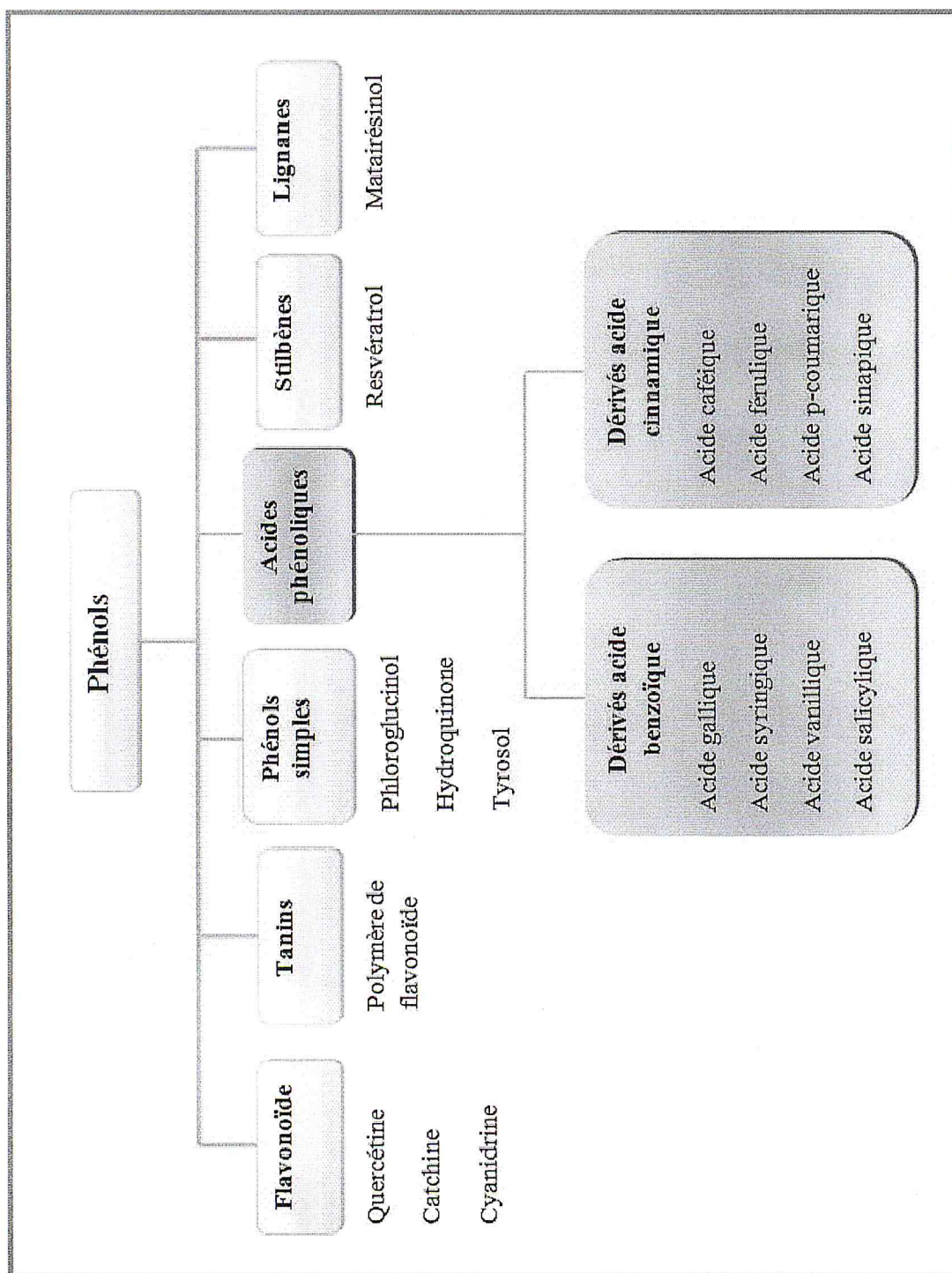


Figure 3. Représentation schématique des principales classes de la famille des phénols

II.1.1. Généralités sur les acides phénoliques

Les acides phénoliques se répartissent en deux classes : les acides benzoïques et les acides cinnamiques. Ils présentent des propriétés biologiques intéressantes : anti-inflammatoires, antiseptiques urinaire, anti-radicalaires, cholagogues, hépato-protecteurs, cholérétiques, immunostimulants ^[14].

II.1.1.a. Acides benzoïques

Les acides benzoïques ont une formule de base de type C₆-C₁ donc ils sont formés d'un squelette à sept atomes de carbones. Ils sont principalement représentés par les acides p-hydroxybenzoïques, protocatéchiques, vanilliques, galliques, syringiques, salicyliques et gentisiques. Ces acides sont particulièrement bien représentés chez les gymnospermes et les angiospermes d'où ils sont souvent libérés après hydrolyse alcaline du matériel végétal ^[11].

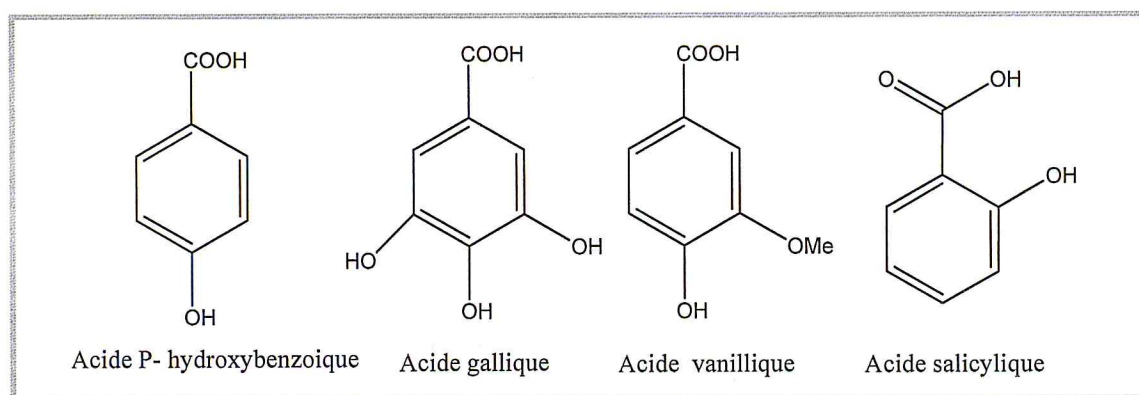


Figure 4. Structure de quelques dérivés de l'acide hydroxybenzoïque.

Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans le tableau 1

Tableau 1. Principaux acides hydroxybenzoïques

Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénolique
	H	H	H	H	Ac benzoïque
	H	H	OH	H	Ac p-hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Ac protocatéchique
	H	OCH3	OH	H	Ac vanillique
	H	OH	OH	OH	Ac gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Ac syringique
	OH	H	H	H	Ac salicylique
	OH	H	H	OH	Ac gentisique

II.1.1.b. Acides cinnamiques

Ces acides représentent une classe très importante dont elles possèdent une structure de base du type C₆-C₃. Les composés les plus fréquents sont l'acide p-coumarique, l'acide caféique, l'acide férulique et sont dérivé 5-hydroxylé et enfin l'acide sinapique ^[11].

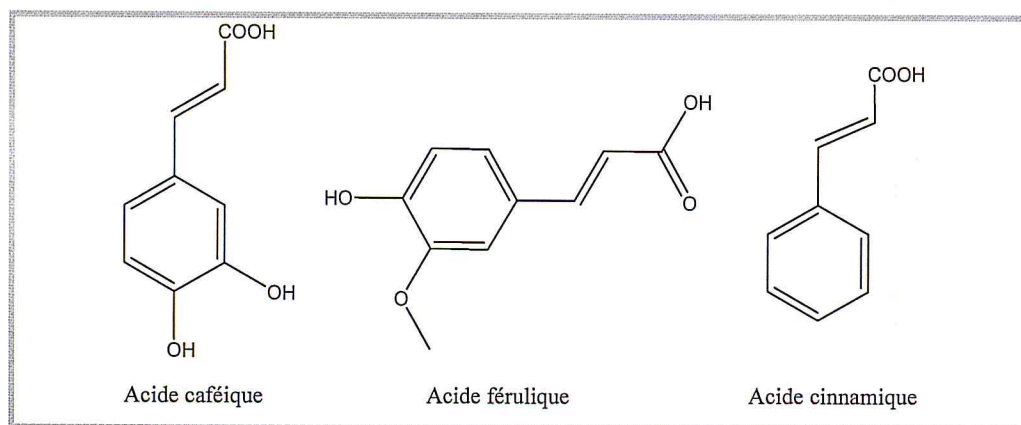


Figure 5. Structure de quelques dérivés de l'acide hydroxycinnamique.

Les acides hydroxycinnamiques les plus abondants sont répertoriés dans le tableau 2

Tableau 2. Principaux acides hydroxycinnamiques

Structure	R1	R2	R3	Acides phénolique
	H	H	H	Ac cinnamique
	H	OH	H	Ac p coumarique
	OH	OH	H	Ac caféique
	OCH3	OH	H	Ac férulique
	OCH3	OH	OCH3	Ac sinapique

III. Généralités sur les méthodes d'extraction utilisées

Nous présentons dans cette partie un flash sur le principe théorique de quelques méthodes d'extraction utilisées lors de la réalisation de la partie expérimentale de ce travail.

III.1. Chromatographie sur couches minces (CCM)

Les récents développement de la chromatographie sur couches minces CCM, lui ont permis de passer du statut semi-quantitative à celui de méthode quantitative, susceptible de donner des résultats fiables.

III.1.1. Principe de la CCM

La CCM n'a pas changé quant à son principe, mais la différence essentielle entre cette forme et les autres formes de chromatographie se situe sur le plan pratique, plutôt sur celui de phénomènes physiques (adsorbant, partage, ...). Elle nécessite une phase stationnaire qui est constituée d'une fine couche d'adsorbant (gel de silice, poudre de cellulose ou alumine) recouvrant un matériau support inerte et rigide tel qu'une plaque de verre, une feuille d'aluminium ou de plastique et d'un solvant ou un mélange de solvants (la phase mobile ou éluant) et tout à fait le mélange à séparer. La séparation se déroule par conséquent sur une surface plane et essentiellement en deux dimensions ^[15].

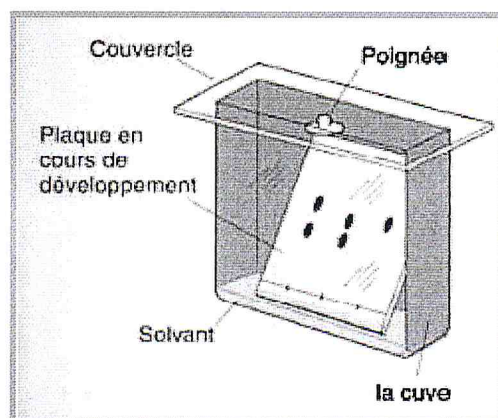


Figure 6. Principe de la CCM

III.1.2. Technique de la CCM

Les étapes principales d'une séparation sur couches minces sont les suivantes :

- 1- Préparation des plaques ;
- 2- Dépôt de l'échantillon ;
- 3- Développement des plaques ;
- 4- Révélation des taches.

Pour identifier les solutés, l'évaluation s'exprime par le rapport frontal R_f ou encore par sa valeur multipliée par 100, notée $h R_f$ (figure 7). La valeur de R_f est définie par la relation :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le composé depuis l'origine}}{\text{Distance parcourue par le front de solvant depuis l'origine}}$$

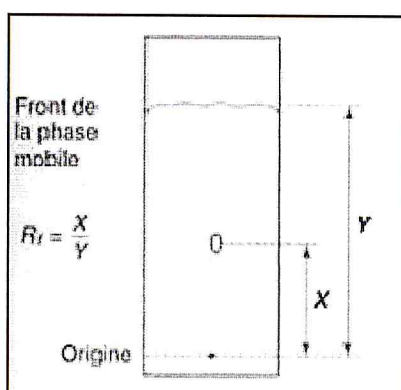


Figure 7. Mesure de R_f sur une plaque CCM

III.2. Extraction en phase solide (EPS)

III.2.1. Principe de l'EPS

L'extraction en phase solide (EPS) est une technique relativement nouvelle, très simple dans leur principe et dans leur emploi ^[15]. C'est un procédé d'extraction qui utilise une phase solide et une phase liquide pour isoler un analyte à partir d'un mélange solution. On l'utilise habituellement pour quantifier la quantité d'analyte (s) dans l'échantillon par des techniques analytiques, par exemple : CLHP, CPG, RMN et IRTF ^[16].

III.2.2. Procédure générale de l'EPS

La procédure générale consiste à charger une solution sur une phase d'adsorbant, laver les composants indésirables, puis rincez les analytes désirés avec un autre solvant dans un tube de collecte. Les phases stationnaires utilisées sont de même type que celles utilisées dans les colonnes de chromatographie liquide. La phase stationnaire de type gel de silice ou autre est contenue dans une colonne en verre ou en matière plastique.

Les procédures d'extraction en phase solide sont utilisées non seulement pour extraire des traces de composés organiques à partir d'échantillons, mais aussi pour éliminer les

composantes d'interférences des matrices complexes de manière à obtenir un extrait contenant les analytes d'intérêts ^[17].

L'extraction se déroule généralement en quatre étapes :

- 1- Le conditionnement ;
- 2- Le chargement de l'échantillon ;
- 3- Le(s) lavage(s) de la cartouche ;
- 4- L'élution (figure 8).

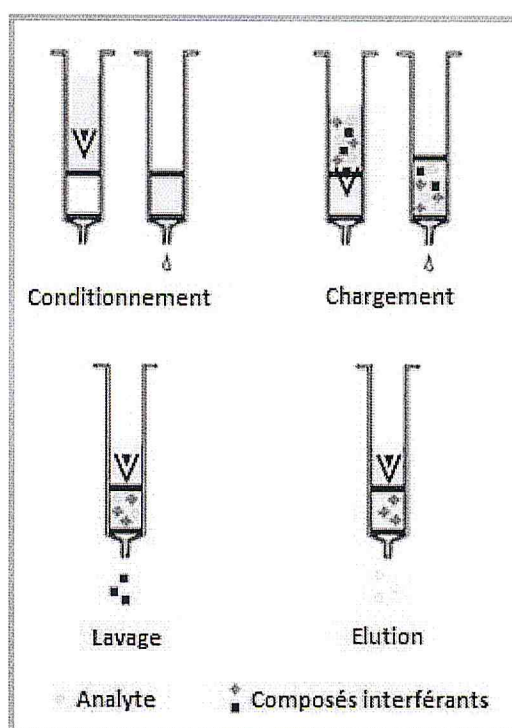


Figure 8. Les quatre principales étapes de l'EPS

III.3. Extraction assistée par micro-ondes

L'extraction assistée par micro-ondes (EAM) est un processus d'utilisation de l'énergie des micro-ondes pour chauffer des solvants en contact avec un échantillon afin de partager l'analyte à partir de la matrice de l'échantillon dans le solvant.

La capacité de chauffer rapidement le mélange de solvant de l'échantillon est inhérent à la EAM et le principal avantage de cette technique.

Une procédure typique d'extraction prend de petits volumes de solvant d'environ 10 fois plus petits que les volumes utilisés par des techniques d'extraction classiques. Dans la plupart des cas, la récupération des analytes et la reproductibilité sont améliorées par rapport aux techniques conventionnelles, comme indiqué dans plusieurs applications ^[18].

III.4. Spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)

Le rayonnement infrarouge (IR) fut découvert en 1800 par Frédéric Wilhelm Hershel. Ces radiations localisées au-delà des longueurs d'onde dans le rouge, sont situées entre la région du spectre visible (400 à 900 nm). Le domaine infrarouge s'étend de 0,7 μm à 50 μm . A cause de sa grande extension et de la différence en application et instrumentation la région de l'infrarouge est divisée en 3 catégories, le proche infrarouge (NIR) s'étend de 14000 à 4000 cm^{-1} , le moyen infrarouge (MIR) s'étend de 4000 jusqu'à 200 cm^{-1} et le lointain infrarouge (FIR) s'étend de 200 à 10 cm^{-1} ^[15].

III.4.1. Principe de la spectrométrie IRTF

La spectrométrie d'absorption infrarouge est utilisée pour l'observation de spectre de vibration ou de rotation du matériau analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau ^[19]. Le spectromètre à transformée de Fourier correspond à un montage à simple faisceau, le monochromateur étant remplacé par un interféromètre de type Michelson placé entre la source et l'échantillon comme l'illustre la figure 9.

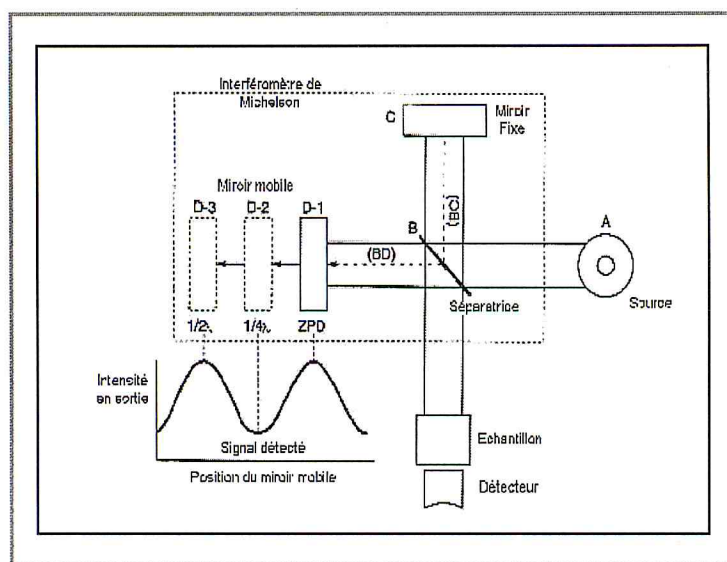


Figure 9. Schéma d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier

Le grand développement de la technique IRTF est dû à son emploi tant pour l'identification qualitative que pour l'analyse quantitative et pour l'étude complémentaire des structures. La spectroscopie infrarouge est devenue l'une des méthodes d'analyse chimique utilisée dans le plus grand nombre de disciplines scientifiques.

III.4.2. Analyse qualitative

L'analyse qualitative de l'infrarouge est la méthode la plus universelle. L'analyse se fait par comparaison avec des spectres de référence.

III.4.3. analyse quantitative

L'analyse quantitative est basée sur l'utilisation de la loi de Beer-Lamber qui établit une relation entre les mesures d'absorbance et la concentration des espèces à déterminer. Les spectromètres IRTF ont comme avantages une meilleure sensibilité, une résolution et une vitesse d'acquisition des données particulièrement élevées et un spectre complet peut être relevé en quelques secondes^[20].

La spectrométrie infrarouge a été considérée comme outil fondamental d'analyse quantitative dans plusieurs travaux scientifiques de notre équipe de recherche^[21-22].

Chapitre II

Synthèse Bibliographique

I. Travaux antérieurs réalisés sur les procédés d'extraction et les méthodes de dosage des phénols dans la matière végétale

Ce chapitre porte sur la synthèse des travaux de recherches antérieurs, en s'intéressant d'un coté aux différents procédés d'extraction des composés phénoliques à partir de végétaux supérieurs ou inférieurs et d'autre coté aux méthodes d'analyse de cette classe de produits.

I.1. Procédés d'extraction des composés phénoliques à partir de matière végétale

L'extraction de principes actifs à haute valeur à partir de la matière végétale, notamment le cas des polyphénols végétaux, suscitent actuellement beaucoup d'intérêt en raison de leur pouvoir antioxydant et antiradicalaire élevé ^[23].

Cependant, les procédés d'extraction des composés phénoliques présentent un facteur majeur dans la variabilité des propriétés antioxydantes d'extraits. En effet, la température, la puissance de solvant d'extraction, le temps d'extraction et la méthode adoptée pour la préparation des échantillons et pour l'extraction influe de manière significative sur la composition de l'extrait.

Le développement de techniques modernes telles que l'extraction assistée par micro-ondes ou ultrasons est destiné à surmonter ces difficultés en augmentant l'efficacité d'extraction, la sélectivité et la cinétique ^[24].

I.1.1. Influence du solvant d'extraction sur la teneur de composés phénoliques

Afin d'optimiser les conditions d'extraction et d'obtenir des meilleurs teneurs en phénols et activité antioxydante, des études basées sur le choix d'un solvant approprié ont été réalisées.

I.1.1.a. Procédés d'extraction classique

✓ D'après Clémentine et coll., [23]

L'extraction de composés phénoliques a été effectuée dans le but de valoriser le résidu de la production de pâte d'arachide des pellicules.

Les effets des solvants (éthanol, eau, 50% éthanol), du rapport solide/liquide, de la granulométrie de la phase solide et de la durée d'extraction ont été étudiés.

Les essais d'extraction de composés phénoliques ont été réalisés en mode batch (échelle laboratoire) après avoir fait subir à la matière première une répartition granulométrique plus homogène (figure10).

Des essais d'extraction ont été effectués avec différentes solutions aqueuses d'éthanol (de 0 à 95%). Le choix du solvant a été conditionné par le caractère polaire des composés phénoliques identifiés dans les pellicules d'arachide.

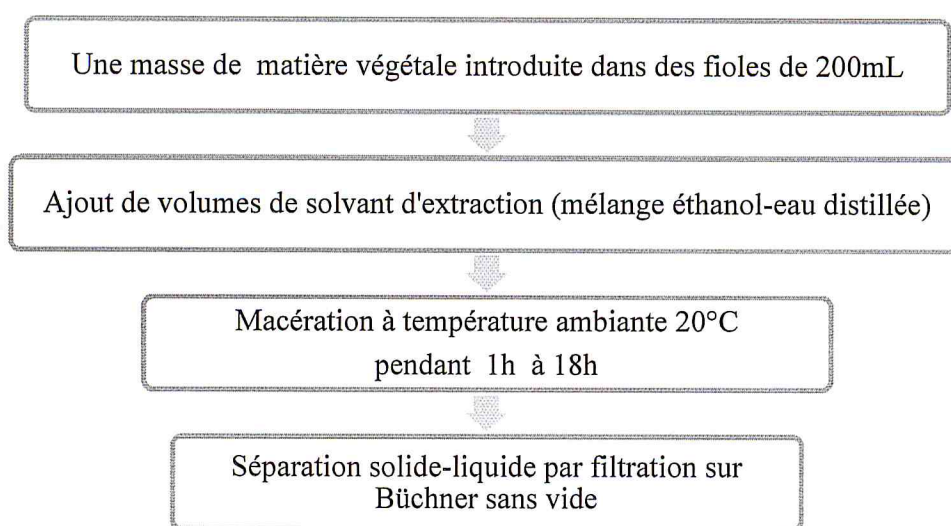


Figure 10. Procédé d'extraction des composés phénoliques en considérant différentes proportions éthanol – eau ^[23].

Il a été constaté la tendance d'extraire plus de composés phénoliques avec le mélange éthanol-eau qu'avec les solvants purs (eau et éthanol), le rendement maximum de 143.5 ± 2.1 mg EAG/g MS a été obtenu à 50% d'éthanol.

Il est à noter que l'éthanol pur est le meilleur solvant que l'eau, l'éthanol solubilise correctement des composés phénoliques moyennement polaires et peut entraîner aussi des substances lipophiles résiduelles.

L'addition de l'eau au système d'extraction fait améliorer le rendement en composés phénoliques glycosylés et des phénols avec un degré de polymérisation plus élevé, d'une autre part, l'augmentation de l'eau fait extraire en quantité importante les composés non phénoliques comme les glucides et les protéines qui conduit à la formation des complexes colloïdaux. Il a été noté aussi que, les composés phénoliques peuvent être isolés facilement

par macération agitée, sans broyage complémentaire de la matière végétale, pour des temps de contact inférieurs à 1h et à température ambiante.

✓ D'après Milan S. Stanković et coll.,^[25]

L'extraction de composés phénoliques a été effectuée dans le but de déterminer la teneur en phénols totaux dans différents extraits de l'espèce *Marrubium peregrinum*.

Le matériel végétal collecté a été séché à l'air dans l'obscurité à température ambiante (20°C), les plantes séchées ont été découpées et stockées dans des récipients sombres bien serrés jusqu'à utilisation. Les extraits de plantes ont été préparés selon le protocole montré ci-dessous (figure 11). La matière végétale est mise dans cinq (05) flacons sombres, et chacun contient un solvant de polarité différente (eau, méthanol, acétate d'éthyle, acétone et l'éther de pétrole).

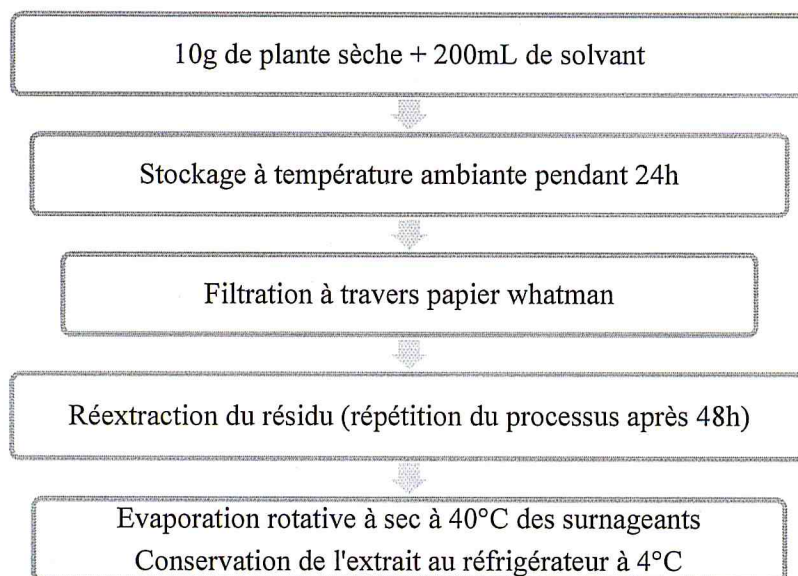


Figure 11. Procédé d'extraction de composés phénoliques par des solvants de polarités différentes^[25].

Le rendement le plus élevé du résidu solide a été obtenu en utilisant de l'eau ou du méthanol comme solvants d'extraction comme l'illustre le tableau 3.

Tableau 3. Le rendement d'extraction des résidus solides et de l'évaporation à partir de 10g de plantes séchées.

Extrait	Rendement (g) ¹
Méthanol	1.98 ± 0.082
Eau	1.54 ± 0.094
Acétate d'éthyle	0.49 ± 0.021
Acétone	0.32 ± 0.047
Ether de pétrole	0.15 ± 0.014

¹Chaque valeur est la moyenne de trois (03) mesures ± déviation standard.

Il a été vérifié que la plus forte concentration des composés phénoliques dans les extraits a été obtenue en utilisant des solvants de polarité élevée, l'extrait méthanoïque manifeste un plus grand pouvoir de l'extraction des composés phénoliques à partir de *Marrubium peregrinum*.

✓ D'après Aroa Lopez et coll., [26]

L'objectif de cette étude était d'étudier l'effet de plusieurs solvants d'extraction sur les composés phénoliques totaux des extraits bruts provenant de *Stypocaulon scoparium*.

L'algue a été rincée soigneusement à l'eau de mer frais et congelé puis, les échantillons congelés ont été lyophilisés, pulvérisés en poudre par un mixeur et ont été maintenus dans l'obscurité à -20°C sous atmosphère d'azote (figure 12).

Les solvants utilisés sont : méthanol absolu, éthanol absolu, eau et un mélange eau/méthanol (50%).

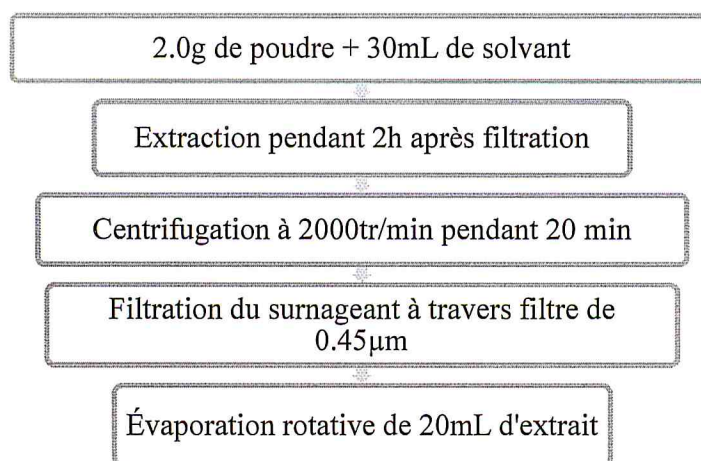


Figure 12. Procédé d'extraction des composés phénoliques par des solvants à différentes polarités ^[26].

Les rendements obtenus par ordre décroissant sont : eau / méthanol, l'eau, le méthanol, l'éthanol, comme le montre le tableau 4.

Tableau 4. Rendement d'extraction d'extraits de *Stypocaulon scoparium* préparés en utilisant différents solvants

Solvant	Rendement d'extraction ^a (%)
Eau	16.6
Eau-méthanol	16.8
Méthanol	13.3
éthanol	2.36

^a Valeurs exprimées en % de poudre d'algues sèches.

I.1.1.b. Procédés d'extraction élaborés

En raison des faibles rendements d'extractions, la performance des techniques dites d'extraction assistée (extraction assistée par micro-ondes, extraction assistée par ultrasons, extraction par solvant accélérée ou extraction par liquide sous pression) a été étudiée.

✓ D'après Falleh et coll., [24]

Le but de ce travail, est d'étudier l'influence du solvant d'extraction assistée par ultrasons sur la qualité des extraits. L'extraction en considérant deux solvants méthanol et éthanol en deux temps (5 et 10 min) a été évalué en fonction de la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante de l'extrait végétal.

Dans ce contexte, l'utilisation des ultrasons pour rompre les membranes cellulaires a l'avantage de réduire considérablement le temps d'extraction et d'augmenter le rendement d'extraction (figure 13).

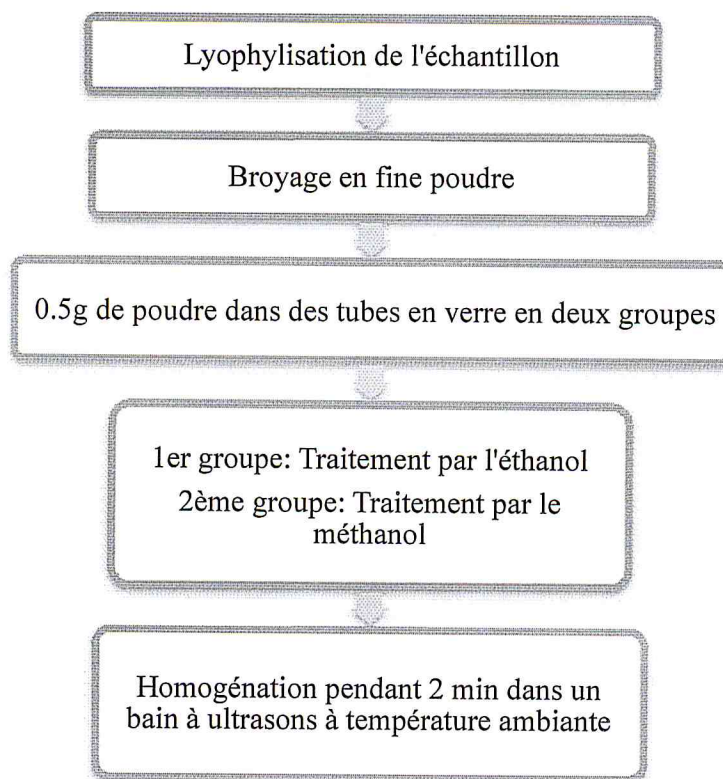


Figure 13. Procédure d'extraction assistée par ultrason par l'éthanol et le méthanol ^[24].

Il a été vérifié dans cette étude que l'extrait méthanoïque était significativement plus riche en polyphénols que l'extrait éthanoïque et pour les deux solvants utilisés, la durée la plus longue d'extraction, a donné une teneur plus élevée en polyphénols.

✓ D'après S.Rodriguez-Rojo et coll., [27]

L'objectif de ce travail était de comparer l'utilisation de deux solvants verts l'eau et l'éthanol pour l'extraction de composés phénoliques de *Rosmarinus officinalis* et c, en utilisant l'extraction classique, l'extraction assistée par micro-ondes et l'extraction assistée par ultrasons.

➤ Prétraitement de la matière végétale :

Deux manières différentes de prétraitement ont été testées à côté de la matière végétale fraîche, déshuilée et déshuilée plus broyée, afin d'améliorer le rendement d'extraction d'antioxydants.

1. Matière végétale déshuillée :

Consiste à retirer l'huile essentielle a été retirée de la matière végétale par exposition de cette dernière aux micro-ondes sans solvant. L'extraction a été réalisée comme décrit par Navarrete et coll. (2011), dans un four à micro-ondes domestique modifié (Panasonic NN-GD 566 M) ^[28].

100g de plante fraîche + chauffage micro-ondes à 1000W pendant 5min

2. Matière végétale déshuillée et broyée :

De plus du traitement de déshuilage, la matière végétale déshuillée est ensuite broyée en fine poudre.

Broyage dans un moulin à café à lames à température ambiante

La fraction entre 0,850 et 0,212 mm a été choisie

- Extraction de composés phénoliques à partir du romarin par solvant classique (figure 14) : L'extraction a été effectuée conformément à Navarrete et coll. (2011) ^[28].

Préchauffage de la MV prétraité dans bain-marie à 40°C pendant 15min

Ajout du solvant préchauffé (1:6 m\m) + rotation à 50tr\min

Après 4h, filtration sous vide à travers 0.45µm

Récupération de la phase liquide et stockage à 4°C

Figure 14. Procédé d'extraction des composés phénoliques par solvant ^[28].

- Extraction de composés phénoliques à partir du romarin assistée par micro-ondes (figure 15) :

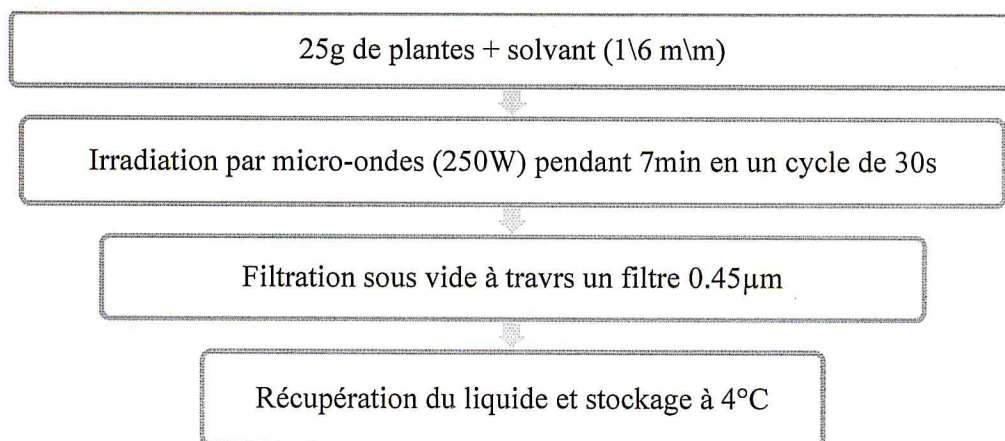


Figure 15. Procédé d'extraction des composés phénoliques par micro-ondes ^[28].

- Extraction des composés phénoliques à partir du romarin assistée par ultrasons (figure 16) :

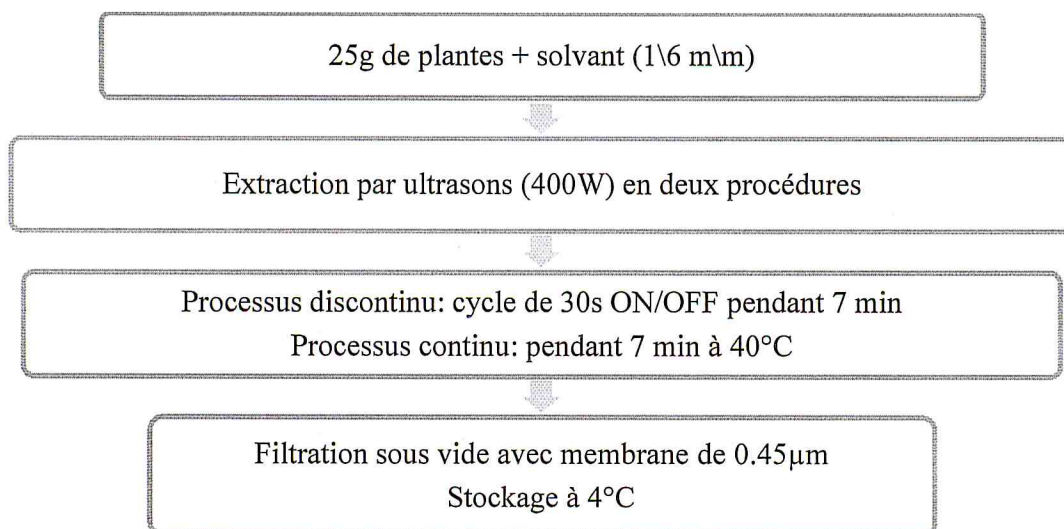


Figure 16. Procédé d'extraction des composés phénoliques par solvant ^[28].

Tableau 5. Teneur en phénols totaux dans les feuilles de Romarin déshuilées et broyées en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu

Technique d'extraction	Solvant	Rendement d'extraction (% m/v)	Teneur de phénols totaux (ppm EAG)
Extraction par solvant	Ethanol	2.4 ± 0.2	2600 ± 700
	Eau	3.89 ± 0.07	7700 ± 900
Micro-ondes (cycle ON/OFF)	Ethanol	3.3 ± 0.2	3662 ± 8
	Eau	4.6 ± 0.8	8300 ± 800
Ultrasons (cycle ON/OFF)	Ethanol	2.70 ± 0.02	2570 ± 80
	Eau	6.61 ± 0.09	8790 ± 300
Ultrasons (en continu)	Ethanol	2.35 ± 0.02	2040 ± 40
	Eau	3.500 ± 0.007	8440 ± 70

Tableau 6. Résultats de l'extraction depuis les feuilles de Romarin déshuilées

Technique d'extraction	Solvant	Rendement d'extraction (% m/v)	Teneur de phénols totaux (ppm EAG)
Extraction par solvant	Ethanol	2.135 ± 0.007	1290 ± 80
	Eau	0.600 ± 0.014	960 ± 90
Micro-ondes (cycle ON/OFF)	Ethanol	2.050 ± 0.016	1240 ± 170
	Eau	0.13 ± 0.03	179 ± 3
Ultrason (cycle ON/OFF)	Ethanol	1.70 ± 0.08	670 ± 17
	Eau	0.14 ± 0.09	2110 ± 1.3
Ultrason (en continu)	Ethanol	1.54 ± 0.03	664 ± 11
	Eau	0.31 ± 0.03	218 ± 2

Tableau 7. Résultats de l'extraction depuis les feuilles fraîches de Romarin

Technique d'extraction	Solvant	Rendement d'extraction (% m/v)	Teneur de phénols totaux (ppm EAG)
Extraction par solvant	Ethanol	2.5 ± 0.9	450 ± 60
	Eau	0.0605 ± 0.007	550 ± 110
Micro-ondes (cycle ON/OFF)	Ethanol	3.1 ± 1.2	902 ± 32
	Eau	0.095 ± 0.007	110 ± 6
Ultrason (cycle ON/OFF)	Ethanol	2.70 ± 1.5	330 ± 70
	Eau	0.077 ± 0.004	92 ± 36
Ultrason (en continu)	Ethanol	1.10 ± 0.02	195 ± 9
	Eau	0.075 ± 0.007	92 ± 48

✓ D'après Waksmundzka et coll., [29]

L'objectif du travail discuté dans cet article était, la comparaison de différentes techniques d'extraction pour isoler les acides phénoliques à partir de deux matériaux végétaux couramment utilisés en thérapie-les fleurs de *Sambucus nigra* L. et les feuilles de *Polygonum aviculare* L., le rendement d'extraction des acides phénoliques a été déterminé pour les différents procédés d'extraction liquide-solide : extraction par Soxhlet, l'extraction par ultrasons, extraction assistée par micro-ondes et l'extraction accélérée par solvant.

Le méthanol a été utilisé comme solvant d'extraction, l'extract brut a été évaporé à sec et préparé pour le fractionnement des acides phénoliques par extraction liquide-liquide ou par extraction en phase solide. Les échantillons contenant la fraction d'acides phénoliques ont été analysés par CLHP en phase inverse en utilisant la méthode de calibration externe.

La composition qualitative et quantitative des extraits contenant la fraction d'acides phénoliques dépend de la méthode d'extraction. Pour *Sambucus nigra* L. la plus efficace méthode est l'extraction exhaustive dans un appareil Soxhlet et pour *Polygonum aviculare* L. les plus efficaces sont l'extraction assistée par micro-ondes et l'extraction par ultrason.

Des rendements similaires ont été obtenus lorsque les méthodes de purification (extraction liquide-liquide) et (extraction en phase solide) ont été étudiées pour ces acides phénoliques.

L'extraction assistée par micro-ondes est très efficace pour l'extraction des dérivés polaires d'acide benzoïque à savoir l'acide gallique, protocatéchique et l'acide p-hydroxybenzoïque.

***Conditions expérimentales des différentes techniques d'extractions**

Extraction par Soxhlet : 2g matière végétale sont placés dans une cartouche : extraction par MeOH pendant 15H.

Extraction par ultrason : 2g de matière végétale trempés dans 50mL de MeOH pendant 30min dans un bain à ultrasons : filtration (refaire la manip 3 fois) à température ambiante et à 60°C.

Extraction assistée par micro-ondes : 2g de matière végétale placés dans 50mL de MeOH à 80% : extraction en deux étapes (40% la puissance du générateur pendant 1min puis 60% la puissance du générateur pendant 30 min à 600W) en deux modes : système ouvert et fermé.

Extraction par solvant accélérée : 1g dans 50mL MeOH à 80% (pour les fleurs) MeOH pure (pour les feuilles) à T=100°C et à 60bar pendant 10min. (refaire la manip 3 fois)

Extraction liquide-liquide : Les extraits obtenus sont évaporés à sec, les résidus sont mélangés avec 50mL eau bouillante après les refroidir à 4°C. Après 12h les extraits sont filtrés puis sont extrais par l'éther diéthylique (8x50mL) : évaporation à sec et le résidu est dissout dans 5mL MeOH.

Extraction en phase solide (EPS): Conditionnement des cartouches de C18 avec 10mL MeOH puis 10mL eau distillée, l'extrait est dissout dans 5mL MeOH/H₂O à 30%, et l'élution est faite par 2mL d'eau distillée.

Addition d'une solution de 1.2mL de bicarbonate de sodium NaHCO₃ à 2.5%. La solution obtenue par EPS est diluée avec l'eau distillée et ajustée dans une fiole de 25mL (Les acides phénoliques sont sous forme anionique).

Des cartouches de silice greffées avec une amine quaternaire sont conditionnées avec 10mL eau distillée puis avec 29mL de NaHCO₃ à 0.0625%.

L'extrait contenant les acides phénoliques sous forme anionique est chargé dans ces cartouches préparées comme décrites précédemment et l'élution est faite par 20mL 1M Acide phosphorique-H₂O-MeOH (1 :4 :5) (v/v).

Tableau récapitulatif des solvants utilisés dans l'extraction des composés phénoliques de différente matière végétale avec procédés d'extraction classique et élaborés, montré ci-dessous dans le tableau 8.

Tableau 8. Les différents solvants utilisés pour l'extraction de composés phénoliques.

Référence	Solvants testés	Solvant adéquat
[23]	Ethanol-eau, éthanol, eau	Ethanol-Eau (50 :50)
[25]	Eau, méthanol, acétate d'éthyle, acétone, éther de pétrole	Eau ou Méthanol
[26]	Méthanol-eau, méthanol, éthanol, eau	Méthanol-Eau (50:50)
[24]	Ethanol, méthanol	Méthanol
[27]	Ethanol, eau	Ethanol pour MV fraîche Eau pou MV déshuillée et déshuillée broyée
[29]	MeOH/Eau à 80% et MeOH pure	MeOH/Eau à 80% MeOH pure

I.2. Méthodes de dosage des composés phénoliques dans la matière végétale

La quantification des composés phénoliques est le plus souvent réalisée par absorptiométrie dans le visible ou par chromatographie en phase liquide (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 l'huile. 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.

I.2.1. Dosage par spectrophotométrie

La méthode de Folin-Ciocalteu est la plus utilisée pour l'estimation des composés phénoliques extractibles totaux.

I.2.1.1. Principe de la méthode de Folin-Ciocalteu

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits, fractions et sous-fractions sont déterminées au moyen du réactif de Folin-Ciocalteu (Parejo et coll. 2002). Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène.

Le réactif de FolinCiocalteu voit ces propriétés colorimétriques modifiées lorsqu'il est complexé à certaines molécules. Il réagit avec la fonction -OH des phénols et de ce fait vire de la couleur jaune au bleu.

La coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 750 nm. L'absorbance, par référence à une gamme étalon obtenue avec un acide phénolique (acide gallique), permet de déterminer la quantité de polyphénols totaux présente dans un extrait en se référant à une courbe d'étalonnage à partir des concentrations connues. Elle est exprimée en mg d'équivalent acide gallique par g de matière sèche ^[30].

Plusieurs procédures de dosage ont été testées à partir des techniques générales décrites dans les ouvrages spécialisés, on propose dans ce travail les trois protocoles les plus communément utilisés.

➤ Dosage Folin-Ciocalteu selon Nathalie et coll., ^[31]

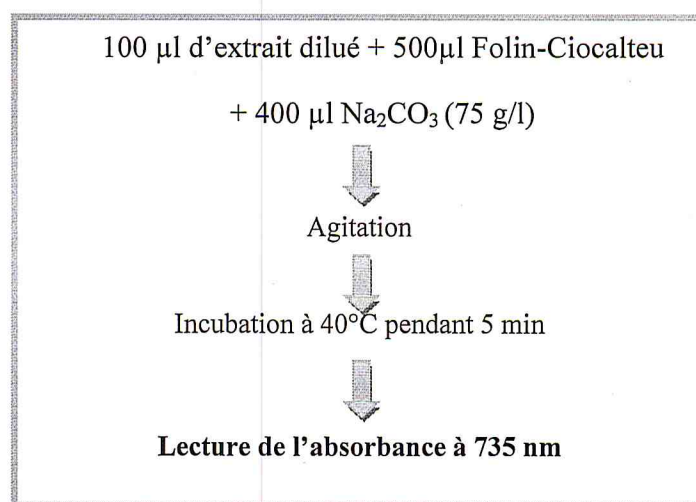


Figure 17. Procédé de dosage selon Nathalie et coll. ^[31]

➤ Dosage Folin-Ciocalteu selon Andrew et coll., ^[32]

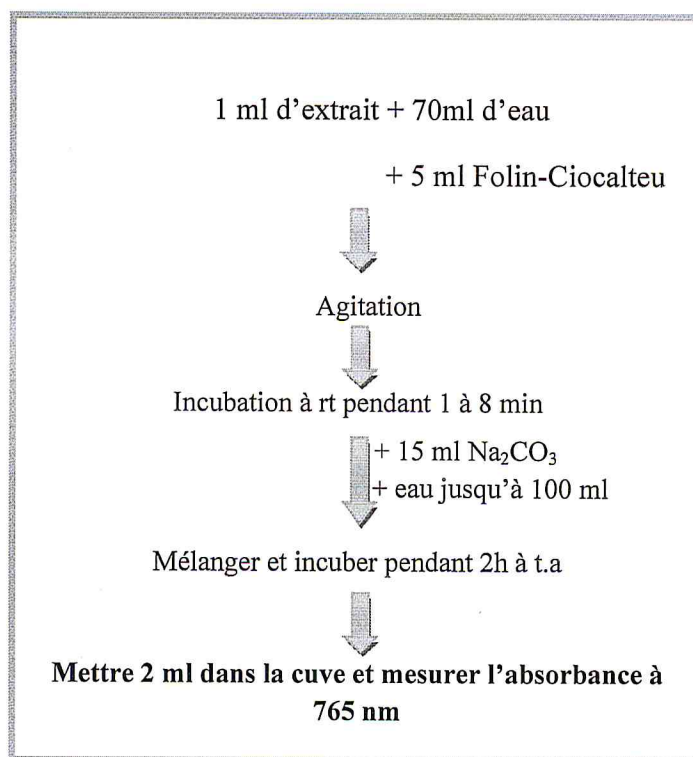


Figure 18. Procédé de dosage selon Andrew et coll. ^[32]

➤ Dosage Folin-Ciocalteu Selon Bellebcir ^[33],

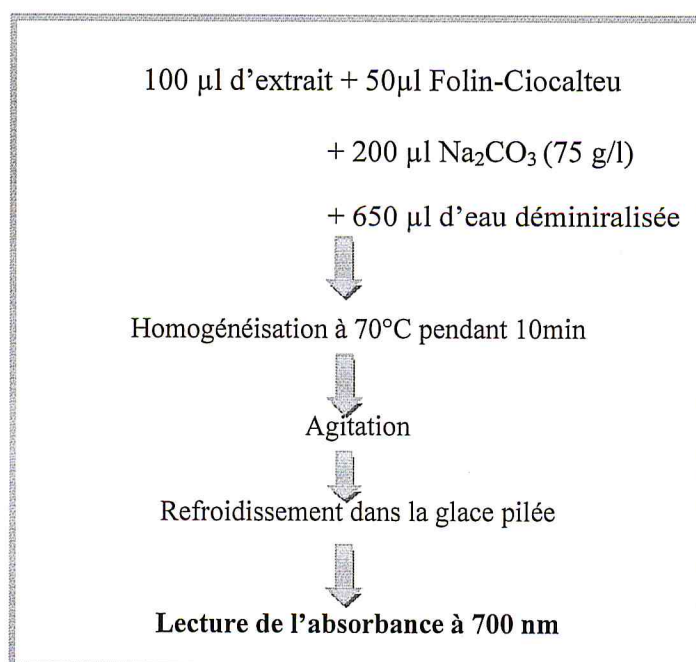


Figure 19. Procédé de dosage selon Bellebcir ^[33]

Il y a lieu de noter qu'une autre méthode dite Folin-Denis (méthode initiale pour le dosage des phénols) a été utilisée pour le dosage des composés phénoliques ^[34]. Le protocole se résume dans la figure 20 comme suit :

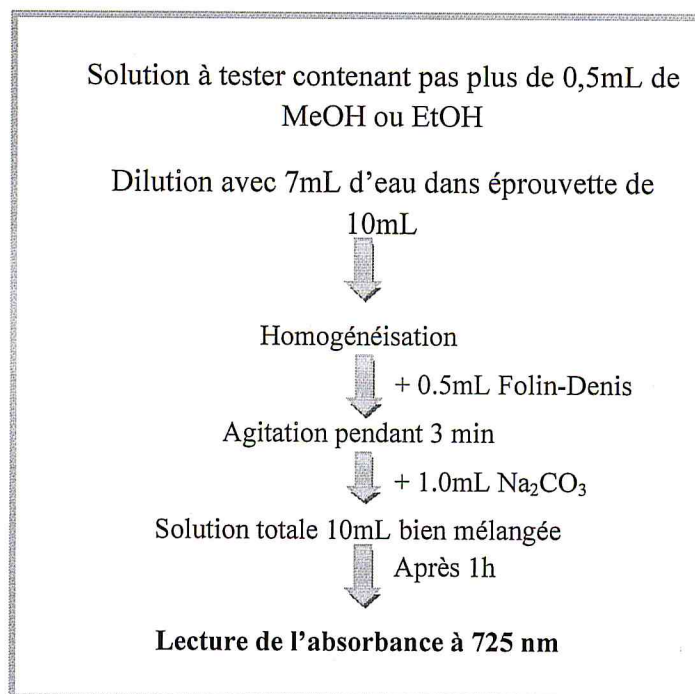


Figure 20. Procédé de dosage selon Swain et coll. ^[34]

La méthode d'évaluation du contenu en composés phénoliques utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu est utilisée dans les laboratoires et donne des résultats fiables et reproductibles, mais elle reste néanmoins une méthode analytique destructive qui bien qu'optimisée demande la mise en œuvre de plusieurs manipulations ^[30].

Le choix du polyphénol témoin choisi pour la calibration a son importance, l'acide gallique est un bon compromis mais n'est pas spécifique et ne représente pas les différents composés phénoliques présents dans la matière végétale ^[32].

I.2.2. Dosage par chromatographie

Il est évident que les composés phénoliques totaux mesurés par la procédure de Folin-Ciocalteu ne donnent pas une information précise de la quantité ou de la qualité des constituants phénoliques dans le mélange ^[35].

Les techniques de CLHP sont de nos jours largement utilisées pour identifier et quantifier les composés phénoliques notamment la chromatographie en phase inverse ^[36].

Le tableau 9, résume les différents travaux utilisant la technique CLHP.

Tableau 9. Travaux de recherche réalisés avec la technique de Chromatographie liquide à haute performance.

Fraction considérée	Analyte (Acide phénolique)	Conditions CLHP					Réf An
		Phase stationnaire	Phase mobile	Volume injecté (µl)	Débit (ml/min)	Détecteur et λ fixée (nm)	
Fraction phénolique	Phénols totaux Hydroxyrosol Tyrosol Ac caféique Ac p coumarique Ac férulique Quercétine lutéoline	RP.18e Merck	Gradient binaire (A) H ₂ O/CH ₃ COOH (B) CH ₃ OH/CH ₃ CN	10	4	-	[37] 2004
Extrait méthanoïque	Acide gallique Ac p- hydroxybenzoïque Acide gentisique Hydroxytyrosol Tyrosol Ac vanillique Ac caféique Ac p-coumarique Ac férulique Naringénine (+)-Catechine Coumarine Ac o-coumarique Ac 3-nitro-phtalique	RP Spheriso rb 5µm ODS2	(A) Eau + 1%Ac acétique glacial (B) Eau + 6%Ac acétique glacial (C) Eau/acétonitrile (65 :30) + 5% Ac acétique glacial	20	0.5	280	[35] 2006
Extrait brut	(A):Ac gallique Ac protocatéchique Catéchine Ac vanillique Epicatechine Ac caféique Ac syringic (B) :Ac chlorogénique Ac gentisique Ac caféique Ac coumarique Ac férulique (C) :Rutine Myrcétine quercétin	RP Pursuit XRS C18	(A) Eau + 0.1 % Ac formique (B) Méthanol	60	1	A 270 B 324 C 373	[31] 2011

Phase aqueuse de l'extrait	Ac gallique Ac syringique Ac coumarique Ac p-coumarique Ac m-coumarique Ac benzoïque Ac 4-hydroxybenzoïque Ac protocatéchique hydroxytyrosol	RP.C18	(A) Eau/Ac formique (19 :1) (B) Méthanol	-	-	280	[38] 2011
Extrait éthanolique et Extrait d'eau	Phénols totaux Ac rosmarinique Ac carnosique	RP.C18	(A) Eau/Ac acétique/acétonitrile (840 :8.5 :150 ml) (B) Méthanol	20	1.5	284	[32] 2012
Extrait méthanolique	Acide : gallique, chlorogénique, gentisique, vanillique, caféique, syringique, sinapique, p-coumarique, fêrulique, anisique, rosmarinique, salicylique, cinnamique.	XBP-C18	(A) Eau 0.02%TFA (B) MeOH 0.02%TFA	10	0.5	254	[39]
Fraction phénolique des feuilles de <i>Polygonum aviculare</i> L.	Acide gallique, portocatéchique, p-hydroxybenzoïque, syringique et acide fêrulique	Hypersil ODS	Isocratique MeOH-Acide phosphorique 0.001M 22:78(v/v)	20	-	520	[29]
Fraction phénolique des fleurs de <i>Sambucus nigra</i> L.	Acide fêrulique, portocatéchique, p-hydroxybenzoïque et acide vanillique	Hypersil ODS	Isocratique 25% MeOH/Eau 1% Acide acétique	20	-	520	[29]

II. Présentation de l'espèce *Spirulina platensis*

II.1. Histoire de la spiruline

La spiruline est une très ancienne forme de vie, dont l'apparition sur terre remonte à près de 3,5 milliards d'années.

La spiruline était généralement consommée dans les périodes de pénurie alimentaire. Pendant ces périodes de famine, elle est alors utilisée pour permettre aux habitants d'apporter à leur corps suffisamment de vitamines et de minéraux, et quelques protéines, malgré la rareté des aliments « habituels » ^[40].

II.2. Les étapes de la recherche

Les scientifiques et les industriels ne se sont intéressés à la spiruline que tardivement, dans les années 70. C'est d'abord par son exceptionnelle richesse en protéines que la spiruline a attiré l'attention des nutritionnistes. Contenant de 50 à 70% de son poids sec en protéines, la spiruline est la meilleure source connue en acides aminés, puisqu'elle les contient tous, acides aminés essentiels et acides aminés soufrés (méthionine et cystéine) compris.

Un peu plus tard, les chercheurs ont isolé dans la spiruline des substances nutritives d'un intérêt considérable, notamment les vitamines du groupe B, le bêta-carotène, la vitamine E, de nombreux oligo-éléments et acides gras essentiels. En ce moment ils s'intéressent à l'étude des propriétés antioxydantes de cette algue ^[40].

Sont rares les pays dans le monde où on cultive de la spiruline, une algue très riche. Les USA détiennent 50% de la production mondiale. Deux pays seulement en Europe produisent de la spiruline ; il s'agit de la France et de la Hongrie.

En Algérie, on est au stade de la production artisanale et expérimentale. Mr.Hiri Abdelkader l'unique Algérien qui connaît parfaitement le processus de production de cette espèce d'algue. Il a réussi à la faire déplacer de son environnement naturel (El Guelta) vers un bassin. Il dispose d'un bassin d'une superficie légèrement au-dessus de 20 m² dans la région de Tamanrasset et produit 20 kg de spiruline sèche par an. Quatre mois après l'ensemencement du bassin, on peut déjà récolter la spiruline.

II.3. Description de *Spirulina platensis*

Appelée Dihé ou Tecuitlat, *Spirulina platensis* est une cyanobactérie ou microalgues bleue-verte filamenteuse multicellulaire photosynthétique composé de filaments verts bleus de cellules cylindriques (1 - 12 μm de diamètre), ainsi nommée en raison de sa forme spiralée. Elle forme massive de la population dans les régions tropicales et sub-tropicales masses d'eau qui ont un niveau élevé de carbonate et de bicarbonate de pH alcalins allant jusqu'à 11 ^[41].

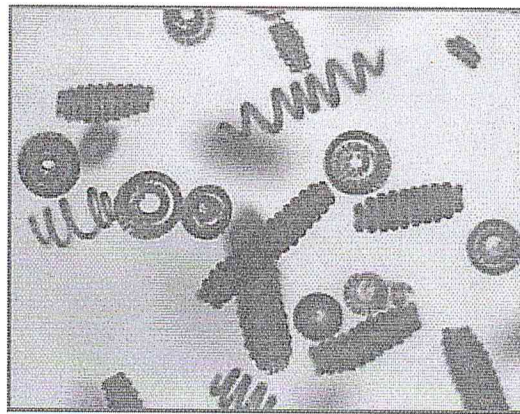


Figure 21. Spiruline vu au microscope (agrandissement x100)

II.4. Classification systématique de *Spirulina platensis*

Règne : Monera ou Bacteria

Sous-règne : Prokaryota

Division : Cyanophyta ou Cyanobacteria

Classe : Cyanophyceae

Ordre : Oscillatoriales

Famille : Oscillatoriaceae

Genre : *Arthrospira*

Espèce : *platensis*



Figure 22. *Spirulina platensis* (lac verdoyant)

II.5. Composition chimique de *Spirulina platensis*

La composition de la spiruline est très riche : elle comporte les : **Protéines, Lipides, Glucides, Acides Nucléiques, Bêta-carotène (provitamine A), Tocophérols (vitamine E), Vitamines du groupe B, Vitamine B12, Minéraux et oligo-éléments, Molécules complexes polypeptidiques et polysaccharidiques** et les **Phénols** qui sont des acides phénoliques, les plus intéressants sont : l'acide salicylique, acide synaptique, acide cinnamique et trans-cinnamique, acide chlorogénique, acide quinique, acide p-coumarique, p-hydroxy-benzoïque et l'acide caféique ^[40].

Il a été reporté, que la microalgue *Spirulina platensis* est une source prometteuse de composés phénoliques par rapport à d'autres tissus végétaux mentionnés dans la littérature ^[41].

II.6. Potentialités et utilisations de la spiruline

Dans les pays développés, et depuis peu dans quelques régions d'Afrique, la Spiruline est consommée comme complément alimentaire « bénéfique à la santé ». Elle est vendue dans le secteur des produits dits « Bio ».

Autres utilisations : Le groupe des cyanobactéries produit une variété de métabolites secondaires dans leur milieu de culture. Beaucoup de ces produits naturels ont des activités antibiotiques, algicide, antiviral, fongicide.

Elle est utilisée en synergie avec d'autres algues, comme agent cicatrisant et antiseptique. Dans l'agroalimentaire, elle est utilisée comme colorant naturel (la phycocyanine est un des rares pigments naturels de couleur bleue) dans les chewing gums, sorbets, sucreries, produits laitiers, boissons non alcoolisées. En Suisse et au Japon, il existe depuis longtemps du pain à la Spiruline ^[40].

III. Travaux antérieurs réalisés sur la microalgue bleue-verte Spiruline

✓ **Phénols à partir de *Spirulina maxima*** (Hanaa H. Abd El-Baky et coll.)

Récemment, une grande attention a été portée sur les microalgues comme sources de nouvelles structures de composés biologiquement actifs tels que la phycobiline, les phénols, les terpénoïdes, stéroïdes et les polysaccharides.

L'influence des conditions de croissance sur la composition chimique de la spiruline a été étudiée par de nombreux chercheurs dans le but d'optimiser la production de composés nutritionnellement et économiquement intéressants, tels que des pigments, les antioxydants, les vitamines et les phycocyanines.

Par conséquent, des extraits de *Spirulina* enrichis en antioxydants phénoliques peuvent fournir une source prometteuse d'antioxydant naturel. En outre, la production d'algues antioxydants peut être améliorée par une modification des conditions de culture ^[42].

✓ **Activité antioxydante de la microalgue *Spirulina maxima* (M.S. Miranda et coll.)**

La Spiruline, qui est utilisé comme additif alimentaire, est une micro-algue riche en protéines et autres éléments nutritifs essentiels. La Spiruline contient des acides phénoliques, du tocophérol et β -carotène qui sont connus pour présenter des propriétés anti-oxydantes.

La composition chimique de la spiruline indique qu'elle a une valeur nutritionnelle élevée en raison d'une grande variété de nutriments essentiels, tels que les vitamines, minéraux et protéines. De plus, elle contient d'autres composés tels que $\omega 3$ et $\omega 6$ acide gras polyinsaturé, les provitamines et les composés phénoliques. En outre, ces algues peuvent être produites à grande échelle des systèmes.

Ils ont étudié l'activité antioxydante de composés phénoliques, des caroténoïdes et des tocophérols extraits de spiruline et ont constaté que les composés phénoliques sont responsables des propriétés antioxydantes des extraits de spiruline qui sont des acides organiques (caféique, chlorogénique, quénique, salicylique, synaptique et trans-cinnamique), qui agissent individuellement ou en synergie ^[43].

✓ **Propriétés antioxydantes de *Spirulina (Arthospira) platensis* cultivée sous différentes températures (Luciane Marie Colla et coll.)**

L'objectif principal de ce travail était d'étudier les effets de la température et de la concentration d'azote sur le potentiel antioxydant des extraits de la biomasse de spiruline.

Les résultats indiquent que, les quantités de composés phénoliques pourraient être augmentées en modifiant les conditions de culture, suggèrent qu'il est possible d'augmenter le potentiel antioxydant de la biomasse de spiruline pour être utilisé comme un complément nutritionnel ^[44].

- ✓ **Activité antioxydante de l'extrait éthanoïque à partir de *Spirulina platensis* et *Nostoc linckia* mesurée par différentes méthodes** (Liliana Cepoi et coll.)

L'objectif principal de ce travail était de déterminer le pourcentage de l'activité antioxydante de plusieurs extraits éthanoïques à partir de *Spirulina platensis* et *Nostoc linckia*. Les résultats indiquent la présence des antioxydants dans les deux extraits et aussi la possibilité d'augmenter leurs activités en changeant la concentration d'éthanol ^[45].

- ✓ **Amélioration de la production des composés phénoliques (antioxydants) dans *Spirulina plantensis* sous des différents régimes d'acide indole acétique** (Munawer Khan Mohammed et coll.)

Réalisant l'importance des composés phénoliques qui sont présents dans les micro-algues particulièrement dans la spiruline, ils ont planifié des expériences simples pour améliorer la production des antioxydants naturels ^[42].

- ✓ **Amélioration de la production des composés phénoliques dans *Spirulina platensis* par deux modes de culture** (Remziye Aysun Kepekçi et coll.)

L'objectif de cette étude était d'augmenter la quantité des composés phénoliques dans *Spirulina platensis* avec deux modes de culture.

La relation entre activité antioxydante et la quantité totale des composés phénoliques était significativement corrélée au domaine de confiance de 99%, ce qui conduit à ce que les phénols ont contribué principalement l'activité antioxydante ^[46].

- ✓ **L'évaluation de l'activité antifongique des extraits de *spirulina platensis* phénoliques contre *Aspergillus flavus*** (Michele Moraes de Souza et coll.)

L'objectif de cette étude consiste à évaluer l'effet d'extrait phénolique à partir de *Spirulina platensis* sur la production de composés de structure dans *Aspergillus flavus*, afin de déterminer son effet sur l'inhibition fongique ^[47].

- ✓ **Optimisation de l'extraction par solvant accélérée d'antioxydants de microalgue *Spirulina platensis*** (Miguel Herrero et coll.)

Un dispositif expérimental a été utilisé pour optimiser l'extraction d'antioxydants de la microalgue spiruline platensis utilisant extraction par solvant accélérée (ESA) avec quatre différents solvants (hexane, l'éther de pétrole, l'éthanol et de l'eau). L'optimisation des

principales variables impliquées dans le processus ESA (température d'extraction et le temps d'extraction) a été effectuée ^[48].

✓ **Production des composés phénoliques à partir de la microalgue *Spirulina maxima* et ses effets protecteurs** (Hanaa H Abd El-Baky et coll.)

L'apparition de composés phénoliques dans les algues bleu-vert est moins documentée que chez les plantes supérieures, récemment beaucoup d'attention a été concentrée sur les microalgues comme sources de nouveaux composés biologiquement actifs.

Le but de cette étude était d'illustrer l'amélioration du processus de synthèse des composés phénoliques dans *Spirulina maxima* qui grandit dans un milieu complété avec différentes concentrations de nitrate de sodium NaNO_3 et / ou en combinaison avec la phénylalanine.

Le profil CLHP-DAD des extraits phénoliques de la spiruline a révélé la présence d'un grand nombre d'acides phénoliques et des flavonoïdes, à des niveaux variables. L'acide gallique, chlorogénique, cinnamique, p-hydroxy-benzoïque et le pinostrobin ont été trouvés comme les constituants les plus abondants dans les différents extraits ^[49].

Comme l'illustre le tableau 10, ci-dessous, les travaux de recherche, réalisés sur la microalgue bleue-verte Spiruline aussi bien pour l'espèce *Spirulina platensis* que pour *Spirulina maxima*, avaient pour objectif principal le test des propriétés antioxydantes de l'espèce, en utilisant l'extraction par solvant et l'analyse de la teneur des composés phénoliques par la méthode de Folin-Ciocalteu.

Tableau 10. Travaux de recherche réalisés sur la microalgue bleue-verte Spiruline

Espèce	Analyte (Acides phénolique)	Procédé d'extraction	Méthode d'analyse	Intérêt	Réf Année
<i>Spirulina platensis</i>	Ac cinnamique Ac p-coumarique Phycocyanine Caroténoïdes Protéines Chlorophylle	Extraction par MeOH	Folin – Ciocalteu	Test de deux modes de culture	[46] 2012
<i>Spirulina platensis</i>	Composés phénoliques	Extraction par MeOH, rinçage hexane	Folin - Ciocalteu	Test d'activité antifongique	[47] 2011
<i>Spirulina platensis</i>	Composés phénoliques	Extraction par MeOH 80% et reextraction par EtOH 80%	Folin - Ciocalteu	Test de culture sous différents régimes d'acide indole acétique	[41] 2011
<i>Spirulina platensis</i>	Composés phénoliques	Extraction 1g dans EtOH/eau	Folin - Ciocalteu	Test d'activité antioxydante	[45] 2009
<i>Spirulina maxima</i>	L'acide gallique, chlorogénique, cinnamique, p-hydroxy-benzoïque pinostrobin	Extraction par l'éthanol	Folin- Ciocalteu CLHP-DAD	Synthèse et test d'activité antioxydante	[49] 2009
<i>Spirulina maxima</i>	Acide gallique, chlorogénique, cinnamique, pinostrobin et p-hydroxy-benzoate	Extraction par l'éthanol	Folin- Ciocalteu CLHP	Culture et test d'activité antioxydante	[42] 2009
<i>Spirulina platensis</i>	Composés phénoliques Protéines Lipides	Extraction par MeOH et purification par l'hexane	Folin - Ciocalteu	Test de propriétés antioxydantes	[44] 2007
<i>Spirulina platensis</i>	Composés phénoliques	Extraction par solvant accélérée	-	test d'activité antioxydante	[48]

<i>Spirulina platensis</i>	Carotène Chlorophylle a Quelques composés phénoliques	Extraction par fluide supercritique	CL-SM	caractérisation	[37] 2005
<i>Spirulina maxima</i>	Ac salicylique Ac trans cinnamique Ac synaptique Ac chlorogénique Ac quinique Ac caféique α - Tocophérol β - Carotène	Extraction par solvant : (par l'éther d'éthyle après extraction du résidu par MeOH)	Folin-Denis selon [34]	Test des propriétés antioxydantes	[43] 1998

Chapitre III

Partie Expérimentale :

Détermination des
acides phénoliques
dans la microalgue
bleue-verte

Spirulina platensis par
spectrométrie IRTF

I. Partie expérimentale

Les microorganismes, petits eucaryotes (champignon, algue...) et procaryotes, en particulier les cyanobactéries, produisent un très grand nombre de métabolites secondaires, récemment, beaucoup d'attention a été concentrée sur les micro-algues comme sources de nouveaux composés biologiquement actifs tels que les phénols. Cependant, l'étude de composés phénoliques dans les algues bleu-vert est moins documentée que chez les plantes supérieures ^[49].

Plus récemment, l'algue bleue-verte Spiruline, a été étudiée en raison de ses propriétés thérapeutiques comme étant une source prometteuse de nouvelles structures de composés biologiquement actifs ^[43], notamment les phénols par rapport à d'autres tissus végétaux mentionnés dans la littérature ^[47].

La détermination de ces composés a été faite souvent par spectrométrie UV-Visible en employant la méthode Folin-Ciocalteu qui reste néanmoins une méthode analytique destructive et partiellement quantitative ^[31-35]. Les techniques de CLHP sont de nos jours largement utilisées pour identifier et quantifier les composés phénoliques.

A cet effet, l'objectif principal de ce travail est le développement d'une nouvelle méthode analytique pour la détermination des acides phénoliques dans des comprimés à base d'algue bleue-verte *Spirulina platensis* ou dans l'algue même produite dans la région de Tamanrasset, par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).

Dans ce travail, l'extrait riche en composés phénoliques a été obtenu par la macération du matériel végétal dans un mélange de solvant méthanol/eau, l'acide salicylique a été choisi comme standard représentant cette classe de ces produits et l'aire balayant la zone des pics entre 1800-1460cm⁻¹ a été considérée.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de chimie des substances naturelles du département de chimie et au laboratoire des plantes médicinales et aromatiques du département d'agronomie, Université de Blida.

I.1. Appareillage

I.1.1. Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Un spectrophotomètre à transformée de Fourier IRTF de marque Bruker type TENSOR-27, équipé d'un détecteur sulfate triglicine deutéré DTGS à température ambiante, d'une source infrarouge moyen ($4000-400\text{ cm}^{-1}$), d'un rayonnement de laser et un diviseur de faisceau KBr a été utilisé. L'acquisition des spectres a été effectuée avec une résolution de 4 cm^{-1} et un nombre de scan égal à 20 spectres. Le traitement des spectres est réalisé avec le logiciel OPUS 6.5 sous le système d'exploitation Microsoft Windows XP.

I.1.1.a. Analyse par spectrométrie infrarouge en phase liquide

Les fenêtres utilisées pour l'analyse de la phase liquide sont en fluorure de baryum (BaF_2) avec une entretoise en téflon de 0.1 mm d'épaisseur. Les tubes de connections sont en téflon avec un diamètre intérieur de 0.8mm et le chargement est réalisé en employant des tubes de chlorure de polyvinyle de diamètre intérieur de 2.79mm.

L'introduction des solutions se fait avec un système à écoulement bloqué avec une cellule de flux, l'avantage d'une telle cellule est d'éviter les inconvénients relatifs au nettoyage et au remplissage des cellules conventionnelles et de minimiser la consommation des solvants organiques est de réduire le temps d'analyse (15-60s).

Le système d'écoulement est effectué en utilisant une pompe péristaltique, le flux est stoppé momentanément une fois la cellule est remplie. On obtient le spectre et on rétablit le flux pour rincer la cellule avec le solvant et la remplir à nouveau avec une autre solution (figure 23).

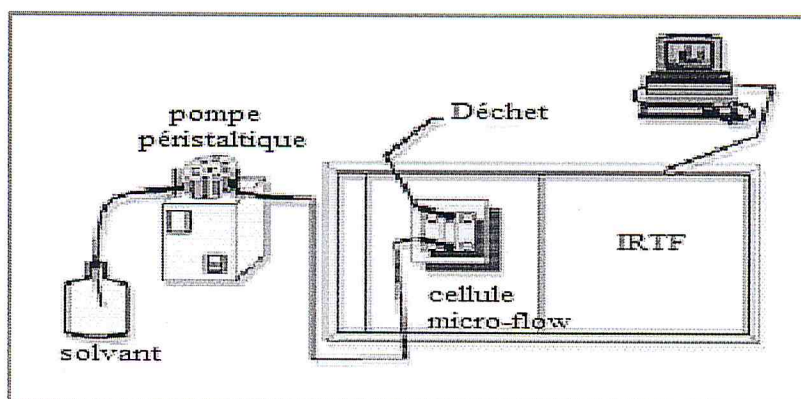


Figure 23. Montage de flux utilisé pour la détermination de l'acide salicylique par IRTF

I.1.1.b. Analyse par spectrométrie infrarouge en phase solide

La technique de la pastille en bromure de potassium (KBr) est probablement la plus couramment utilisée pour la préparation d'échantillons solides pour des analyses infrarouge.

Dans un premier temps, l'échantillon solide est broyé en fine particules à l'aide d'un mortier lisse (en agate), puis mélangé uniformément avec la poudre KBr.

Finalement, l'échantillon est placé dans le moule à pastille et pressé par une presse hydraulique à 7bar pour obtenir une pastille.

L'analyse par spectrométrie infrarouge en phase solide est réalisée en utilisant un support simple de 13 mm pour y placer les pastilles de KBr (figure 24).

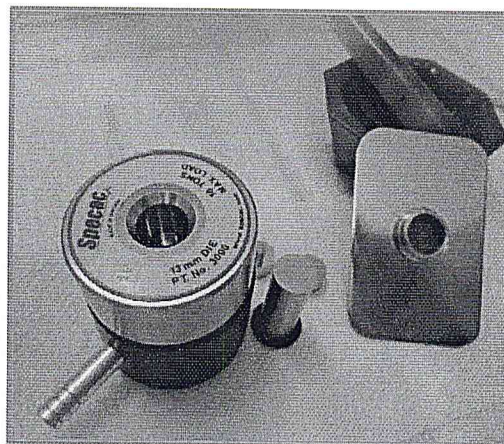


Figure 24. Montage IRTF pour les préparations des échantillons en phase solide

Pour traiter les spectres obtenus des différentes manipulations, on a utilisé un autre logiciel qui calcul les absorbances et les absorbances nettes des différentes bandes de chaque spectre, exprimées en terme de hauteur du pic (Net Absorbance) ou aire du pic (Integrate), en utilisant une macro commande à partir de l'option « ApPro » développée par le logiciel Winfirst.

I.2. Réactif

Tous les réactifs utilisés lors de ce travail, le chloroforme stabilisé avec l'éthanol, le méthanol et l'éthanol sont de grade analytique.

I.3. Identification de l'acide salicylique par chromatographie sur couches minces (CCM)

L'objectif de cette manipulation est de vérifier la présence de l'acide salicylique et de ces analogues dans les extraits obtenus à partir des comprimés d'algue et de l'algue brut *Spirulina platensis*.

La plaque CCM utilisée est une feuille en plastique recouverte avec du gel de silice Si. L'élution est réalisée avec du méthanol. La révélation est effectuée par les vapeurs de diiode.

I.4. Méthode de calibration externe

Pour trouver la concentration d'un analyte dans un échantillon donné, une série d'étalons dans les mêmes conditions expérimentales que l'échantillon réel est préparé. Ces solutions sont constituées d'un analyte de concentrations croissantes. La série d'étalonnage est soumise à l'analyse. Ainsi, la droite de calibration est établie (absorbance en fonction de la concentration). L'absorbance de l'inconnu, est alors inséré dans la droite et la concentration de l'échantillon est calculée.

II. Procédures générale

L'organigramme de la figure 25 résume les différentes étapes du protocole d'extraction utilisé pour obtenir la fraction riche en composés phénoliques à partir du matériel végétal.

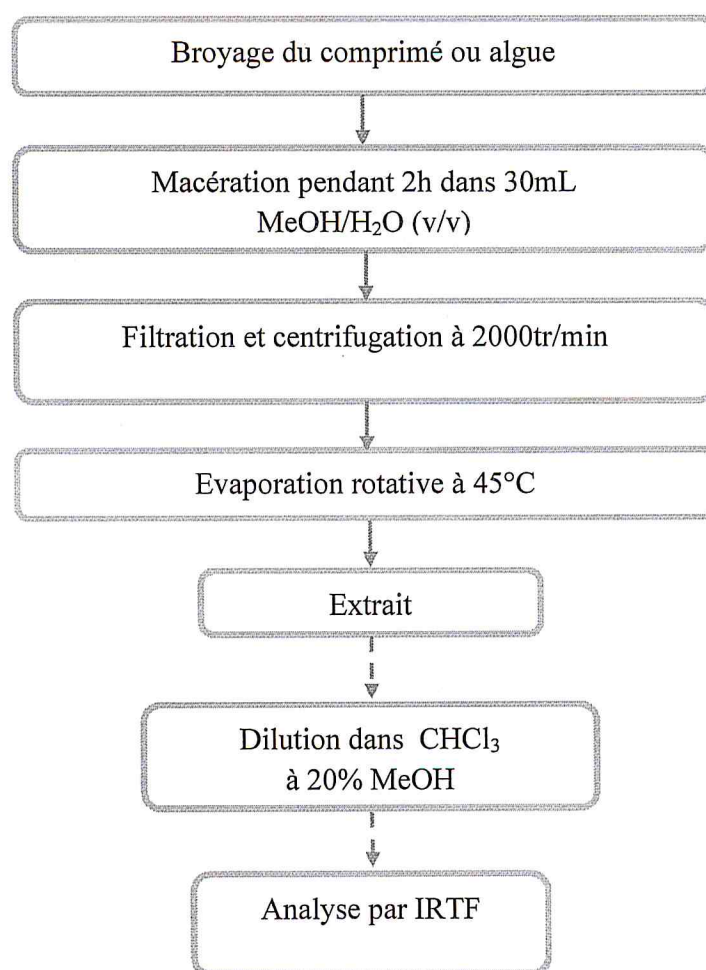


Figure 25. Protocole d'extraction de la fraction riche en composés phénoliques à partir du matériel végétal

L'extrait a été récupéré avec 1mL de CHCl₃/MeOH (80/20) (v/v) qui est le solvant adéquat pour l'analyse par spectrométrie IRTF (vu le caractère polaire de l'extrait obtenu, effectivement, on remarquait durant la réalisation des manipulations que le chloroforme seul ne récupérait pas la totalité de l'extrait collé sur les parois du ballon).

L'algue utilisée dans ce travail est sous deux (02) formes illustrées sur la figure 26:

Une sous forme de granulés secs (brut) récoltée en Mars 2013 au niveau d'une ferme à Tamanrasset au sud d'Algérie.

L'autre est sous forme de comprimés à base de l'algue « *Spirulina platensis* » apportée d'une pharmacie en France (prise comme complément alimentaire).

Les comprimés et l'algue ne subissent aucun tri ou lavage ou séchage, ils sont employés directement tels qu'ils sont après broyage.

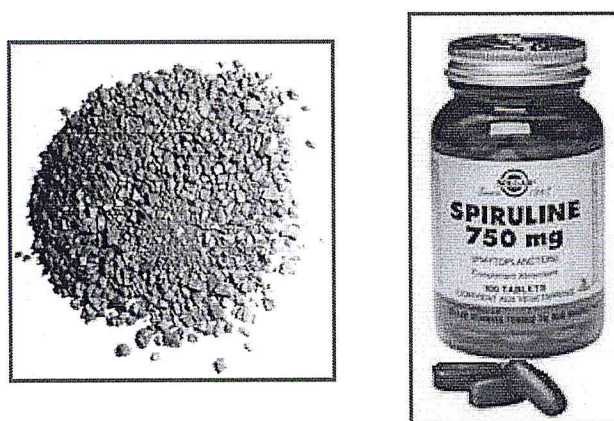


Figure 26. Algue bleu-verte *Spirulina platensis* brut et sous forme de comprimés.

II. 1. Caractéristiques de l'extrait des comprimés de l'algue *Spirulina platensis*

Les propriétés organoleptiques constituent généralement une partie d'étude visant à analyser les facteurs qui affectent la qualité de l'extrait. Notre analyse a été faite en observant et en inhalant directement les extraits. Dans cette étude, l'aspect, la couleur et l'odeur sont considérés pour évaluer la qualité organoleptique.

Les propriétés organoleptiques des extraits sont regroupées dans le tableau 11.

Tableau 11. Caractères organoleptiques des extraits des comprimés et de l'algue brut

Caractères organoleptiques			
	Aspect	Couleur	Odeur
Extrait brut des comprimés de l'algue <i>Spirulina platensis</i>	Pâteux	Marron	Forte odeur caractéristique
Extrait brut de l'algue <i>Spirulina platensis</i> brut	Pâteux	Verte	Caractéristique
Extrait traité des comprimés de l'algue <i>Spirulina platensis</i>	Pâteux	Verte	Forte odeur caractéristique

II.2. Identification de l'acide salicylique par chromatographie sur couche mince (CCM)

L'analyse de la plaque CCM (figure 27) montre l'apparition des taches pour les extraits bruts et traité de *Spirulina platensis* à la même hauteur de la tache de l'acide salicylique.

Les rapports frontaux sont respectivement :

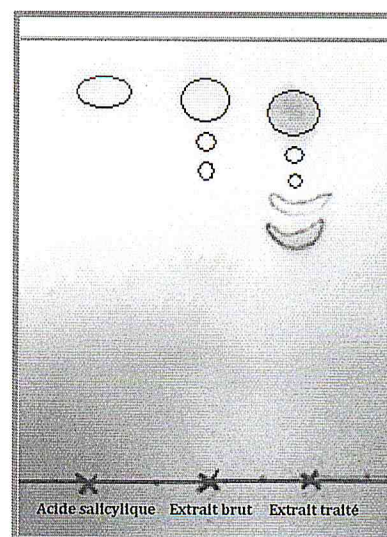
$$R_f \text{ Extrait brut} = 0,77 ;$$

$$R_f \text{ Extrait traité} = 0,75 ;$$

$$R_f \text{ Acide salicylique} = 0,79.$$

En analysant la plaque CCM et particulièrement l'élution de l'extrait traité on peut supposer que l'acide salicylique n'est pas le seul acide phénolique présent dans le comprimé de l'algue et que d'autres produits de la classe peuvent être présents.

Figure 27. Identification de l'acide salicylique par CCM



III. Résultats et discussion

III.1. Choix de l'étalon pour le dosage des acides phénoliques par spectrométrie IRTF

Dans ce travail, nous nous intéressons au dosage d'une classe de phénols à savoir les acides phénoliques, qui sont caractérisés par une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. L'acide salicylique a été choisi comme standard représentant cette classe de produits du fait de sa disponibilité en quantité au niveau du laboratoire.

Cependant, il y a lieu de noter, que la perspective de ce travail est de vérifier la possibilité d'utiliser un seul étalon, qui est l'acide salicylique dans ce cas, qui pourra représenter l'ensemble des produits des acides phénoliques ou, à la limite utiliser un étalon pour une détermination spécifique qui pourra concerner la sous classe des acides hydroxycinnamiques ou des acides hydroxybenzoïques.

Afin d'éclaircir cette question, les spectres infrarouge en phase solide d'autres étalons comme l'acide caféique, férulique, gallique et syringique, ont été obtenus dans les mêmes conditions expérimentales.

Il a été vérifié, en analysant les spectres infrarouge (figures 28-29) d'une série de standards appartenant à la classe des acides phénoliques (acide gallique, acide gallique monohydraté, acide syringique, acide férulique et acide caféique) que l'acide salicylique choisi comme témoin (à cause de sa disponibilité) n'est pas spécifique et ne représente pas les différents composés présents dans la fraction phénolique, de ce fait les teneurs d'acides phénoliques déterminées sont exprimées sous forme d'équivalent d'acide salicylique dans l'extrait.

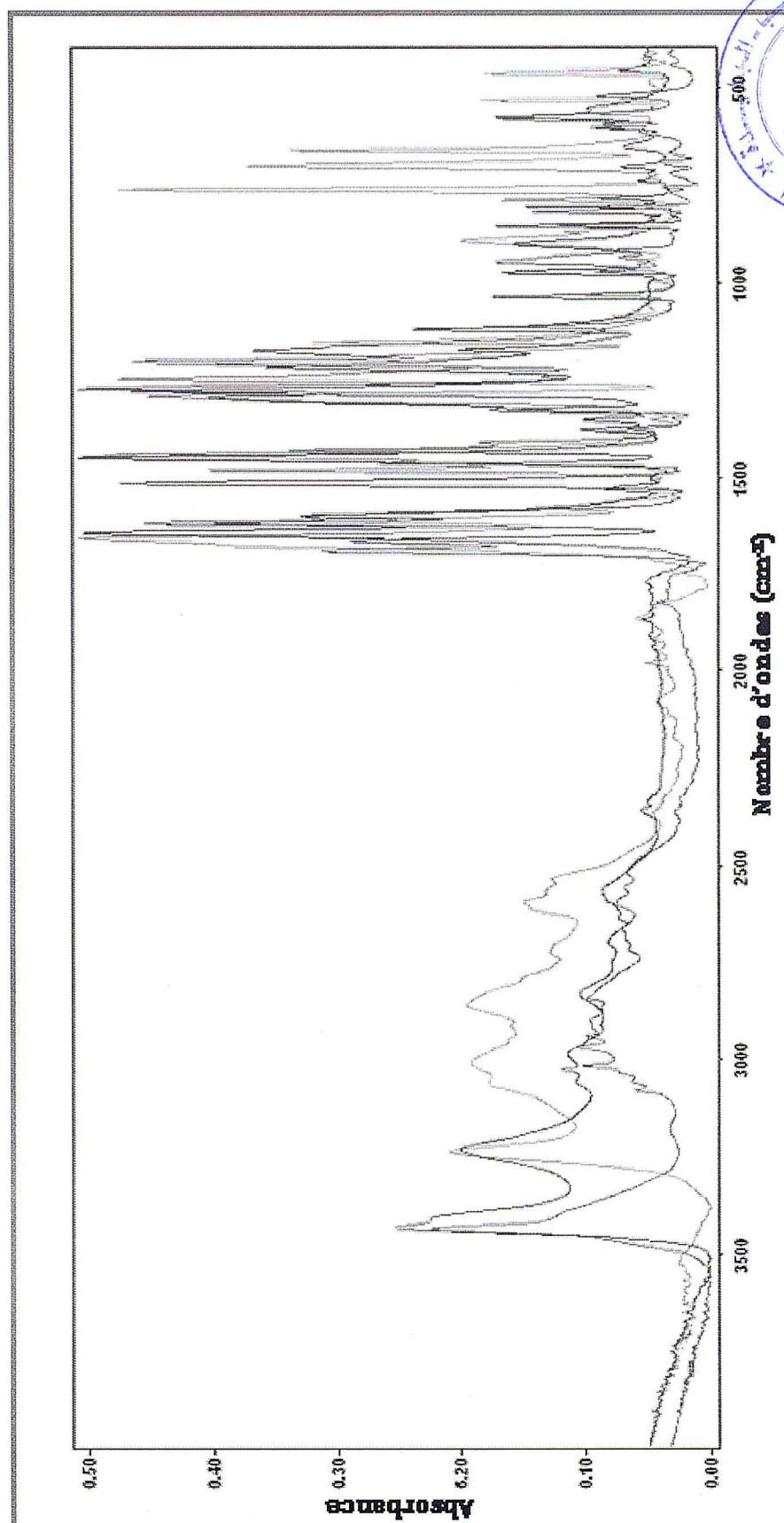


Figure 28. Spectres IRTF en phase solide comparatifs de l'acide salicylique (vert) et les dérivés cinnamiques : acide caféique (rose) et acide férulique (bleu) préparés à 1.5%.

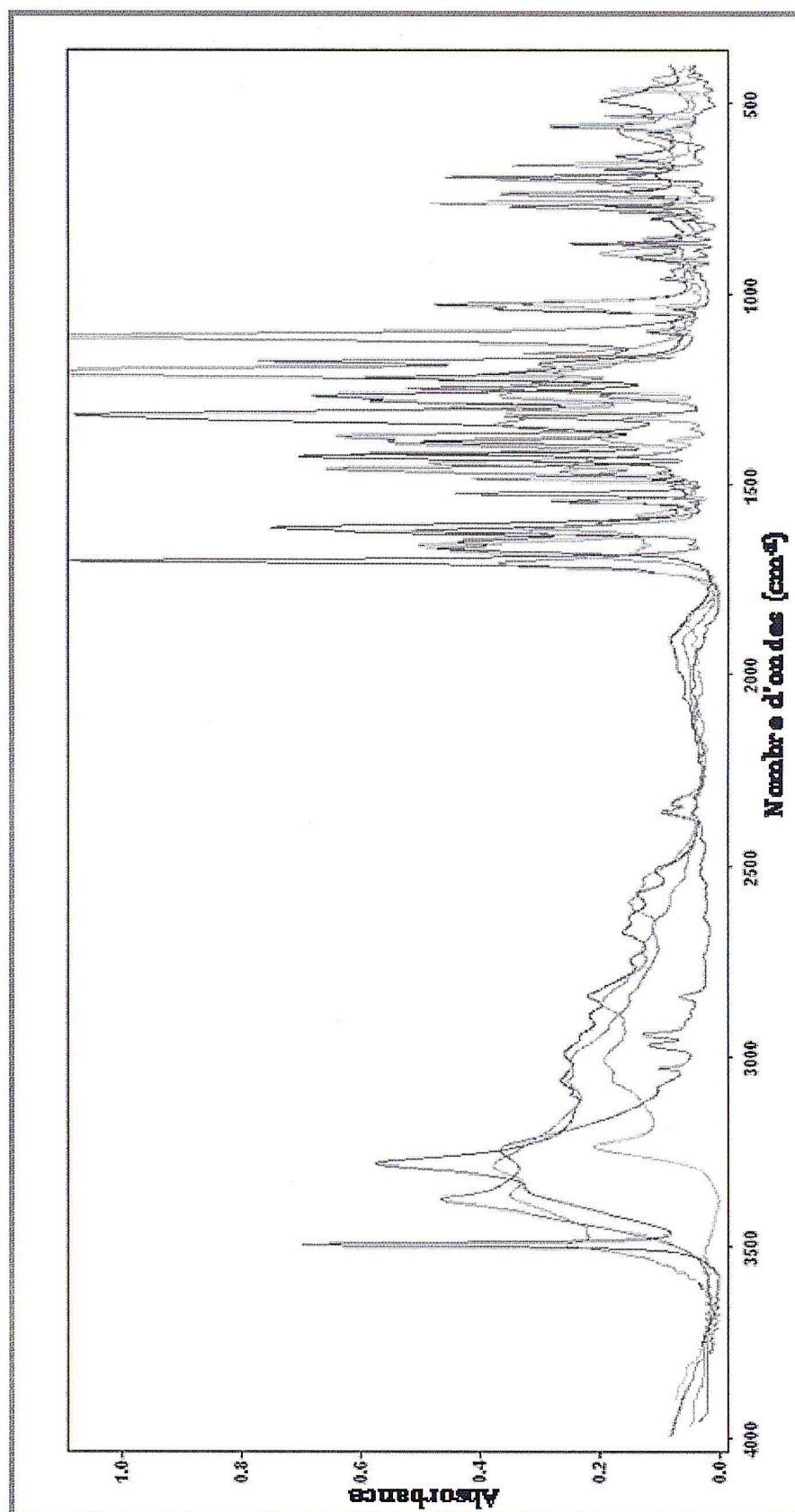


Figure 29. Spectres IRTF en phase solide comparatifs de l'acide salicylique (vert) et les dérivés benzoïques : acide gallique monohydraté (rose), acide syringique (bleu) et acide gallique (orange) préparés à 1.5%

III.2. Spectre IRTF de l'acide salicylique

La gamme spectrale étudiée s'étale de 2000 à 800 cm^{-1} , car en dessous de 800 cm^{-1} les fenêtres de la cellule utilisée sont opaques et au dessus de 2000 cm^{-1} l'allure des pics n'est pas exploitable (figure 30).

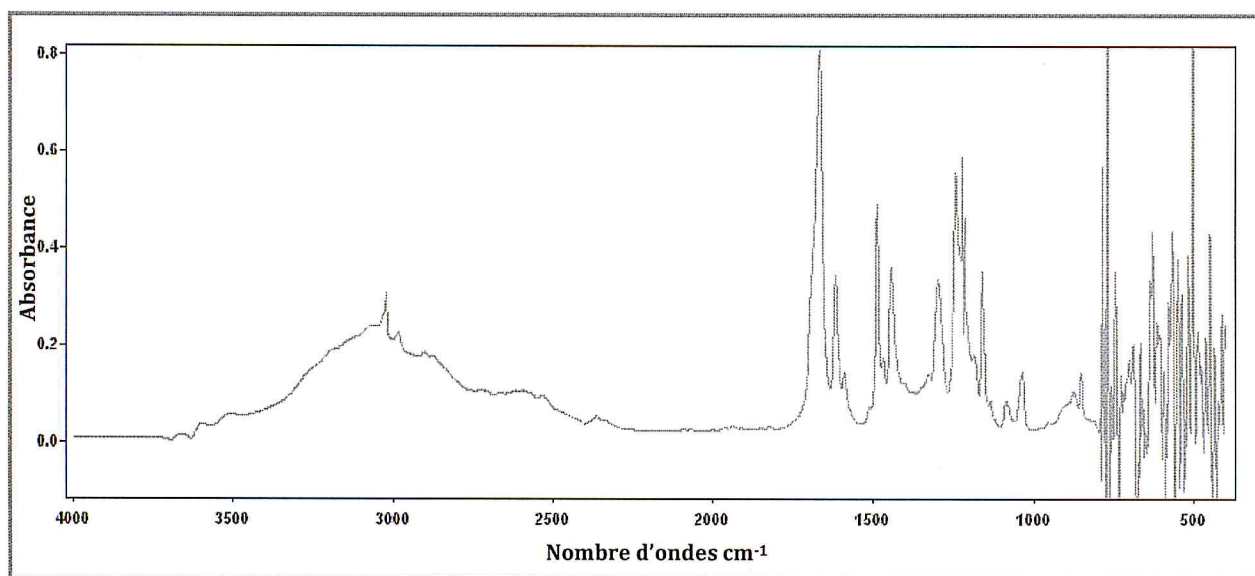


Figure 30. Spectre IRTF de l'acide salicylique dans la gamme spectrale de 4000-400 cm^{-1}

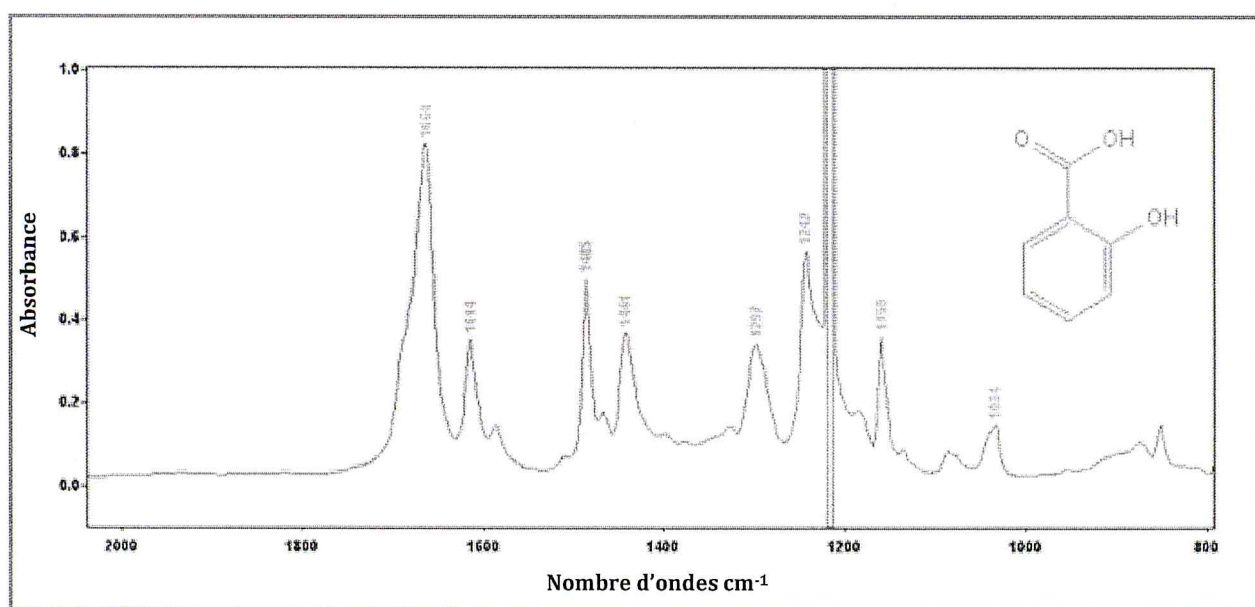


Figure 31. Spectre IRTF de l'acide salicylique 20 mg.mL^{-1} préparé directement dans CHCl_3

Conditions expérimentales : Chemin optique 0.1 mm, Résolution nominale 4 cm^{-1} , Nombre de balayage 20 scans, Background de la cellule remplie de CHCl_3 .

Le spectre de la figure 31, montre des bandes à 1664 cm^{-1} , 1614 cm^{-1} et 1485 cm^{-1} représentant l'élongation du groupement C=C aromatique, et présente également une bande à 1159 cm^{-1} caractéristique de l'élongation de la liaison C-O d'un phénol et deux bandes à 1297 cm^{-1} et 1242 cm^{-1} qui correspondent à l'élongation de la liaison C-O d'un acide, 1441 cm^{-1} présente la liaison C-H d'élongation et 1034 cm^{-1} caractérise l'élongation de la liaison C-O.

III.3. Spectres IRTF des comprimés et de l'algue Spiruline préparés directement dans le chloroforme

L'objectif principal de cette manipulation préliminaire est de vérifier l'analyse directe des acides phénoliques du comprimé ou de l'algue ayant les mêmes propriétés physico-chimiques que l'acide salicylique. Du fait de la solubilité de l'acide salicylique dans le chloroforme, nous avons procédé à la préparation directe des comprimés et de l'algue Spiruline dans ce solvant adéquat pour l'analyse infrarouge.

Le processus de la préparation des échantillons est résumé dans la figure 32

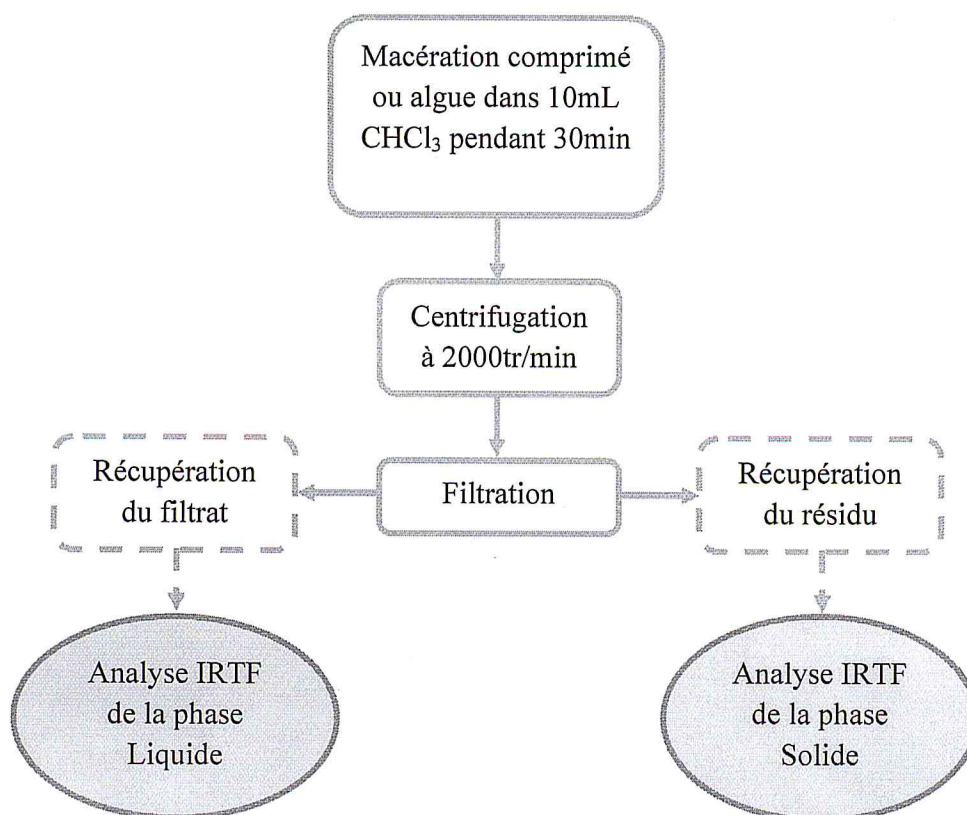


Figure 32. Protocole de la préparation directe des comprimés et de l'algue dans le chloroforme

Les figures 33 et 34 présentent les spectres d'un comprimé et de l'algue Spiruline préparés directement dans le chloroforme en phase liquide et leur résidu après filtration sur papier en phase solide.

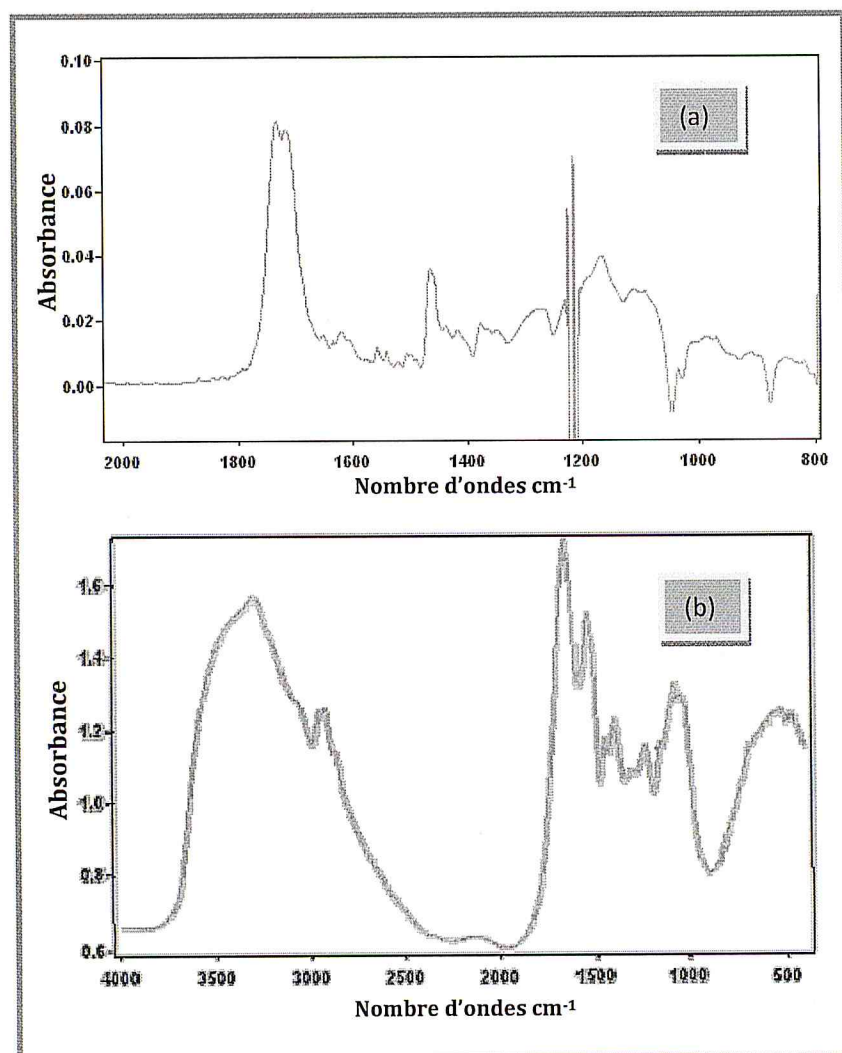


Figure 33. Spectre IRTF d'absorbance du comprimé dans CHCl₃ en phase liquide (a), et du résidu du comprimé en phase solide (b)

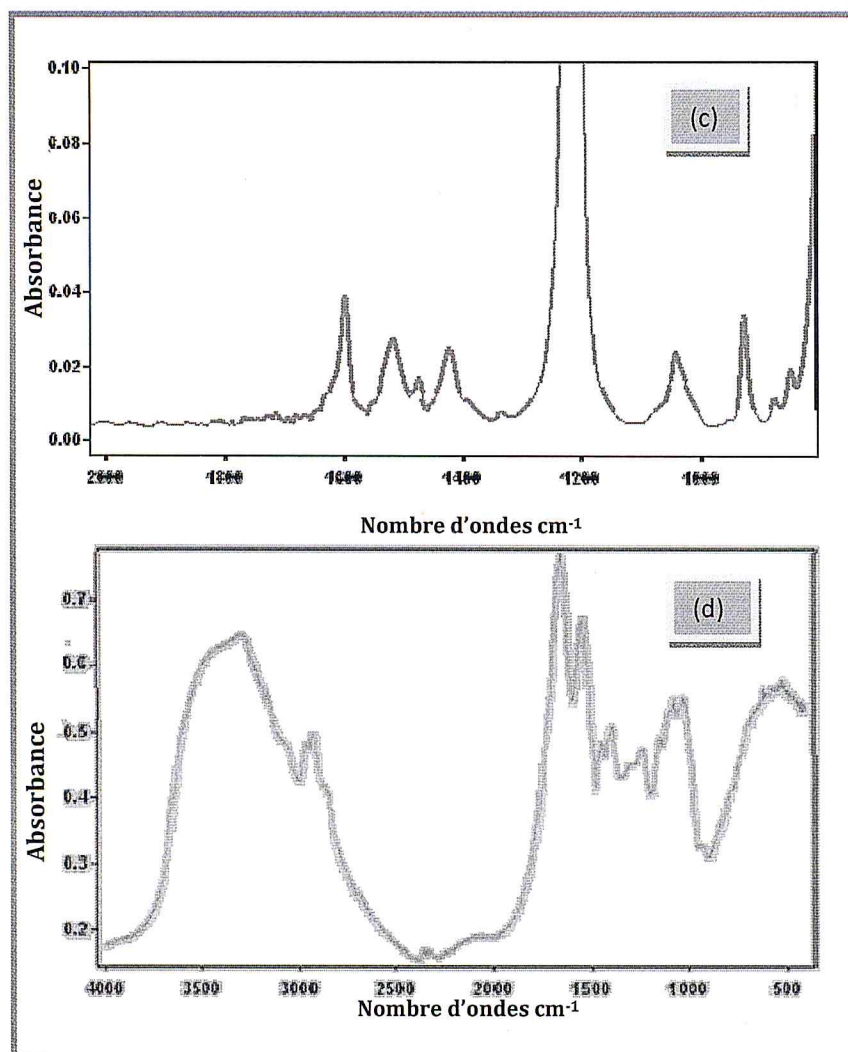


Figure 34. Spectre IRTF d'absorbance de l'algue dans CHCl_3 en phase liquide (c), et du résidu de l'algue en phase solide (d)

L'analyse des spectres infrarouges du comprimé ou de l'algue en phase liquide (figure 33(a) et figure 34(c)) indique que le chloroforme ne solubilise pas les composés phénoliques de la matrice.

Par contre la comparaison des deux spectres des phases solides figure 33(b) et figure 34(d) confirme d'un côté que le comprimé préparé à partir de l'algue bleu-verte *Spirulina platensis* et l'algue brut bleu-verte *Spirulina platensis* ont exactement la même composition chimique et de l'autre côté l'analyse directe par spectrométrie IRTF en phase liquide ou solide semble impossible et un traitement préalable des échantillons réels s'impose.

III.4. Caractéristiques analytiques de l'acide salicylique préparé directement dans le chloroforme CHCl_3

La figure 35 illustre les spectres d'absorbance d'une série de solutions d'acide salicylique préparée directement dans CHCl_3 , et ce, dans un domaine de concentration allant de 2.5 jusqu'à 20 mg.mL^{-1} dans le domaine spectral compris entre 2000 et 800 cm^{-1} .

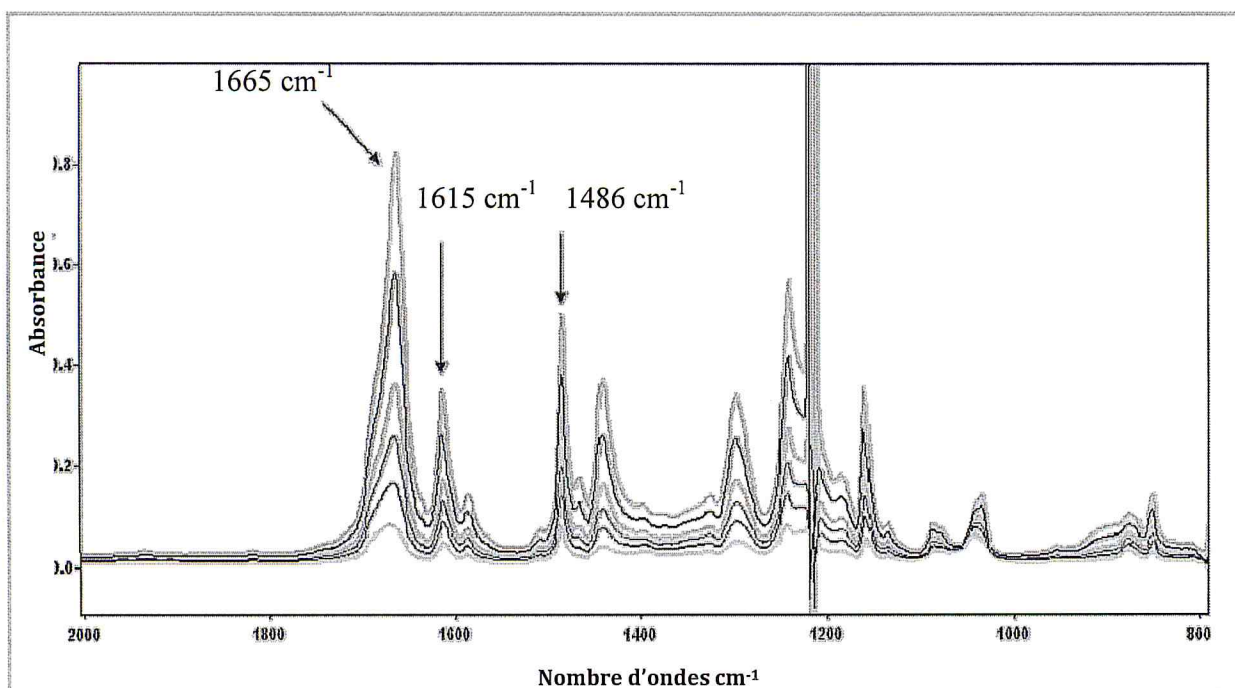


Figure 35. Spectres d'absorbance de l'acide salicylique préparé directement dans CHCl_3

Les caractéristiques analytiques de la série des solutions de l'acide salicylique préparées directement dans CHCl_3 , sont résumées dans le tableau 12.

Tableau 12. Caractéristiques analytiques de l'acide salicylique préparé directement dans CHCl_3

Paramètres analytiques	Max (Ligne de base)		
	1665 cm^{-1} (1839-1537) cm^{-1}	1615 cm^{-1} (1839-1537) cm^{-1}	1486 cm^{-1} (1537-1105) cm^{-1}
Droite de calibration	$y = 0,0394C - 0,0243$	$y = 0,0119C - 0,0013$	$y = 0,0227C + 0,0068$
Coefficient de corrélation (R)	0.9984	0.9999	0.9996
LD ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	30	10	40
D.S.R % (n=10)	0.62	0.37	0.49
Domaine de concentration ($\text{mg}.\text{mL}^{-1}$)	2.5 – 20		

C : Concentration en $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$, D.S.R(%) : Déviation Standard Relative (pour $C=10\text{mg}.\text{mL}^{-1}$), LD : Limite de détection en $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ obtenue pour un niveau de confiance de 99.6% ($k=3$).

Conditions expérimentales : Chemin optique 0.1 mm, Résolution nominale 4 cm^{-1} , Nombre de balayage 20 scans, Background de la cellule remplie de CHCl_3 .

Les résultats montrent une bonne linéarité aux bandes d'absorbance considérées et des limites de détections acceptables avec une bonne précision de l'ordre de 0.5%.

III.5. Caractéristiques analytiques de l'acide salicylique obtenu après extraction et dilution dans CHCl_3

Les spectres infrarouges de l'acide salicylique après traitement et dilution dans CHCl_3 à des concentrations allant de 2.5 à 20mg.mL⁻¹ dans le domaine spectral compris entre 2000 et 800 cm⁻¹ sont représentés dans la figure 36.

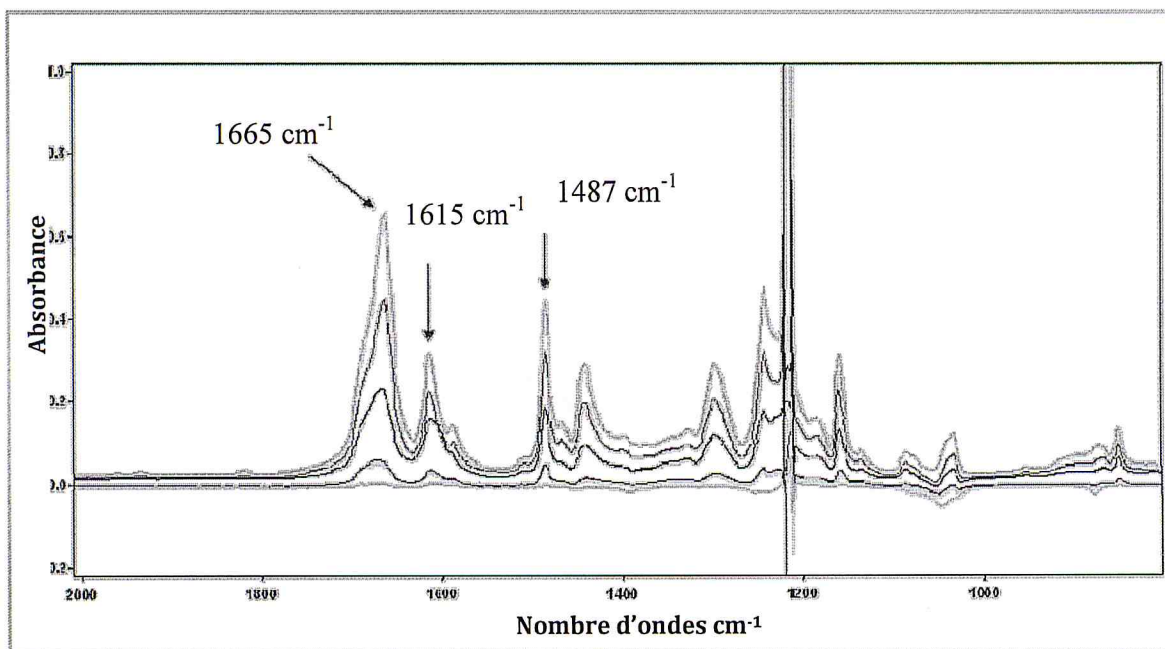


Figure 36. Spectres d'absorbance de la série d'étalonnage d'acide salicylique traitée et diluée dans CHCl_3

Les caractéristiques analytiques de la série des solutions de l'acide salicylique obtenues après traitement sont établies et résumées dans le tableau 13.

Tableau 13. Caractéristiques analytiques de l'acide salicylique préparé après traitement dans CHCl_3

Paramètres analytiques	Max (Ligne de base)		
	1665 cm^{-1} (1839-1537) cm^{-1}	1615 cm^{-1} (1839-1537) cm^{-1}	1487 cm^{-1} (1537-1105) cm^{-1}
Droite de calibration	$y = 0,0314C - 0,0267$	$y = 0,0143C - 0,0113$	$y = 0,0207C - 0,0153$
Coefficient de corrélation (R)	0.9957	0.9971	0.9978
LD ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)	15	10	02
D.S.R % (n=10)	0.75	0.87	0.55
Domaine de concentration ($\text{mg}.\text{ml}^{-1}$)	2.5 – 20		

C : Concentration en $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$, D.S.R(%) : Déviation Standard Relative (pour $C=10\text{mg}.\text{mL}^{-1}$), LD : Limite de détection en $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ obtenue pour un niveau de confiance de 99.6% ($k=3$).

Conditions expérimentales : Chemin optique 0.1 mm, Résolution nominale 4 cm^{-1} , Nombre de balayage 20 scans, Background de la cellule remplie de CHCl_3 .

Les résultats montrent une bonne linéarité aux bandes d'absorbance considérées et des limites de détections acceptables avec une bonne précision de l'ordre de 0.7%.

Le pourcentage de récupération de l'acide salicylique calculé à partir des rapports des pentes des droites de calibrations obtenues pour des étalons d'acide salicylique après traitement et des étalons préparés directement dans le chloroforme, est montré dans le tableau 14 et ce, en considérant les bandes d'absorbance sélectionnées.

Un rendement de récupération variant entre 80% et 120% confirme que le protocole proposé pourra permettre le dosage spécifique des acides phénoliques de l'algue bleue-verte *Spirulina platensis* dans l'extrait. Le tableau 14 résume la récupération obtenue.

Tableau 14. Pourcentage de récupération

Max (Ligne de base) cm^{-1}	Pourcentage de récupération (%)
1665 cm^{-1} (1839-1537) cm^{-1}	80
1615 cm^{-1} (1839-1537) cm^{-1}	120
1487 cm^{-1} (1537-1105) cm^{-1}	91

III.6. Détermination du taux d'équivalent d'acide salicylique dans l'extrait réel

III.6.1. Solvant de récupération

Lors de la réalisation de l'extraction sur les échantillons réels en suivant le protocole décrit dans la section II, nous avons remarqué que la dilution de l'extrait obtenu après évaporation (voir figure 25) avec 1mL ou même plus, de chloroforme ne permettait pas la récupération de la totalité de l'extrait et que ce dernier resterait coller sur les parois du ballon. Ceci, est illustré par l'allure des spectres montrés sur la figure 37.

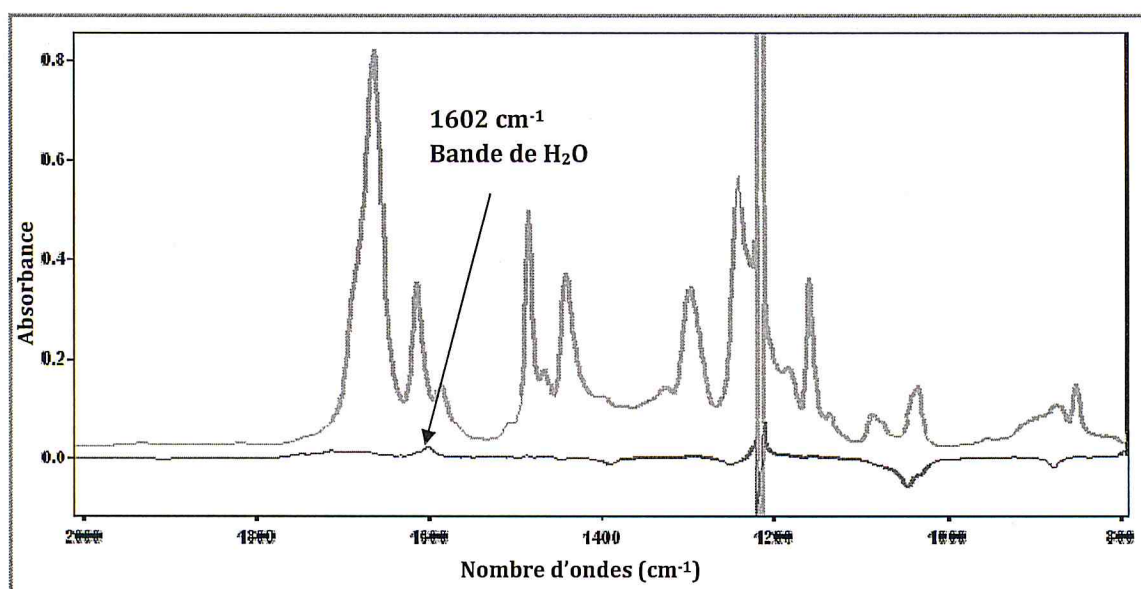


Figure 37. Spectres IRTF comparatifs de l'acide salicylique (vert) et l'extrait brut (bleu) récupérés avec CHCl_3

Suite à ce résultat, il a été décidé de modifier la polarité du chloroforme avec l'ajout de 20% (v/v) de MeOH. Il a été vérifié au sein de l'équipe à travers des travaux antérieurs dans le domaine, que la qualité des spectres est meilleure avec l'ajout de MeOH (figure 38-39).

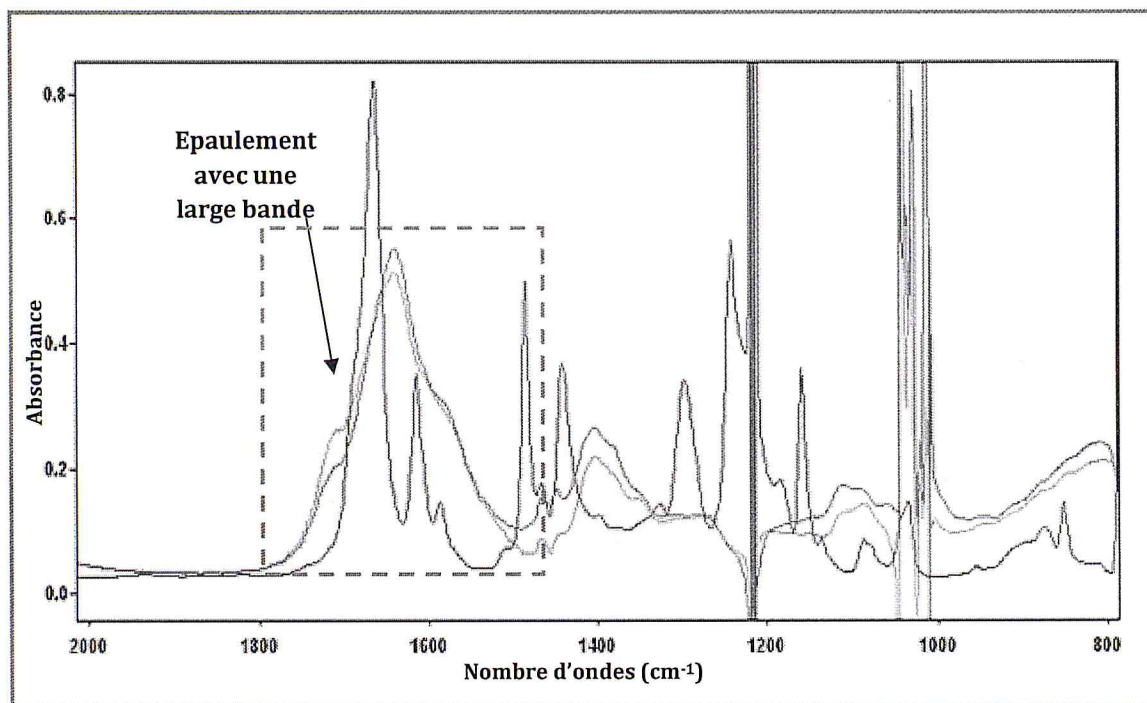


Figure 38. Spectres comparatifs de l'acide salicylique (rose) et l'extract brut du comprimé (vert) et de l'algue brut (bleu) obtenus après traitement récupérés avec CHCl_3 à 20% MeOH

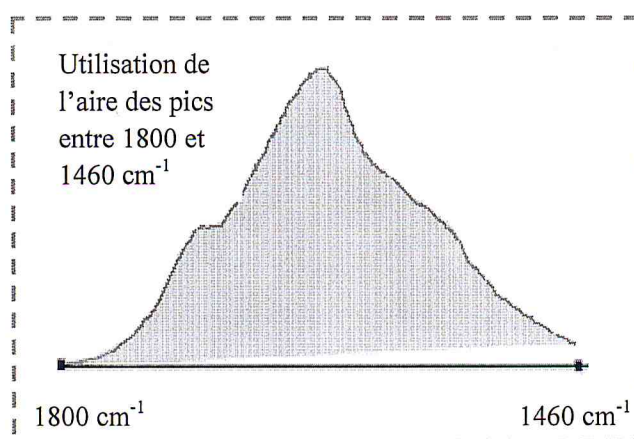


Figure 39. Utilisation de l'aire des pics en considérant la zone entre 1800 et 1460 cm^{-1}

Les spectres IRTF comparatifs des extraits du comprimé et de l'algue récupérés avec le chloroforme et l'extrait brut récupéré avec le chloroforme de polarité modifiée sont montrés sur la figure 35. L'analyse des spectres confirme d'un côté que le chloroforme à 20% MeOH permettait la récupération de la totalité de l'extrait et de l'autre côté, l'utilisation des hauteurs des pics aux bandes sélectionnées est inadéquate car l'allure des pics a changé pour les échantillons réels. De ce fait, il est plus judicieux de considérer l'aire balayant la zone des trois pics (1665, 1615 et 1487 cm^{-1}) et ce, en considérant la zone entre 1800 et 1460 cm^{-1} .

III.6.2. Caractéristiques analytiques de l'acide salicylique en considérant l'aire des pics

Les caractéristiques analytiques des solutions de l'acide salicylique préparées directement dans CHCl_3 et en considérant l'aire des pics entre 1800 et 1460 cm^{-1} , sont résumées dans le tableau 15.

Tableau 15. Caractéristiques analytiques de l'acide salicylique obtenu directement dans CHCl_3 en considérant l'aire des pics

Paramètres analytiques	Aire des pics entre 1800-1472 cm^{-1}
Droite de calibration	$y = 1.1560C + 0,0019$
Coefficient de corrélation (R)	0.9999
LD ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)	40
D.S.R % (n=10)	0.14
Domaine de concentration ($\text{mg}.\text{ml}^{-1}$)	2.5 – 20

C : Concentration en $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$, D.S.R(%) : Déviation Standard Relative (pour $C=10\text{mg}.\text{mL}^{-1}$), LD : Limite de détection en $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ obtenue pour un niveau de confiance de 99.6% ($k=3$).

Conditions expérimentales : Chemin optique 0.1 mm, Résolution nominale 4 cm^{-1} , Nombre de balayage 20 scans, Background de la cellule remplie de CHCl_3 .

Les caractéristiques analytiques des solutions de l'acide salicylique obtenues après traitement dans CHCl_3 et en considérant l'aire des pics entre 1800 et 1460 cm^{-1} , sont résumées dans le tableau 16.

Tableau 16. Caractéristiques analytiques de l'acide salicylique obtenu après traitement en considérant l'aire des pics

Paramètres analytiques	Aire des pics entre 1800-1472 cm^{-1}
Droite de calibration	$y = 1.0431C - 0,1318$
Coefficient de corrélation (R)	0.9985
LD ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	20
D.S.R % (n=10)	2
Domaine de concentration (mg.ml^{-1})	2.5 – 20
Récupération (%)	111

Le pourcentage de récupération de l'acide salicylique calculé à partir des rapports des pentes des droites de calibrations obtenues pour des étalons d'acide salicylique après traitement et des étalons préparés directement dans le chloroforme en considérant l'aire des pics de la zone entre 1800 et 1460 cm^{-1} , est montré dans le tableau 16, avec une récupération de 111%.

III.6.3. Détermination du taux d'équivalent d'acide salicylique en considérant l'aire des pics

Le contenu équivalent d'acides salicyliques de l'extrait du comprimé de l'algue bleue-verte *Spirulina platensis* et de l'extrait de l'algue brut est obtenu en extrapolant les valeurs d'absorbance dans la droite de calibration établie pour l'acide salicylique traité de la même façon que les extraits réels et en utilisant l'aire des pics balayant la zone entre 1800 et 1460 cm^{-1} . Les résultats sont résumés dans le tableau 17 et montrent un taux d'équivalent d'acides salicyliques contenu dans les extraits des comprimés à base de *Spirulina platensis* de 6% et un taux de l'algue brut de l'ordre de 4.7%.

Tableau 17. Taux d'équivalent d'acide salicylique de l'extrait brut de l'algue brut et de l'extrait de comprimé de l'algue *Spirulina platensis* déterminé par calibration externe.

Masse de l'échantillon (mg)	Aire* des pics entre (1800-1472 cm^{-1})	Taux (mg/g)**	Taux (%)
929 mg de comprimé broyé	59.3	61.4	6
	56.2	58.0	
		$60 \pm 2.4^{\#}$	
929 mg d'algue brut	48.0	49.6	4.7
	48.1	44.4	
		$47 \pm 3.7^{\#}$	

* Aire de deux mesures indépendantes

** mg d'équivalent d'acide salicylique dans 1g d'extrait brut

[#] Valeur moyenne $\pm$ déviation standard de deux mesures indépendantes

IV. Extraction et préconcentration des acides phénoliques par une technique élaborée

Dans le but d'améliorer les paramètres d'extraction utilisés lors du protocole précédent, à savoir le temps de macération et la qualité et la quantité de solvant utilisé, une série d'expériences préliminaires basée sur l'extraction assistée par micro-ondes suivie d'une préconcentration à travers une phase solide a été réalisée pour déterminer le taux d'équivalent d'acide salicylique dans les comprimés préparés à partir de l'algue bleue-verte *Spirulina platensis*.

IV.1. Extraction assistée par micro-ondes

Pour améliorer les temps de macération et obtenir un extrait à partir des comprimés préparés à base de l'algue bleue-verte *Spirulina platensis*, une technique élaborée qui est l'extraction assistée par un four à micro-onde domestique modifié a été employée (figure 40). Quatre (04) comprimés de masse globale 3663.3mg broyés ont été introduits dans un mélange de 120mL MeOH-Eau 1 :1 (v/v) pendant 5 min avec un cycle de 3sec et en considérant la puissance maximale de 800W.

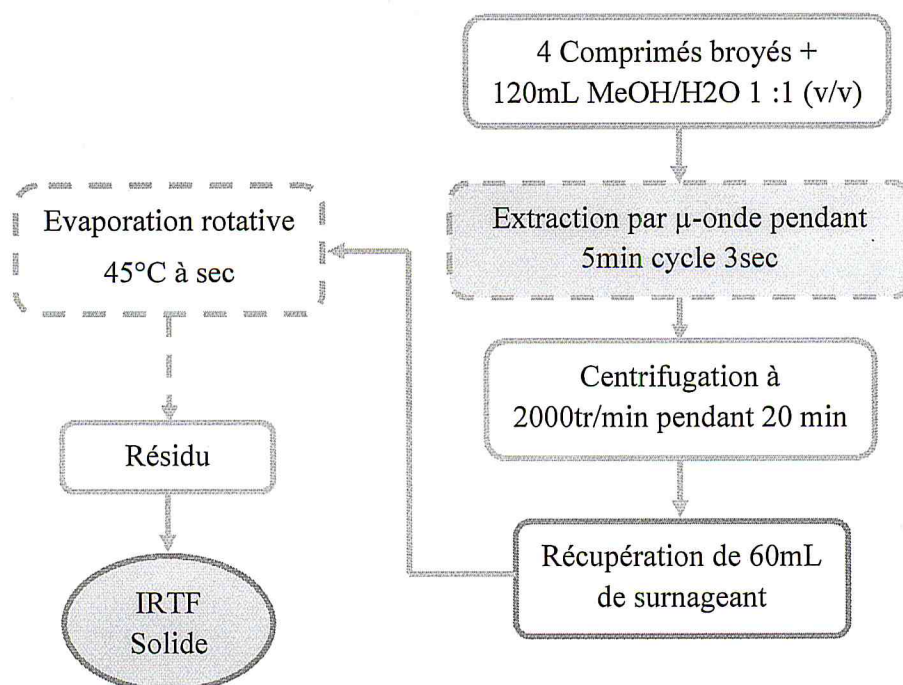


Figure 40. Protocole d'extraction assistée par micro-ondes

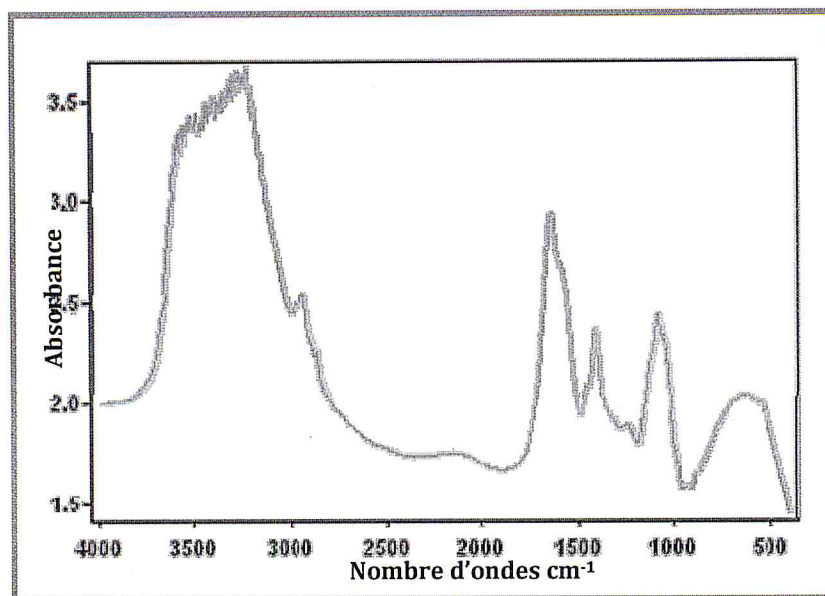


Figure 41. Spectre IRTF en phase solide du résidu obtenu après évaporation lors d'extraction assistée par micro-ondes

On comparant le spectre de la figure 41 avec celui de la figure 33, nous pouvons conclure qu'un temps de 5min par micro-ondes est suffisant pour extraire la majorité du contenu de la matrice.

IV.2. Procédure de préconcentration des acides phénoliques

Pour améliorer le procédé d'extraction et éviter les pertes de l'extrait qui colle sur les parois du ballon, une extraction assistée par micro-ondes suivie d'une préconcentration sur un support solide ont été testés.

Le mélange obtenu après extraction par micro-onde est centrifugé pour se débarrasser des débris, une fois terminer la solution surnageante est passé à travers des cartouches de phase solide de capacité 3mL préalablement conditionnées avec 2mL de méthanol suivie de 1mL d'eau distillée. L'élution est réalisée avec 3 fois la fraction de 1mL de chloroforme en dernière étape. L'extrait est passé à travers le sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) afin d'éliminer toute trace d'eau. Par la suite, l'extrait est analysé par spectrométrie infrarouge en phase liquide.

IV.2.1. Sélection de la phase solide

Dans le but de récupérer la totalité de l'extrait, nous avons commencé par une étape préliminaire afin de choisir la phase solide adéquate pour notre matrice et ce, en réalisant une macération classique.

Pour cela, nous avons employé l'ajout d'un étalon qui est l'acide salicylique afin d'étudier le phénomène de rétention-élution à travers la phase polaire et la phase apolaire et avoir une idée sur le comportement des acides phénoliques à travers le support solide.

Le protocole suivi est détaillé sur la figure 42.

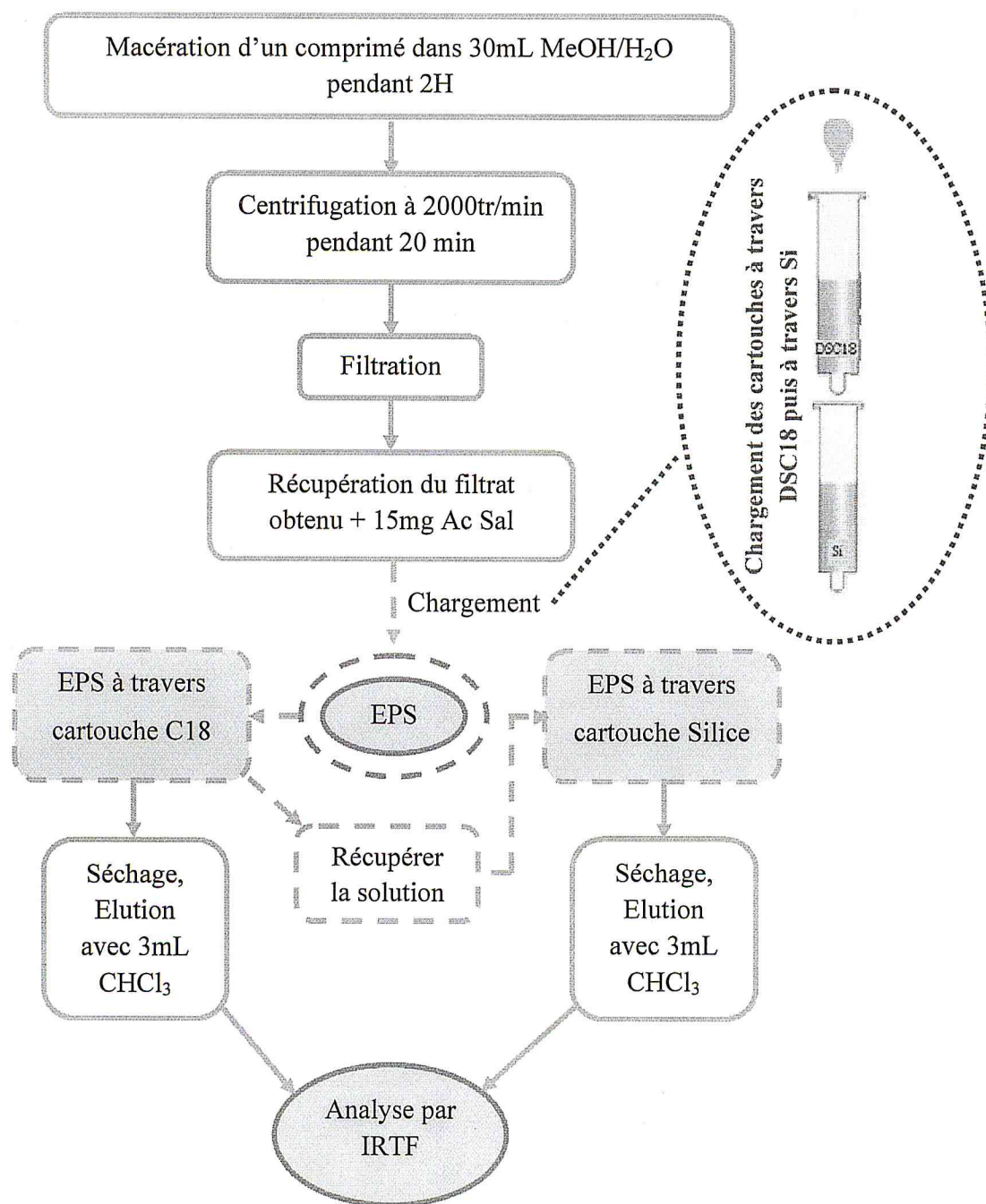


Figure 42. Extraction des acides phénoliques par l'EPS

Dans cette manipulation, le filtrat est chargé en série à travers deux (02) cartouches d'EPS de type DSC18 et de type Silice. Les deux cartouches sont éluées chacune à part, par le chloroforme pour leurs postérieure analyse par spectrométrie IRTF.

La figure 43 illustre les spectres infrarouges des extraits passés à travers les deux phases solides.

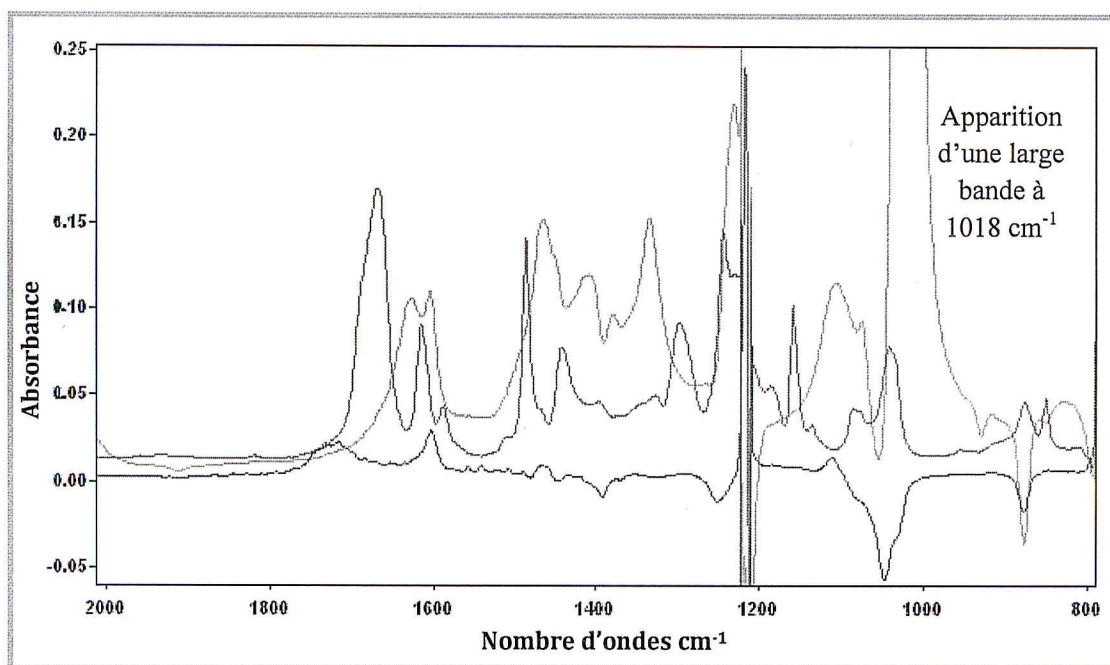


Figure 43. Spectres IRTF comparatifs de l'acide salicylique de concentration 5mg.mL⁻¹ (bleu) et de l'extrait obtenu après EPS à travers la Silice (vert) et l'extrait obtenu après EPS à travers la DSC18 (rose).

L'analyse des spectres montrés sur la figure 43, indique que la phase solide DSC18 ne retient ni l'acide salicylique ni les constituant de l'extrait du comprimé, alors que la silice retient l'analyte et ces homologues.

Nous avons constaté aussi un effet matrice remarquable par le déplacement des bandes vers les faibles fréquences et l'apparition d'une large bande intense vers 1018 cm⁻¹ spécifique au benzène substitué qui pourrait être identifiée et exploitée dans de futurs travaux.

En conclusion, la phase solide de type silice a été sélectionnée pour la rétention des acides phénoliques présents dans les comprimés préparés à partir de l'algue bleue-verte *Spirulina platensis*.

IV.3. Extraction et préconcentration des acides phénoliques

Le mélange obtenu après extraction par micro-ondes a subi une centrifugation et a été partagé en deux fractions. L'une des fractions a été enrichie avec une quantité connue d'acide salicylique de 15mg. Chaque fraction est préconcentrée à travers des cartouches remplies avec une phase solide polaire de type Silice après avoir la conditionnée avec 2mL de méthanol et 1mL d'eau distillée.

Le chloroforme d'élution des cartouches bien séchées a été passé à travers des cartouches remplies avec du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) afin d'obtenir une fraction sans traces d'eau et prête à être analysée en infrarouge en phase liquide.

L'organigramme de la figure 44 résume toutes les étapes du protocole appliqué.

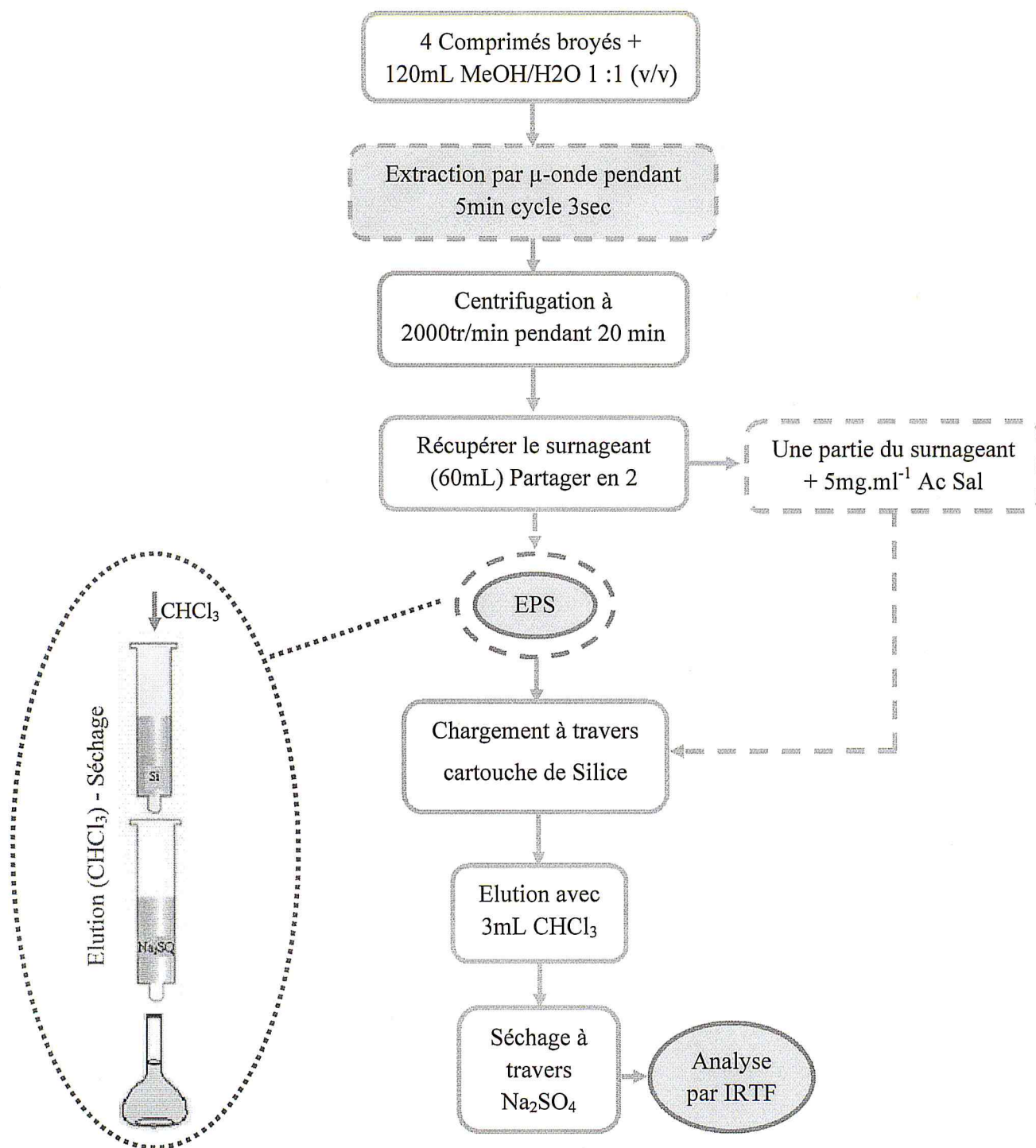


Figure 44. Protocole d'extraction et de préconcentration des acides phénoliques

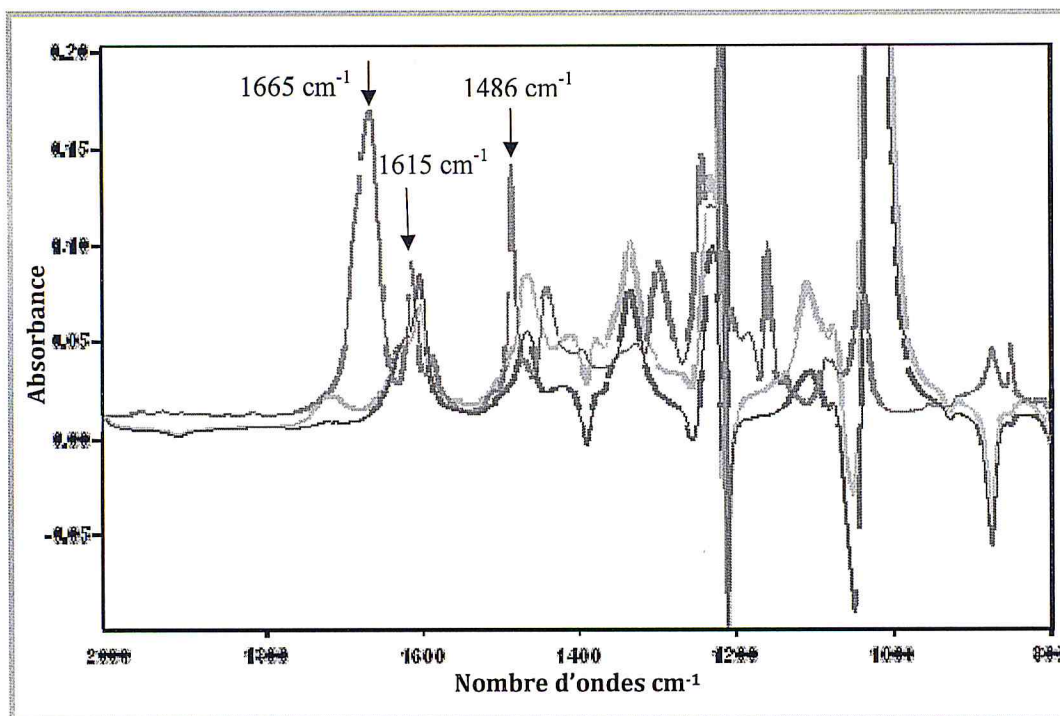


Figure 45. Spectres IRTF de l'acide salicylique de concentration 5mg.mL^{-1} (bleu), de l'extrait traité sans ajout d'acide salicylique (rose) et de l'extrait traité avec ajout de 5mg.mL^{-1} d'acide salicylique (vert).

Les résultats montrés sur la figure 45 indiquent que la technique d'extraction élaborée testée ne permet pas la détermination quantitative des acides phénoliques mais ouvre des perspectives prometteuses pour des expériences complémentaires.

Conclusion Générale

Conclusion générale

L'objectif de ce travail a été consacré au développement des applications quantitatives de la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier IRTF, en vue de dosage de métabolites secondaires à partir des microorganismes marins utilisés dans l'industrie pharmaceutique.

On s'est intéressé particulièrement à travers cette étude, à la détermination d'une sous-classe de phénols à savoir les acides phénoliques de l'extrait méthanoïque des comprimés à base de la microalgue bleue-verte « *Spirulina platensis* » et de l'extrait méthanoïque de l'algue brute cultivée au sud d'Algérie dans la zone de Tamanrasset, par l'utilisation de la spectrométrie IRTF considérée comme méthode analytique simple, rapide fiable et disponible.

Une synthèse bibliographique importante qui regroupe tous les travaux antérieurs réalisés sur les procédés d'extraction et les méthodes de dosage des phénols dans la matière végétale en général, et les travaux réalisés sur la microalgue bleu-verte Spiruline en particulier a été réalisée. Il a été révélé à travers cette synthèse que la fraction phénolique est constituée particulièrement d'acides phénoliques.

La partie expérimentale décrit d'une part le procédé d'extraction des composés phénoliques à partir des comprimés à base de l'algue *Spirulina platensis* ou de l'algue brut, et de l'autre part, au dosage quantitatif des acides phénoliques extractibles dans les extraits méthanoïques, par spectrométrie IRTF, en utilisant la méthode de calibration externe.

Une alternative de récupération de la fraction phénolique basée sur l'extraction assistée par micro-ondes et la préconcentration à travers une phase solide ont été testées à travers cette étude.

Il a été vérifié, en analysant les spectres infrarouge d'une série de standards appartenant à la classe des acides phénoliques (acide gallique, acide gallique monohydraté, acide syringique, acide férulique et acide caféique) que l'acide salicylique choisi comme témoin (à cause de sa disponibilité) n'est pas spécifique et ne représente pas les différents composés présents dans la fraction phénolique, de ce fait les teneurs d'acides phénoliques déterminées sont exprimées sous forme d'équivalent d'acide salicylique dans l'extrait.

Le chloroforme, qui est le solvant adéquat pour les analyses des échantillons par spectrométrie IRTF, ne permettait pas la récupération quantitative des extraits, on a procédé à la modification de sa polarité par l'ajout de 20% de MeOH.

Les valeurs d'absorbances en considérant la hauteur des pics à 1665, 1615 et à 1486 cm^{-1} corrigées avec des lignes de bases adéquates ont donné, pour la série de solutions d'acide salicylique préparées directement dans le chloroforme dans un domaine de linéarité entre 2.5-20 mg.mL^{-1} une bonne linéarité avec une bonne précision et des acceptables limites de détection.

La récupération de l'acide salicylique après traitement, en considérant les trois bandes d'absorbances sélectionnées, variant entre 80 et 120 %.

Lors de l'analyse des échantillons réels, on a remarqué un effet matrice provoque le déplacement des bandes vers les faibles fréquences et un changement dans l'allure des pics. Pour une meilleure fiabilité d'analyse on a opté à l'utilisation de l'aire de pics contenant les trois pics sélectionnés et ce, en considérant la zone entre 1800 et 1460 cm^{-1} . Ce mode de mesure a fourni une récupération de l'ordre de 111%.

Le taux d'équivalent d'acide salicylique de l'extrait des comprimés à base de l'algue bleue-verte *Spirulina platensis* est de 6%, et pour l'extrait de l'algue brut, le taux a été évalué à 4.7%.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

- [1] T. Bahorun, « Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle », Food and Agricultural Research Council, AMAS 1997.
- [2] Y. Farid, S. Etahiri, O. Assobhei, « Activité antimicrobienne des algues marines de la lagune d'Oualidia (Maroc) : Criblage et optimisation de la période de la récolte », Journal of Applied Biosciences, 2009.
- [3] MG. Sall, B.Dankoko, M. Badiane, E. Ehua, N. Kuakuwi, « La Spiruline : une source alimentaire à promouvoir », Médecine d'Afrique Noire, 1999.
- [4] S. Sguera, « *Spirulina Platensis* et ses constituants d'intérêts nutritionnels et activités thérapeutiques », Université Henri Poincare - Nancy 1, 2008.
- [5] A. Saggai, « Compatibilité des eaux des nappes de la région de Ouargla pour la culture de spiruline art », Université Kasdi Merbah Ouargla, 2008.
- [6] V. Leclerc, J-Y. Floc'h, « Les secrets des Algues », Ed Quae, France, 2010.
- [7] J.-R. Drand, C. Lévêque, « Flore et Faune Aquatiques de l'Afrique Sahelo-Soudanienne », Orstom, 1980.
- [8] P. Gayrel, J. Cosson, « Connaître et reconnaître les algues marines », Ed Belin, Paris, 2001.
- [9] H. Balusson, « ULVANS, Ulves Valorisation Nutrition Santé, Lorient, 2012.
- [10] J-C. Corbeil, A. Archambault, « Le dictionnaire Visuel Définitions », Ed Québec Amérique, Montréal, 2009.
- [11] J.J. Macheix, A. Fleuriet, C.Jay-Allemand, « Les composés phénolique des végétaux », presses polytechniques et universitaires romandes, 2005.

- [12] M. El Hattab, G. Culioli, L. Piovetti, S.E. Chitour, R. Valls, «Comparaison of various extraction methods for identification and determination of volatiles metabolites from the brown alga *Dictyopteris membranacea*», *Chrom.A*, 1143, 1-7, 2007.
- [13] N. El Hattab, Y. Daghbouche, M. El Hattab, L. Piovetti, S. Garrigues, M. de la Guardia, « FTIR determination of stérols from red alga *Asparagopsis armata*: comparative studies with HPLC», *Talanta*, 68, 1230-1235, 2006.
- [14] J. Bruneton, « Pharmacognosie photochimie plantes médicinales », TEC & DOC, 3^{ème} édition 1999.
- [15] A.I. Vogel, J. Mendham, J. Toullec, M. Mottet, « Analyse chimique quantitative de VOGEL », Ed De Boech, Bruxelles, 2006.
- [16] A. Żwir-Fereuc, M. Biziuk, «Solid phase extraction technique-trends, opportunities and applications », *Polish Journal of Environ Stud*, Vol 15(5), 677-690, Poland, 2006.
- [17] Y. Daghbouche, S. Garrigues, M.T. Vidal, M. de la Guardia, « Flow injection Fourier transform infrared determination of caffeine in soft drinks », *Anal.Chem*, 69, 1086-1091, 1997.
- [18] C.S. Eskilsson, E. Björklund, «Analytical-scale microwave-assisted extraction », *Journal of Chromatography A*, Vol 902, 227-250, Sweden, 2000.
- [19] J. Lynch, « Analyse physico-chimique des catalyseurs industriels, manuel pratique », Ed TECHNIP, Paris, 2001.
- [20] N.B. Colthup, L.H. Daly, S.E. Wiberley, «Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy », 3^{ème} éd, Ed Academic press, Boston, 1990.

- [21] Y. Daghbouche, S. Garrigues, M. de la Guardia, « Liquid chromatography-Fourier transform infrared spectrometric determination of cholesterol in animal greases», *Anal.Chim.Acta*, 354, 97-106, 1997.
- [22] N. Bouzidi, Y. Daghbouche, M. ElHattab, Z. Alliche, G. Culioli, L. Piovetti, S. Garrigues, M. de la Guardia, « Determination of total sterols in brown algae by Fourier transform infrared spectroscopy», *ACA*, 616, 185-189, 2008.
- [23] C. Bonnaillie, M. Salacs, E. Vassiliova, I. Saykova, « Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) », *Revue de génie industriel*, 7, 35-45, 2012.
- [24] H. Falleh, R. Ksouri, M-E. Lucchessi, C. Abdelly, C. Magné, «Ultrasound-Assisted Extraction: Effect of Extraction Time and Solvent Power on the levels of polyphenols and antioxidant activity of *Mesembryanthemum edule* L. Aizoaceae Shoots», *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11(2), 243-249, 2012.
- [25] M.S. Stanković, «Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts», *Kragujevac J. Sci*, 33, 63-72, 2011.
- [26] A. Lopez, M. Rico, A. Rivero, M. Suárez, *Food Chemistry*, 125, 1104-1109, 2011.
- [27] S. Rodríguez-Rojo , A. Visentin , D. Maestri , M.J. Cocero, «Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents», *Journal of Food Engineering*, 109, 98–103, (2012).
- [28] A. Navarrete, M. Herrero, A. Martín, M.J. Cocero, E. Ibáñez, «Valorization of solid wastes from essential oil industry», *Journal of Food Engineering*, 104, 196–201, 2011.
- [29] M. Waksmundzka-Hajnos, A. Oniszczyk, K. Szewczyk, D. Wianowska, «Effect of sample-preparation methods on the HPLC quantitation of some phenolic acids in plant materials», *Acta Chromatographica*, 19, 2007.

- [30] M. Chaabi, « Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : *Euphorbia stenoclada* Baill. (Euphorbiaceae), *Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr. (Combretaceae), *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae) », Thèse de Doctorat en Sciences, Université Louis Pasteur, 2008.
- [31] N. Boizot, J-P. Charpentier, « Méthode rapide d'évaluation du contenu en composé phénolique des organes d'un arbre forestier », Le cahier des Techniques de l'Inra, Numéro spécial, 2006.
- [32] A.L. Waterhouse, «Determination of total phenolics», Current Protocols in Food Chemistry, I.1.1,-I.1.8, 2002.
- [33] L. Bellebcir, « Etude des composés phénoliques en tant que marqueurs de biodiversité chez les céréales », Mémoire de Magister en Biodiversité et production végétale, Université Mentouri de Constantine, 2008.
- [34] T. Swain, W.E. Hillis, «The phenolic constituents of *Prunus domestica*: The quantitative analysis of phenolic constituents», J. Sci. Food Agric, 1959.
- [35] C. Proestros, D. Sereli, M. Komaitis, «Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS», Food Chemistry, 95, 44-52, 2006.
- [36] S. Daas Amieur, « Etude quantitative des composés phénoliques des extraits de trois Variétés de dattes (*Phoenix dactylifera* L.) et évaluation in vitro de leur activité biologique », mémoire de Magister en Biologie, option: Biochimie appliquée, Université El-Hadj Lakhdar – Batna, 2009.
- [37] 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, 965, pp.169-196, 2004.

- [38] F.Fadel, S. Fattouch, S. Tahrouch, R. Lahmar, A. Benddou, A. Hatimi, « The phenolic compounds of *Ceratonia siliqua* pulps and seeds », J. Mater. Environ. Sci., 2(3), 285-292, 2011.
- [39] Dawei Wen, Chenchen Li, Hao Di, Yiping Liao, Huwai Liu, « A universal HPLC method for determination of phenolic acids in compound herbal medicines », China.
- [40] C.G. Andréani, « Cours d'enseignement phyto-aromathérapie : Algues et Cyanobactéries », faculté de médecine Paris XIII, 2010-2011.
- [41] M. Munawer Khan, M. Mazharuddin Khan, « Amélioration de la production des composés phénoliques (antioxydants) dans *Spirulina plantensis* sous des différents régimes d'acide indole acétique », International Journal of Engineering Science and Technology (IJEST), 0975-5462, Vol 3(4), 2011.
- [42] H.H. Abd El-Baky, F.K. El Baz, G.S. El-Baroty, « Phenolics from *Spirulina maxima*: Over production and *in vitro* protective effect of its phenolics on CCl₄ induced hepatotoxicity », Journal of Medicinal Plants Research Vol. 3(1), pp. 024-030, 2009.
- [43] M.S. Miranda, R.G. Cintra, S.B.M. Barros and J. Mancini-Filho, « Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima* », Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 31, 1075-1079, 1998.
- [44] L.M. Colla, E.B. Furlong, J.A. Vieira Costa, « Antioxidant Properties of *Spirulina (Arthrospira) platensis* Cultivated Under Different Temperatures and Nitrogen Regimes », Brazilian Archives of Biology and Technology, Vol.50(1), pp.161-167, January 2007.
- [45] L. Cepoi, L. Rudi, V. Miscu, A. Cojocari, T. Chiriac, D. Sadovnic, Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie Tom. XVI/2, pp 43-48, 2009.



[46] R.A. Kepekçi, S.D. Saygideger, «Enhancement of phenolic compound production in *Spirulina platensis* by two-step batch mode cultivation», J Appl Phycol, 24:897–905, 2012.

[47] M.M. de Souza, L. Prietto, A.C. Ribeiro, T.D. de Souza, E. Badiale-Furlong, «Assessment Of The Antifungal Activity Of *Spirulina Platensis* Phenolic Extract Against *Aspergillus flavus*, Ciênc. agrotec», Lavras, Vol 35(6), p. 1050-1058, 2011.

[48] M. Herrero, P. J. Martín-Álvarez, F. J. Señoráns, A.o Cifuentes, E. Ibáñez, «Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga», Spain.

[49] H.H. Abd El-Baky, F.K. El Baz, G.S. El-Baroty, « Production de composés phénoliques à partir de la micro-algue *Spirulina maxima* et ses effets protecteurs », African journal of biotechnology, Vol 8(24), 7059-7067, 2009.