

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ SAAD DAHLEB BLIDA 1

**Faculté des sciences
Département de Chimie**



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master

Spécialité : Chimie des produits naturels

Thème :

ETUDE CHIMIQUE ET POTENTIALITES PHARMACOLOGIQUES
DE L'ALGUE MARINE MEDITERRANEENNE
CYTOSEIRA AMENTACEA

Présentée par :

BERROUANE Abdelilah

Devant le jury composé de :

Z. L. CHINI	MAA	Président	Université Saad Dahlab Blida
M. AISSAOUI	MCB	Examineur	Université Saad Dahlab Blida
S. HAMICHE	MCB	Encadreur	Université Saad Dahlab Blida
C. ESSEID	MCB	Co-Encadreur	Université Saad Dahlab Blida

Blida, 11 juillet 2023

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Allah le tous puisent de m'avoir donné la patience, le courage, la volonté, la force et la santé au cour de la réalisation de ce travail.

Mes chaleureux remerciements s'adressent à ma promotrice, Dr. Hamiche Sonia. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour son encadrement, ses conseils, son aide et le temps qu'elle a consacré pour à moi. Sans elle ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Je remercie les membres du jury, Monsieur Z.L CHINI et Madame M. AISSAOUI, qui ont accepté d'évaluer mon travail et d'apporter leurs remarques constructives. Leurs contributions ont indéniablement enrichi mon travail.

Je tiens à remercier sincèrement Monsieur MEZRAG, Monsieur ZAHI, et Madame ESSEID, pour leur disponibilité, leur aide et leurs précieux conseils tout au long de ce parcours..

Je désire aussi remercier Monsieur BENSOUICI Chawki pour sa gentillesse, sont aide ainsi qu'envers tout le personnel du Laboratoire de biochimie du CRBT, en particulier Mehdi, Amina, Sarah et Latifa qui m'ont fourni les conditions nécessaires pour la réussite de mon stage.

Je tiens à remercier aussi tous les enseignants que j'ai côtoyés tout au long de mon parcours académique universitaire.

Aux ingénieurs du Laboratoire pédagogique du Pavillon 5, particulièrement Mme Asma, Mme Amina, Mme Kahina, ainsi qu'à tout le personnel, un grand merci.

Je tiens à remercier mes meilleurs amis : Adlane, Sohaib, Islem et mes collègues de travail, Monsieur Kolli, Mme Fatima et Mme Houda, pour leur soutien et leurs encouragements.

J'adresse également mes sincères remerciements à mes amies et collègues de la spécialité Chimie des Produits Naturels, ainsi qu'à toutes les spécialités de la Chimie.



Dédicaces

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail :

A ceux qui donnent sans recevoir, se brûlent pour que leur fils voie la lumière du savoir, à ceux qui ont été toujours la source d'inspiration et de courage, à ceux qui tous les mots du monde ne suffisent pas pour leurs montrer mon amour ; à mes très chers parents, la prunelle de mes yeux.

A mon cher frère : Hichem et sa femme Roufeida

A mes chères sœurs : Hasna , Wassila ainsi que son marie Abdennour et mes petites nièces Chahd et Khadija

A ma fiancé Hayet « L'alliance entre deux Être ne doit pas de limiter aux anneaux »

A toute ma famille maternelle merci énormément pour leurs encouragements.

A tous ceux qui ont dit que je ne pouvais pas, je l'ai fait de mon mieux et au fond de mon cœur.

BERROUANE Abdelilah

Résumé

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des algues marines méditerranéennes, plus précisément de l'algue brune *Cystoseira amentacea*. L'objectif est de mettre en valeur cette espèce en étudiant sa composition chimique et ses potentielles applications pharmacologiques. Une méthodologie d'extraction a été mise en place pour extraire les différents constituants de l'algue. Ensuite, un screening chimique a été réalisé afin d'identifier les différentes classes chimiques présentes dans l'extrait obtenu et de ses différentes fractions. Les résultats ont révélé une grande diversité de composés bioactifs tels que les tanins, les flavonoïdes, les stérols, les phlorotannins, les diterpènes, les triterpènes et les alcaloïdes.

Des méthodes de dosage spectrophotométriques ont été utilisées pour quantifier les composés phénoliques et les flavonoïdes totaux présents dans les échantillons. En ce qui concerne la quantification des composés phénoliques totaux, la fraction acétate d'éthyle a présenté la plus forte teneur, avec une valeur de $(420,26 \pm 1,8 \mu\text{g EAG/mg.PS})$. Pour ce qui est de la quantification des flavonoïdes totaux, l'extrait chloroformique a montré le taux le plus élevé, avec une valeur de $(158,75 \pm 1,76 \mu\text{g EQ/mg.PS})$.

En parallèle à l'analyse chimique, des évaluations pharmacologiques approfondies ont été réalisées afin de déterminer les propriétés biologiques de *Cystoseira amentacea*, notamment en ce qui concerne son activité antioxydante, enzymatique et antimicrobienne. Ces études ont révélé des activités potentielles, démontrant ainsi que cette algue brune étudiée pourrait constituer une source prometteuse de composés bioactifs présentant des propriétés pharmacologiques remarquables.

Mots clés : *Cystoseira amentacea*, algue brune, activité antioxydante, activité enzymatique, activité antimicrobienne.

Abstract

This study is part of the valorization of Mediterranean marine algae, specifically focusing on the brown algae *Cystoseira amentacea*. The objective is to explore its chemical composition and potential pharmacological applications. An extraction methodology was employed to extract the various constituents of the algae. Subsequently, a chemical screening was conducted to identify the different chemical classes present in the obtained extract and its fractions. The results revealed a diverse range of bioactive compounds including tannins, flavonoids, sterols, phlorotannins, diterpenes, triterpenes, and alkaloids.

Quantification of total phenolic compounds and flavonoids in the samples was performed using spectrophotometric assay methods. The ethyl acetate fraction exhibited the highest content of total phenolic compounds, with a value of $(420.26 \pm 1.8 \mu\text{g GAE/mg DW})$. In terms of total flavonoids, the chloroform extract showed the highest level, with a value of $(158.75 \pm 1.76 \mu\text{g QE/mg DW})$.

Concurrently, comprehensive pharmacological evaluations were conducted to determine the biological properties of *Cystoseira amentacea*, particularly its antioxidant, enzymatic, and antimicrobial activities. These studies unveiled potential activities, indicating that this brown algae under investigation could be a promising source of bioactive compounds with notable pharmacological properties.

Keywords: *Cystoseira amentacea*, brown algae, antioxidant activity, enzymatic activity, antimicrobial activity.

ملخص

هذا العمل هو جزء من تطوير الطحالب البحرية في البحر الأبيض المتوسط ، وبشكل أكثر تحديداً الطحالب البحرية البنية *Cystoseira amentacea*. الهدف هو تسليط الضوء على هذا النوع من خلال دراسة تركيبته الكيميائية والتطبيقات الدوائية المحتملة. تم تطبيق منهجية استخلاص لاستخراج المكونات المختلفة للأعشاب البحرية. بعد ذلك، تم إجراء فحص كيميائي من أجل تحديد الفئات الكيميائية المختلفة الموجودة في المستخلص الذي تم الحصول عليه ومن هذه الكسور المختلفة. كشفت النتائج عن تنوع كبير في المركبات النشطة بيولوجياً مثل التانينات ، الفلافونويد ، الستيروول ، الفلوروتانينات ، الديتيربين ، الترايتيربينات والقلويدات.

تم استخدام طرق المقايسة الطيفية لتحديد المركبات الفينولية ومجموع مركبات الفلافونويد الموجودة في العينات. فيما يتعلق بالتقدير الكمي للمركبات الفينولية الكلية، قدم جزء أسيتات الإيثيل أعلى محتوى بقيمة (1.8 ± 420.26) ميكروغرام / EQ (mg.PS). فيما يتعلق بتقدير إجمالي مركبات الفلافونويد ، أظهر مستخلص الكلوروفورم أعلى معدل بقيمة (1.76 ± 158.75) ميكروغرام (EQ / mg.PS).

بالتوازي مع التحليل الكيميائي، تم إجراء تقييمات دوائية واسعة النطاق لتحديد الخصائص البيولوجية لـ *Cystoseira amentacea*، لا سيما فيما يتعلق بنشاطها المضاد للأوكسدة والأنزيمات والميكروبات. كشفت هذه الدراسات عن أنشطة محتملة، مما يدل على أن هذه الطحالب البنية المدروسة يمكن أن تكون مصدرًا واعدًا للمركبات النشطة بيولوجياً ذات الخصائص الدوائية الرائعة.

الكلمات المفتاحية: *Cystoseira amentacea*، الطحالب البنية، النشاط المضاد للأوكسدة، النشاط الأنزيمي، النشاط المضاد للميكروبات.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	
Dédicaces	
Résumé	
Abstract	
الملخص	
TABLE DES MATIÈRES	
LISTE DES ABRÉVIATIONS	
LISTE DES FIGURES	
LISTE DES TABLEAUX	
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
I.1 GÉNÉRALITÉS SUR LES ALGUES MARINES	3
I.1.1 Notions générales sur les algues marines	3
I.1.2 Systématique et taxonomique des algues	3
I.1.2.1 Algues rouges	3
I.1.2 .2 Algues brunes	4
I.1.2.3 Algues vertes	4
I.1.2.4. Les Cyanobactéries	5
I.1.3 Répartition géographique des algues	5
I.1.4 Utilisation et importance des algues marines	5
I.1.5 Présentation du genre <i>Cystoseira</i>	6
I.1.5.1 Origines	6
I.1.5.2 Systématique	6
I.1.5.3 Diversité	7
I.1.5.4 Morphologie	7
I.1.6 Présentation de l'espèce <i>Cystoseira amentacea</i>	8
I.1.6.1. Description	8

I.2 ETUDE CHIMIQUE DES EXTRAITS LIPIDIQUES D'ALGUES MARINES	9
I.2.1 Extraction	9
I.2.1.1 Méthodes d'extraction conventionnelles (classiques)	9
I.2.1.2 Méthodes d'extraction innovantes	11
I.2.1.2.1 L'extraction en condition de haute température et haute pression	11
I.2.1.2.2 Extraction Assistée par Microondes (EAM)	11
I.2.1.2.3 Extraction Assistée par Ultrasons (EAU)	12
I.2.2 Dosage	13
I.2.2.1 Dosage des composés phénoliques totaux	13
I.2.2.2 Dosage des flavonoïdes totaux	13
I.2.2.3 Dosage des tannins totaux	13
I.2.3 Composition chimique	14
I.2.3.1 Les métabolites secondaires des algues marines	14
I.2.3.2 Les composés phénoliques	14
I.2.3.3 Les composés Terpénoïdes	14
I.2.3.4 Les alcaloïdes	15
I.2.4 Composition chimique des algues brunes du genre <i>Cystoseira</i>	15
I.2.4.1 Composition chimique des algues brunes du genre <i>Cystoseira Amentacea</i>	17
I.3 POTENTIALITES PHARMACOLOGIQUE DES ALGUES MARINES	18
I.3 Potentialités pharmacologique des algues brunes genre <i>Cystoseira</i>	18
I.3 Potentialités pharmacologiques des algues brunes genre <i>Cystoseira Amentacea</i>	19

**CHAPITRE II : ETUDE CHIMIQUE DES EXTRAITS DE
CYSTOSEIRA AMENTACEA :
EXTRACTION, SCREENING CHIMIQUE ET DOSAGE**

II.1 Introduction	21
II.2 Récolte et traitement de la matière végétal	21
II.3 Extraction	22
II.3.1 Procédure d'extraction	22
II.3.2 Rendement d'extraction	22
II.3.3 Résultats et discussion	24
II.4 Screening phytochimique	26
II.4.1 Tests de caractérisations	26
II.4.2 Résultats et discussion	30

II.5 Quantification des composés phénoliques	34
II.5.1 Dosage des composés phénoliques totaux	34
II.5.1.1 Principe du dosage	34
II.5.1.2 Procédure expérimentale	35
II.5.1.3 Résultats et discussion	35
II.5.2 Dosage des flavonoïdes totaux	39
II.5.2.1 Principe du dosage	39
II.5.2.2 Procédure expérimentale	39
II.5.2.3 Résultats et discussion	40

**CHAPITRE III : POTENTIALITES PHARMACOLOGIQUES DE
CYSTOSEIRA AMENTACEA : ACTIVITES ANTIOXYDANTES,
ANTIMICROBIENNES ET ENZYMATIQUES**

III.1 Introduction	43
III.2 Evaluation des activités antioxydantes	43
III.2.1 Test de piégeage du radical libre DPPH *	44
III.2.1.1 Description de la méthode	44
III.2.1.2 Procédure expérimentale	44
III.2.1.3 Résultats et discussion	45
III.2.2 Piégeage du radical ABTS ^{•+}	47
III.2.2.1. Description de la méthode	47
III.2.2.2 Procédure expérimentale	47
III.2.2.3 Résultats et discussion	48
III.2.3 Test de détermination du pouvoir réducteur FRAP	50
III.2.3.1 Principe de la méthode	50
III.2.3.2 Procédure générale	50
III.2.3.3 Résultats et discussion	51
III.2.4 Capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)	53
III.2.4.1 Description de la méthode	53
III.2.4.2 Procédure expérimentale	53
III.2.4.3 Résultats et discussion	53

III.2.5	Activité de réduction par la formation du complexe Fe ²⁺ Phenanthroline	55
III.2.5.1	Description de la méthode	55
III.2.5.2	Procédure générale	55
III.2.5.3	Résultats et discussion	56
III.3	Evaluation de l'activité antidiabétique (Inhibition de l'amylase)	58
III.3.1	Description de la méthode	58
III.3.2	Procédure générale	58
III.3.3	Résultats et discussion	59
III.4	Evaluation des activités antimicrobiennes	61
III.4.1	Préparation de la suspension microbienne « l'inoculum »	61
III.4.2	Préparation des concentrations d'extraits à tester et milieux de culture	62
III.4.3	Ensemencement et dépôt des disques	62
III.4.4	Résultats et discussion	62
	Conclusion générale	65
	ANNEXES	67
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A_{0.50}	Absorbance de la concentration inhibitrice médiane
ABTS	2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
AcOEt	Acétate d'éthyle
ATCC	American Type Culture Collection
BHA	Butylhydroxyanisole
BHT	Butylhydroxytoluène
CCME	Canadian Council of Ministers of the Environment
CG-SM	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de Masse
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance
CUPRAC	Cuprique ion Reducing Antioxidant Capacity
DNSA	Digital National Security Archive
DPPH	2,2-Diphenylpicrylhydrazyl
EAM	Extraction Assistée par Microondes
EAU	Extraction Assistée par Ultrasons
FC	Folin-Ciocalteu
FRAP	Activité du pouvoir réducteur
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC₅₀	Concentration Inhibitrice à 50%
IKI	Iodure de potassium

LC-MS	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
LOBEM	Laboratoire d'Océanographie Biologique et Environnement Marin
M.H	Muller-Hinton
MA	Masse de l'algue
ME	Masse de l'extrait
MeOH	Méthanol
MgSO₄	Sulfate de magnésium
Nc	Neocuproïne
OMS	Organisation mondiale de la santé
SAT	Saturé
SM	Spectrométrie de Masse
TPC	Teneur Composés Phénoliques Totaux
UV	Ultra – Violet
Vis	Visible

LISTE DES FIGURES

Figures	Titres	Pages
Figure 1	a. <i>Asparagopsis armata</i> ; b. <i>Peyssonnelia cf. squamaria</i>	4
Figure 2	a. <i>Cystoseira baccata</i> ; b. <i>Desmarestia ligulata</i>	4
Figure 3	a. <i>Palmophyllum crassum</i> ; b. <i>Codium tomentosum</i>	5
Figure 4	Organisation d'un thalle de <i>Cystoseira</i> : exemple de l'espèce tophuleuse <i>Cystoseira nodicaulis</i>	8
Figure 5	<i>Cystoseira Amentacea</i>	8
Figure 6	Structure chimique des composés terpéniques isolés des algues brunes du genre <i>Cystoseira</i>	15
Figure 7	Structure chimique des méroterpènes isolés des algues brunes du genre <i>Cystoseira</i>	16
Figure 8	Structure chimique des stéroïdes isolés des algues brunes du genre <i>Cystoseira</i>	16
Figure 9	Différents types de stérol de <i>Cystoseira Amentacea</i>	17
Figure 10	<i>Cystoseira amentacea</i>	21
Figure 11	Procédé d'extraction et de fractionnement grossier de l'algue <i>Cystoseira amentacea</i>	23
Figure 12	Histogramme schématique des résultats obtenus pour le fractionnement par extraction liquide-liquide de l'extrait	25
Figure 13	Droite d'étalonnage des solutions standards d'acide gallique de concentrations allant de 4.375 à 70 ug.ml ⁻¹ obtenue par le test de Folin-Ciocalteu	36
Figure 14	Histogrammes exprimés en ug d'équivalence de l'acide gallique par milligrammes Poids Sec (ug.EAG/mg PS), illustrant la teneur en composés phénoliques	38
Figure 15	Courbe d'étalonnage de la quercétine	40

Figure 16	Histogrammes de la quantité en ($\mu\text{g EAG/mg PS}$) des flavonoïdes dans les cinq extraits	41
Figure 17	Réduction du radical DPPH $^{\bullet}$ en présence d'un antioxydant	44
Figure 18	Comparaison des valeurs de CE50 de l'extrait brut, des fractions et des antioxydants standards	46
Figure 19	Génération de cations radicaux ABTS $^{+\bullet}$ à l'aide de persulfate de potassium et sa réaction avec l'antioxydant AH	47
Figure 20	Comparaison des valeurs de CE50 de l'extrait brut, Fraction et des antioxydants standards	49
Figure 21	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridy-s-tri-azine ferrique Fe(III)-TPTZ et un antioxydant	50
Figure 22	Comparaison des valeurs d'A0.50 de l'extrait brut, des Fractions et des antioxydants standards	52
Figure 23	Réduction du complexe chromogène de (Neocuproïne) (Cu(II)-Nc)	53
Figure 24	Comparaison des valeurs d'A0.50 de l'extrait brut, des Fractions et des antioxydants standards	54
Figure 25	Formation du complexe Fe $^{2+}$ - phenanthroline à partir du fer aqueux	55
Figure 26	Comparaison des valeurs d'A0.50 de l'extrait brut, des Fractions et des antioxydants standards	57
Figure 27	Réduction du sucre par la méthode DNSA	58
Figure 28	Valeurs d'CI50 du test d'inhibition de l' α amylase	60
Figure 29	Préparation de la suspension microbienne	61
Figure 30	Aromatogramme des bacterie à Gram positive <i>Bacillus cereus</i> testé avec les fractions de <i>Cystoseira amentacea</i>	63
Figure 31	Aromatogramme des bacterie <i>Enterobacter Tumefaciens</i> à Gram négative testé avec les fractions de <i>Cystoseira amentacea</i>	63

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	Titres	Pages
Tableau 1	Méthodes conventionnelles pour l'extraction des composés d'intérêt d'algues	10
Tableau 2	Méthodes innovantes pour l'extraction des composés d'intérêt d'algues	12
Tableau 3	Masses et rendements d'extrait et des fractions de <i>Cystoseira amentacea</i>	25
Tableau 4	Résultats des tests du screening chimique de l'extrait méthanolique de <i>Cystoseira amentacea</i> et ses différentes fractions	31
Tableau 5	Résultats de la Teneur des polyphénols dans l'extrait Brut et ces différentes fractions	37
Tableau 6	Résultats de la Teneur en flavonoïdes de l'extraits Brut et ces différentes fractions	41
Tableau 7	Variation des taux de piégeage du DPPH• en fonction des différentes concentrations des échantillons testés	46
Tableau 8	Variation des taux de piégeage de l'ABTS•+ en fonction des différentes concentrations des échantillons	49
Tableau 9	Variation des absorbances en fonction des différentes concentrations des échantillons	52
Tableau 10	Variation des absorbances en fonction des différentes concentrations des échantillons	54
Tableau 11	Variation des absorbances en fonction des différentes concentrations des échantillons	57
Tableau 12	Inhibition de l'α amylase par l'extraits Brut et ces Fraction	60
Tableau 13	Résultats de l'antibiogramme des extraits de <i>Cystoseira Amentacea</i>	64

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La nature, par son impressionnante richesse, sa biodiversité et sa complexité, est une source d'inspiration pour les chimistes. Elle offre aux chercheurs une multitude de sujets de recherche, en particulier pour trouver des molécules aux propriétés biologiques intéressantes : thérapeutiques, phytosanitaires, etc. [1]. En effet, aujourd'hui, 60 à 70% de tous les médicaments disponibles sont des molécules naturelles issues de diverses sources terrestres ou marines. Sur près de 220 000 substances naturelles répertoriées, seules 10% sont d'origine marine. Ceci peut s'expliquer par le fait que les organismes marins ont été beaucoup moins étudiés que leurs analogues terrestres, et ce principalement à cause du manque de connaissance de ce milieu et des difficultés liées à la récolte des échantillons. Ainsi, les premières recherches sur les produits naturels marins datent seulement de la fin des années 60 alors que les substances d'origine terrestre sont étudiées intensivement depuis déjà plus d'un siècle [2].

Les ressources vivantes de l'océan sont immenses et diverses. D'elles dépendent nos avenir climatique, alimentaire et pharmaceutique..., à condition de se donner les moyens de les identifier et de les exploiter. Les algues occupent la majeure partie du milieu aquatique, soit 18% du règne végétal. L'avenir des substances naturelles biologiquement intéressantes passe par la poursuite des études chimiques et pharmacologiques.

Depuis quelques décennies, l'attention du grand public est de plus en plus fréquemment appelée par les médias sur les algues. Cet ensemble de végétaux est très largement représenté dans toutes les formations aquatiques de notre planète [3]. Sur le plan de la systématique, les algues sont également très diversifiées, ce qui témoigne de leur très longue histoire génétique. Elles se répartissent entre plusieurs lignées évolutives complètement indépendantes les unes des autres [4]. Ces métabolites se caractérisent souvent par la présence d'éléments chimiques ou de structures rarement observées, voire inconnues en milieu terrestre

Ces algues se sont révélées être une source extrêmement riche en métabolites secondaires, ayant exhibés une myriade d'activités biologiques (activité antioxydant, antimicrobienne, antifouling, et cytotoxique...etc.) [5].

Cependant, les activités antimicrobiennes et antioxydantes ont été largement étudiées chez les algues brunes, en particulier chez les algues brunes du genre *Cystoseira*. Ces recherches ont suscité un grand nombre d'études dans ce domaine.

Dans ce contexte, notre étude s'est concentrée sur l'analyse chimique et les potentialités pharmacologiques d'une espèce d'algue marine appartenant au genre *Cystoseira*. Notre travail s'est articulé autour de trois principales parties :

- La première partie de notre étude est dédiée à une synthèse bibliographique et à la description de la famille des *Sargassaceae*, en mettant l'accent sur le genre *Cystoseira* et les métabolites secondaires présents dans l'algue *Cystoseira amentacea*.
- La deuxième partie de notre étude se concentre sur l'extraction des différents constituants de l'algue et l'identification des différentes classes chimiques présentes dans l'extrait et les fractions obtenues, en utilisant une approche de screening phytochimique. Des méthodes de dosage spectrophotométrique sont utilisées pour quantifier les composés phénoliques et les flavonoïdes totaux présents dans les échantillons.
- Enfin, le dernier chapitre de notre étude regroupe les différentes activités biologiques de l'algue *Cystoseira amentacea*, notamment ses propriétés antioxydantes, antibactériennes et son potentiel dans le domaine de l'anti-diabète.

CHAPITRE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 GÉNÉRALITÉS SUR LES ALGUES MARINES

I.1.1 Notions générales sur les algues marines

Les algues sont des végétaux qui ne possèdent ni tiges, ni feuilles, ni racines. Leur corps est un thalle, d'où leur nom est thallophyte. Les algues sont des organismes aquatiques capables de produire leur propre matière organique par photosynthèse. Elles ont des formes et des dimensions très variables. Certaines sont microscopiques et d'autres mesurent plusieurs mètres de longueur, mais elles ont toutes des caractères communs. Elles sont essentiellement aquatiques dans les eaux douces ou marines, et certaines vivent sur la neige ou la glace des régions polaires et des hautes montagnes. D'autres au contraire supportent dans les eaux des sources thermales des températures élevées (algues thermophiles) [6].

Les algues marines sont de riches sources de composés structurellement divers tels que les caroténoïdes, les fibres alimentaires, les protéines, les acides gras essentiels, les vitamines et les minéraux avec diverses activités biologiques. Plusieurs recherches ont révélé que les composés d'origine algale marine présentent diverses activités biologiques impliquées comme antimicrobien, antiviral, antioxydant, antitumoral et anti-inflammatoire [7]. Les algues ont à l'origine de multiples utilisations : alimentaire, agronomique, en cosmétiques (antirides), pharmaceutique, biotechnologique, en thalassothérapie (retour au milieu originel), en médecine "douce" ou même en médecine légale. Également, elles servent de modèles originaux pour des études de physiologie, de génétique, ou de biologie cellulaire [8].

I.1.2 Systématique et taxonomie des algues

En général, les algues regroupent quatre groupes qui sont différenciées par rapport à la couleur, chaque groupe contient des classes, et chaque classe contient des centaines d'espèces [9].

I.1.2.1 Algues rouges

Les espèces d'algues rouges vont de simples organismes unicellulaires à des organismes complexes, multicellulaires, ressemblant à des plantes. Les algues rouges tirent leur énergie de la photosynthèse. On les trouve dans la zone intertidale et infralittorale jusqu'à des profondeurs allant jusqu'à 40 mètres parfois 250 m. Les algues rouges contiennent une variété de pigments, dont la chlorophylle a, les phycobiliprotéines, la phycoérythrine rouge, la phycocyanine bleue,

le carotène, la lutéine et la zéaxanthine. Le pigment le plus important est la phycoérythrine, qui fournit la pigmentation rouge de l'algue en réfléchissant la lumière rouge et en absorbant la lumière bleue. Les parois sont constituées de cellulose, d'agar et de carraghénane [10].



Figure 1. a. *Asparagopsis armata* ; **b.** *Peyssonnelia cf. squamaria*

I.1.2.2 Algues brunes

Les algues brunes sont les algues les plus grandes et les plus complexes, y compris les algues brun doré (Chrysophyta). Ce type d'algues marines est de couleur brune, olive ou brun jaunâtre. Les algues brunes contiennent une dominance des pigments de xanthophylle et de chlorophylle a et c et un pigment appelé fucoxanthine, qui lui donne sa couleur. La principale réserve glucidique est la laminarine. Les parois cellulaires sont constituées de cellulose et d'acide alginique [11].

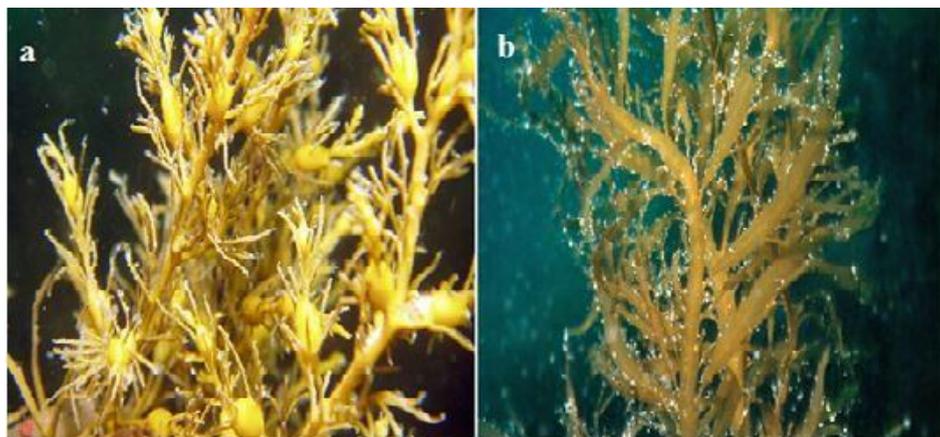


Figure 2. a. *Cystoseira baccata* ; **b.** *Desmarestia ligulata*

I.1.2.3 Algues vertes

Les algues vertes ont une coloration allant du vert foncé au vert clair, qui provient de la présence de chlorophylle a et b, qu'elles contiennent dans les mêmes quantités que les plantes supérieures. Leur coloration globale est déterminée par les quantités d'autres pigmentations, notamment le bêta-carotène (qui est jaune) et les xanthophylles (qui sont jaunâtres ou

brunâtres). Comme les plantes supérieures, elles stockent leur nourriture sous forme d'amidon. Parmi les trois, les algues rouges sont considérées comme la source la plus importante de nombreux métabolites biologiquement actifs par rapport aux autres classes d'algues [12].



Figure 3. a. *Palmophyllum crassum*; b. *Codium tomentosum*

I.1.2.4. Les Cyanobactéries

Les cyanobactéries ou les algues bleues sont constituées des colonies de taille, de forme et de couleur très variable. Comme les algues rouges, elles possèdent des pigments surnuméraires bleus (Phycocyanines) et rouges (Phycoérythrine) qui masquent la chlorophylle a. En dépit de leur nom ancien d'algues bleues, elles sont rarement bleues mais plus souvent rouges, vertes avec des reflets bleutés, violets, bruns, jaunes ou orangés. La plupart d'entre elles ont une consistance gélatineuse voire gluante en raison des mucilages qu'elles sécrètent [13].

I.1.3 Répartition géographique des algues

Les algues sont liées à l'eau et peuvent dès lors s'installer dans tous les types d'habitat suffisamment humides et éclairés. On peut les retrouver en eau douce, en mer, sur sol humide et même sur la neige. Les algues étant photosynthétiques, elles sont dépendantes de la présence de la lumière. Aussi, les algues nécessitent d'être fixées à un substrat, par conséquent, la texture, le degré de cohésion et la nature chimique du substrat ont une importance sur la répartition spatiale des espèces [14].

I.1.4 Utilisation et importance des algues marines

De nos jours les algues marines sont utilisées principalement dans trois secteurs : celui de l'agroalimentaire, de l'industrie des texturants et enfin dans l'alimentation animale et pour les industries pharmaceutique et cosmétique.

On trouve actuellement environ 40 médicaments avec les extraits d'algues. Par exemple le CEVA (Centre d'Etude et de Valorisation des Algues Plénières) travaille sur les propriétés

antioxydantes des extraits d'algues qui auraient des effets sur la prévention et le développement de maladies telles que le cancer du côlon et l'athérosclérose, aussi que sur d'autres molécules intéressantes pour le traitement de pathologies cardio-vasculaires [15]. La nature de ces métabolites secondaires apparaît fortement variable selon les algues considérées, et parfois selon les flores microbiennes associées à ces algues dont il convient également de tenir compte. Les potentialités des algues peuvent donc s'exprimer au niveau de différentes molécules et s'adresser à différents champs d'application [16].

I.1.5 Présentation du genre *Cystoseira*

I.1.5.1 Origines

En méditerranée, les zones rocheuses sont principalement peuplées par des espèces photophiles comme celles du genre *Cystoseira* C. Agardh dont la majorité sont endémiques à la méditerranée. Les espèces du genre *Cystoseira* sont considérées comme ingénieuses car elles forment des forêts qui structurent l'habitat benthique des étages infralittoral et circalittoral. Pourtant de nombreuses données manquent à la mise en place d'un plan de conservation notamment sur la répartition des espèces et la génétique des populations. En effet, une seule étude digénétique des populations, avant ce travail, s'est intéressée à la diversité et à la structure de *C. amentacea* var. *stricta* [17].

L'algue du genre *Cystoseira* a été défini en 1820 par Agardh dans son ouvrage intitulé *Species algarum*. Le nom vient d'un caractère morphologique, l'existence d'un flotteur (*cysto-*) disposés en chaînes (*-seira*) sur les cellules de ces algues, néanmoins la description d'Agardh ne reposait que sur du matériel génital et ne décrivait que les principales caractéristiques du navire [18].

I.1.5.2 Systématique

L'état systématique du genre *Cystoseira* s'est peu stabilisé au cours des deux derniers siècles. Initialement inclus dans un très grand groupe « les ficoïdes » [19], puis dans la famille des *Sargassaceae* [20,21]. D'après les visites taxonomiques [22], le genre qui a été pris pour intégrer une nouvelle famille qui porte son nom: les *Cystoseiraceae*. De récents travaux de biologie moléculaire [23-25] l'ont à nouveau réintégré dans la famille des *Sargassaceae*, leurs résultats ont été confortés par les travaux plus récents de [26-28]. De fait, la famille des *Cystoseiraceae* n'a plus d'existence en systématique.

I.1.5.3 Diversité

Les *cystoseires* se caractérisent par une forte diversité morphologique au niveau interspécifique et intraspécifique ainsi si différentes espèces offrent un large éventail de formes et aspects, une variation morphologique est observée :

- Entre individus d'une même espèce.
- Au sein d'un même individu au cours des saisons.

Complique la tâche de reconnaissance sur le plant aussi le premier critère d'identification des espèces a été identifié sur la base d'échantillons Provenant d'une seule localité qui Souvent inadaptés dans un environnement fondamentalement différent [29].

I.1.5.4 Morphologie

Les principales caractéristiques du genre *Cystoseira* ont été décrites pour la première fois par [30], qui a détaillé les espèces atlantiques et méditerranéennes de la cote française, puis [31] pour les échantillons de l'adriatique , en général le thalle d'un *cystoseir* se présente sous la forme d'un système d'axes de plusieurs ordres (primaire, secondaire, etc. ; Figure 4) avec une croissance illimitée, peut contenir des ajouts croissance limitée, comparable à la pleurésie. Le ou les axes principaux proviennent de la plaque de base en forme de cône, qui est le point d'attache du thalle à son substrat. La présence de kystes aériens (flotteurs) dans la position interne des axes est typique de la famille. Cependant, selon la phénologie et les conditions environnementales, certains individus peuvent en manquer.

Les *cystoseires* sont des espèces pérennes dans le sens où elles sont présentes dans leur environnement tout au long de l'année. En revanche, ils perdent et retrouvent leurs axes secondaires selon le rythme saisonnier. Ce phénomène est illustré par une étude écologique des populations de surveillance des *Cystoseira* bretonnes.

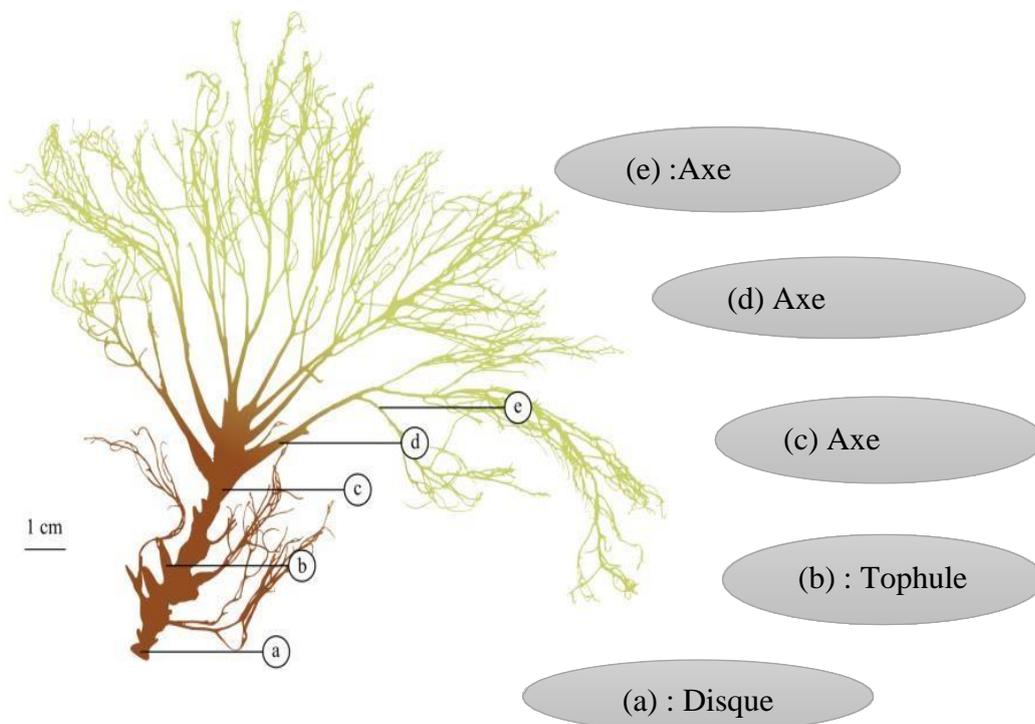


Figure 4. Organisation d'un thalle tophuleuse *Cystoseira*

I.1.6 Présentation de l'espèce *Cystoseira amentacea*

I.1.6.1 Description

Cystoseira amentacea se développe au niveau de la frange littorale dans des zones rocheuses plus ou moins exposées à un fort hydrodynamisme (Ollivier 1929). C'est une espèce de grande taille, facile à observer et à récolter. Ainsi, dès le début du 19^{ième} siècle les observations de *C. amentacea* sont fréquentes et les auteurs la cite comme abondante sur les roches "d'eaux pures" (Agardh 1842; Castagne 1845; Montagne 1846; Debeaux 1873; Bornet et Flahault 1883; Marrion 1883; Bornet 1892) [32].

- **Règne :** *Chromobiota*
- **Embranchement :** *Ochrophyta*
- **Classe :** *Phaeophyceae*
- **Ordre :** *Fucales*
- **Famille :** *Sargassaceae*
- **Genre / Espèce :** *Cystoseira amentacea*



Figure 5. *Cystoseira amentacea*.

Tous ces rameaux sont couverts de nombreux ramules courts spiniformes assimilés à de petites feuilles [33]. Les rameaux primaires, très flexibles, suivent le mouvement des vagues. Lorsqu'ils sont émergés, ils s'étalent sur la roche. Les jeunes rameaux et les extrémités de l'algue ont souvent une iridescence bleu-vert. L'algue est couverte de petites cryptes pilifères dispersées [34].

I.2 ETUDE CHIMIQUE DES EXTRAITS LIPIDIQUES D'ALGUES MARINES

La biodiversité marine et la diversité chimique qui en découle mobilisent un nombre croissant d'équipes de recherche dans le monde, et de grands groupes pharmaceutiques se penchent sur ce gisement de molécules. Cette chimio-biodiversité marine est aujourd'hui perçue comme un gisement pour les biotechnologies et aussi un outil pour la compréhension des interactions dans le monde vivant. La diversité chimique des algues marines ne cesse de se développer grâce à des méthodes d'extraction, de séparation, de dosage et d'identification qui ont fait des progrès spectaculaires au cours des trente dernières années.

I.2.1 Extraction

Parmi les différentes étapes que constituent l'analyse et l'identification de molécules bioactives, l'étape d'extraction, qui a pour but la désorption des molécules d'intérêt des sites actifs de la matrice végétale, est primordiale puisqu'elle déterminera la nature et la quantité des molécules extraites, et par conséquent le succès des étapes suivantes. L'extraction des molécules bioactives d'algues marines est influencée par leurs natures chimiques, le procédé d'extraction utilisé, la taille des particules de l'échantillon, la durée de stockage et d'autres conditions telle que la présence de substances interférentes [35].

Aujourd'hui on recense de nombreuses méthodes d'extraction des molécules bioactives de la biomasse algale. Ces techniques sont, cependant, davantage dédiées à l'échelle du laboratoire que dans un but de production industrielle ; elles servent tout de même de point de départ au développement d'un procédé d'extraction industriel. Parmi ces techniques, il existe des méthodes d'extractions conventionnelles ou classiques et des méthodes d'extraction innovantes.

I.2.1.1 Méthodes d'extraction conventionnelles (classiques)

Les méthodes conventionnelles d'extraction incluant l'extraction au Soxhlet, la macération, la percolation et la sonication sont utilisées depuis de nombreuses années et ont participé au développement de l'industrie de l'extraction de molécules naturelles. Cependant ces

techniques sont très consommatrices en énergie du fait des temps de traitements importants et très polluantes du fait de l'utilisation d'une quantité importante de solvant à recycler [36].

L'extraction par solvant est la plus ancienne des méthodes traditionnelles. Ce type d'extraction est dépendante de plusieurs facteurs intervenant sur la solubilité des composés chimiques et sur l'efficacité du transfert de masse parmi lesquelles, la nature du solvant utilisé, l'énergie appliquée et l'agitation du mélange solvant/produit [37]. Le choix du solvant ou d'un mélange de solvants est lié directement à la nature des composés d'intérêt ciblés mais également au type de biomasse traitée. Le facteur principal intervenant sur le choix du solvant est la polarité des molécules, les composés lipophiles vont nécessiter l'application de solvants non polaires tandis que les composés hydrophiles vont nécessiter l'utilisation de solvants plus polaires. Cependant, le mélange de différents solvants permet une diversité de polarité entre le solvant le plus polaire, l'eau, et les plus apolaires à longue chaîne carbonée tel que l'hexane, le pentane et le cyclohexane. Toutefois d'autres facteurs physicochimiques parmi lesquels le poids moléculaire peut influencer l'extraction de certains composés [38]. Toutefois les procédures mettant en jeu des solvants organiques d'origine pétrolière ont des limites car elles nécessitent une biomasse sèche et, par ailleurs, ne sont pas toujours transposable à l'échelle industrielle du fait des volumes de solvant mis en jeu et de leur toxicité vis-à-vis de l'opérateur et de l'environnement.

Les méthodes conventionnelles couramment utilisés pour l'extraction des molécules bioactives d'algues marines décrites par différents auteurs sont indiquées dans le tableau 1.

Tableau 1. Méthodes conventionnelles pour l'extraction des composés d'intérêt d'algues

Algues	Méthodes d'extraction	Solvants d'extraction	Références
<i>Turbinaria ornata</i>	Extraction par Soxhlet	Méthanol (2 :1)	[39]
<i>Sargassum Ringgoldianum</i>	Extraction par solvant	50% Ethanol	[40]
<i>Cystoseira barbata</i>	Extraction par Solvant	Méthanol Eau	[41]
<i>Sargassum vulgare</i>	Extraction par solvant	Dichlorométhane	[42]

I.2.1.2 Méthodes d'extraction innovantes

I.2.1.2.1 L'extraction en condition de haute température et haute pression

De façon générale, le mécanisme est le suivant : en condition de pression et de température élevées, les composés organiques deviennent miscibles avec le solvant. Puis, une seconde étape de diminution de la température et de la pression permet de séparer facilement le solvant et les produits extraits. Plusieurs techniques d'extraction se basant sur ce mécanisme existent :

- **À l'eau sub-critique** : cette technique, utilisant de l'eau juste en dessous de la température critique et à une pression suffisamment élevée pour rester à l'état liquide a déjà été utilisée pour l'extraction sélective de composés de microalgues. Les avantages de cette technique est l'utilisation de l'eau comme solvant, ce qui rend inutile l'étape de séchage et constitue un procédé propre. La durée d'extraction est courte, les produits extraits sont de haute qualité et les agents d'extraction sont de faibles coûts. Cependant la consommation énergétique n'est pas négligeable.
- **Aux fluides supercritiques** : ce procédé se base sur l'augmentation de la capacité de solvation des agents d'extraction au-dessus de leur point critique. L'un des principaux agents utilisés est le CO₂, mais l'on peut aussi citer l'éthane, l'eau, le méthanol. Le CO₂ à l'état supercritique est le plus utilisé notamment pour ces conditions critiques facilement accessibles ($T_c = 31,1^\circ\text{C}$ et $P_c = 72,9 \text{ ATM}$). Par ailleurs, il est peu coûteux, non toxique, ininflammable et chimiquement inerte. La technologie au CO₂ supercritique apparaît comme adaptée à l'extraction de lipides partir de microalgues pour les raisons suivantes
 - Le pouvoir solvant à géométrie variable.
 - Le transfert de matière favorisé.
 - L'obtention d'extrait sans résidus de solvant.

I.2.1.2.2 Extraction Assistée par Microondes (EAM)

L'extraction par solvant assistée par micro-ondes (ESAM) consiste à traiter sous microondes un solide, sec ou humide, en contact avec un solvant partiellement ou totalement transparent aux micro-ondes [43]. Ce procédé a pour vocation d'être uneméthode d'extraction utilisable pour un grand nombre de matrices solides telles queles végétaux. Dans ESAM, la matière végétale utilisée est généralement sèche. Toutes fois les cellules des matières contiennent toujours des petites traces d'humidité. Cettehumidité ciblée par les radiations micro-onde, une fois chauffée par l'énergie s'évapore et produit une pression énorme sur les parois des cellules qui finissent par se rompre

Cette rupture libère les constituants des cellules vers le solvant organique. Ce phénomène peut être intensifié par l'usage d'un solvant polaire. Le principe de chauffage de la matière par les micro-ondes est dû à deux phénomènes qui interviennent simultanément : la conduction ionique et la rotation [44,45].

I.2.1.2.3 Extraction Assistée par Ultrasons (EAU)

Lorsque les ultrasons se propagent à travers un milieu donné, ils induisent une série de compressions et de raréfactions dans les molécules du milieu irradié par ces ultrasons. Ce phénomène est connu sous le nom de « cavitation acoustique ». La cavitation est définie comme une perturbation du milieu liquide sous l'effet de contraintes excessives [46]. Dans le domaine des ultrasons, la cavitation acoustique désigne généralement la formation, la croissance rapide (expansion) durant les cycles compression/raréfaction jusqu'à l'atteinte de leur taille critique et l'implosion se produisant lors de la propagation d'une onde ultrasonore dans un milieu liquide [47].

Ces méthodes d'extraction innovantes ont été appliquées aux macroalgues marines. Le tableau suivant regroupe quelques études antérieures rapportant l'utilisation des méthodes innovantes dans l'extraction des métabolites primaires et secondaires d'algues marines.

Tableau 2. Méthodes innovantes pour l'extraction des composés d'intérêt d'algues

Algues	Molécules ciblées	Méthodes d'extraction	Références
<i>Grateloupia turuturu</i>	R-phycoérythrine	Extraction Assistée par Ultrasons	[48]
<i>Porphyra</i> <i>Palmaria</i> <i>Undaria pinnatifida</i> <i>Himantalia elongata</i>	Minéraux (Ca, K, Na, Mg, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb et Zn)	Extraction Assistée par Ultrasons	[49]
<i>Sargassum fusiforme</i>	Phytostérols et phytols	Extraction Assistée par Microondes	[50]
<i>Fucus vesiculosus</i>	Fucoïdane	Extraction Assistée par Microondes	[51]
<i>Undaria pinnatifida</i>	Polyphénols	Extraction au CO2 supercritique (ScCO2)	[52]
<i>Bangia atropurpurea</i> <i>Porphyra angusta</i>	Acide Eicosapentaénoïque	Extraction au CO2 supercritique (ScCO2)	[53]

I.2.2 Dosage

I.2.2.1 Dosage des composés phénoliques totaux

Un certain nombre de méthodes spectrophotométriques ont été développées pour la quantification des composés phénoliques totaux. Le dosage de Folin-Ciocalteu (FC) est l'un des tests chimiques les plus couramment utilisés.

Pour effectuer le test, les échantillons de composés phénoliques sont traités avec le réactif de Folin-ciocalteu (hétéropolyphosphotungstates-molybdates) qui réagit avec les composés aromatiques hydroxylés. En milieu alcalin (carbonate de sodium), le réactif développe une coloration bleue dont l'absorption est mesurée à 760 nm. La température et le temps de réaction influent sur le développement de la coloration [54]. Cette méthode permet de déterminer la concentration des composés phénoliques en se référant à une courbe d'étalonnage à partir des concentrations connues.

I.2.2.2 Dosage des flavonoïdes totaux

La détermination de la teneur en flavonoïde des extraits est généralement effectuée en suivant la méthode de Trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ [55]. Le chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) forme un complexe très stable avec les groupements hydroxydes (OH) des phénols. Ce complexe jaune absorbe la lumière visible à une longueur d'onde égale à 430 nm [56]. En effet, dans des tubes à hémolyse, 1ml de chlorure d'aluminium $AlCl_3$ est ajouté à 1 ml de l'extrait. Le mélange est vigoureusement agité, puis incubé pendant 10 minutes et l'absorbance est ensuite lue à 430 nm.

I.2.2.3 Dosage des tannins totaux

Lorsqu'ils sont ingérés en quantités substantielles, les tanins affectent la croissance et augmentent le métabolisme énergétique. Ils sont aussi responsables de l'astringence perçue au contact avec le mucus de la langue. D'un point de vue quantitatif, les méthodes appropriées pour doser les composés phénoliques sont partiellement redondantes, car même des phénols de faible poids moléculaire peuvent précipiter les protéines. On dose généralement les phénols totaux et les tanins condensés (plus difficiles à dégrader que les tanins hydrolysables) avec des méthodes spectrophotométriques, complétées par des tests biologiques de précipitation des protéines (la sérum-albumine bovine, par exemple ; Hagerman et Butler, 1989) [57]. Les dosages peuvent également être réalisés directement sur les complexes tanin-protéine formés, ce qui renseigne sur l'activité potentielle des polyphénols dans les extraits végétaux [58].

I.2.3 Composition chimique

I.2.3.1 Les métabolites secondaires des algues marines

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes [59]. Les algues peuvent contenir aussi des métabolites secondaires comme les composés phénoliques (polyphénols et bromophénols), les Terpénoïdes et les alcaloïdes avec diverses propriétés biologiques comme antioxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoires [60].

I.2.3.2 Les composés phénoliques

La plupart des algues marines contiennent des polyphénols algaux aussi appelés phlorotannins. A la différence des polymères issus des végétaux terrestres qui dérive de l'acide ellagique, les polyphénols algaux sont formés par la polymérisation des unités monomères de Phloroglucinol et biosynthétisés par la voie de l'acétate-malonate. En outre, ces phlorotannins sont des composants fortement hybrides avec un large éventail de taille moléculaire (126 - 650 KDa) [61,62].

La présence de très nombreux dérivés phénoliques, oligophénols et polyphénols, avec ou sans halogènes et avec ou sans groupes sulfate, est la principale caractéristique des algues brunes. La plupart de ces dérivés phénoliques se rencontrent dans les espèces appartenant aux ordres des Fucales et des Laminariales, mais on en trouve également dans d'autres ordres comme les Dictyosiphonales. Si l'on rajoute les méroterpènes, on peut donc dire que les dérivés phénoliques sont omniprésents chez les algues brunes [63,64].

I.2.3.3 Les composés terpénoïdes

La présence des terpènes a été montrée chez de nombreux organismes marins et terrestres tels que les bactéries, les champignons, les micro- et macroalgues, les plantes et également chez certains animaux. Dans le domaine de produits naturels marins, la classe des terpénoïdes occupe une place privilégiée au regard du nombre de structures originales isolées ainsi qu'aux propriétés bioactives de ces produits. Cette famille de composés est beaucoup plus décrite chez les macroalgues brunes, cependant, la présence de terpènes chez les algues rouges est très peu décrite [65].

I.2.3.4 Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés azotés présents dans les algues marines, ils sont divisés en trois groupes : alcaloïdes phényléthylamine, indole et alcaloïdes indoliques halogénés [66] Les alcaloïdes des algues marines sont relativement rares, comparés aux alcaloïdes végétaux terrestres, ils possèdent des activités antibactériennes, antiinflammatoires, antioxydantes, antitumorales et ont donc de grandes utilisations dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques [67].

I.2.4 Composition chimique des algues brunes du genre *Cystoseira*

Les algues brunes du genre *Cystoseira* ont fait l'objet de nombreuses études sur la composition chimique de leurs extraits lipidiques. Ces études ont révélé que les algues du genre *Cystoseira* sont connues pour métaboliser majoritairement des substances terpéniques à côté des stérols (Figure 6 et 7). On trouve essentiellement des diterpènes linéaires dérivés du géranylgeraniol. Une grande diversité des méroditerpènes (linéaires, monocyclisés, bicyclisés...etc.) est également constatée dans ce genre.

Sachant que les méroditerpènes issus d'algues brunes de la famille de *Cystoseiracée* présentent deux séries ; les méroditerpènes à noyau hydroquinonique et les méroditerpènes à noyau chromanol, l'algue brune *Cystoseira amentacea* est caractérisée par l'isolement de nombreuses molécules de méroditerpènes à noyau hydroquinonique [68].

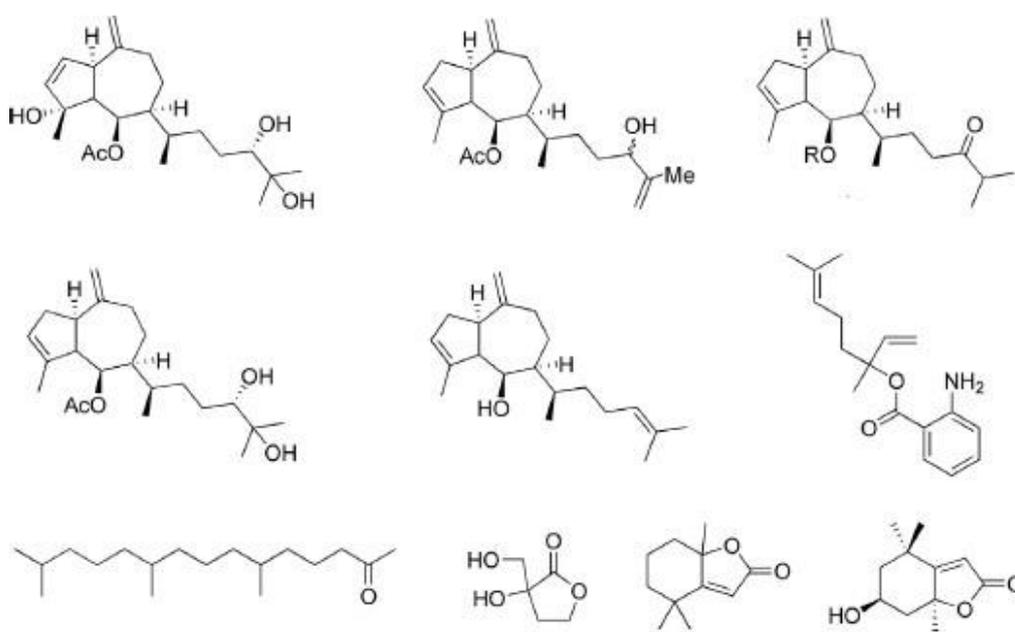


Figure 6. Structure chimique des composés terpéniques isolés des algues brunes du genre *Cystoseira* [69]

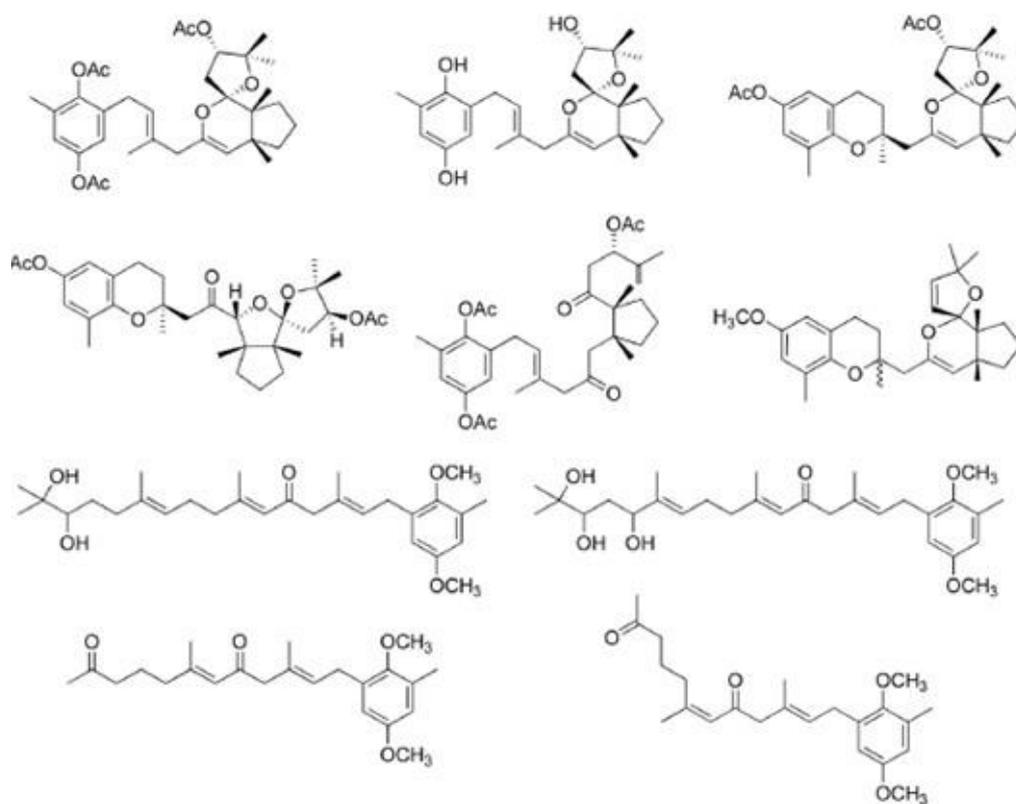


Figure 7. Structure chimique des méroterpènes isolés des algues brunes du genre *Cystoseira* [69]

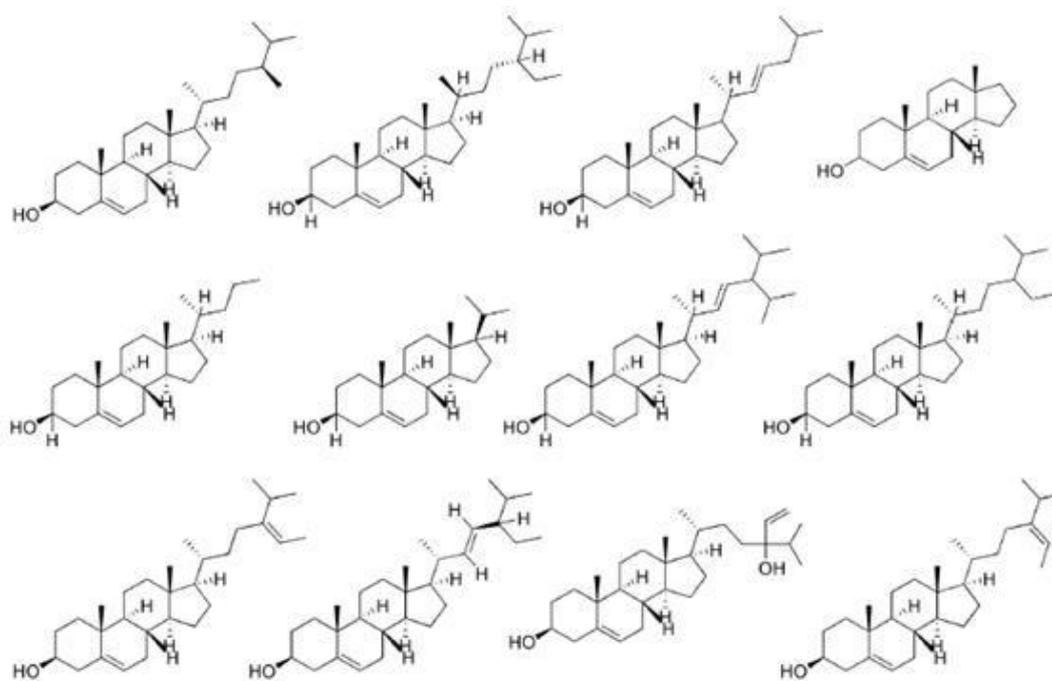


Figure 8. Structure chimique des stéroïdes isolés des algues brunes du genre *Cystoseira* [69]

I.2.4.1 Composition chimique

L'algue brune *Cystoseira amentacea* est caractérisée par l'isolement de nombreuses molécules de méroditerpènes à noyau hydroquinonique [70]. D'autres études ont pu isoler et identifier dans l'espèce *amentacea* de métabolite sous forme d'un couple quinone-hydroquinone(2'E,6'E)-2-(10',11'-Dihydroxygéranylgeranyl)6-méthylquinoline,et (2'E,6'E)-2-(10',11'-Dihydroxygéranylgeranyl)- 6-méthyl- 1,4- benzoquinone ; de trois nouveaux métabolites appartenant à la classe des Méthyltoluquinols (isocystoketal, isostrictalcetal, isobalearone) et quatre Tétraprényltoluquinols; de deux méroditerpènes : 4'-méthoxy-(2E)-bifurcarenone et 2,12-diepino- balearone , et de stérols à savoir le fucostérol (93.1%), le 24-méthylène cholestérol (3.0%), le cholestérol (2.2%), Δ^5 - avénastérol (1.0%), le β -sitostérol (0.6%), le desmostérol (0.1%) et le β -sitostérol (0.6%) [71].

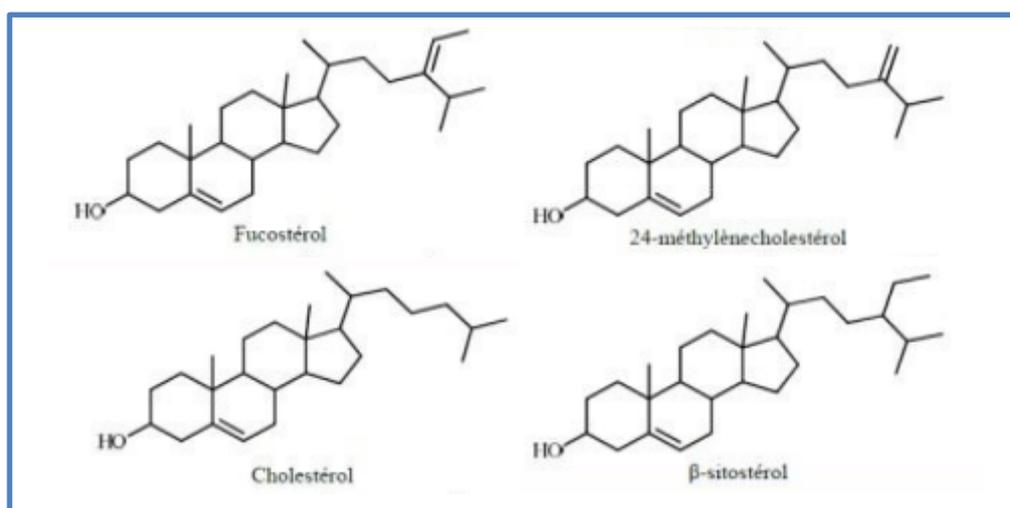


Figure 9. Différents types de stérol de *Cystoseira amentacea* [72].

I.3 POTENTIALITES PHARMACOLOGIQUE DES ALGUES MARINES

Les algues marines sont des organismes essentiels pour l'équilibre du globe, du fait de leurs propriétés et de leur abondance en nombre dans le domaine aquatique qui recouvre les 2/3 de la planète. Récemment, l'intérêt pour les algues marines a pris un essor considérable aussi bien pour l'industrie pharmaceutique que cosmétique ou alimentaire. L'intérêt porté pour les algues marines provient du fait qu'elles constituent un énorme réservoir de molécules naturelles potentiellement actives, dont leurs actions constituent dans certains cas, un élément de protection contre les prédateurs naturels.

Plusieurs travaux de recherche antérieurs portant sur les algues marines ont permis d'isoler et d'identifier un très grand nombre de nouvelles molécules de grande originalité structurale et dont beaucoup d'entre elles ont des activités biologiques intéressantes tels que les activités antibactériennes, antioxydantes, antivirales, antitumorales, antiinflammatoires et d'autres propriétés comme celles qui entrent dans la régulation du système immunitaire et prévenir la plupart des maladies de siècle [73]. D'autres travaux menant sur les extraits lipidiques d'algues marines et de leurs fractions ont démontré également un large éventail d'activités biologiques comme antioxydants, antimicrobiens, anticoagulants, anticancéreux, antivirales et anti-inflammatoires [74-76].

I.3.1 Potentialités pharmacologiques des algues brunes du genre *Cystoseira*

Les algues brunes sont des algues largement répandues à travers le monde, ceci revient à leur faculté d'adaptation via leur reproduction et leur réponse à des conditions écologiques variées. Ceci suppose que les algues brunes secrètent des substances chimiques de défense contre les multiples dangers auxquels elles sont exposées. D'un point de vue pharmacologique, plusieurs espèces d'algues brunes ont révélé qu'elles présentent différentes activités biologiques notamment des activités antimicrobiennes, anticancéreuses, antioxydantes, anti-inflammatoire, antidiabétique et antiparasitaire.

Les algues brunes du genre *Cystoseira* sont des algues largement répartis dans les océans tempérés et tropicaux du monde et dans la région méditerranéenne [77]. Des études antérieures ont rapporté de nombreuses activités biologiques de divers extraits obtenus à partir d'algues brunes du genre *Cystoseira*, y compris les activités antioxydantes de *Cystoseira barbata*, *Cystoseira compressa*, *Cystoseira crinita.*, *Cystoseira indica*, *Cystoseira merica*, *Cystoseira sedoides* et *Cystoseira tamariscifolia* [78,79] , les activités anti-inflammatoires de *Cystoseira crinita*, *Cystoseira compressa* et *Cystoseira sedoides*, les activités antimicrobiennes de

Cystoseira amentacea, *Cystoseira barbata*, et *Cystoseira compressa*, et les activités antiprolifératives de *Cystoseira compressa*, *Cystoseira crinita*, *Cystoseira indica*, *Cystoseira merica*, *Cystoseira sedoides* et *Cystoseira tamariscifolia* [80].

I.3.1.1 Potentialités pharmacologiques de l'algues brune du genre *Cystoseira amentacea*

Particulièrement, différents travaux de recherche ont été menés sur une variété d'activités biologiques d'une espèce d'algues brunes *Cystoseira Amentacea*

Les travaux menés par Gina De La Fuente et al [81]. ont rapporté les activités bioactives des extraits de *Cystoseira amentacea* en termes d'activités antioxydantes et anti-inflammatoires. Les données obtenues dans cette étude démontrent de forts effets antioxydants et anti-inflammatoires des deux extraits de *Cystoseira amentacea* (DMSO et éthanolique), qui ont été pour la première fois étudiés en profondeur. Ces résultats ouvrent la voie, pour l'utilisation future des métabolites de *Cystoseira amentacea* comme additifs alimentaires antioxydants, dans des formulations anti-âges ainsi que dans des lotions cosmétiques adoucissantes pour les peaux enflammées et/ou endommagées.

Les algues brunes sont une source importante de composés bioactifs qui présentent des activités antioxydantes, anti-inflammatoires, antitumorales et antimicrobiennes, entre autres [82]. *Cystoseira amentacea* est une espèce d'algue brune répandue dans les régions côtières de la Méditerranée. Elle a été identifiée comme une source potentielle de composés bioactifs, mais peu d'études ont été menées pour caractériser sa composition chimique globale

Une récente étude réalisée par M. Benmahdjoub [83] sur l'espèce *Cystoseira Amentacea* récoltée au niveau de la côte nord-ouest de l'Algérie a permis de démontrer l'effet de la variation saisonnière de l'algue sur les potentialités antioxydantes des extraits lipidiques obtenus par quatre solvants organiques (méthanol, acétone, hexane et éther d'éthylque). Les résultats indiquent que l'activité antioxydante de *Cystoseira amentacea* dépendaient du solvant utilisé dans l'extraction ainsi que de la variation de la saison. Une forte activité antioxydante a été observée en mars, juin, septembre et décembre. D'autres études sont nécessaires pour isoler et identifier les composés bioactifs présents dans la plupart des extraits actifs de cette algue.

Fatiha Grina et al. [84] ont contribué à l'évaluation des activités antioxydantes, anticholinestérase, uréase et tyrosinase de plusieurs espèces d'algues brunes provenant de l'océan Atlantique marocain, notamment l'algue *Cystoseira Amentacea*, Les résultats ont montré que cette dernière a présenté une activité inhibitrice de la peroxydation lipidique la plus

élevée. Cette étude a démontré que les algues étudiées, en particulier *Fucus spiralis* et *Cystoseira amentacea* pouvaient être une source prometteuse d'antioxydants et de composés phytochimiques qui peuvent être utilisés dans les cosmétiques, les produits pharmaceutiques et comme compléments alimentaires nutritionnels dans les industries agro-alimentaires, contre le stress, les troubles et les maladies délétères induits par les radicaux libres.

Rasha Abu-Khudir et al. [85] ont rapporté l'évaluation de l'activité antioxydante et du potentiel antimicrobien du SHAE et du CCME. Les résultats ont montré que ces deux extraits ont présenté une activité antimicrobienne contre diverses souches bactériennes testées à gram-négatif notamment *E.coli*, *K. pneumonie* et *P. aeruginosa*, ainsi que la souche bactérienne gram-positif *Staphylococcus aureus*, et le pathogène fongique *C. albicans*.

Des études antérieures ont également signalé des observations similaires et ont confirmé L'activité antimicrobienne des extraits organiques des genres *Cystoseira amentacea* et *Sargassum* [82].

En particulier, une récente étude réalisée par B. Tanna [86]. Les algues marines ont montré la présence de nombreux métabolites secondaires bioactifs, avec de grandes potentialités tant du point de vue nutraceutique que biomédical

Au cours des vingt dernières années, ces recherches permettent de l'identification de nouveaux médicaments antioxydants [87], anti-inflammatoires [88], antimicrobiens [89] et antitumoraux [90] présents dans les macroalgues rouges, vertes et brunes.

Chapitre II

Etude chimique de *Cystoseira amentacea* : Extraction, screening chimique et dosage

II.1 Introduction

Cystoseira amentacea est une algue brune largement répandue dans les eaux côtières méditerranéennes. Elle renferme une variété de composés bioactifs, tels que des polyphénols, des terpènes, des stérols et des polysaccharides, qui ont montré des activités biologiques intéressantes [91]. Dans ce contexte, nous allons décrire dans ce chapitre la méthodologie utilisée pour l'extraction de divers constituants d'algue brune *Cystoseira amentacea*, et présenter les différentes classes chimiques constitutives des extraits obtenus via des tests de screening chimique. Nous allons ainsi présenter le dosage des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes.

Cette étude pourrait contribuer à l'identification de nouveaux composés bioactifs issus de cette algue brune, ainsi qu'à la compréhension de leurs propriétés pharmacologiques et de leur potentiel thérapeutique.

II.2 Récolte et traitement de la matière végétal

L'algue *Cystoseira amentacea* a été récoltée en novembre 2022 sur les côtes méditerranéennes algériennes, au niveau de l'Anse de Kouali, à l'ouest de Tipaza. L'identification a été faite par Dr. L. BAHBAH au niveau du Laboratoire d'Océanographie Biologique et Environnement Marin (LOBEM) de l'Université des Sciences et de la Technologie d'Alger (USTHB). L'algue a été séchée à l'ombre, à l'air libre, dans un lieu sec et aéré, puis triée manuellement afin d'éliminer les épiphytes et autres organismes susceptibles de contaminer la nature chimique de l'extrait.



Figure 10. *Cystoseira amentacea*

II.3 Extraction

II.3.1 Procédure d'extraction

Deux procédés d'extraction et de traitement de l'extrait ont été appliqués dans cette étude. Le premier procédé consiste à effectuer une macération de 40 g d'algue par le mélange hydroalcoolique MeOH/H₂O (80/20 : v/v), avec renouvellement du solvant chaque 48h jusqu'à épuisement de la matière végétale, et cela dans un système statique à une température ambiante pendant une semaine, suivie d'une filtration et de l'évaporation du solvant jusqu'à obtention d'un résidu que l'on appelle « extrait brut ». L'extrait brut ainsi obtenu a été récupéré avec du méthanol ce qui a permis d'obtenir un extrait appelé « extrait méthanolique ».

Le second procédé consiste d'abord à effectuer une macération de 300g d'algue en utilisant le même protocole d'extraction que celui décrit dans le premier procédé. Cependant, après filtration, les miscellas (extrait + solvant) obtenus sont concentrés par évaporation à environ 250 ml. Cette solution obtenue est diluée par la suite, sous agitation magnétique, avec de l'eau distillée, puis après un repos d'une nuit à 4°C, la solution a subi des extractions liquide-liquide successives en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par l'éther de pétrole, puis le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol, chaque extraction est répétée trois fois. Les quatre phases organiques ainsi obtenues « éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol » sont séchées avec du MgSO₄ puis filtrées et concentrées à sec sous pression réduite. Le traitement ci-dessus permet d'effectuer une séparation grossière de l'extrait en fractions apolaire, moyennement polaire et polaire [92]. Les différentes étapes de ce procédé d'extraction sont résumées dans l'organigramme ci-après (Figure 11).

II.3.2 Rendement d'extraction

Le rendement en extrait s'exprime par le rapport entre la masse d'extrait (ME) obtenu et la masse d'algue (MA) sèche par la relation suivante :

$$\eta_E (\%) = ME/MA * 100$$

η (%) : Rendement en extrait (%)

ME : Masse de l'extrait (g)

MA : Masse d'algue utilisée (g)

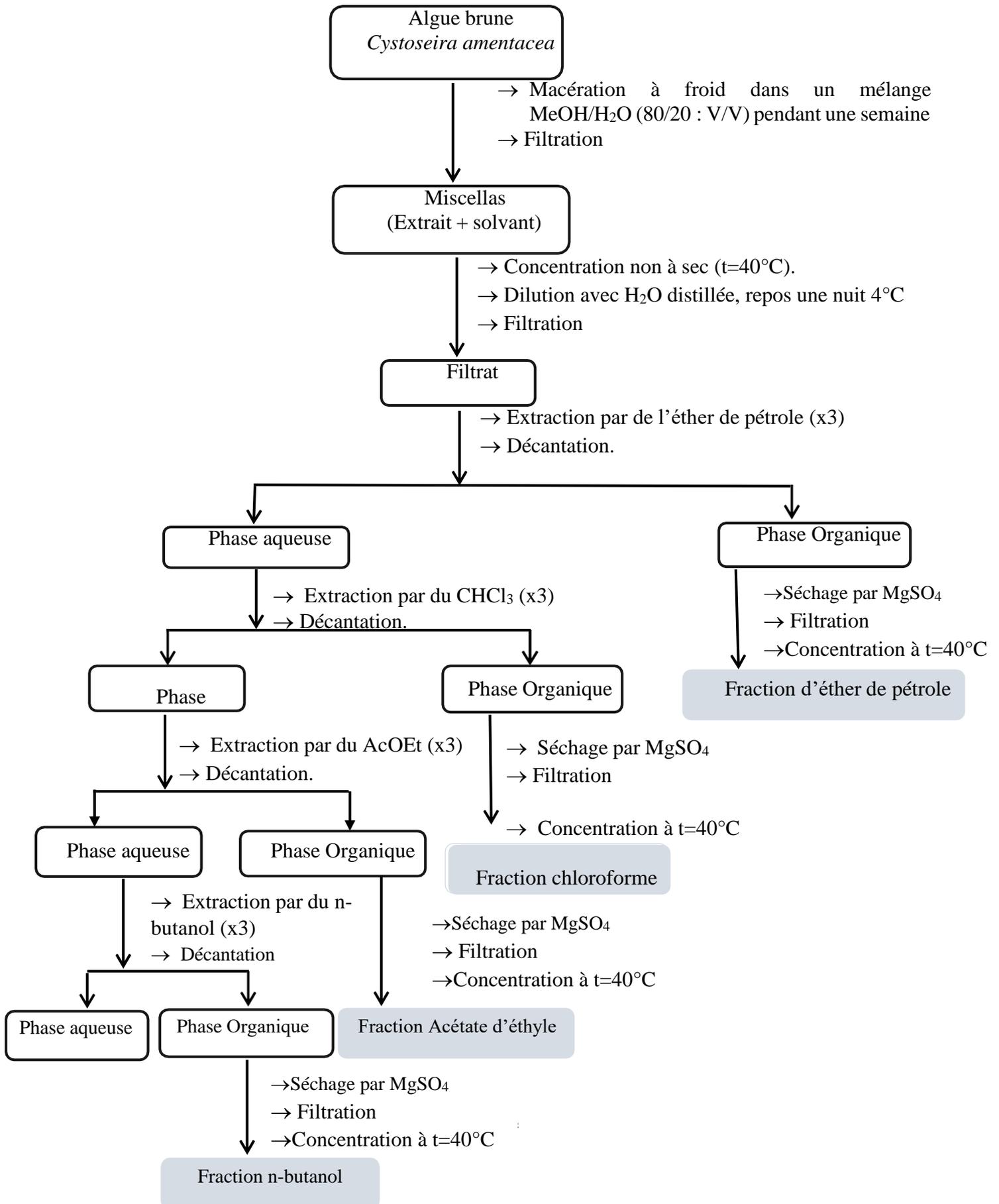


Figure 11. Procédé d'extraction et de fractionnement grossier de l'algue *Cystoseira*

II.3.3 Résultats et discussion

Cystoseira amentacea est une algue brune connue pour contenir une variété de composés bioactifs tels que des polyphénols, des terpènes, des stérols et des polysaccharides [93]. Plusieurs études ont été menées pour extraire ces composés bioactifs de l'algue en utilisant différents solvants tels que l'éthanol, l'acétone, le méthanol ou des mélanges hydroalcoolique à différentes proportions [94]. Les méthodes d'extraction les plus couramment utilisées par différents auteurs sont l'extraction par solvant, l'extraction assistée par ultrasons, l'extraction assistée par micro-ondes et l'extraction assistée par CO₂ supercritique [95].

Les rendements d'extraction et la composition chimique des extraits dépend de plusieurs facteurs tels que les conditions de collecte de l'algue, le solvant d'extraction utilisé, le temps et la méthode d'extraction, ainsi que les propriétés physico-chimiques des molécules d'intérêt [96]. Les masses et les rendements d'extraction obtenus dans cette étude sont mentionnés dans le (tableau 3).

Le rendement en extrait brut obtenu dans cette étude est similaire à celui trouvé dans certaines études antérieures [97]. Cela suggère que les conditions d'extraction utilisées dans cette étude étaient efficaces pour extraire les composés bioactifs de *Cystoseira amentacea*. Toutefois, il est également noté que d'autres études antérieures ont obtenu des résultats plus efficaces [81], ce qui peut être dû à l'utilisation de solvants et de méthodes d'extraction différentes. En général, les méthodes d'extraction telles que l'extraction par ultrasons, l'extraction assistée par micro-ondes et l'extraction par pression sont considérées comme plus efficaces que l'extraction par macération classique en termes de temps et de rendement, car elles permettent une meilleure pénétration du solvant dans la matière végétale et une libération plus rapide des composés bioactifs [98].

La méthode de collecte de l'algue peut influencer également le rendement en extrait. A titre d'exemple, la saison de récolte et les conditions environnementales telles que la température, l'ensoleillement, le pH et la salinité peuvent affecter la croissance, la qualité et la quantité de biomasse d'algue disponible pour l'extraction. Une récolte effectuée en été peut avoir une composition chimique différente de celle effectuée en hiver, ce qui peut affecter la qualité et la quantité des composés bioactifs extraits [99].

Par conséquent, les résultats d'extraction peuvent varier considérablement en fonction des paramètres d'extraction utilisés. Il est important de prendre en compte ces différences lors de la comparaison des résultats entre différentes études.

Les résultats de l'extraction Liquide – liquide, montre que les quatre fractions varient entre 0.1% et 0.4%.

La fraction éther de pétrole possède la valeur la plus grande par rapport à l'autre fraction, d'après les résultats mentionnés dans le tableau 3 on remarque que à chaque fois on passera d'un solvant moins polaire à un solvant plus polaire le rendement va diminuer. Ce qui implique que notre algue est plus riche en composés apolaires que les composés polaires.

Tableau 3. Masses et rendements d'extrait et des fractions de *Cystoseira amentacea*

<i>Extrait/fraction</i>	<i>Masse d'algue (g)</i>	<i>Aspect</i>	<i>Couleur</i>	<i>Masse extrait/fraction (g)</i>	<i>Rendement (%)</i>
<i>Extrait Méthanolique</i>	40 g	Visqueux	Vert foncé	2.43	6.07
<i>Fraction Ether de pétrole</i>	300 g	Visqueux	Vert	1.19	0.40
<i>Fraction Chloroforme</i>	300 g	Solide	Marron foncé	1.07	0.36
<i>Fraction Acétate d'éthyle</i>	300 g	Poudre	Marron Claire	0.362	0.12
<i>Fraction n-Butanol</i>	300 g	Visqueux	Marron	0.300	0.1

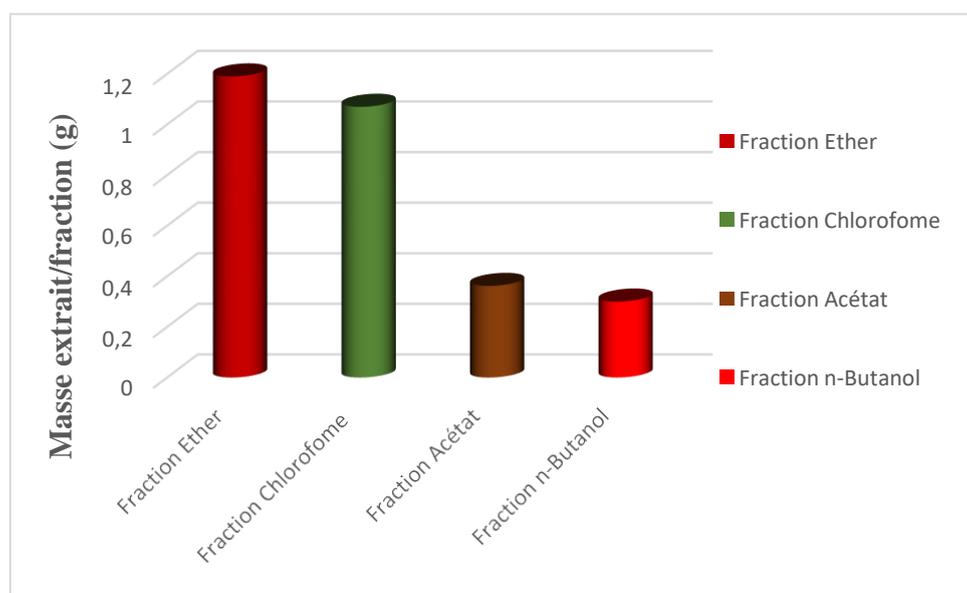


Figure 12. Histogramme schématisant les résultats obtenus pour le fractionnement par extraction liquide-liquide de l'algue *Cystoseira amentacea*

II.4 Screening phytochimique

Le screening phytochimique est une méthode utilisée en pharmacologie pour étudier les constituants chimiques présents dans les plantes ou les extraits de plantes. Cette méthode consiste à tester des extraits ou des fractions d'extraits pour détecter la présence de composés chimiques spécifiques qui pourraient avoir des propriétés thérapeutiques potentielles ou des activités biologiques intéressantes, tels que des alcaloïdes, des flavonoïdes, des terpènes, des tanins, des saponines, des anthocyanes, des composés phénoliques, etc. Il consiste en une série de tests comprenant généralement des réactions chimiques spécifiques pour identifier des classes de composés. La présence de ces derniers est attestée, soit par la formation d'un précipité soit par le changement de coloration du milieu [100].

Il convient de noter que ces tests peuvent également réagir avec d'autres composés présents dans l'extrait végétal, de sorte qu'une confirmation supplémentaire par des techniques d'analyse plus avancées est souvent nécessaire pour confirmer la présence des composés.

II.4.1 Tests de caractérisations

→ Test des tanins

Les tanins sont des composés phénoliques qui peuvent être caractérisés par plusieurs tests de réaction chimique. Ces tests peuvent être utilisés pour caractériser différents types de tanins, tels que les tanins hydrolysables et les tanins condensés [101].

Le test de braymer est choisi dans cette étude pour la caractérisation des tanins. Ce test est basé sur la réaction entre le chlorure ferrique et les tanins pour former un complexe de couleur bleu-vert. Pour effectuer ce test 2 à 3 gouttes de FeCl_3 (5%) diluée dans l'éthanol sont ajoutées dans un tube à essai qui contient 1mL d'extrait et 1mL de l'eau distillée.

✓ L'apparition d'une couleur qui vire vers le bleu-vert confirme la présence des tanins [102].

→ Test des Phlorotannins

Les phlorotannins sont des polymères de Phloroglucinol présents dans les algues brunes, qui peuvent être liés par des liaisons C-C ou C-O-C. Le test des phlobatanins est une méthode qui permet de mettre en évidence la présence de phénols condensés qui peuvent former des complexes rouges ou violets en présence de réactifs spécifiques tels que le chlorure de fer III ou l'acide chlorhydrique [103]. Dans notre étude, nous avons utilisé le test d'acide chlorhydrique en ajoutant 1mL d'HCl (1%) à 1mL d'extrait.

✓ L'apparition d'un précipité rouge ou violet indique la présence des Phlobatanins [102].

→ Test des Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont une classe de composés phénoliques largement distribués dans le règne végétal. Il existe plusieurs tests phytochimiques utilisés pour détecter la présence de flavonoïdes dans les extraits. Les tests les plus couramment utilisés pour les flavonoïdes sont les tests de Shinoda (test au chlorure d'aluminium $AlCl_3$) et le test de Shibata [104]. Nous avons opté dans ce travail au test de Shibata qui est basé sur la réaction des flavonoïdes avec des copeaux de magnésium pour former des complexes de couleur rouge à orange.

Pour effectuer ce test, 1mL d'extrait est dilué avec 1mL éthanol et mélangé avec 3 à 4 gouttes d'HCl concentré et quelques copeaux de magnésium.

- ✓ L'apparition d'une couleur qui vire vers le rouge {flavanols} ou l'orange {flavones} confirme l'existence des flavonoïdes. Cette coloration est due à la formation de complexes entre les flavonoïdes et le magnésium, qui agissent comme un mordant, et le HCl, qui sert de révélateur [102].

→ Test des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont une classe de molécules organiques qui contiennent un ou plusieurs groupes phénoliques (-OH attaché à un cycle aromatique). Ces composés ont une variété de fonctions biologiques, notamment des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses, ce qui en fait des molécules importantes pour la santé humaine.

Il existe plusieurs méthodes pour effectuer le test de screening chimique des composés phénoliques, cependant, le test de Folin-Ciocalteu est le plus couramment utilisé car il est sensible et relativement spécifique pour les composés phénoliques totaux. De plus, il peut être quantitatif, permettant ainsi la détermination de la teneur en composés phénoliques d'un échantillon. Ce test est basé sur la capacité des composés phénoliques à réduire le réactif de Folin-Ciocalteu et à former un complexe bleu intense. Plus la concentration de composés phénoliques est élevée, plus l'intensité de la couleur est importante [105].

Pour réaliser ce test 0.2mL de l'extrait sont ajoutés à 0.8mL de la solution de carbonate de sodium 7.5%, après agitation 1mL du réactif Folin-Ciocalteu est ajouté à la solution.

- ✓ Après 20min d'incubation à l'obscurité de la lumière, la présence de polyphénols est confirmée par l'apparition d'une couleur bleue [102].

→ **Test des stérols**

Les stérols sont des lipides stéroïdiens présents dans les membranes cellulaires de tous les organismes vivants. Le test des stérols est une méthode qui repose sur des réactions chimiques spécifiques qui permettent de générer des composés colorés caractéristiques des stérols. La méthode la plus couramment utilisée pour le test des stérols en chimie des produits naturels et en biochimie est la méthode de Liebermann-Burchard [106]. Cette méthode repose sur l'ajout de 1mL d'acide sulfurique concentré et 1mL du chloroforme à 1mL de l'extrait à tester. Le mélange est chauffé pendant quelques minutes, puis refroidie à température ambiante. Les stérols présents dans l'extrait se dissolvent dans la phase chloroforme et réagissent avec l'acide sulfurique pour former un composé coloré caractéristique. Ces composés sont ensuite observés et comparés à des échantillons de référence pour déterminer la présence de stérols dans l'échantillon testé.

- ✓ L'apparition d'une couleur rouge dans la couche chloroforme indique la présence des stérols [102].

→ **Test des Terpènes**

Les terpènes sont des composés organiques naturels présents dans une grande variété de plantes, d'algues et d'autres organismes. Le test des terpènes est une méthode importante pour la caractérisation de ces composés organiques naturels, en particulier dans le domaine de la chimie des produits naturels [107].

La détection des terpènes peut être déterminée par le test de Liebermann-Burchard précédemment utilisé dans la détection des stérols. En plus de la réaction avec les stérols, les terpènes peuvent également réagir avec les réactifs pour former des composés colorés spécifiques qui peuvent être détectés par le test, et ceci en ajoutant 1mL de l'extrait à tester à 1mL du chloroforme et 1mL de l'anhydride acétique, suivi de l'ajout de 1mL d'acide sulfurique concentré. Le chloroforme et l'anhydride acétique sont utilisés pour dissoudre les terpènes, tandis que l'acide sulfurique concentré est utilisé pour provoquer une réaction de cyclisation des terpènes, produisant ainsi des composés colorés distincts qui peuvent être observés visuellement.

- ✓ La formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet traduit l'existence des Terpénoïdes [102].

Il convient de souligner que le test des terpènes ne permet pas de différencier les différents types de terpènes présents dans un extrait végétal. D'autres méthodes plus spécifiques sont nécessaires pour la détection des diterpènes et des triterpènes.

→ **Test des Diterpènes**

Le test avec l'acétate de cuivre est couramment utilisé pour la détection des diterpènes. Les diterpènes contiennent souvent des groupes fonctionnels qui réagissent avec l'acétate de cuivre pour former des précipités colorés ou des complexes solubles colorés [108].

Le test consiste à mélanger 1mL d'extrait à tester à 1mL d'eau distillée, puis 3 à 4 gouttes d'acétate de cuivre sont ajoutées. L'ajout d'eau distillée au mélange d'extrait et d'acétate de cuivre permet de favoriser cette réaction en créant des conditions de solubilité favorables.

✓ L'apparition d'une couleur verte dans le mélange confirme la présence des diterpènes [102].

→ **Test des Triterpènes**

Le test de Salkowski est une méthode couramment utilisée pour la détection qualitative des triterpènes dans les extraits de plantes. Cette méthode est basée sur la réaction des triterpènes avec l'acide sulfurique concentré pour former un complexe de couleur jaune à rouge caractéristique [109].

Pour réaliser le test de Salkowski, quelques gouttes d'acide sulfurique concentré sont ajoutées à 1mL d'extrait.

✓ Si des triterpènes sont présents dans l'extrait, un complexe de couleur jaune à rouge apparaîtra [102].

→ **Test des sucres**

Il existe plusieurs tests phytochimiques pour détecter la présence de sucres dans les extraits. Les tests les plus couramment utilisés sont les tests de Molisch, de Fehling et de Benedict [110]. Dans cette étude, le choix s'est porté sur le test de Fehling. Le test de Fehling est basé sur la réduction des ions cuivre (Cu^{2+}) en ions cuivreux (Cu^+) par les sucres. Une solution de sulfate de cuivre est mélangée avec une solution de tartrate de sodium et de potassium, puis une solution d'hydroxyde de sodium est ajoutée pour former la solution de Fehling. 1mL d'extrait est ensuite ajouté à 1mL de la solution de Fehling et le mélange est chauffé.

✓ Si des sucres sont présents, ils réduisent les ions cuivre en ions cuivreux, formant un précipité rouge-brun [102].

→ Test des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont une classe de composés organiques hétérocycliques contenant des atomes d'azote et possédant des propriétés pharmacologiques importantes. Pour détecter leur présence dans les extraits, le test de Wagner est couramment utilisé [111].

Cette méthode consiste à mélanger 1mL d'HCL à 1mL d'extrait, et filtrer la solution. Quelques gouttes de réactif de Wagner (solution aqueuse de 1,27 g d'iodure de potassium et 2 g d'iodate de potassium dissous dans 100 ml d'eau distillée) sont ajoutées par la suite au mélange. Lorsque le réactif de Wagner est ajouté, une réaction chimique se produit, entraînant la formation d'un précipité brun-rouge. Cette réaction est due à la formation d'un complexe entre les ions iodure et les alcaloïdes présents dans l'extrait.

✓ L'apparition d'un précipité brun-rouge indique la présence d'alcaloïdes dans l'extrait [102].

→ Test des anthraquinones

Les anthraquinones sont des composés organiques naturels appartenant à la famille des quinones. Elles sont caractérisées par une structure cyclique composée de trois cycles fusionnés : deux cycles benzéniques et un cycle quinone [112]. Les anthraquinones sont couramment détectées par la méthode Bornträger. Elle est basée sur la formation d'un complexe coloré entre les anthraquinones et une solution alcaline.

Pour réaliser ce test, 1mL de chloroforme est ajouté dans un tube à essai contenant 1mL de l'extrait, puis quelques gouttes de solutions NaOH (10%) sont ajoutées et le mélange est agité vigoureusement.

✓ La présence des anthraquinones est confirmée par l'apparition d'une coloration rose, violette ou rouge [102].

II.4.2 Résultats et discussion

L'algue brune *Cystoseira amentacea* est connue pour contenir une grande variété de composés bioactifs tels que des polyphénols, des flavonoïdes, des stérols, des terpènes et des alcaloïdes, qui ont montré des activités pharmacologiques potentielles. Dans cette étude, nous avons utilisé une série de tests de screening chimique pour caractériser les composés bioactifs présents dans l'extrait méthanolique et ses différentes fractions de l'algue brune *Cystoseira amentacea*.

Les groupes chimiques présents dans nos échantillons ont été caractérisés par des réactions en tubes. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 4 selon la notion suivante :

(-) Résultats négatif, (+) Résultat faiblement positif, (++) Résultat positif, (+++) Résultat fortement positif.

Tableau 4. Résultats des tests du screening chimique de l'extrait méthanolique de *Cystoseira amentacea* et ses différentes fractions

<i>Groupes chimiques</i>	<i>Extrait Méthanolique</i>	<i>Fraction Ether de pétrole</i>	<i>Fraction Chloroforme</i>	<i>Fraction Acétate d'éthyle</i>	<i>Fraction n-butanol</i>
<i>Tanins</i>	+	+	+	+	-
<i>Phlorotannins</i>	+	++	+	+	-
<i>Flavonoïdes</i>	+	-	-	+	+
<i>Polyphénols</i>	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Stérols</i>	++	+++	+++	++	+
<i>Terpènes</i>	+	++	-	-	-
<i>Diterpènes</i>	++	+++	++	++	+
<i>Triterpènes</i>	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Anthraquinones</i>	+	+	-	+++	++
<i>Alcaloïdes</i>	+	++	+++	-	-
<i>Sucres</i>	-	-	-	-	-

Les résultats obtenus indiquent une forte diversité de composés bioactifs dans l'algue brune *Cystoseira amentacea* tels que les tanins, les flavonoïdes, les stérols, les terpènes, les phlorotannins, les diterpènes et les alcaloïdes. Les intensités de présence de ces composés varient selon les fractions et sont détaillées ci-dessous.

- Les résultats ont révélé la présence de tanins et de phlorotannins dans différents échantillons à tester, à savoir l'extrait méthanolique, la fraction éther de pétrole, la fraction chloroformique et la fraction d'acétate d'éthyle. Toutefois, ces composés sont absents dans la fraction n-butanol.

La présence de tanins et de phlorotannins dans la fraction éther de pétrole peut sembler surprenante car ces composés sont généralement solubles dans l'eau et les solvants organiques polaires. Cependant, leur présence dans la fraction éther de pétrole peut être due à leur extraction conjointe avec d'autres composés lipophiles présents dans l'algue. En effet,

certains tanins ont une certaine affinité pour les lipides et peuvent se retrouver piégés dans la fraction éther de pétrole lors de l'extraction. De plus, la présence de tanins dans cette fraction peut être liée à leur distribution inégale dans l'algue et leur solubilité variable dans les différents solvants utilisés pour l'extraction en raison de leur structure chimique particulière. Il est également possible que les tanins présents dans la fraction éther de pétrole soient des formes estérifiées, ce qui les rendrait plus lipophiles et donc plus solubles dans ce solvant non polaire.

En outre, il est important de garder à l'esprit que les tests de screening chimique sont des méthodes non sélectives et que la réaction de chlorure ferrique peut également donner une coloration similaire à celle des tanins en réagissant avec d'autres composés présents dans la fraction étherée, tels que les terpènes ou les stéroïdes. Toutefois, cela reste des hypothèses et des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette explication et déterminer la raison précise de la présence de tanins dans la fraction éther de pétrole.

- Les flavonoïdes sont présents avec une faible intensité dans l'extrait méthanolique et dans les fractions acétate d'éthyle et n-butanol, mais ils sont totalement absents dans les fractions éther de pétrole et chloroforme. Ce résultat est tout à fait cohérent. L'absence de flavonoïdes dans les fractions éther de pétrole et chloroforme pourrait s'expliquer par leur faible solubilité dans ces solvants non polaires. Les flavonoïdes sont en effet plus solubles dans les solvants organiques polaires tels que le n-butanol et l'acétate d'éthyle, ce qui explique leur présence dans ces fractions. Cela indique que les flavonoïdes présents dans l'extrait initial sont plus polarisables et que leur solubilité dépend de la polarité du solvant utilisé pour l'extraction.
- Les stérols sont trouvés avec des intensités différentes. Ils sont très importants dans la fraction éther de pétrole et chloroforme, moyennement importants dans l'extrait méthanolique et la fraction acétate d'éthyle, et faiblement présents dans la fraction n-butanol.
- Les terpènes sont détectés uniquement dans la fraction éther de pétrole, avec une intensité importante. Ils sont moins présents dans l'extrait méthanolique, mais totalement absents dans les fractions chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol. En revanche, les diterpènes et les triterpènes sont présents dans l'extrait méthanolique et dans toutes les fractions, cependant, leur présence est plus intense dans la fraction éther de pétrole.

En général, les terpènes, diterpènes et triterpènes sont des composés lipophiles en raison de leur grande partie hydrocarbonée, mais leur solubilité dans les solvants polaires dépend de leur structure chimique. Ces composés présents dans les extraits d'algue peuvent être soit polaires, soit apolaires, en fonction de leur structure chimique. Certains diterpènes et triterpènes peuvent avoir des groupes fonctionnels polaires tels que des groupes hydroxyle

ou des groupes carboxyle, ce qui les rend plus solubles dans les solvants polaires. D'autres diterpènes et triterpènes peuvent être plus apolaires en raison de la présence de groupes alkyle non polaires tels que des groupes méthyle ou éthyle, ce qui les rend plus solubles dans les solvants non polaires tels que l'éther de pétrole et le chloroforme.

- Les alcaloïdes sont détectés avec une forte intensité dans la fraction chloroforme, moyennement importants dans la fraction éther de pétrole, et faiblement présents dans l'extrait méthanolique. En revanche, ils sont totalement absents dans la fraction acétate d'éthyle et la fraction n-butanol.

Les alcaloïdes peuvent être soit polaires soit apolaires, car cela dépend de leur structure chimique. En général, les alcaloïdes ont un noyau azoté et peuvent avoir des groupes fonctionnels polaires comme des groupes hydroxyle, amine ou carboxyle. Cependant, ils peuvent également avoir des chaînes carbonées apolaires ou des cycles aromatiques qui leur confèrent des propriétés apolaires. Il est donc possible que les alcaloïdes présents dans les fractions apolaires de l'algue soient des composés plus lipophiles, c'est-à-dire qu'ils ont une plus grande affinité pour les solvants apolaires. En revanche, les fractions polaires telles que la fraction acétate d'éthyle et n-butanol peuvent ne pas être en mesure de dissoudre ces alcaloïdes apolaires en raison de leur polarité élevée.

- La présence des anthraquinones a été détectée avec des intensités différentes, étant très importante dans les fractions de l'acétate d'éthyle et de n-butanol, à faible intensité dans l'extrait méthanolique et la fraction éther de pétrole, tandis qu'une absence totale a été observée dans la fraction chloroforme.
- Aucun sucre n'a été détecté dans l'extrait méthanolique ni dans toutes les fractions.

Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que l'extrait d'algue brune *Cystoseira amentacea* est riche en composés bioactifs tels que les composés phénoliques, les flavonoïdes, les tannins et phlorotannins, les stérols et les terpènes. Ces composés sont connus pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antimicrobiennes, ce qui suggère que l'extrait d'algue brune pourrait avoir un potentiel thérapeutique et alimentaire intéressant. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer les propriétés biologiques de ces composés et leur potentiel en tant qu'agents thérapeutiques.

II.5 Quantification des composés phénoliques

La quantification des composés phénoliques est une méthode courante utilisée pour évaluer la présence et la quantité de différents composés phénoliques dans un échantillon. Les composés phénoliques totaux, les flavonoïdes et les tannins sont parmi les composés phénoliques les plus couramment quantifiés en raison de leurs propriétés antioxydantes et de leurs effets bénéfiques sur la santé. La quantification des composés phénoliques extraits peut être réalisée par différentes méthodes analytiques telles que la spectrophotométrie et la chromatographie liquide haute performance (HPLC). La spectrophotométrie est l'une des méthodes les plus couramment utilisées car elle est simple, rapide et peu coûteuse. La HPLC est une méthode plus précise et sensible qui permet de séparer et d'identifier différents composés phénoliques individuellement.

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé la méthode de quantification des composés phénoliques en utilisant la spectrophotométrie afin de déterminer la quantité de composés phénoliques totaux, de flavonoïdes et de tannins présents dans l'extrait méthanolique et ses différentes fractions préparées à partir de notre échantillon d'algue.

II.5.1 Dosage des composés phénoliques totaux

II.5.1.1 Principe du dosage

La teneur en composés phénoliques totaux a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu. Cette méthode est couramment utilisée pour quantifier la teneur en composés phénoliques totaux dans un échantillon. Le principe de cette méthode repose sur la capacité des phénols à réduire le réactif de Folin-Ciocalteu, qui est un mélange de réactifs chimiques contenant des ions phosphotungstiques et phosphomolybdiques. Lorsque les phénols sont oxydés, ils réduisent les ions phosphotungstiques et phosphomolybdiques en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. Ce mélange d'oxydes bleus présente une absorption maximale dans la région du spectre UV-Visible à environ 760 nm, qui est utilisée pour mesurer la quantité de phénols présents dans l'échantillon. Pour ce faire, on prépare une courbe d'étalonnage en utilisant des solutions de référence de composés phénoliques de concentrations connues. Ensuite, on mesure l'absorbance de l'échantillon à la même longueur d'onde et on utilise la courbe d'étalonnage pour calculer la quantité de phénols dans l'échantillon [113].

Cette méthode est simple, rapide et peu coûteuse, ce qui en fait une méthode de choix pour quantifier la teneur en composés phénoliques totaux dans un grand nombre d'échantillons. Cependant, il est important de noter que cette méthode ne permet pas de distinguer les différents types de composés phénoliques présents dans l'échantillon et que des interférences peuvent se produire en présence d'autres composants de l'échantillon.

II.5.1.2 Procédure expérimentale

La teneur en composés phénoliques totaux a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu *via* la méthode de dosage sur microplaque adaptée par Muller et al. [113] avec quelques modifications. 0.5mg d'extrait d'algue ont été préalablement dissous dans 1mL de méthanol à la température ambiante. Ensuite, 20uL de la solution d'extrait ont été mélangés à 80uL de carbonate de sodium (Na_2CO_3). Après agitation, 100uL du réactif de Folin-Ciocalteu dilué (1 :10) a été ajoutés, la coloration a été développée pendant 2 heures à l'obscurité à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV.

Le dosage quantitatif des produits phénoliques par le test de Folin-Ciocalteu nécessite tout d'abord l'établissement d'une droite d'étalonnage. Pour établir la droite d'étalonnage de l'acide gallique, une gamme étalon contenant des concentrations connues d'acide gallique, allant de (4.375 à 70 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), dissous dans du méthanol, a été préparée et traitée de la même manière que l'échantillon réel. Huit points expérimentaux ont été réalisés pour tracer la courbe d'étalonnage, chaque point représentant la moyenne de trois analyses.

II.5.1.3 Résultats et discussion

La détermination de la teneur en composés phénoliques totaux dans l'extrait d'algue *Cystoseira amentacea* et ses différentes fractions a été réalisée à l'aide de la méthode de Folin-Ciocalteu. Cette méthode repose sur la réduction des ions phosphotungstate (WO_4^{-2}) et phosphomolybdate (MoO_4^{-2}) présents dans le réactif de Folin-Ciocalteu par les groupes phénoliques oxydables des composés présents dans l'échantillon. Cette réaction chimique conduit à la formation de produits de réduction de couleur bleue.

Les absorbances des échantillons ont été mesurées à une longueur d'onde spécifique et converties en concentrations de composés phénoliques en utilisant une courbe d'étalonnage établie avec de l'acide gallique comme standard (Figure 13).

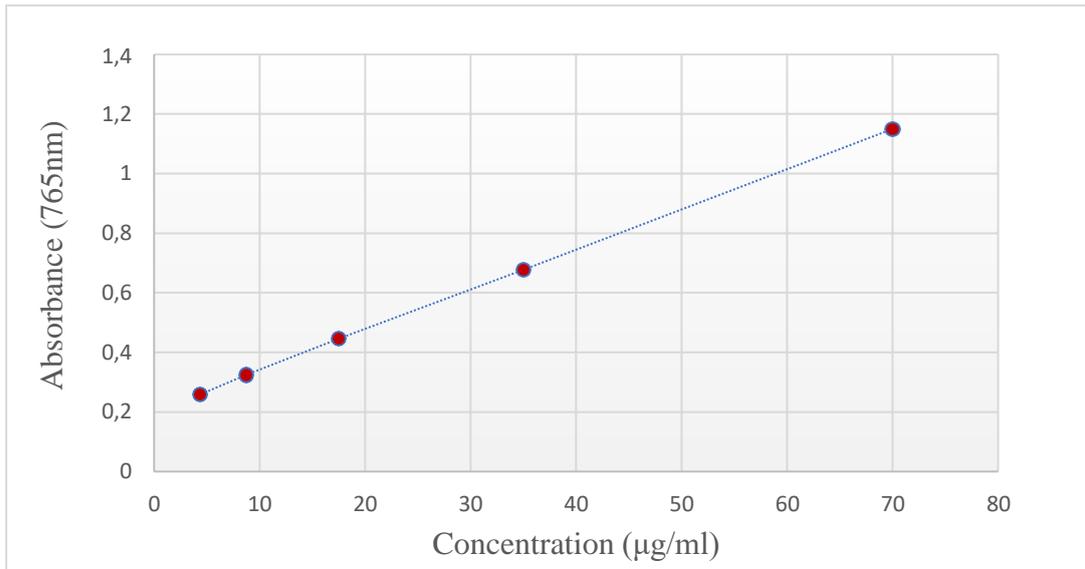


Figure 13. Droite d'étalonnage des solutions standards d'acide gallique de concentrations allant de 4.375 à 70 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ obtenue par le test de Folin-Ciocalteu

La teneur en composés phénoliques équivalente à l'acide gallique est déterminée selon la relation ci-dessous, sachant que la concentration de chaque échantillon à tester équivalente à l'acide gallique est obtenue par extrapolation de la valeur d'absorbance de la solution d'échantillon ayant réagi avec le réactif de Folin-Ciocalteu dans la droite de calibration établie pour l'acide gallique et traité de la même manière que l'échantillon réel.

$$T = (C \times V) / M$$

- T : Taux des composés phénoliques ($\mu\text{g EAG}/\text{mg PS}$).
- C : Concentration d'échantillon équivalente à l'acide gallique.
- V : Volume d'échantillon (ml).
- M : Poids sec d'échantillon d'algue (mg).

Tableau 5. Résultats de la teneur dans l'extrait brut et ses différentes fractions

<i>Extrait</i>	<i>Extrait brut</i>	<i>Fraction Éther de pétrole</i>	<i>Fraction chloroforme</i>	<i>Fraction Acétate</i>	<i>Fraction n- butanol</i>
<i>Teneur en composés phénoliques totaux µg EAG/mg PS</i>	56,3 ± 0.39	53,78 ± 0.36	49,96 ± 1.06	420,26 ± 1.8	92,44± 1.26

AG: Acide gallique, **EAG** : équivalent d'Acide gallique, **PS** : Poids Sec de

Les résultats obtenus ont révélé des variations significatives de la teneur en composés phénoliques entre l'extrait brut de l'algue brune *Cystoseira amentacea* et ses différentes fractions (Figure 14). La fraction acétate d'éthyle a présenté la plus haute teneur en composés phénoliques totaux, avec une valeur de (420,26 ± 1.8 µg EAG/mg.PS) En revanche, la fraction chloroformique a montré la teneur la plus faible en phénols totaux, avec une valeur de (49,96 ± 1.06 µg EAG/mg PS). Les autres échantillons, à savoir la fraction n-butanol, l'extrait brut et la fraction éthérique, ont montré des teneurs respectives de l'ordre de (92,44 ± 1.26), (56,3 ± 0.39) et (53,78 ± 0.36) µg EAG/mg PS.

Une étude menée par Fatiha Grina et al [84] a rapporté que le contenu en composés phénoliques totaux dans l'algue *Cystoseira Amentacea* est de l'ordre de (7.24 ± 0.03 mg PEs/mg extract) une valeur très supérieure à celle trouvée dans notre étude (Extrait Brut) , Ce désaccord peut être dû à différents facteurs, tels que l'origine géographique, la procédure d'extraction et/ou le solvant d'extraction.

Les résultats de dosage des composés phénoliques totaux peuvent ne pas être fiables, car le réactif de Folin-Ciocalteu peut réagir avec d'autres molécules telles que les acides aminés aromatiques, les glucides réducteurs et la vitamine C, ce qui peut entraîner des interférences [114]. De plus, la teneur en composés phénoliques peut varier en fonction de facteurs environnementaux tels que la salinité, la sécheresse et l'exposition solaire, ainsi que de la méthode d'extraction utilisée [115].

Les travaux menés par Gina De La Fuente et al [81]. ont rapporté que, l'extrait éthanolique contenait en effet 20,3 µg CPT/mg d'extrait brut (correspondant à 6,3 mg/g d'algues séchées), alors que dans l'extrait DMSO la teneur en composés phénoliques était de 65,9 µg/mg d'extrait brut (correspondant à 11,3 mg/g d'algues séchées).

Des études antérieures rapporté par Mannino A.M et al [116], montre que, L'extraction des polyphénols a été réalisée avec de l'éthanol à 95 % et le contenu en polyphénols totaux a montré teneur minimale en hiver (moins de 1 mg/g d'algues séchées) à une teneur maximale en été (6 mg/g d'algues séchées).

Ces résultats sont Ceci est probablement dû non seulement à l'approche différente appliquée dans les diverses études, c'est-à-dire aux conditions d'extraction et à la saisonnalité, mais aussi à d'autres facteurs liés à la variabilité des habitats de chaque espèce, tels que l'irradiation, la température et le niveau bathymétrique.

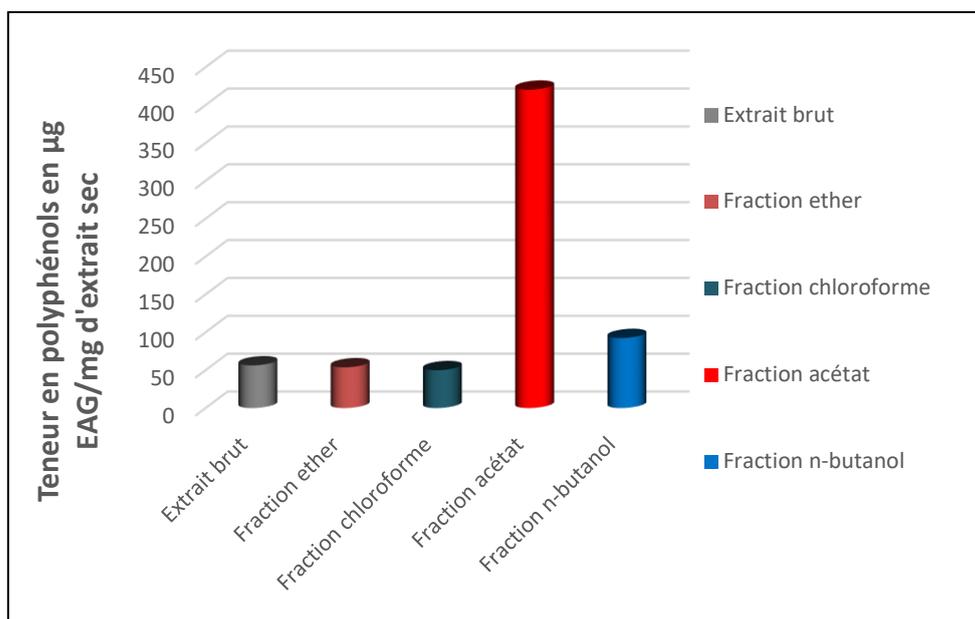


Figure 14. Histogrammes exprimés en (ug.EAG/mg PS), illustrant la teneur en composés phénoliques dans l'extrait brut et ces différentes

Ces résultats démontrent clairement que la composition en composés phénoliques varie selon le solvant d'extraction utilisé et soulignent l'importance de choisir le solvant approprié pour extraire et isoler efficacement les composés phénoliques présents dans les échantillons d'algues brunes, afin de maximiser leur potentiel bénéfique pour diverses applications. En outre, cette analyse quantitative des composés phénoliques fournit des informations précieuses pour comparer la richesse en composés phénoliques des échantillons étudiés, ouvrant ainsi des perspectives prometteuses pour leur utilisation potentielle dans des applications alimentaires, pharmaceutiques ou cosmétiques.

II.5.2 Dosage des flavonoïdes totaux

II.5.2.1 Principe du dosage

Le dosage des flavonoïdes repose sur la formation d'un complexe entre les flavonoïdes présents dans l'échantillon et l'ion Al^{+3} . Cette réaction se produit en présence d'un réactif de complexation, tel que le nitrate d'aluminium. Les flavonoïdes présents dans l'échantillon réagissent avec l'ion Al^{+3} pour former un complexe coloré. La mesure de l'absorbance de ce complexe coloré est réalisée à une longueur d'onde spécifique, généralement à 415 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre. L'absorbance est directement proportionnelle à la concentration en flavonoïdes présents dans l'échantillon [117].

Afin d'obtenir des résultats précis, une courbe d'étalonnage est établie en utilisant des solutions de référence contenant des concentrations connues de flavonoïdes. Les solutions de référence sont traitées de la même manière que l'échantillon réel, en les mélangeant avec le réactif de complexation et en mesurant leur absorbance. En comparant l'absorbance de l'échantillon à la courbe d'étalonnage, il est possible de déterminer la concentration en flavonoïdes dans l'échantillon. La courbe d'étalonnage permet d'établir une relation linéaire entre l'absorbance et la concentration en flavonoïdes, ce qui permet une quantification précise des flavonoïdes présents dans l'échantillon testé. Ce dosage des flavonoïdes est une méthode couramment utilisée pour évaluer la présence et la concentration de ces composés bioactifs dans divers échantillons, tels que les extraits de plantes, les aliments et les produits naturels [118].

II.5.2.2 Procédure expérimentale

La détermination de la teneur en flavonoïdes a été réalisée par la méthode de dosage sur microplaque adaptée par Topic et *al* [119], avec quelques modifications. Pour se faire, 130 μ L de méthanol ont été ajoutés à 50 μ L d'échantillon d'algue, suivis de l'ajout de 10 μ L de potassium d'acétate et 10 μ L de nitrate d'aluminium.

Le mélange a été laissé réagir pendant 40 minutes, permettant ainsi la formation d'un complexe coloré entre les flavonoïdes présents dans l'échantillon et l'ion Al^{+3} du nitrate d'aluminium. La

lecture de l'absorbance a été effectuée à une longueur d'onde de 415 nm. Pour établir une courbe d'étalonnage, des solutions de référence de quercétine de concentrations connues ont été préparées et soumises au même traitement que les échantillons. La concentration en flavonoïdes dans les échantillons d'algue a été calculée en se basant sur la courbe d'étalonnage de la quercétine. Les résultats ont été exprimés en microgrammes d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait).

II.5.2.3 Résultats et discussion

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) qui révèle les flavonoïdes en jaune [120], La quercétine a été utilisé comme étalon. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 430 nm. Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage (Figure 15), ayant l'équation : $Y = 0,002x + 0,009$ / $R^2 = 0,999$

Les analyses quantitatives des flavonoïdes, sont déterminées à partir de l'équation de la régressionlinéaire de la courbe d'étalonnage exprimé en μg équivalent quercitrine.

Les valeurs moyennes de la concentration en flavonoïdes des différents échantillons testés sont représentées dans le (Tableau 6) calculées à partir des valeurs des absorbances à une longueur d'onde de 430 nm.

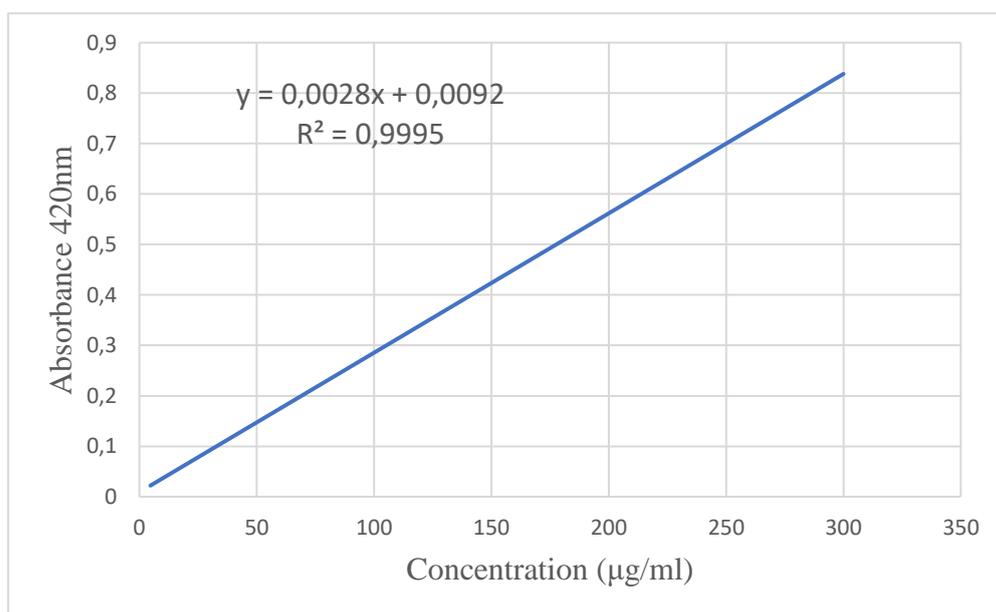


Figure 15. Courbe d'étalonnage de la quercétine

Tableau 6. Résultats de la Teneur en flavonoïdes de l'extraits brut et ces différentes fractions

<i>Extrait</i>	<i>Extrait brut</i>	<i>Fraction éther</i>	<i>Fraction chloroforme</i>	<i>Fraction acétate</i>	<i>Fraction n-butanol</i>
<i>Teneur flavonoïdes µg EQ/mg PS</i>	51.75 ± 0.35	69.50 ± 0.70	158.75 ± 1.76	99.50 ± 1.41	94.25 ± 1.06

Q : quercétine, **EQ** : équivalent de quercétine, **PS** : Poids Sec de l'extrait

Les résultats de la quantification des flavonoïdes indiquent que, tous les échantillons testés montrent la présence de flavonoïdes avec des teneurs varient entre 158.75±1.76 et 51.75±0.35 (µg EQ/mg PS) le taux le plus élevé a été détecté dans la fraction chloroformique (CHCl₃) ce qui indique sa richesse en flavonoïdes avec une teneur de 158.75 ± 1.76 µg EQ/mg PS, suivi par les fractions acétate d'éthyle et n-butanol avec des teneurs respectives de l'ordre de 99.50 ± 1.41 et 94.25 ± 1.06 µg EQ/mg PS. Tandis que la fraction étherique et l'extrait brut ont enregistré des teneurs respectives de l'ordre (69.50 ± 0.70), (51.75 ± 0.35 µg EQ/mg PS).

Les résultats ont montré qu'il existait des différences significatives dans la teneur en flavonoïdes de l'extrait brut d'algue brune *Cystoseira amentacea* et de ses différentes fractions.

D'après ces résultats, le chloroforme est le meilleur solvant d'extraction qui a permis d'obtenir la teneur la plus élevée en flavonoïdes par rapport aux autres échantillons.

Les résultats du dosage des flavonoïdes sont représentés sous forme d'histogramme comme le montre la (Figure 16):

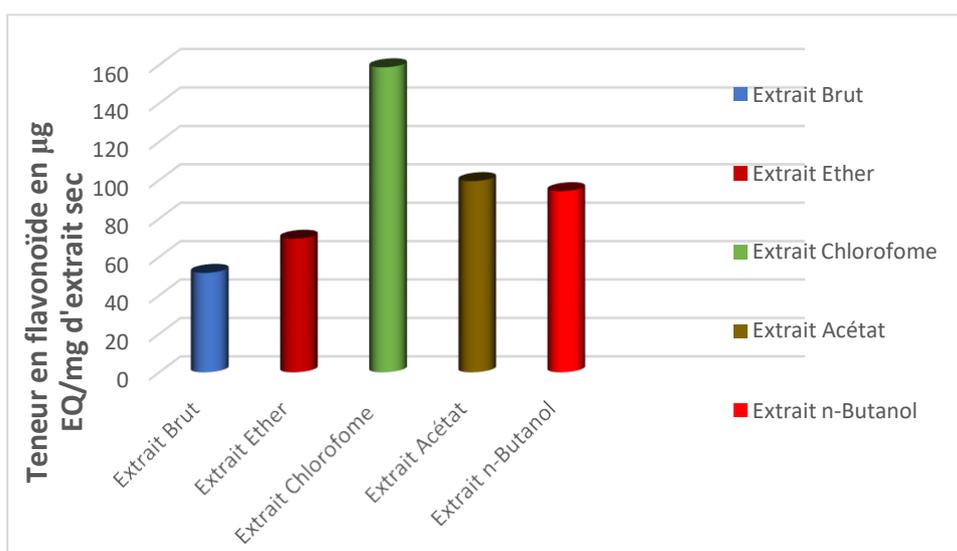


Figure 16. Histogrammes de la quantité en (µg EQ/mg PS) des flavonoïdes dans l'extrait brut et ces différentes fractions

Les travaux menés par Gina De La Fuente et al [81] ont rapporté que, l'extrait éthanolique présente une teneur en flavonoïdes de l'ordre 20,3 μg CFT/mg d'extrait brut (3.1 ± 0.48), alors que dans l'extrait DMSO teneur de 65,9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ d'extrait brut (15.8 ± 0.51).

Une autre étude menés par Fatiha Grina [84] a rapporté que le contenu en flavonoïdes totaux dans l'algue *Cystoseira amentacea* est de l'ordre de ($8.53 \pm 0.02\text{mg PS}/\text{mg extract}$) une valeur très supérieure à celle trouvée dans notre étude (extrait brut), Ce désaccord peut être dû à différents facteurs, tels que l'origine géographique, la procédure d'extraction et/ou le solvant d'extraction.

Chapitre III

Potentialités pharmacologiques de *Cystoseira amentacea* : Activités antioxydantes, antimicrobiennes et enzymatiques

III. 1 Introduction

Les extraits bruts de *Cystoseira amentacea* ont suscité un intérêt croissant en raison de leurs potentialités pharmacologiques, notamment pour leurs activités antioxydantes et antimicrobiennes. En effet, les composés phénoliques, les flavonoïdes et les terpènes présents dans ces extraits ont été identifiés comme des composés actifs responsables de ces activités biologiques. Ces propriétés pharmacologiques des extraits bruts de *Cystoseira amentacea* pourraient être utilisées dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques naturels pour le traitement de maladies associées au stress oxydatif et aux infections bactériennes. Ainsi, la caractérisation de ces extraits bruts et l'identification de leurs composés actifs pourraient conduire à de nouvelles applications thérapeutiques prometteuses. Dans cette étude, nous avons évalué les potentialités pharmacologiques des extraits bruts de *Cystoseira amentacea* en termes d'activités antioxydante et antimicrobienne et l'activité antidiabétique.

III. 2 Evaluation des activités antioxydantes

Il existe plusieurs méthodes qui ont été mises au point pour l'évaluation in vitro de l'activité antioxydante d'un échantillon. Ces méthodes impliquent généralement la combinaison d'espèces oxydantes, telles que des radicaux libres, avec des échantillons contenant des antioxydants capables d'inhiber la formation de radicaux libres. Ces antioxydants peuvent agir selon deux principaux mécanismes : soit par transfert d'atome d'hydrogène, soit par transfert d'électron [121].

Il est important de noter qu'aucune méthode unique ne peut fournir une évaluation complète du profil antioxydant d'un échantillon. Il est donc recommandé d'utiliser plusieurs tests chimiques complémentaires pour obtenir une vue d'ensemble de l'activité antioxydante. Dans notre étude, nous avons choisi d'employer cinq tests chimiques différents afin de caractériser de manière approfondie l'activité antioxydante de nos échantillons, à savoir, le test de piégeage des radicaux DPPH[•], le test de piégeage du radical-cation ABTS^{•+}, le test de capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC), le test du pouvoir réducteur (FRAP) et le test de réduction par la formation du complexe Fe²⁺ Phenanthroline.

III. 2.1 Test de piégeage du radical libre DPPH •

III. 2.1.1 Description de la méthode

Le DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable contenant des électrons non appariés au niveau moléculaire. Contrairement à d'autres radicaux, les molécules de radical DPPH• ne forment pas de dimères et restent sous forme monomérique relativement stable à température ambiante. L'utilisation de ce radical offre une méthode simple et rapide pour évaluer l'activité de piégeage des antioxydants.

Le principe de la méthode DPPH• repose sur la réduction du radical DPPH• dans des solutions alcooliques en présence d'un donneur d'hydrogène (HA), impliquant à la fois le transfert d'un atome d'hydrogène et le transfert d'électron. Lors de ce test, les antioxydants présents dans l'échantillon réduisent le radical DPPH•, initialement de couleur violette, en DPPH-H non radicalaire de couleur jaunâtre (Figure 17). L'intensité de la couleur formée lors de la réaction est directement liée à la capacité des antioxydants à neutraliser le radical DPPH• présent dans le milieu. Cette réaction peut être quantifiée en mesurant l'absorbance de la solution à une longueur d'onde de 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

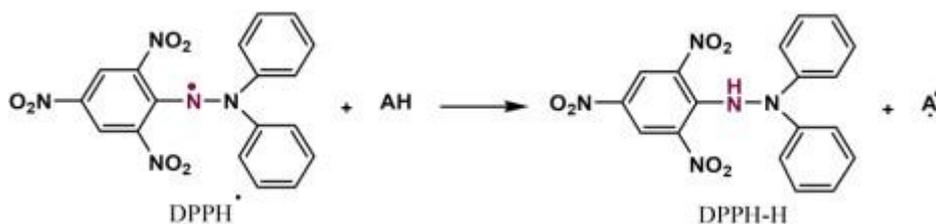


Figure 17. Réduction du radical DPPH• en présence d'un antioxydant

III. 2.1.2 Procédure expérimentale

La capacité antiradicalaire de l'extrait brut de *Cystoseira amentacea* et de ses différentes fractions a été déterminée par la méthode DPPH adaptée par M.S. Blois [122]. Pour réaliser le test, 40 µL de chaque solution ont été mélangés avec 160 µL d'une solution méthanolique de DPPH à 0,004% (p/v). Les mélanges ont été incubés dans l'obscurité et à température ambiante pendant 30 minutes. Simultanément, une solution blanc contenant 40 µL de méthanol et 160 µL de solution DPPH a été préparée dans les mêmes conditions. L'activité antiradicalaire a été évaluée en mesurant l'absorbance des échantillons à 517 nm à l'aide d'une microplaque.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition I % selon la formule suivante :

$$I \% = \frac{Abs_{Blanc} + Abs_{\text{échantillon}}}{Abs_{Blanc}} \times 100$$

- **I%** : Pourcentage d'inhibition de DPPH.
- **Abs Blanc** : Absorbance du blanc.
- **Abs Echantillon** : Absorbance de l'extrait.

III. 2.1.3 Résultats et discussion

L'analyse des résultats montre que l'augmentation de la concentration a fait augmenter le pourcentage d'inhibition, L'interprétation des résultats de l'activité antiradicalaire par la méthode de DPPH* est exprimée en concentration efficace (CE₅₀). Ce paramètre est défini comme étant la concentration d'antioxydant qui provoque une perte de 50% de l'activité de DPPH* [123].

Toutes les fractions testées, à l'exception de l'extrait brut et de la fraction n-butanol, ont révélé une activité antioxydante significative avec des CE₅₀ inférieures à 40 µg/ml. En particulier, la fraction éther de pétrole a présenté une activité de (22,72 ± 2,14 µg/ml), la fraction chloroforme a montré une activité de (29,82 ± 1,24 µg/ml), et la fraction acétate d'éthyle a montré une activité de (36,12 ± 3,33 µg/ml). Ces résultats soulignent l'importante activité antioxydante de ces fractions. Cependant, en comparaison avec les antioxydants standards, tous les échantillons testés se sont révélés moins actifs.

Tableau 7. Variation des taux de piégeage du DPPH• en fonction des différentes concentrations des échantillons testés

	12,5	25	50	100	200	400	800	CE ₅₀ (μ/ml)
<i>Extrait brut</i>	NA	6,02 ± 1,18	11,56 ± 1,94	25,47 ± 1,43	47,15 ± 3,37	73,13 ± 0,18	81,26 ± 1,85	242,43 ± 7,21
<i>Fraction ether</i>	34,48 ± 3,81	57,58 ± 2,17	80,14 ± 0,74	83,50 ± 0,37	86,51 ± 0,57	86,51 ± 0,27	SAT	22,72 ± 2,14
<i>Fraction chloroforme</i>	29,77 ± 3,01	47,80 ± 0,57	70,25 ± 1,14	81,85 ± 0,62	SAT	SAT	SAT	29,82 ± 1,24
<i>Fraction acétate</i>	25,64 ± 6,86	40,02 ± 7,72	62,70 ± 0,71	79,44 ± 2,45	83,44 ± 0,57	SAT	SAT	36,12 ± 3,33
<i>Fraction n.butanol</i>	1,95 ± 2,76	8,39 ± 1,15	13,79 ± 1,89	27,34 ± 1,39	48,48 ± 3,29	73,81 ± 0,17	81,73 ± 1,80	238,95 ± 3,38
	0.78125	1.5625	3.125	6.25	12.5	25	50	CE₅₀ (μ/ml)
<i>Trolox</i>	6.42 ± 0.91	13.33 ± 2.14	30.19 ± 0.67	61.48 ± 2.98	87.16 ± 0.28	88.46 ± 0.11	87.72 ± 0.47	5.12 ± 0.21
<i>Acid Ascorbique</i>	0.31 ± 1.02	12.90 ± 0.28	29.69 ± 0.39	76.67 ± 0.37	84.94 ± 0.84	87.78 ± 0.49	86.36 ± 0.21	4.39 ± 0.01

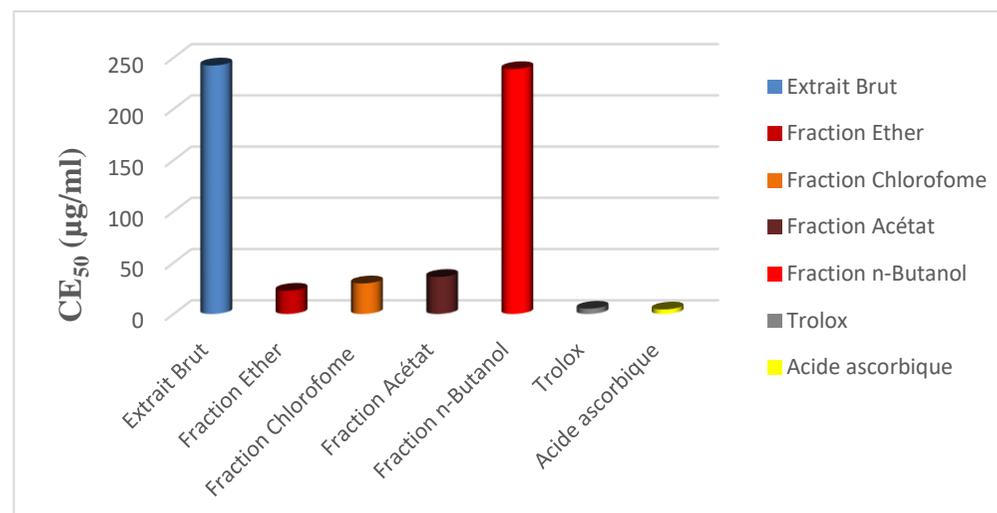


Figure 18. Comparaison des valeurs de CE50 de l'extrait brut, des fractions et des antioxydants standards

III. 2.2 Piégeage du radical $ABTS^{\bullet+}$

III. 2.2.1. Description de la méthode

Le principe du test de mesure de l'activité anti-radicalaire par la méthode ABTS repose sur la réduction du cation radicalaire $ABTS^{\bullet+}$ et la décoloration subséquente de la solution. Lorsque le radical $ABTS^{\bullet+}$ est réduit, il est converti en une forme non radicalaire, ce qui entraîne une diminution de l'absorbance à 734 nm. Cette diminution de l'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre et est directement proportionnelle à la concentration d'antioxydants présents dans l'échantillon [124].

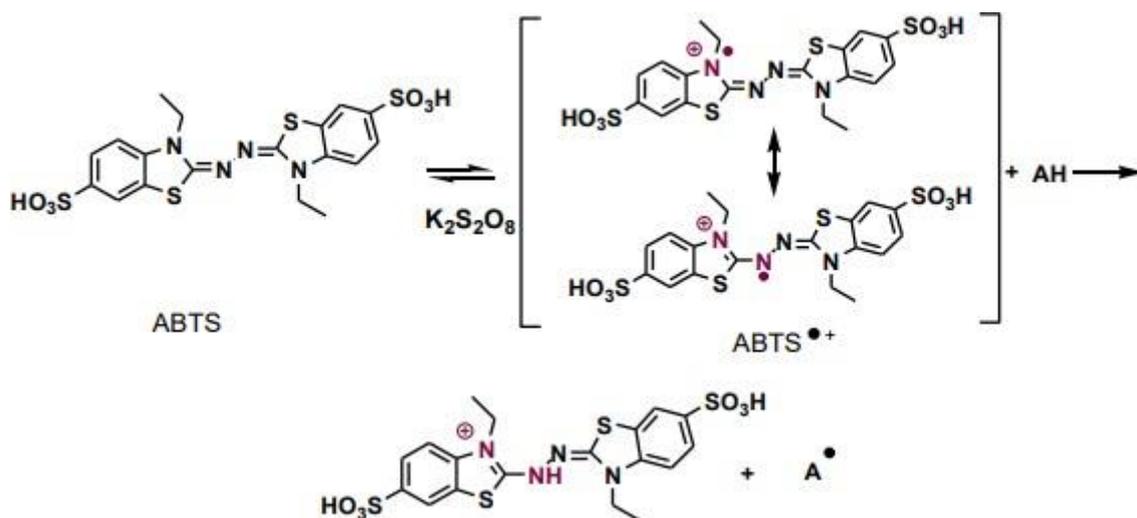


Figure 19. Génération de cations radicaux $ABTS^{\bullet+}$ à l'aide de persulfate de potassium et sa réaction avec l'antioxydant AH

III. 2.2.2 Procédure expérimentale

L'activité de piégeage de l' $ABTS^{\bullet+}$ a été déterminée selon la méthode décrite par R. Re et al. [125], avec de quelques modifications. Pour générer le radical cationique $ABTS^{\bullet+}$, une réaction a été réalisée entre 7 mM d'ABTS et 2,45 mM de persulfate de potassium. Le mélange a été incubé dans l'obscurité à température ambiante pendant 12 à 16 heures jusqu'à l'obtention d'une solution de couleur bleu-verdâtre. Ensuite, l'absorbance de la solution a été mesurée à une longueur d'onde de 734 nm et diluée avec du méthanol pour atteindre une absorbance de $0,70 \pm 0,02$. Pour effectuer le test, 160 μ L de la solution d' $ABTS^{\bullet+}$ sont mélangés avec 40 μ L de chaque échantillon à tester, ainsi que des échantillons de contrôle positifs contenant du (trolox et acide ascorbique) à différentes concentrations. Le mélange est ensuite incubé dans l'obscurité à température ambiante pendant 10 minutes. Après incubation, les absorbances sont mesurées à 734 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits. En comparant les valeurs d'absorbance

obtenues avec un blanc (contrôle), les pourcentages d'inhibition pour chaque concentration sont calculés à l'aide de l'équation suivante :

$$ABTS \text{ inhibition } \% = \frac{Abs_{Contrôle} + Abs_{échantillon}}{Abs_{Contrôle}} \times 100$$

- **Abs échantillon** : Absorbance à 734 nm du mélange réactionnel (échantillon + ABTS).
- **Abs contrôle** : Absorbance à 734 nm du mélange sans échantillon (méthanol + ABTS)

III.2.2.3 Résultats et discussion

Comme décrit précédemment pour le test DPPH, la capacité de l'extrait brut et ces différentes fractions à inhiber le radical ABTS^{•+} obtenu à partir d'ABTS est exprimé par concentration efficace (CE₅₀).

Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode ABTS ont montré que la fraction éther de pétrole (4,19 ± 0,19 µg/ml) et la fraction chloroforme (5,61 ± 0,47 µg/ml) de l'algue *Cystoseira amentacea* présentaient une activité antioxydante plus élevée que la fraction n-Butanol (21,44 ± 0,58 µg/ml) et l'extrait brut (22,59 ± 0,16 µg/ml).

Ces résultats sont en bon accord avec les résultats du test DPPH. Cette similitude est certainement due aux mécanismes réactionnels mis en jeu.

Tableau 8. Variation des taux de piégeage de l'ABTS^{•+} en fonction des différentes concentrations des échantillons

	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	CE₅₀ (µg/ml)
Extrait brut	16,10 ± 6,43	23,42 ± 2,89	39,09 ± 2,50	52,24 ± 1,09	72,53 ± 3,97	90,03 ± 1,55	SAT	22,59 ± 0,16
Fraction éther	43,71 ± 2,29	62,09 ± 1,78	92,95 ± 0,21	SAT	SAT	SAT	SAT	4,17 ± 0,19
Fraction chloroforme	41,60 ± 2,25	52,46 ± 1,87	72,57 ± 3,58	92,77 ± 0,74	SAT	SAT	SAT	5,61 ± 0,47
Fraction acétate	SAT	SAT	SAT	SAT	SAT	SAT	SAT	SAT
Fraction n.butanol	22,64 ± 9,22	25,58 ± 18,64	36,88 ± 1,42	55,14 ± 1,39	92,15 ± 0,19	92,78 ± 0,29	93,45 ± 1,33	21,44 ± 0,58
	0.78125	1.5625	3.125	6.25	12.5	25	50	CE₅₀ (µg/ml)
Trolox	14.74 ± 0.37	26.15 ± 0.65	51.70 ± 1.51	89.72 ± 0.67	92.89 ± 0.19	92.89 ± 0.19	91.84 ± 1.19	3.21 ± 0.06
Acide Ascorbique	13.43 ± 0.82	28.76 ± 0.67	52.94 ± 0.94	93.21 ± 0.11	93.08 ± 0.19	92.40 ± 0.88	92.96 ± 0.11	3.04 ± 0.05

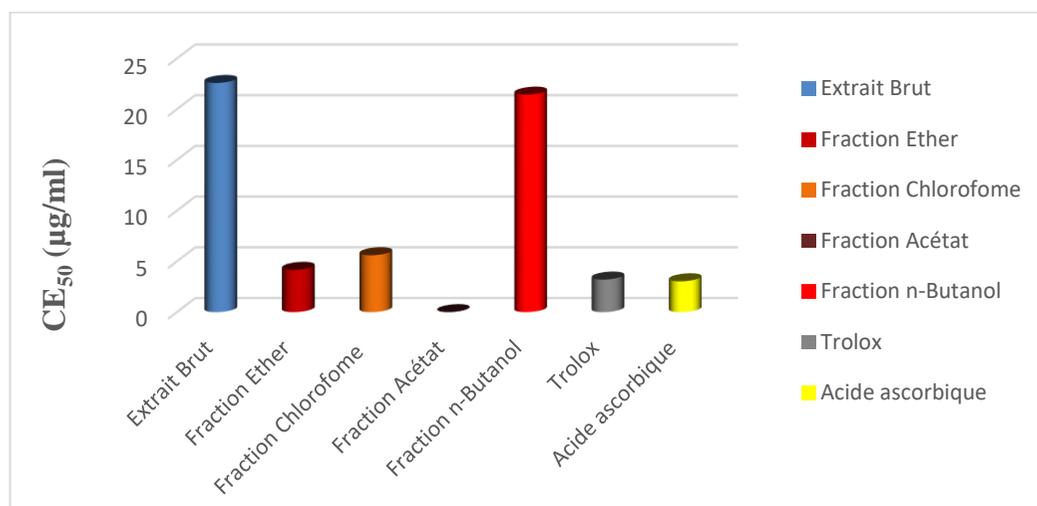


Figure 20. Comparaison des valeurs de CE₅₀ de l'extrait brut, des différentes fractions et des antioxydants standards

III. 2.3 Test de détermination du pouvoir réducteur FRAP

III. 2.3.1 Principe de la méthode

Le pouvoir réducteur de l'extrait est étroitement lié à son activité antioxydante. Le principe de la méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) repose sur la capacité des antioxydants présents dans un échantillon à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ détecté à une longueur d'onde de 700 nm. Initialement, le fer ferrique présente une couleur jaune, mais il se réduit en présence d'un agent donneur d'électrons, entraînant un changement de couleur vers un bleu clair. Ce changement de couleur est proportionnel à l'effet antioxydant des extraits. L'intensité de l'absorbance est proportionnelle à la capacité réductrice des antioxydants présents dans l'échantillon. Ainsi, plus l'absorbance est élevée, plus l'activité antioxydante est importante [126].

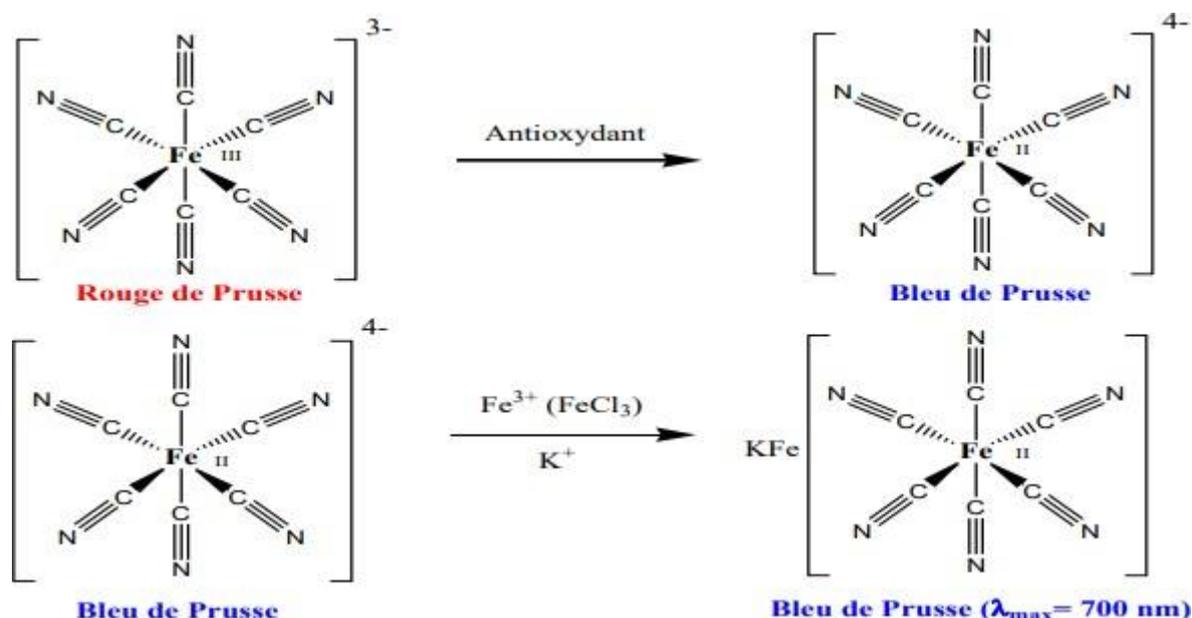


Figure 21. Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyl-s-tri-azine ferrique $\text{Fe}(\text{III})$ -TPTZ et un antioxydant

III. 2.3.2 Procédure générale

L'activité réductrice de chaque extrait de *Cystoseira amentacea* est déterminée selon la méthode de Oyaizi [127] avec quelques modifications mineures. Dans cette méthode, 10 μL d'extrait sont mélangés avec 40 μL de solution tampon phosphate (pH 6,6), puis 50 μL de ferricyanure de potassium (1%) ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) sont ajoutés. Le mélange est ensuite incubé à 50°C pendant 20 minutes. Après l'incubation, 50 μL d'acide trichloroacétique (TCA) (10%), 40 μL d'eau et 10 μL de chlorure de ferrique (FeCl_3) (0,1%) sont ajoutés. Les valeurs d'absorbance sont ensuite

mesurées à 700 nm, et les résultats peuvent être exprimés en tant que valeurs FRAP en utilisant la formule suivante:

$$\text{Valeur FRAP} = \frac{\text{Abs}_{\text{échantillon}} + \text{Abs}_{\text{Contrôle}}}{\text{Abs}_{\text{standard}} - \text{Abs}_{\text{Contrôle}}} \times 100$$

- **Abs échantillon** : Absorbance a 700 nm de l'échantillon
- **Abs Standard** : Absorbance a 700 nm du standard

III.2.3.3 Résultats et discussion

Les résultats obtenus avec ce test diffèrent de ceux obtenus avec la méthode de piégeage du radical DPPH.

Ces résultats montrent que la fraction acétate d'éthyle de l'espèce *Cystoseira amentacea* présente un pouvoir antioxydant plus élevé que les autres fractions avec une valeur de $A_{0,5}$ de $(3,63 \pm 0,24 \mu\text{g/ml})$, suivie par la fraction éther de pétrole avec une valeur de $(13,15 \pm 0,40 \mu\text{g/ml})$, et enfin les fractions n-Butanol et chloroforme avec des valeurs respectives de $(30,98 \pm 0,44 \mu\text{g/ml})$ et $(41,85 \pm 1,52 \mu\text{g/ml})$.

Malgré le pouvoir réducteur important observé dans les différentes fractions, leurs valeurs de $A_{0,5}$ restent inférieures à celles enregistrées par l'antioxydant de référence, l'acide ascorbique $(3,62 \pm 0,29 \mu\text{g/ml})$, à l'exception de la fraction acétate qui a montré un excellent résultat avec un pouvoir réducteur similaire à celui de l'acide ascorbique $(3,63 \pm 0,24 \mu\text{g/ml})$ et supérieur à celui du trolox $(5,25 \pm 0,20 \mu\text{g/ml})$.

Tableau 9. Variation des absorbances en fonction des différentes concentrations des échantillons

	<i>0.78125</i>	<i>1.5625</i>	<i>3.125</i>	<i>6.25</i>	<i>12.5</i>	<i>25</i>	<i>50</i>	<i>A_{0,5}(µg/ml)</i>
<i>Extrait brut</i>	0,10 ± 0,05	0,14 ± 0,00	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,32 ± 0,02	>50
<i>Fraction ether</i>	0,15 ± 0,00	0,18 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,48 ± 0,01	0,83 ± 0,05	0,95 ± 0,22	13,15± 0,40
<i>Fraction chloroforme</i>	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,09	0,21 ± 0,02	0,28 ± 0,03	0,39 ± 0,07	0,57 ± 0,02	41,85 ± 1,52
<i>Fraction acétate</i>	0,22 ± 0,02	0,29 ± 0,04	0,45 ± 0,03	0,63 ± 0,02	0,73 ± 0,49	0,95 ± 0,22	1,22 ± 0,04	3,63 ± 0,24
<i>Fraction n.buatnol</i>	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,25 ± 0,04	0,37 ± 0,04	0,41 ± 0,00	0,73 ± 0,07	30,98 ± 0,44
	0.0976	0.195	0.390	0.781	1.562	3.125	6.25	A_{0,5}(µg/ml)
<i>Trolox</i>	0,07 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,13 ± 0,00	0,19 ± 0,02	0,28 ± 0,05	0,60 ± 0,04	5,25 ± 0,20
<i>Acid ascorbique</i>	0,07 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,47 ± 0,03	0,79 ± 0,09	3,62 ± 0,29

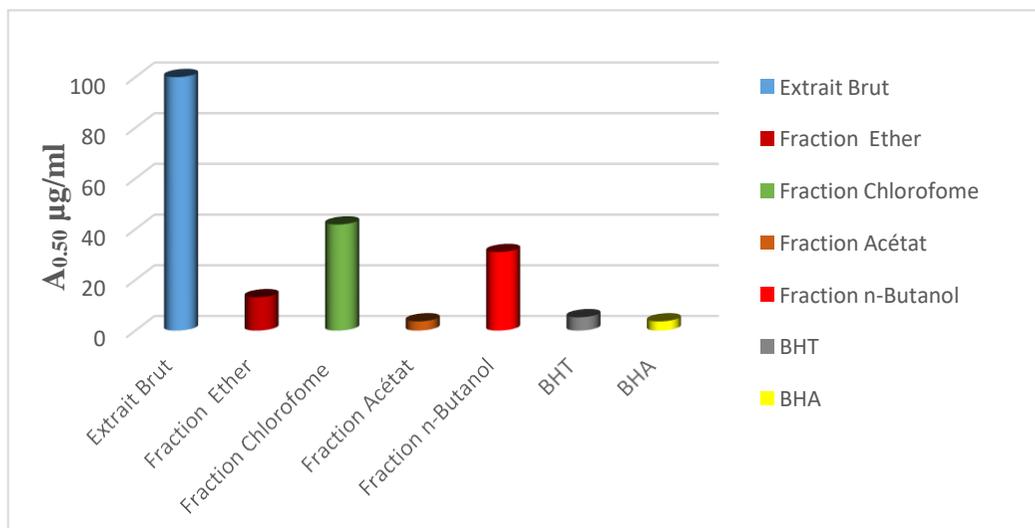


Figure 22. Comparaison des valeurs d'A_{0.50} de l'extrait brut, des Fractions et des antioxydants standards

III. 2.4 Capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

III. 2.4.1 Description de la méthode

La méthode CUPRAC implique la réduction du complexe de cuivre (II) (Neocuproïne) (Cu(II)-Nc) en présence d'un antioxydant, ce qui conduit ainsi à la formation du complexe chromogène de cuivre (I) (Neocuproïne) (Cu(I)-Nc) de couleur jaune orangé montrant une absorption maximale à 450 nm (Figure 23). Dans cette réaction, les groupes Ar-OH des antioxydants phénoliques réactifs sont essentiellement oxydés en quinones correspondantes (Ar)-O [128].

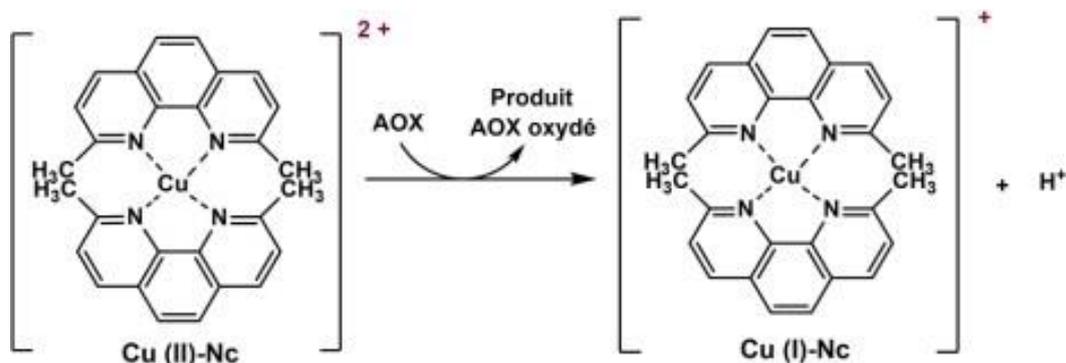


Figure 23. Réduction du complexe chromogène de (Neocuproïne) (Cu(II)-Nc)

III. 2.4.2 Procédure expérimentale

La réduction du cuivre a été déterminée par la méthode CUPRAC décrite par Apak et al [129]. Dans une microplaque de 96 puits, 50 μ L de chaque échantillon à tester à différentes concentrations ont été mélangés avec 50 μ L Cu (II) (10 mM), 50 μ L Neocuproïne (7,5 mM), et 60 μ L de solution tampon NH₄Ac (1 M, pH = 7,0). Après 60 min d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance a été mesurée à 450 nm. La capacité de réduction des échantillons a été comparée à celles du BHA et BHT. Les résultats ont été calculés à titre d' $A_{0,5}$ (μ g/ml) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

III. 2.4.3 Résultats et discussion

Les résultats de l'activité antioxydante par la méthode CUPRAC (tableau 10) indique que l'extrait brut présente la valeur $A_{0,5}$ la plus élevée ($139,95 \pm 2,12 \mu$ g/ml), suivie par la fraction chloroforme et la fraction n-Butanol ($43,62 \pm 0,96 \mu$ g/ml) et ($24,20 \pm 0,75 \mu$ g/ml) respectivement. La plus faible valeur est obtenue par la fraction acétate ($15,19 \pm 0,46 \mu$ g/ml), suivie de près par la fraction étherique ($17,35 \pm 0,08 \mu$ g/ml). Ces valeurs se rapprochent de celles obtenues avec la méthode du pouvoir réducteur FRAP.

Tableau 10. Variation des absorbances en fonction des différentes concentrations des échantillons

	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	A _{0.50} µg/ml
<i>Extrait brut</i>	0,10 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,19 ± 0,00	0,22 ± 0,01	0,36 ± 0,04	0,65 ± 0,05	139,95 ± 2,12
<i>Fraction éther</i>	0,15 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,61 ± 0,42	0,87 ± 0,07	1,66 ± 0,07	2,87 ± 0,02	17,35 ± 0,08
<i>Fraction chloroforme</i>	0,15 ± 0,03	0,17 ± 0,04	0,20 ± 0,05	0,21 ± 0,00	0,62 ± 0,02	1,06 ± 0,84	2,45 ± 0,11	43,62 ± 0,96
<i>Fraction acétate</i>	0,22 ± 0,02	0,29 ± 0,07	0,38 ± 0,03	0,92 ± 0,03	1,36 ± 0,08	1,75 ± 0,44	2,54 ± 0,02	15,19 ± 0,46
<i>Fraction n.buatnol</i>	0,19 ± 0,02	0,17 ± 0,09	0,41 ± 0,07	0,50 ± 0,00	0,72 ± 0,02	1,48 ± 0,07	2,18 ± 0,12	24,20 ± 0,75
<i>BHT</i>	0.19 ± 0.01	0.33 ± 0.04	0.66 ± 0.07	1.03 ± 0.07	1.48 ± 0.09	2.04 ± 0.14	2.32 ± 0.28	9.62 ± 0.87
<i>BHA</i>	0.46 ± 0.00	0.78 ± 0.01	1.34 ± 0.08	2.36 ± 0.17	3.45 ± 0.02	3.76 ± 0.03	3.93 ± 0.01	3.64 ± 0.19

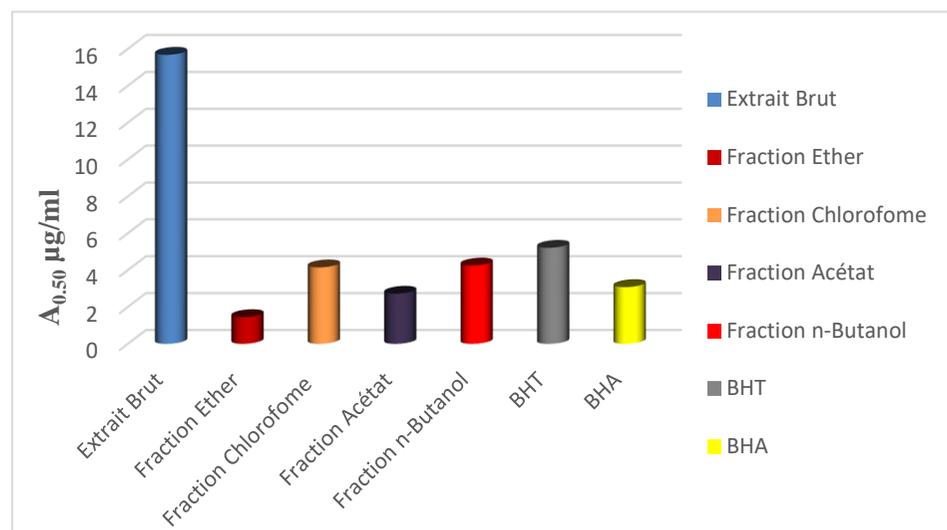


Figure 24. Comparaison des valeurs d'A_{0.50} de l'extrait brut, des Fractions et des antioxydants standards

III. 2.5 Activité de réduction par la formation du complexe Fe²⁺-Phenanthroline

III. 2.5.1 Description de la méthode

Cette activité est basée sur la formation du complexe Fe²⁺- phenanthroline à partir du fer aqueux du fer sous sa forme ferreuse réduite (Fe²⁺) qui peut être déterminé par spectrophotomètre et 1,10-phenanthroline (synonyme= orthophénanthroline), en solution acide (PH 3-4) Figure (25)

On peut citer ce complexe sous le nom de férroïen , il est de couleur rouge-orangée foncé , c'est l'indicateur d'oxydoréduction le plus couramment utilisé en chimie. cet ion complexe octaédrique est soluble et stable en solution aqueuse la mesure de son absorbance et à 510 nm dans le spectrophotomètre des microplaques [130].

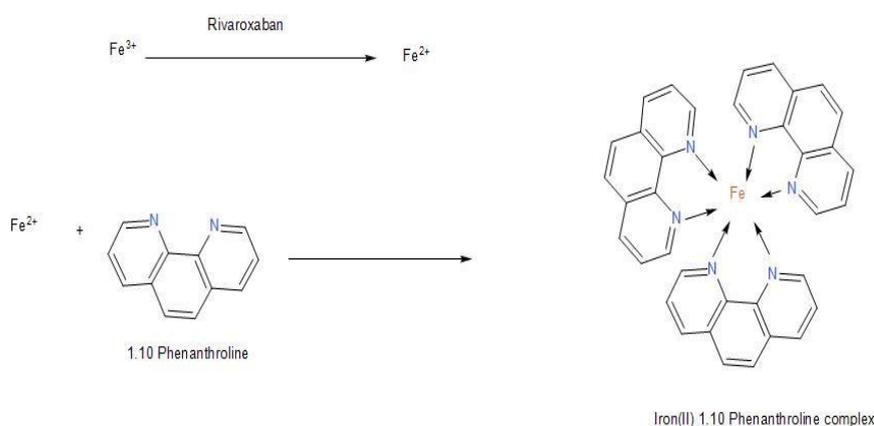


Figure 25. Formation du complexe Fe²⁺- phenanthroline à partir du fer aqueux

III. 2.5.2 Procédure générale

L'activité de réduction par la formation du complexe Fe²⁺ - phenanthroline des échantillons est déterminé par la méthode décrite par (szyddlowska-czermiaka,2008) [131].

10 ul de chaque extrait et 50 ul de FeCl₃ (0.2%) est ajouter dans les puits de micro-plâtre, 30 ul phenanthroline (0.5%) a été rajouter à la solution et finit par 110 ul MeOH, sans oublier le blanc (selon la même méthode sauf l'extrait on le remplace par le méthanol). Le mélange a été agité fortement et incubé pendant 20 min dans l'étuve a une température de 30°C, puis on mesure l'absorbance à une longueur d'onde de 510 nm.

Les résultats ont été calculés en A_{0.5} (ug/ml), ce qui ressemble à une concentration présentant une absorbance de 0.50. Les standards utilisés dans les mêmes conditions réactionnelles sont : BHT et BHA.

III. 2.5.3 Résultats et discussion

Notre résultats montrent que la fraction éther de pétrole de l'espèce *Cystoseira amentacea* possède un pouvoir antioxydant plus élevé que les autres fractions avec une valeur de $A_{0,5}$ de $(1,45 \pm 0,07 \mu\text{g/ml})$, suivie par la fraction acétate d'éthyle avec une valeur de $(2,72 \pm 0,38 \mu\text{g/ml})$, et enfin les fractions chloroforme et n-Butanol avec des valeurs respectives de $(4,15 \pm 0,40 \mu\text{g/ml})$ et $(4,25 \pm 0,93 \mu\text{g/ml})$, alors que l'extrait brut présente un pouvoir antioxydant le plus bas par rapport aux fractions avec une valeur $(15,68 \pm 1,93 \mu\text{g/ml})$.

A travers nos précédents résultats, le pouvoir antioxydant observé est important dans les différentes fractions, la valeur $A_{0,5}$ de la fraction éther de pétrole et acétate d'éthyle est inférieure à celles enregistrées par l'antioxydant de référence, BHA ($3,08 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$) et BHT ($5,21 \pm 0,27 \mu\text{g/ml}$) ce qui montre que ces deux fractions sont plus actives.

Tandis que la fraction chloroforme et n-Butanol qui a montré un excellent résultat avec un pouvoir antioxydant inférieur à celui de BHA ($3,08 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$) et supérieur à celui du BHT ($5,21 \pm 0,27 \mu\text{g/ml}$).

L'extrait brut possède un pouvoir antioxydant moins important que celui du BHT et BHA.

En comparaison avec les antioxydants standards, toutes les fractions testées sont révélées plus actives.

Tableau 11. Variation des absorbances en fonction des différentes concentrations des échantillons

<i>Extracts</i>	<i>0.78125</i>	<i>1.5625</i>	<i>3.125</i>	<i>6.25</i>	<i>12.5</i>	<i>25</i>	<i>50</i>	<i>A_{0,5} (µg/ml)</i>
<i>Extrait brut</i>	0,29 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,34 ± 0,06	0,38 ± 0,07	0,43 ± 0,06	0,55 ± 0,06	0,66 ± 0,08	15,68 ± 1,93
<i>Fraction éther</i>	0,36 ± 0,04	0,52 ± 0,01	0,62 ± 0,00	0,78 ± 0,14	1,07 ± 0,21	1,26 ± 0,18	1,75 ± 0,22	1,45 ± 0,07
<i>Fraction chloroforme</i>	0,25 ± 0,08	0,37 ± 0,02	0,44 ± 0,02	0,59 ± 0,10	0,65 ± 0,28	0,66 ± 0,14	0,78 ± 0,26	4,15 ± 0,40
<i>Fraction acétate</i>	0,33 ± 0,03	0,38 ± 0,13	0,56 ± 0,05	0,72 ± 0,04	0,80 ± 0,02	1,18 ± 0,63	1,25 ± 0,23	2,72 ± 0,38
<i>Fraction n.butanol</i>	0,37 ± 0,02	0,38 ± 0,01	0,44 ± 0,07	0,57 ± 0,02	0,80 ± 0,08	1,12 ± 0,04	1,14 ± 0,10	4,25 ± 0,93
	0.0976	0.195	0.390	0.781	1.562	3.125	6.25	A_{0,5} (µg/ml)
<i>BHT</i>	0,25 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,26 ± 0,00	0,32 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,56 ± 0,02	5,21 ± 0,27
<i>BHA</i>	0,26 ± 0,01	0,29 ± 0,00	0,29 ± 0,02	0,31 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,50 ± 0,00	0,80 ± 0,00	3,08 ± 0,02

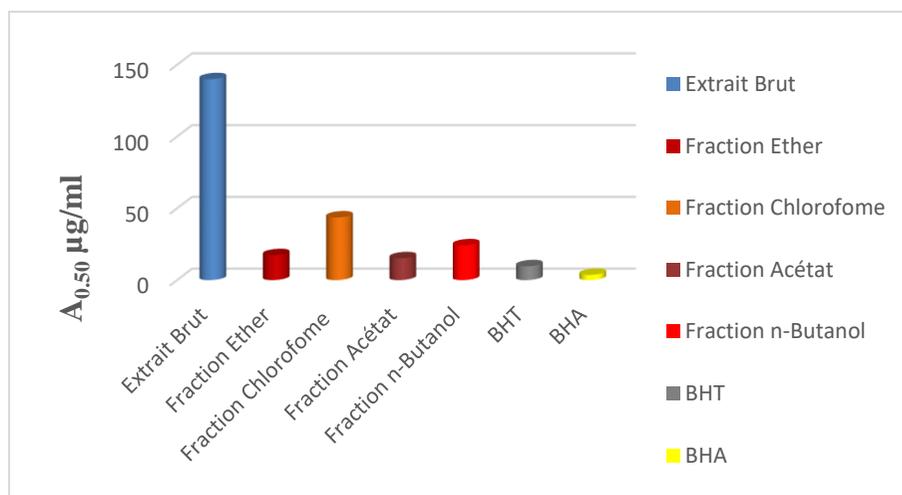


Figure 26. Comparaison des valeurs d'A_{0.50} de l'extrait brut, des fractions et des antioxydants standards

III.3 Evaluation de l'activité antidiabétique (Inhibition de l'amylase)

III.3.1 Description de la méthode

L'inhibition enzymatique est une méthode courante et importante pour la découverte de nouveaux médicaments et le traitement des maladies humaines. Il existe plusieurs enzymes dont l'inhibition est considérée comme une cible pour le traitement ou la prévention des maladies associées. Par exemple, les cholinestérases (maladie d'Alzheimer), les cyclooxygénases (inflammation), l'amylase et la glucosidase (diabète sucré) et l'enzyme de conversion de l'angiotensine (hypertension) sont des enzymes cibles thérapeutiques importantes, L'activité inhibitrice de l' α -amylase a été réalisée à l'aide de la technique iodure de potassium (KI).

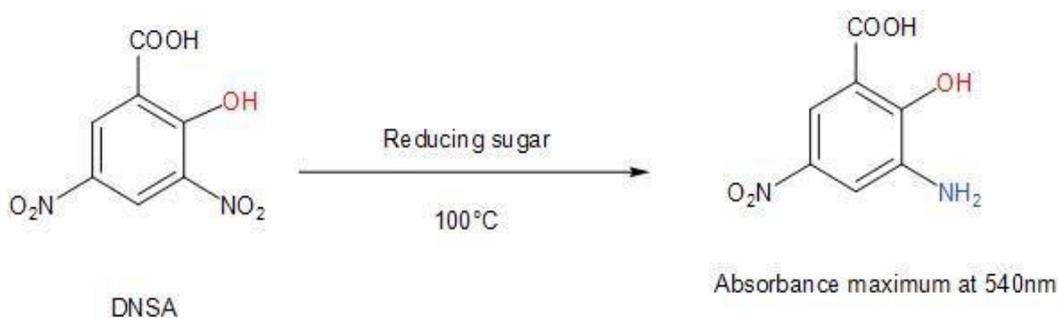


Figure 27. Réduction du sucre par la méthode DNSA

III.3.2 Procédure générale :

L'activité inhibitrice de l' α - amylase a été réalisée en utilisant la méthode de G. Zengin et al. [132]. Dans une plaque à 96 puits, 25 μ L d'échantillon préparé dans du méthanol à différentes concentrations a été mélangé avec 50 μ L d'une solution d' α - amylase (1U/ml) préparé dans un tampon phosphate (pH 6,9) avec du chlorure de sodium (6 mM), le tout est incubé pendant 10 min à 37 ° C. La réaction a été initiée par l'addition de 50 μ l d'une solution d'amidon à 0,1% . Le mélange réactionnel a été incubé pendant 10 min à 37 ° C. Ensuite, la réaction a été stoppée par l'addition de 25 μ l d'HCl (1 M), suivie par l'ajout de 100 μ l de la solution iodure de potassium (KI). L'absorbance a été mesurée à 630 nm. Les résultats peuvent être exprimés en calcul de pourcentage d'inhibition :

$$INH \% = 1 - \frac{(A_c - A_e) - (A_s - A_b)}{(A_c - A_e)}$$

A_c =Absorbance [Amidon+KI+HCl+Vol de solvant d'extrait+Vol tampon Enzyme]

A_e =Absorbance [Enzyme+Amidon+KI+HCL+ Vol de solvant d'extrait]

A_s =Absorbance [Enzyme+Extrait+Amidon+KI+HCl]

A_b =Absorbance [Extrait+KI+125µl de tampon]

III.3.3 Résultats et discussion

Les résultats obtenus (Tableau 12) révèlent que l'extrait brut et ses quatre fractions ont une activité inhibitrice de l' α -amylase. La fraction chloroforme ($CE_{50}=304,73 \pm 1,60 \mu\text{g/mL}$) et la fraction acétate ($CE_{50}=1143,55 \pm 63,45 \mu\text{g/mL}$) présentent une activité plus élevée que celle de l'acarbose ($CE_{50}=3650,93 \pm 10,70 \mu\text{g/mL}$). La fraction chloroforme est onze fois plus puissante que le standard, tandis que la fraction acétate est trois fois supérieure à l'acarbose. Ces résultats suggèrent que ces deux fractions pourraient être utilisées comme agents antidiabétiques.

Une étude réalisée par R, Yesmin et al [133] a montré que les composés polyphénoliques peuvent inhiber l'activité des enzymes hydrolysant les glucides, comme l' α -amylase et l' α -glucosidase, en raison de leur capacité à se lier aux protéines [134].

Les résultats de cette étude soutiennent l'utilisation de ces espèces d'algues marines comme source prometteuse de molécules bioactives pour les industries pharmaceutiques dans le traitement du diabète [135].

Tableau 12. Inhibition de l'α amylase par l'extraits brut ces différentes fractions

% d'inhibition

<i>Extraits</i>	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	1600 µg	CE₅₀ (µg/ml)
<i>Extrait brut</i>	4,89 ± 3,31	5,01 ± 1,24	8,25 ± 1,98	9,05 ± 0,46	13,95 ± 2,31	19,53 ± 1,03	33,22 ± 0,94	>1600
<i>Fraction éther de pétrole</i>	NA	NA	NA	NA	12,96 ± 2,21	24,22 ± 3,73	41,40 ± 2,26	>1600
<i>Fraction Chloroforme</i>	5,74 ± 0,25	9,45 ± 0,76	16,73 ± 1,27	29,04 ± 2,09	71,01 ± 5,17	SAT	SAT	304,73 ± 1,60
<i>Fraction acétate d'éthyle</i>	3,16 ± 0,34	4,08 ± 0,06	5,94 ± 0,27	8,44 ± 1,28	25,19 ± 4,80	39,25 ± 2,29	70,09 ± 5,80	1143,55 ± 63,45
<i>Fraction n-butanol</i>	NA	NA	NA	3,53 ± 0,27	4,85 ± 1,57	14,91 ± 2,14	17,85 ± 4,08	>1600
	62,5 µg	125 µg	250 µg	500 µg	1000 µg	2000 µg	4000 µg	CE₅₀ (µg/ml)
<i>Acarbose</i>	7,76 ± 0,17	8,08 ± 0,30	9,46 ± 0,11	10,70 ± 0,96	31,81 ± 2,89	37,21 ± 3,54	53,05 ± 1,59	3650,93 ± 10,70

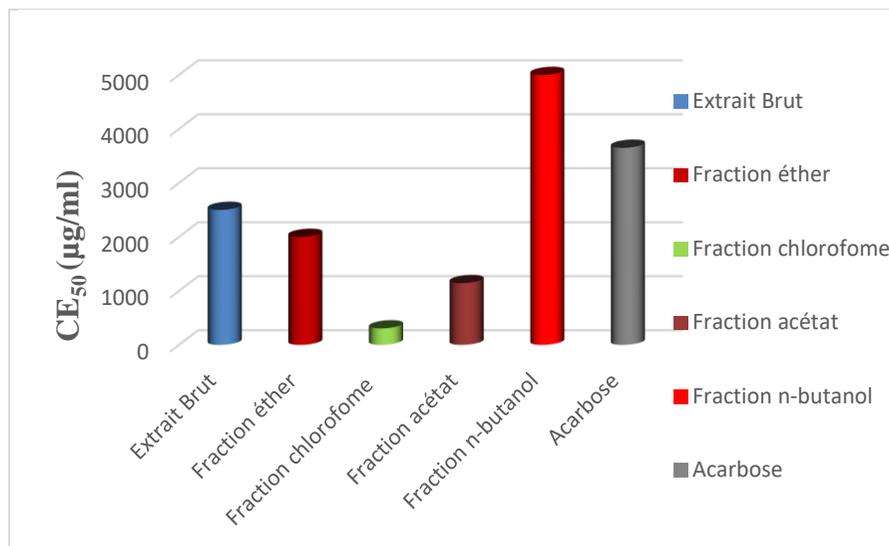


Figure 28. Valeurs d'CE₅₀ du test d'inhibition de l'α amylase

III.4 Evaluation des activités antimicrobiennes

Les produits naturels marins constituent une riche source de composé chimiquement différents qui peuvent être utilisés pour développer de nouveaux, potentiels et utiles agents thérapeutiques parmi les ressources marines, les algues ont été signalés comme présentant des effets antimicrobiens contre plusieurs agents pathogènes. Les phlorotannins dérivés d'algues brunes ont été considérés dans la perspective de leur potentielle activité antimicrobienne [136].

L'étude de l'activité antibactérienne des cinq (05) échantillon, à savoir l'extrait brut ainsi que les fractions éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle et n-Butanol de l'algue *Cystoseira amentacea*, a été réalisée les fractions éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle et n-Butanol de l'algue *Cystoseira amentacea*, a été réalisée en utilisant la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé. Cette étude a été menée au laboratoire de bactériologie de l'Établissement Hospitalier Public, EHP FABOR.

Dans cette étude, nous avons utilisés des souches bactériennes de référence (ATCC) fournies par le laboratoire d'hygiène de l'Etablissement Public Hospitalier Ferroudja Blida Repiquage des souches microbiennes

Les souches bactériennes sontensemencées dans un premier temps à l'aide d'une pipette pasteur dans un tube à essai contenant du boillon nutritif puis incubées à 37°C pendant 24h, afin de stimuler leur développement après la croissance, ces souches sont repiquées sur des boites pétrie content le milieu Mueller- Hinton et incubées pendant 24 h et 48h respectivement dont le but est l'obtention des souches jeunes [137].

III.4.1 Préparation de la suspension microbienne « l'inoculum »

Les suspensions microbiennes sont préparées par prélèvement de 3 à 5 colonies bien isolées, parfaitement identiques et bien séparées d'une culture fraîche (jeune) de 24 h pour les bactéries et les mères dans 5 ml de l'eau physiologique et bien agiter au vortex pendant quelque seconde [138].

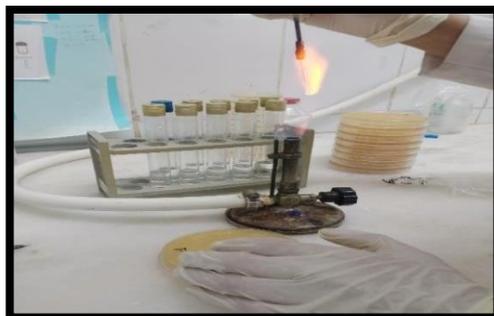


Figure 29. Préparation de la suspension microbienne

III.4.2 Préparation des concentrations d'extraits à tester et milieux de culture

Les 5 échantillons à tester ainsi que l'antibiotique de référence sont préparés à une concentration de 20 mg/ml (même concentration pour tous les échantillons) dans le méthanol. Les milieux gélosés déjà liquéfiés dans un bain marie M.H (Muller-Hinton) sont versés sur des boîtes de pétri à raison de 15 ml par boîte.

III. 4.3 Ensemencement et dépôt des disques

1ml de la solution microbienne est aseptiquement déposée et étalée sur la surface de la gélose à l'aide d'un étalon ou d'un écouvillon. Les disques en cellulose stériles, imbibés d'une quantité de chaque échantillon d'algue, sont déposés sur la surface de la gélose. Les boîtes sont laissées à 4°C pendant 4 h afin de permettre une bonne diffusion d'extraits [139].

L'incubation est effectuée à 37°C pendant 24 h. La lecture se fait par mesure des diamètres des zones claires autour des disques (zone d'inhibition) à l'aide d'un pied à coulisse.

III. 4.4 Résultats et discussion

La mesure des diamètres des zones d'inhibitions permet la détermination *in vitro* de l'activité antibactérienne. Les résultats de l'activité antibactérienne qui ont été réalisés sur les différents échantillons de l'algue *Cystoseira amentacea* sont regroupés dans le (tableau 13).

Les différents échantillons avaient une activité plus ou moins importante selon la nature de la souche et le milieu de culture utilisé.

Le diamètre de la zone d'inhibition exprimé en millimètre [140], est mesuré à l'aide d'une règle ou d'un pied à coulisse pour les différentes concentrations autour des disques. On définit la sensibilité d'un germe comme étant nulle pour un diamètre inférieur ou égal à 8 mm, la sensibilité est limitée pour un diamètre compris entre 8 et 14 mm, moyenne pour un diamètre entre 14 et 20 mm. Pour un diamètre supérieur ou égal à 20 mm le germe est très sensible [140].

La comparaison entre l'extrait brut et les différentes fractions a montré que la fraction éthérique était la plus active car elle a donné les plus grandes zones d'inhibition des bactéries.

Les résultats de l'activité antibactérienne (tableau 13), montrent que les réponses sont très variables en fonction de la souche testée, du type d'échantillon. La fraction éthérique montre une bonne activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* avec des diamètres d'inhibition entre 20 mm et 40 mm, et une activité antibactérienne modérée contre *Micrococcus luteus* avec un diamètre de 35 mm. Concernant les souches *Enterobacter* et *Bacillus cereus* aucune zone d'inhibition n'a été constatée autour de disque.

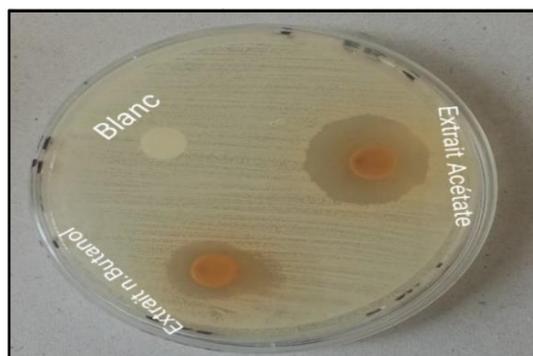


Figure 30. Aromatogramme de la bactérie à Gram positive *Bacillus cereus* testée avec les fractions de *Cystoseira amentacea*

En ce qui concerne l'antibiotique qui a fait l'objet de notre étude (Amoxicilline), il a donné des résultats satisfaisants sur toutes les souches étudiées avec des zones d'inhibition entre 47 et 39 mm respectivement.

Les résultats obtenus peuvent être interprétés par la forte présence des composés terpéniques dans l'extrait éthérique. Ces composés sont à la base d'une catégorie de molécules de grande importance biologique. Ils sont connus pour être antimicrobiens Rakshit_K et al [141], donc sa présence avec une intensité importante due à l'augmentation de l'activité antimicrobienne.

Les composés phénoliques, tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins, font partie des groupes de polyphénols les plus importants sur le plan phytochimique [142]. Ces composés se distinguent par leurs fortes capacités de réticulation et de dénaturation des protéines. Des études sur l'activité antimicrobienne ont révélé des variations de sensibilité aux composés phénoliques et aux acides phénoliques [143].

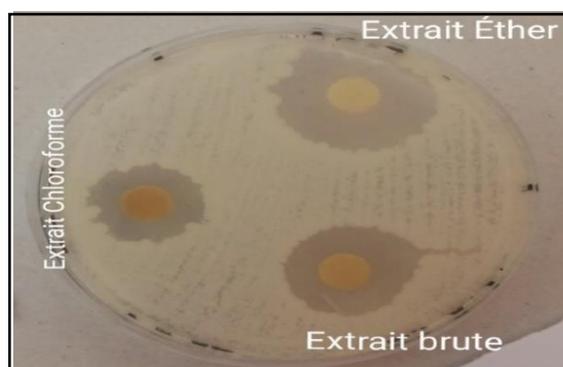


Figure 31. Aromatogramme de la bactérie à Gram négative *Enterobacter Tumefaciens* testée avec les fractions de *Cystoseira amentacea*

Tableau 13. Résultats de l'antibiogramme des extraits de *Cystoseira Amentacea*

Gram	Bactéries	[C] (mg /ml)	Extrait Brut		Fraction Ether		Fraction chloroforme		Fraction Acétate		Fraction n-butanol		Blanc (Méthanol)	
			D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S
+	<i>Bacillus subtilis</i>	20	20		30		/		20		15		0	/
+	<i>Bacillus cereus</i>	20	/		/		/		26		24		0	/
+	<i>Staphylococcus aureus</i>	20	12		20		15		16		12		0	/
+	<i>Micrococcus luteus</i>	20	34		35		37		35		25		0	/
+	<i>Listeria monocytogenes</i>	20	25		32		21		22		16		0	/
+	<i>Enterobacter</i>	20	/		/		17		/		/		0	/
-	<i>Enterobacter Tumefaciens</i>	20	14		20		13		17		16		0	/
-	<i>Agrobacterium Tumefaciens</i>	20	19		40		15		23		15		0	/
-	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	20	33		38		28		18		15		0	/

Méthanol : Contrôle négatif ; **C** : concentration ; **D** : diamètre de la zone d'inhibition en mm ; **S** :

Sensibilité ; - : Résistante ; + : Sensible ; ++ : Très Sensible

Conclusion générale

L'Algérie, dotée de plus de 1200 km de côtes le long de la mer Méditerranée, abrite une biodiversité marine riche et une grande variété d'organismes marins et d'algues, qui pourraient constituer une source intéressante pour la pharmacologie marine. Parmi ces algues, la *Cystoseira amentacea*, une algue brune largement répandue dans les zones côtières, a attiré l'attention en raison de ses propriétés biologiques et de sa richesse en composés bioactifs.

Le principal objectif de cette étude était de réaliser une analyse approfondie de l'algue *Cystoseira amentacea* afin de caractériser sa composition chimique et d'évaluer son potentiel pharmacologique en vue de découvrir de nouveaux médicaments et produits naturels.

Dans cette étude, nous avons d'abord fourni une approche générale sur les algues marines, en se concentrant sur la systématique et la taxonomie des algues brunes du genre *Cystoseira amentacea*.

Nous avons réalisé une extraction hydroalcoolique (80/20) de l'algue brune *Cystoseira amentacea*, suivie d'extractions liquide-liquide avec différents solvants de polarités croissantes : l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le n-butanol. Les résultats obtenus ont révélé que le rendement d'extraction des quatre fractions variait entre 0,1% et 0,4%.

Le screening phytochimique de l'extrait brut de l'algue *Cystoseira amentacea* et de ses différentes fractions a mis en évidence une grande diversité de composés bioactifs tels que les tanins, les flavonoïdes, les stérols, les terpènes, les phlorotannins, les diterpènes et les alcaloïdes. La présence et l'intensité de ces composés variaient selon les fractions.

Pour quantifier les composés phénoliques et les flavonoïdes totaux présents dans l'extrait brut et ses différentes fractions, nous avons utilisé des méthodes de dosage spectrophotométriques. Les résultats ont montré que la fraction acétate d'éthyle présentait la plus haute teneur en composés phénoliques totaux, avec une valeur de $(420,26 \pm 1,8 \mu\text{g EAG/mg.PS})$. En revanche, la fraction chloroformique avait la teneur la plus faible en phénols totaux, avec une valeur de $(49,96 \pm 1,06 \mu\text{g EAG/mg PS})$. Quant aux flavonoïdes totaux, la fraction chloroformique présentait le taux le plus élevé, avec une teneur de $(158,75 \pm 1,76 \mu\text{g EAG/mg.PS})$. L'extrait brut avait la teneur la plus faible en phénols totaux, avec une valeur de $(51,75 \pm 0,35 \mu\text{g EQ/mg PS})$.

Des évaluations pharmacologiques approfondies ont été menées pour déterminer les propriétés biologiques de *Cystoseira amentacea*, notamment son activité antioxydante, enzymatique et antimicrobienne, à travers des études in vitro.

Le potentiel antioxydant des produits phénoliques de l'extrait hydroalcoolique (extrait brut et ses différentes fractions) a été évalué par diverses méthodes, telles que le piégeage du radical DPPH•, le piégeage du radical-cation ABTS•+, la capacité antioxydante par réduction du cuivre CUPRAC, le pouvoir réducteur FRAP et la réduction par la formation du complexe Fe²⁺-Phenanthroline. Les résultats ont montré que tous les échantillons testés présentaient une activité antioxydante potentielle, avec des proportions variables selon le type d'échantillon et la méthode utilisée. Les fractions éther de pétrole et chloroforme ont été révélées les plus actives dans les méthodes DPPH et ABTS, tandis que les fractions acétate d'éthyle et éther de pétrole ont montré une forte activité dans les méthodes FRAP et CUPRAC. La méthode de Phenanthroline a montré que les quatre fractions éther de pétrole, acétate d'éthyle, chloroforme et n-butanol étaient les plus actives.

En ce qui concerne l'activité antibactérienne, celle-ci a été déterminée sur différentes souches bactériennes à l'aide de la méthode de diffusion en disque. Les réponses ont été variables en fonction de la souche testée et du type d'échantillon. La fraction étherique a montré une bonne activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*, avec des diamètres d'inhibition allant de 20 mm à 40 mm, et une activité antibactérienne modérée contre *Micrococcus luteus*, avec un diamètre de 35 mm.

En conclusion, les résultats obtenus dans cette étude ont démontré un fort potentiel pharmacologique de l'algue brune *Cystoseira amentacea*. Ces découvertes ouvrent des perspectives prometteuses pour l'utilisation de cette algue comme source de composés bioactifs ayant des propriétés pharmacologiques remarquables.

ANNEXES

Annexe 1

Illustrations du procédé d'extraction de l'algue brune *Cystoseira amentacea*



Etape 1 : Macération à froid



Etape 2 : Evaporation du solvant



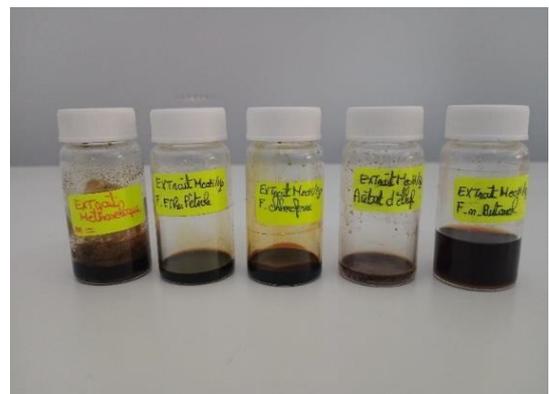
Etape 3 : Différentes phase organique



Etape 4 : Extraction liquide-liquide



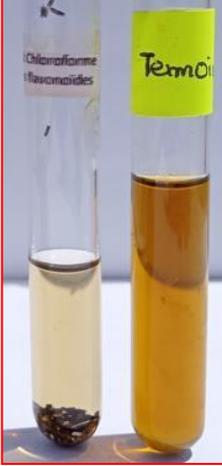
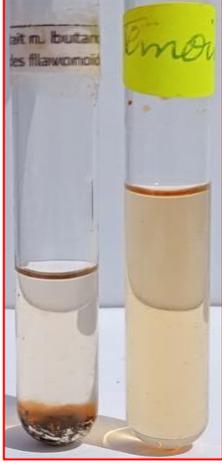
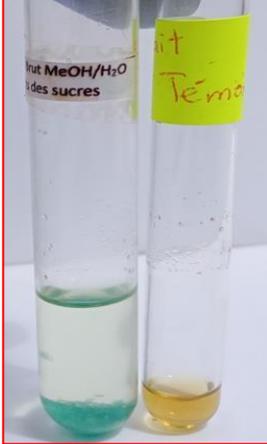
Etape 5 : Evaporation à sec

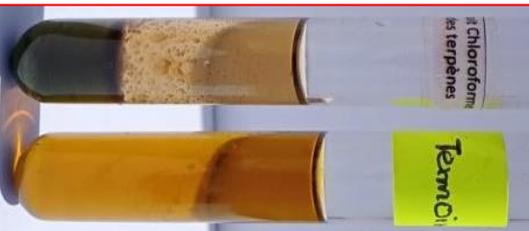
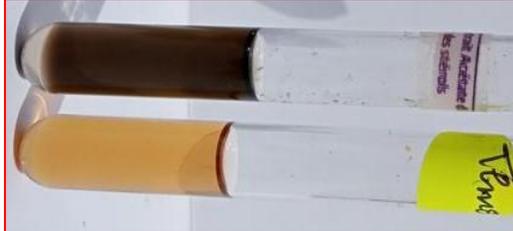
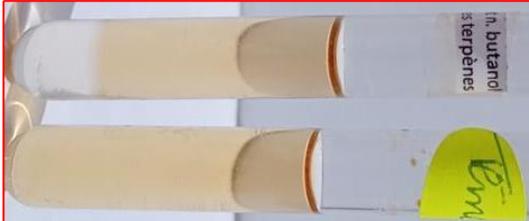


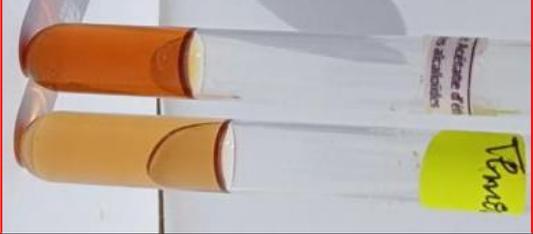
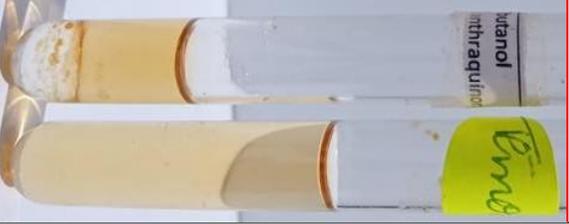
Etape 6 : Extrait brut et fractions obtenus

Annexe 2

Résultats de la caractérisation des groupes chimiques de l'extraits méthanoliques de l'algue *Cystoseira amentacea* est ces déférentes fractions

Constituant	Extrait Méthanoliques	Fraction éther de pétrole	Fraction chloroforme	Fraction acétate d'éthyle	Fraction n-butanol
Tanins					
Flavonoïdes					
Sucres					

Phlorotannins	Terpènes	Stérols
		
		
		
		
		

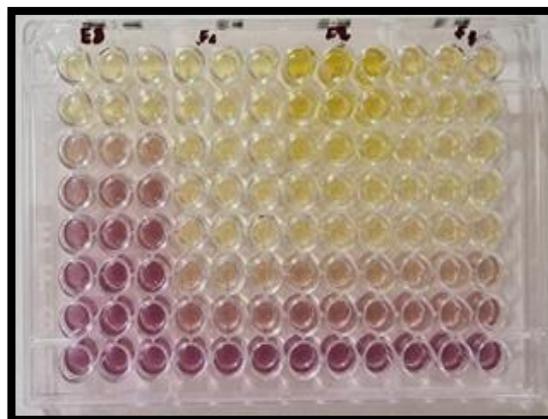
Alcaloïdes	Anthraquinones	Diterpènes
 <p>MeOH/H₂O alcaloïdes</p> <p>Testo</p>	 <p>MeOH/H₂O anthraquinones</p> <p>Testo</p>	 <p>MeOH/H₂O diterpènes</p> <p>Testo</p>
 <p>Éther de pétrole alcaloïdes</p> <p>Testo</p>	 <p>Éther de pétrole anthraquinones</p> <p>Testo</p>	 <p>Éther de pétrole diterpènes</p> <p>Testo</p>
 <p>Chloroforme alcaloïdes</p> <p>Testo</p>	 <p>Chloroforme anthraquinones</p> <p>Testo</p>	 <p>Chloroforme diterpènes</p> <p>Testo</p>
 <p>Ethanol alcaloïdes</p> <p>Testo</p>	 <p>Ethanol anthraquinones</p> <p>Testo</p>	 <p>Ethanol diterpènes</p> <p>Testo</p>
 <p>Butanol alcaloïdes</p> <p>Testo</p>	 <p>Butanol anthraquinones</p> <p>Testo</p>	 <p>Butanol diterpènes</p> <p>Testo</p>

Annexe 3

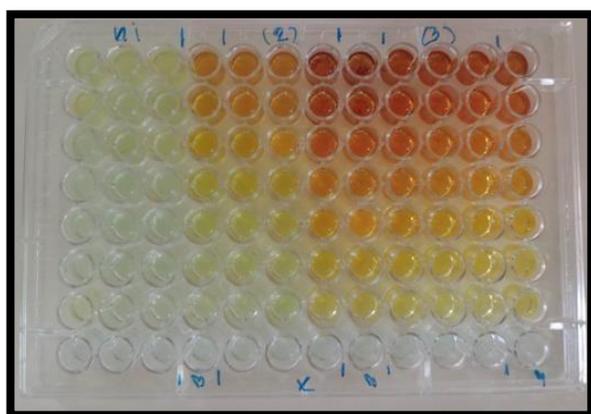
Résultats de l'activité antioxydante de l'extraits méthanoliques de l'algue *Cystoseira amentacea* est ces déférentes fractions



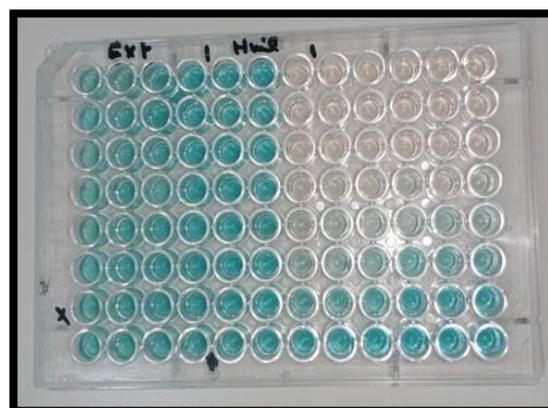
Lecteur Micro plate



Test DPPH



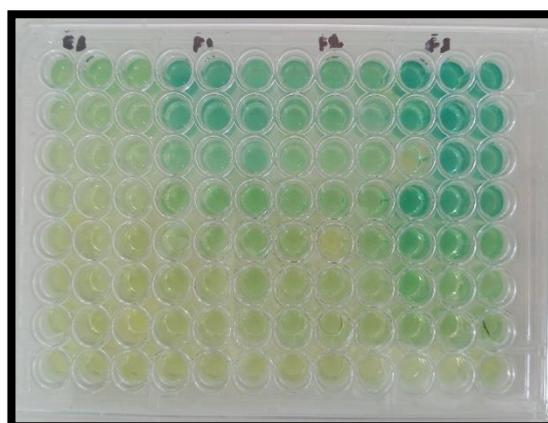
Test CUPRAC



Test ABTS



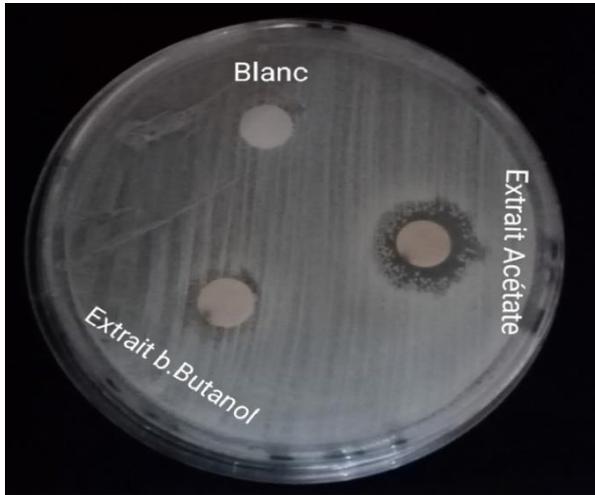
Test Alpha Amylase



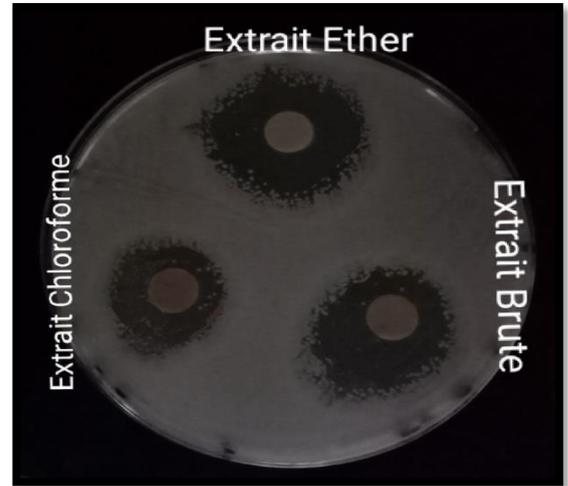
Test FRAP

Annexe 4

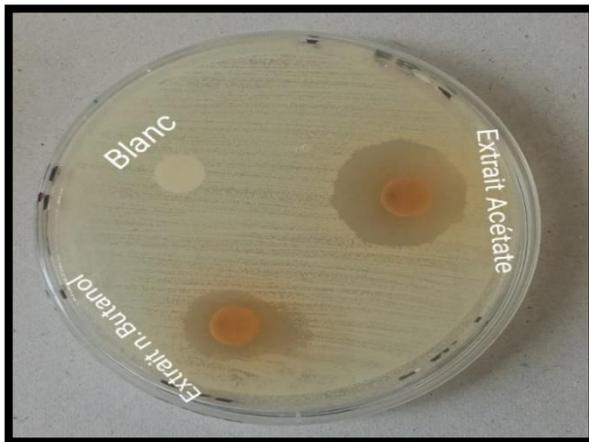
Résultats de l'activité antibactérienne de l'extraits méthanoliques de l'algue *Cystoseira amentacea* est ces déférentes fractions sur les souches bacteriennes.



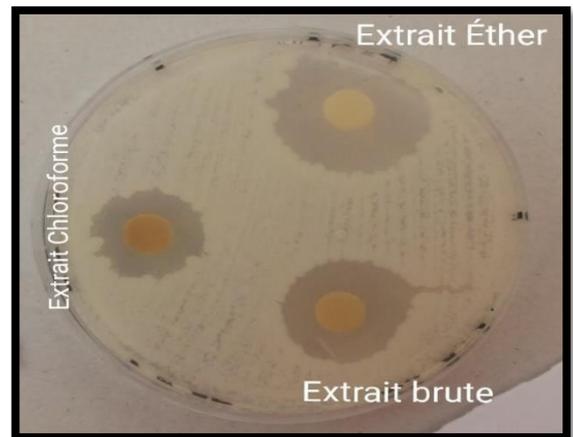
Staphylococcus aureus



Listeria monocytogenes



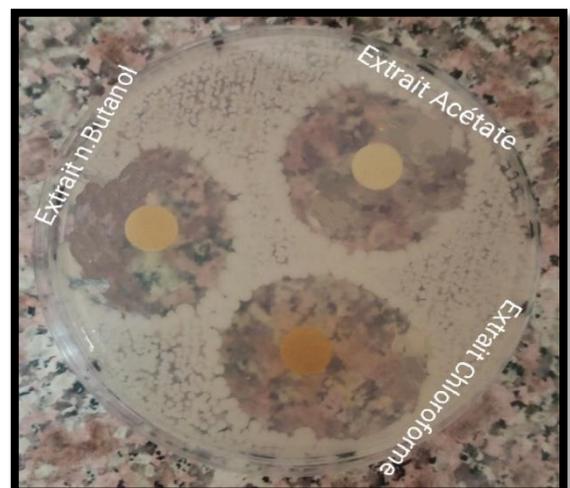
Bacillus cereus



Enterobacter Tumefaciens



Agrobacterium



Micrococcus luteus

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] F. Guéritte, « La nature pour inspirer le chimiste : Substances naturelles, phytochimie et Chimie médicinale », Molécules virtuelles, Journal Horizons du FNS, n°81 : 101-115, juin ; (2009).
- [2] T. Ainane, « Valorisation de la biomasse algale du Maroc : Potentialités Pharmacologiques et Applications environnementales, cas des algues brunes *Cystoseira Tamariscifolia* et *Bifurcaria bifurcata* », Thèse de Doctorat, Université Hassan II – Casablanca ; (2011).
- [3] R. Perez, Raymond KAAS, François CAMPELLO Suzanne ARBAULT, Olivier BARBAROUX, « La culture des algues marines dans le monde », Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer, Ifremer , VII ; (1992).
- [4] J. Person, « Algues, filière du future », Ed. AdebioTech-Romainville, VI ; (2010).
- [5] M.C, Kathleen, G.S, Robert., “Biology of the red algae”, Ed. Combridge university presse, Bretagne, 528 ; (2011).
- [6] G, Haberlandt, « Physiological Plant Anatomy » ; Université berlin ; (1914).
- [7] Ribier, J. et Godineau, J- C., « Les algues », Ed. Flammarion, la maison rustique, Paris ; (1984).
- [8] A. Leandro , L.Pereira ,. M. Gonçalves, « Diverse Applications of Marine Macroalgae » , Review , n°18(1) : 17 ; (2019).
- [9] L.Pereira, J.M. Neto, « Marine algae: biodiversity, taxonomy, environmental assessment, and biotechnology » ; (2014).
- [10] M.V. Freitas, D. Pacheco, J. Cotas, T. Mouga, C. Afonso, L. Pereira « Red Seaweed Pigments from a Biotechnological Perspective » ; (2021).
- [11] B. Lynda, B.Oumnia, Mekircha « Etude des propriétés pharmaceutiques de certaines espèces d'algues du littoral Jijilienne contre les microorganismes pathogènes » Mémoire master, Université de Jijel ; (2020).

- [12] A. Davison, E. Rousseau, Bruce Dunn « Putative anticarcinogenic actions of carotenoids: Nutritional implications ;Canadian Journal of Physiology and Pharmacology » n°71(9) :732-745 ; (1993).
- [13] K. Sahayaraj. « Biological values and conservation of marine algae: an overview » Proceedings of Conservation and Sustainable Utilization of Marine Resources » , ISBN – 978-81-9273 ; (2015).
- [14] J. Belnap, B. Büdel, O. L. Lange « Biological Soil Crusts: Characteristics and Distribution ; Part of the Ecological Studies book » , n° 150 ; (1987).
- [15] M.A .Gammon, G . Riccioni, N. D’Orazio « Marine Carotenoids against Oxidative Stress: Effects on Human Health » ; Journals ,Marine Drugs, n°13(10) ; (2015).
- [16] S. Sasso , G. Pohnert, M. Lohr, M Mittag « Microalgae in the postgenomic era: a blooming reservoir for new natural products ;FEMS Microbiology ,n°36(4) :761-785 ; (2012).
- [17] C. Bouafif, M. Verlaque, H. Langar, «New Contribution to the knowledge of the genus *Cystoseira* C. Agardh in the Mediterranean Sea , with the reinstatement of species rank for *C. schiffneri*» ; Université de Tunis , n°37 (2) : 133-154 ; (2016).
- [18] C. Jégou. « Étude du genre *Cystoseira* des côtes bretonnes : taxinomie, écologie et caractérisation des substances naturelles. Sciences du Vivant [q-bio] ». Université de Bretagne Occidentale ; (2011).
- [19] R. K. Greville, « *Algae Britannicae*, or descriptions of the marine and other articulated plants of the British Isles belonging to the order Algae, with plates illustrative of the genera». Machlachen & Stewart (ed.), 218 ; (1830).
- [20] J. Feldmann, « Les algues marines de la côte des Albères. Revue Algologique », n°9 : 1-197 ; (1937).
- [21] A. E. E. Dawson, « Some observations on *Cystoseira foeniculacea* (L.) Grev. Emend. Sauvageau. New Phytologist, » n°40 : 316-325 ; (1941).
- [22] M. Nizamuddin, « Classification and the Distribution of the Fucales. *Botanica Marina* » n°4 :191-203 ; (1962).

- [23] F. Rousseau, B. De Reviere, « Molecular phylogeny of European Fucales (Phaeophyceae) based on partial large-subunit rDNA sequence comparisons. *Phycologia* », n°36 ; 438-446 ; (1997).
- [24] T. Horiguchi, & Yoshida, T. «The phylogenetic affinities of *Myagropsis myagroides* (Fucales, Phaeophyceae) as determined from 18S rDNA sequences. *Phycologia* ».n°37 : 237-245 ; (1998).
- [25] F. ROUSSEAU, B. DE REVIERS, « Phylogenetic relationships within the Fucales (Phaeophyceae) based on combined partial SSU+LSU rDNA sequence data ». *European Journal of Phycology*, n°34(1) :53-64 ; (1999).
- [26] F. Rousseau, R. Burrowes, A. Peters, R. Kuhlentkamp, B. Reviere «A comprehensive phylogeny of the Phaeophyceae based on nrDNA sequences resolves the earliest divergences Une phylogénie générale des Phaeophyceae basée sur les ADNrn résout les premières divergences ». *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences- Series III - Sciences de la Vie* , n° : 324 : 305-319 ; (2001).
- [27] G. Youn Cho , F. Burrowes , B. Reviere, S. Min Boo, « Phylogenetic relationships within the Fucales (Phaeophyceae) assessed by the photosystem I coding psA sequences. *Phycologia* », n°45 : 512-519 ; (2006).
- [28] N. Phillips, R. Burrowes, F. Rousseau, B. Reviere, W. Gary Saunders. « Resolving Evolutionary relationships among the brown algae using chloroplast and nuclear genes. » *Journal of Phycology*, n° 44(2) :394-405 ; (2008).
- [29] M. Roberts, « Studies on marine algae of the British Isles 3. The genus *Cystoseira*. *European Journal of Phycology* », n°3 : 345-366 ; (1967).
- [30] C. Sauvageau «A propos des *Cystoseira* de Banyuls et de Guéthary. *Bulletin de la Station Biologique d'Arcachon* » n° 14 : 133-556 ; (1912).
- [31] A. Ercegović Fauna, F. Jadrana. J. Cistozira, N. Ekologija, I. Razvitak , F. Adriatica, « Les *Cystoseira* adriatiques - Leur morphologie, écologie et évolution ». *Institut d'Océanographie et de Pêche, Split*. n° 2 : 173-210 ; (1952).

- [32] A. Blanfuné « Global change in the NW Mediterranean Sea: the fate of forests of *Cystoseira* and *Sargassum*, *Lithophyllum* rims and blooms of *Ostreopsis* ». Thèse de Doctorat ; Aix- Marseille Université ; (2016) .
- [33] J. Cabioch, J-Y. Floch, A. Le Toquin, C. Boudouresque, A. Meinesz, M. Verlaque, « Guide des algues des mers d'Europe, manche, atlantique, méditerranée, Les guides du naturaliste, Ed. Delachaux et Niestle », 272 ; (2006).
- [34] C. Delepine, C.F Boudouresque, C. Fradaorestano, M.C. Noailles, « Algues et autres végétaux marins .Fiche FAO d'identification des espèces pour le besoin de la pêche, Révision Méditerranée et mer noire » Végétaux et invertébré . n°37 : 3-11 ; (1987).
- [35] E. G. Bligh, W. JA Dyer « rapid method of total lipid extraction et purification. Canadian journal of biochemistry et physiology », n°37(8) : 911-917 ; (1959).
- [36] B. Kaufmann, P. Christen, « Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction et pressurised solvent extraction. Phytochemical analysis, » n°13(2) : 105-113 ; (2002).
- [37] M. Joseph Awika , W. Lloyd Rooney , Wu. Xianli , L. Ronald Prior, L. Cisneros- Zevallos « Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) et sorghum products » .Journal of agricultural et food chemistry, n°51(23) : 6657-6662 ; (2003).
- [38] B.J. Xu, SKC Chang . « A comparative study on phenolic profiles et antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents ». Journal of food science, n°72(2) : 159-166 ; (2007).
- [39] P. Vijayabaskar, V. Shiyamala, « Antioxidant properties of seaweed polyphenol from *Turbinaria ornata* (Turner) J. Agardh, 1848 », Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, n° 3(2) : 90-98. ; (2012).
- [40] M. Ahn, C. Moon, W. Yang, E.J Ko, J. W Hyun, H. G Joo, Y. Jee, N.H Lee, J. W Park, R.K Ko, G.O Kim, T. Shin, « Diploretohydroxycarmalol, isolated from the brown algae *Ishigeokamurae*, protects against radiation-induced cell damage in mice », Food and Chemical Toxicology. n°49 :864-870 ; (2011).

- [41] A. Haddara, S. Sellimia, R. Ghannouchia, O. M. Alvarezb, M. Nasria, A. Bougatefa, «Functional, antioxidant and film-forming properties of tuna-skin gelatin with a brown algae extract », *International Journal of Biological Macromolecules*. n°51 : 477-483; (2012).
- [42] M. P.Chastaing, M. E. Barillot, « Chimie organique, essai analytique sur la détermination des fonctions », Ed. Octave Doin ; (1988).
- [43] V. Camel, « Recent extraction techniques for solid matrices—supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction et microwave-assisted extraction: their potential et pitfalls. *Analyst*», n°126(7) : 1182-1193 ; (2001).
- [44] F. Onuska, K.A. I.Terry, « Extraction of pesticides from sediments using a microwave technique. *Chromatographia* », V36(1), P191-194 ; (1993).
- [45] L. Jassie, R. Savesz, T. Kierstead, «Matz in: HM Kingston, SJ Haswell (Eds.), *Microwave-Enhanced Chemistry, Fundamentals, Sample Preparations et Applications* » ; (1997).
- [46] I. Michalak, K. Chojnacka, « Algae as production systems of bioactive compounds. *Engineering in Life Sciences* » ,n °15(2) : 160-176 ; (2015).
- [47] Zhi Ying,Xiaoxiang Han,Jianrong Li «Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberryleaves». *Food Chemistry*, n°127 (3) : 1273-1279 ; (2011).
- [48] C. Le Guillard, J.P. Bergé, C. Donnay-Moreno, S. Bruzac, J. Y. Ragon, R. Baron, J. Soft « liquefaction of the red seaweed *Grateloupia turuturu* by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis process» , *Journal of applied phycology*, n°28(4) : 2575-2585 ; (2016).
- [49] R. Domínguez-G, A. Moreda-P, A. Bermejo-B, P. Bermejo-B, «Application of ultrasound-assisted acid leaching procedures for major et trace elements determination in edibleseaweed by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry». *Talanta*,n°66(4) :937-942 ; (2005).
- [50] X. Xiaohua, S. Xiaoxi , Y. Zhiquan, X. Xianfang, L. Gongke, « Isolation of fucoxanthin fromedible brown algae by microwave-assisted extraction coupled with high-speedcountercurrent chromatography ».n°35(17) : 2313-2317 ; (2012).

- [51] R.M, Rodriguez-J, S.I. Mussatto, L. Pastrana, C.N. Aguilar, «Microwaveassisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoïdan) from brown seaweed», *Carbohydr. Polym*, n°86 : 1137–1144 ; (2011).
- [52] M. K. Roh, M.S. Uddin, B.S. Chun, « Extraction of fucoxanthin et polyphenol from *Undaria pinnatifida* using supercritical carbon dioxide with co-solvent. *Biotechnology et Bioprocess Engineering*», n°13(6) : 724-729 ; (2008).
- [53] C.Y. Chen, H.N. Chou, « Screening of red algae filaments as a potential alternative source of eicosapentaenoic acid. *Marine biotechnology* », n°4(2) : 189-192. ; (2002).
- [54] V.L. Singleton, J.A.J. Rossi « Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents». *Amer. J. Enol. Viticult.* N°16 :144-58 ; (1965).
- [55] A. Djeridane, M. Yousfi, B. Nadjemi, D. Boutassouna, P. Stocker, N. Vidal, «Activité antioxydante de certains extraits de plantes médicinales algériennes contenant des composés phénoliques». *Chimie alimentaire*, n°97 : 654-660 ; (2006).
- [56] C. Chia-chi, « Estimation de la teneur totale en flavonoïdes de la propolis par deux Méthodes colorimétriques complémentaires». *Journal de chimie alimentaire*. n°10(03) :178- 182 ; (2002).
- [57] AE. Hagerman, LG. Butler « Choisir des méthodes et des normes appropriées pour doser le tanin». *J Chem Ecol* , n°15 : 1795-1810. ; (1989).
- [58] Hagerman AE. « Méthode de diffusion radiale pour la détermination du tanin dans les extraits végétaux». *J Chem Ecol* , n°13 : 437-449 ; (1987).
- [59] N.C. Karma, « Interference of dustdeposition on screening bio-filters using » ; (2005).
- [60] L.R. Blinks, « Chromatic transients et enhancementrecorded by the glasselectrode. *Photosynthetic Mechanisms of Green Plants*», 1145, 345 ; (1963).
- [61] Y. Li, I. Wijesekara, S. Kim, « Phlorotannins as bioactive agents from brown algae », *Process Biochemistry*, n°46 :2219-2224 ; (2011).
- [62] S.H. Eon, Y.H. Kim, S. Kwonkim, « Antimicrobial effect of phlorotannins from marine brown algae », *Food and chemical Toxicology*, n°50 : 3251-3255 ; (2012).

- [63] A. Vincenzo, N. Giovanni., O. Giovanna., O. Mario, T. Corraw, « A novel acylphloroglucinol from the brown alga *Zonaria tournefortii*, phytochemistry », n°21 :739- 741 ; (1982).
- [64] C. Tringali, M. Piatelli, « Two chromane derivatives from the brown alga *Zonaria tournefortii* », Tetrahedron letters, n°23 : 1509-1512 ; (1982).
- [65] S. Zwenger, «Plant terpenoids: applications et future potentials. Biotechnology et Molecular Biology Reviews» , n°3(1) : 1-7 ; (2008).
- [66] KC Güven, A Percot, E Sezik - « Alkaloids in Marine Algae ; Marine Drugs ,Istanbul Aydın University» Article, n°8(2) :269-284 ,(2010).
- [67] R. Alghazeer, F .Whida, E. Abduelrhman « In vitro antibacterial activity of alkaloid extracts from green, red and brown macroalgae from western coast of Libya » Journal Africain de Biotechnologie ,n°12(51) ; (2013).
- [68] N. Suthananda Sunassee, T. Michael Davies-Coleman « Cytotoxic and antioxidant marine prenylated quinones and hydroquinones ; Review ;Natural Product Reports » n°29 : 513-535; (2011).
- [69] B. Carolina S, Katkam N. G., Jorge M., Madalena P., Thiago R. M., Lenea C., João V., João H.G. L., « *Cystoseira* algae (Fucaceae): update on their chemical entities and biological activities », Tetrahedron: Asymmetry, n°28 : 1486–1505 ; (2017).
- [70] M. C. atrides J. Artauda, N. Vicente, « Composition en stérols de végétaux marins méditerranéens » ; OCEANOLOGICA ACTA, n°6(1) :73-77 ; (1983).
- [71] N. Ikekawa, N. Morisaki, K. Tsuda, T. Hoshida « Sterol composition in some green algae and brown algae, Steroids», Stéroïdes, n°12(1) : 41-48 ; (1968).
- [72] J. Artaud, M.C. atrides, C. Tisse, J.P. Zahra, J. Estienne, «Études chromatographiques et spectroscopiques de stérols : application aux stérols d'algues. Analyse», n°8(7) : 227 ; (1980).
- [73] A . Abourriche, M. Charrouf, M. Berrada, A. Bennamara, N. Chaib, C. Francisco «Antimicrobial activities and cytotoxicity of the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*. Fitoterapia » ; Fitoterapia 70 , n°70(6) : 611–614 ; (1999).

- [74] S. Sellimi, A. Benslima, V. Barragan-Montero, M. Hajji, M. Nasri, « Polyphenolic-protein- polysaccharide ternary conjugates from *Cystoseira barbata* Tunisian seaweed as potential biopreservatives: chemical, antioxidant and antimicrobial properties» . *Int J Biol Macromol.* n°105 :1375–83 ; (2017).
- [75] A. Abdelhamid, M. Jouini, H. Bel Haj Amor, Z. Mzoughi, M. Dridi, V. Ben Said, A. Bouraoui «Phytochemical analysis and evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory, and antinociceptive potential of phlorotannin-rich fractions from three Mediterranean brown seaweeds». *Mar Biotechnol.* n°20(1) : 60–7. ; (2018).
- [76] A. Guner, K oksal , S. Erel ,B. Kayalar, A. Nalbantsoy, A. Sukatar, NU. Karabay Yavas oglu ,« Antimicrobial and antioxidant activities with acute toxicity, cytotoxicity and mutagenicity of *Cystoseira compressa* (Esper) Gerloff & Nizamuddin from the coast of Urla (Izmir, Turkey) » . *Cytotechnol.* n°67(1) :135–43 ; (2015).
- [77] MD. Guiry, GM. Guiry «Algae Base. World-wide electronic publication. Galway: National University of Ireland» ; (2018).
- [78] L. Mhadhebi, A. Mhadhebi, J. Robert, A. Bouraoui « Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative effects of aqueous extracts of three Mediterranean brown seaweeds of the genus *Cystoseira*. » *Iran J Pharm Res.*, n°13(1) : 207–20 ; (2014).
- [79] C. Vizetto-Duarte, L. Custodio, G. Acosta, JHG. Lago, TR. Morais, C. Bruno de Sousa, KN. Gangadhar, MJ. Rodrigues, H. Pereira, RT. Lima, «Can macroalgae provide promising anti-tumoral compounds A closer look at *Cystoseira tamariscifolia* as a source for antioxidant and anti-hepatocarcinoma compounds». *PeerJ.* ; (2016).
- [80] A. Yegdaneh, A. Ghannadi, L. Dayani. « Chemical constituents and biological activities of two Iranian *Cystoseira* species». *Res Pharma Sci.* n°11(4) : 311–7 ; (2016).
- [81] G. Fuente , M. Fontana , V. Asnaghi , M. Chiantore , S. Mirata , A. Salis , G. Damonte and S. Scarfi , « The Remarkable Antioxidant and Anti-Inflammatory Potential of the Extracts of the Brown Alga *Cystoseira amentacea* var. *stricta* , Article » *Mar. Drugs*, n°19(1) . (2021).
- [82] M. Zubia, MS. Fabre, V. Kerjean, KL. Lann, V. Stiger-Pouvreau, M. Fauchon, E. Deslandes «Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food Chem*» ; n°116(3) :693–701 ; (2009).

- [83] M. Benmahdjoub, N. Belyagoubi-Benhammou, L. Belyagoubi, G. Aissaoui, A. El Zerey-Belaskri, Kh. Kerzabi-Kanoun, W. Benguedda-Rahal, F. Atik-Bek « Seasonal variation in polyphenol content and antioxidant activity of the Brown Alga *Cystoseira amentacea* var. *stricta* (Sargassaceae) from Northwest coast of Algeria ; Article Journal of Environmental Science and Technology », edition. N°8.(4) :2437-1114 ; (2022).
- [84] F Grinaa , Z.Ullahc , E Kaplanerc , A.Moujahida , R.Eddohaa , B.Nassera , P.Terzioglu , M. A.Yilmazc , A.Ertas , , M.Ozt,A.Essamadi« In vitro enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phytochemical fingerprints of five Moroccan seaweeds ;Journal homepage Article » (October 2019).
- [85] R.A.Khudir, G. A. Ismail , T Diab ,« Antimicrobial, Antioxidant, and Anti-Tumor Activities of *Sargassum linearifolium* and *Cystoseira crinita* from Egyptian Mediterranean Coast » Journal homepage Article , n°73(5) : 1532-7914 ; (2020).
- [82] M. Zubia, M.S. Fabre, V.K. Klervi Le Lann, V. Stiger-Pouvreau, M. Fauchon, E. Deslandes, « Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts », Article, Food Chemistry, V. 116, P (693-701) ; (2009).
- [86] B. Tanna, A. Mishra, «Metabolites unravelnutraceutical potential of edible seaweeds: An emerging source of functionalfood. Compr». Rev. Food Sci. Food Saf. , n°17 :1613–1624 ; (2018).
- [87] N. Heffernan, N.P. Brunton, R.J. Fitz Gerald, T.J. Smyth, «Profiling of themolecularweight and structural isomerabundance of macroalgae-derived phlorotannins» . Mar.Drugs , n°13 :509–528 ; (2015).
- [88] S. Pinteus, C. Alves, H. Monteiro, E. Araújo, A. Horta, R. Pedrosa, « *Asparagopsis armata* and *Sphaerococcus coronopifolius* as a natural source of antimicrobial compounds».World J. Microbiol. Biotechnol, n°31 :445–451 ; (2015).
- [89] A.J. Smit, «Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed naturalproducts: A review.J. Appl. Phycol», n°16 : 245–262 ; (2004).
- [90] C.B. Brito da Matta, É.T. De Souza, A.C. De Queiroz, D.P. De Lira, M.V. De Araújo, Cavalcante-Silva, J.M. De Miranda, J.M. De Araújo-Junior, J.M. Barbosa-Filho, B.V. De Oliveiras Santos, « Antinociceptive and anti-inflammatory activity from algae of the genus *Caulerpa*». Mar. Drugs., n°9 :307–318 ; (2011).

- [91] A.Gonçalves, M. Fernandes, M. Lima, J.P Gomes « Nanotechnology to the Rescue: Therapeutic Strategies Based on Brown Algae for Neuro degenerative Diseases » , journal applied sciences, V13 ; (February 2023).
- [92] C. ESSEID , « ISOLEMENT ET DETERMINATION STRUCTURALE DE METABOLITES SECONDAIRES DE PLANTES SAHARIENNES- ACTIVITES BIOLOGIQUES » , THESE Doctorat de troisième cycle (LMD) , (2018).
- [93] Y. Kumar, A. Tarafdar, P.C .Badgujar « Seaweed as a source of natural antioxidants: Therapeutic activity and food applications » Journal of Food Quality ; (2021).
- [94] M Čagalj, D Skroza, G Tabanelli, F Özogul, V Šimat « Maximizing the Antioxidant Capacity of Padinapavonica by Choosing the Right Drying and Extraction Methods », article journal processes, n° 9(4) :587 ; (2021).
- [95] A.V .González-de-Peredo, M Vázquez-Espinosa « Development of optimized ultrasound- assisted extraction methods for the recovery of total phenolic compounds and anthocyanins from onion bulbs », article journal Antioxidants, n°10(11) : 1755 ; (2021).
- [96] M Beata Łabowska, I Michalak, J Detyna ;« Methods of extraction, physicochemical properties of alginates and their applications in biomedical field » a review , n°17(1) : 738-762; (2019).
- [97] W.T Chen, Y Zhang, J Zhang, G Yu, LC Schideman « Hydrothermal liquefaction of mixed-culture algal biomass from wastewater treatment system into bio-crude oil », Bioresource Technology , n °152 : 130-139 ; (2014) .
- [98] JM. Piot, JB Bérard, R Kaas, B Serive, T Patrice« Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction » ; Journals ELSEVIER Process Biochemistry ,n°46(1) :59-67 ; (January 2011).
- [99] F.Samir, «Etude biologique et biochimique de l'algue brune Cystoseira amantacea stricta de la baie d'Oran », These doctorat , Université Djillali Labes ; (juin-2019).
- [100] F. Haddouchi, T.M. Chaouche N. Halla. « Screening Phytochimique, Activités Antioxydantes Et Pouvoir Hémolytique De Quatre Plantes Sahariennes D'Algérie», n°5(2) : 2 ; (2018).

[101] D. H. Strumeyer Michael, J. Malin « Condensed tannins in grain sorghum. Isolation, fractionation, and characterization » , Journal of Agricultural and Food Chemistry , n°23(5) : 909–914 ; (1975).

[102] R. Junaid Shaikh and M.K Patil « qualitative tests for preliminary phytochemical screening: An over view » ; international journal of chemical studies; n°8(2) :603-608 ; (2020).

[103] Li ,Yajing, Fu, Xioting, D, Duan , Liu, Xiaoyong Liu , Xu, Jiachao , Xin Gao « Extraction and Identification of Phlorotannins from the Brown Alga, Sargassum fusiforme (Harvey) Setchell » Journal List Mar Drugs ; n°15(2): 49 (2017).

[104] S. M. Mizanur Rahman « Study of total phénol, flavonoïdes contents and phytochemical screening of various leavescrude extracts of locally grown Thymus vulgaris » , University of Dhaka, Bangladesh . n°3(9): 705–710 ; (2013).

[105] M.M, Rahman, M.S Rahaman, M.R, Islam, F. Rahman , « Role of phenolic compounds in humandisease: currentknowledge and future prospects » article ; journal Molecules, n°27(1) : 233 ; (2021).

[106] J. Erick Dufourc, « Sterols and membrane dynamic s » Journal List , J Chem Biol, n°1 :1-4 ; (2008).

[107] A. Masyita, R. Mustika Sari, A. Dwi Astuti, B. Yasir, N. Rahma Rumata, T. Bin Emran, F. Nainu, J. Simal-Gandara « Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives », n°13; (2022).

[108] S. Bouraoui, A.R, Zazoua « Élaboration, étude et développement de capteurs (bio)chimiques à base de substances actives de plantes pour la détection sélective de quelques polluants dans les milieux hydriques » Thèse Doctorat ; Université Jijel (2018)

[109] P. Yadav Ashok Kumar Kanhiya Mahour, V.S. Vihan « Phytochemical Analysis of Some Indigenous Plants Potent Against Endoparasite » Article journal of Advanced Laboratory Research in Biology, n° 1(1) ; (2010).

[110] S. de 1, Y. N. dey2, A. K. ghosh, « phytochemical investigation and chromatographic evaluation of the different extracts of tuber of *amorphophallus paeoniifolius* (araceae) » international journal on pharmaceutical and biomedical research (ijpbr) , n°1(5) : 150-157 ; (2010).

- [111] S. Kumar « alkaloidal drugs » a review asian journal of pharmaceutical science & technology, n°4(3) :107-119. (2014).
- [112] B. Dulo, K. Phan, J. Githaiga , K. Raes & Steven De Meester « Natural Quinone Dyes: A Review on Structure, Extraction Techniques, Analysis and Application Potential » review journal Waste and Biomass Valorization, n°12 : 6339–6374 ; (2021).
- [113] L. Müller, S. Gnoyke , A.M. Popken , V. Böhm « Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. LWT - Food Science and Technology», n°43 :992-999 ; (2010).
- [114] O.K. Popoola Marnewick, J.L. Rautenbach, F. Iwuoha, E.I. et Hussein, A.A, «Acylphloroglucinol Derivatives from the South African Helichrysum niveum and Their Biological Activities » , Molecules, n°20 :17309-17324 ; (2015).
- [115] H. Falleh, R. Ksouri , K. Chaieb , N. Karray-Bouraoui , N. Trabelsi , M. Boulaaba , C. Abdely ; « Phenolic composition of *Cynaracardunculus* L. organs, and their biological activities Étude des composés phénoliques des différents organes de *Cynaracardunculus* L. et de leurs activités biologiques » journal Elsevier , n° 331 (5) :372-379 ; (2008).
- [116] A.M. Mannino Vaglica, V. Cammarata, M. Oddo, E. « Effects of temperature on total phenolic compounds in *Cystoseira amentacea* (C. Agardh) Bory (Fucales, Phaeophyceae) from southern Mediterranean Sea. Plant Biosystems» , n°150 (1) :152-160 ; (2015).
- [117] G. Topçu, Ay.A.A. Bilici, C. Sarıkürkcü, M. Öztürk, and A. Ulubelen, «A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*» , n°103 : 816–822; (2007).
- [118] A. Altemimi, N. Lakhssassi, A. Baharlouei, G. Dennis Watson , A. David. Lightfoot « Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts » review journal Plants, n°6(4) : 42 ; (2017).
- [119] D. Amić, D. Bešlo , N. Trinajstić , « Structure-Radical Scavenging Activity Relationships Of Flavonoids. Croatica chemica Acta » , n°76(1) :55-61 ; (2003).
- [120] R.P. Gayon, « Les composés phénoliques des végétaux », Dunod, ed , Paris ; n°1 :232-242 ; (1968).
- [121] I. Georgiana Munteanu, « Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity » , Article , Journal List Int J Mol Sci PMC8037236 ; (2021).

- [122] M.S. Blois, « Antioxidant déterminations by the use of a stable Free Radical ». Article, Nature, V 181, P (1119-1200). (1958).
- [123] K. Zhu, H. Zhou, H. Qian, « Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase », Article, Journal of Process Biochemistry ELSEVIER, V. 41, Issue 6, P (1296-130), (2006).
- [124] M.N. Alam, N.J. Bristi, M. Rafiquzzaman, « Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity », Article, Saudi Pharmaceutical Journal, V. 21, P (143-152), (2013).
- [125] Re. R. Pellegrini, N. Proteggente, A. Pannala, A. Yang, M. Rice-Evans, « Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay ». Article, Free Radical Bio Med. V 26, P (1231–1237), (1999).
- [126] H.H. Habibou, M. Idrissa, I. Khalide, « Activité Antoxydante Des Extrait Méthanolique De Différentes Organes De Detariummicrocarpum Guill & Perr », Article, European Scientific Journal, V15, N°12, P (159-171), (2019).
- [127] M. Oyaizu, « Studies on products of browning reactions : antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine ». Article, Japanese Journal of Nutrition, V 44, P (307–315), (1986).
- [128] M. Ozyurek, , K.Guclu, R. Apak, « The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement », Article, Trends in Analytical Chemistry, V. 30, P (652-664), (2011).
- [129] R. Apak, K. Guclu, M. Ozyurek, S.E. Karademir, « Novel total antioxidant index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method ». Article, Journal of Agricultural and Food Chemistry, V 52, P (7970–7981), (2004).
- [130] R. Randhir Shetty « Improved α -amylase and Helicobacter pylori inhibition by fenugreek extracts derived via solid-state bioconversion using Rhizopus oligosporus ». Article, Asia Pac J Clin Nutr, V 16 (3), P (382-392), (2007).
- [131] A. Szydłowska-Czerniaka, C. Dianoczki, K. Recseg, G. Karlovits, E. Szlyk, « Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods ». Article, Talanta ; V 76, P (899-905), (2008).

- [132] G. Zengin, « A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabete ». Article, *Industrial Crops and Products*, V 53, P (244–251) ; (2014).
- [133] H. Belal, R Yesmin, Al. Mamun, N. Hasan, D. Islam, Islam, A, Tasnin MN, M. Rezaul Karim -2, Matiar Rahman, Masudul Hasan Khan, M. Ismail Hossain, Amirul Islam, « In Vitro Comprehensive Analysis Of Phytochemical Screening, Antioxidant, Anti-inflammatory and Anti-diabetic Activities Of Three Different Plants Of Bangladesh », Article Received *World Journal Of Pharmaceutical and Life Sciences WJPLS*, V 3, Issue 7, P (39-48) ; (2017).
- [134] N. Tlili, C. Sarikurcu, « Bioactive compounds profile, enzyme inhibitory and antioxidant activities of water extracts from five selected medicinal plants ». Article, *Industrial Crops and Products*. V 151, P (112448) ; (2020).
- [135] J. Mc Connell Oliver, E. L. Ongley Ross, E. Koehn Frank, « The Discovery of Marine Natural Products with Therapeutic Potential », Article, *Journal List Elsevier - PMC COVID-19 Collection* ; (2019).
- [136] B. Stefan, N-Pirjol, D Razvan , R. Anton, « Marine Bioactive Compounds Derived from Macroalgae as New Potential Players in Drug Delivery Systems:» , A Review , *Journal List Pharmaceutics* ; (2022).
- [137] N. Hajimohammadi , P Gharbani , A Mehrizad , « Evaluation of Antibacterial Activity of Aqueous, Ethanolic and Methanolic Extracts of Areca Nut Fruit on Selected Bacteria », *Journal List , Biomed Res Int* ; (2021).
- [138] S. Buerger, A. Spoering, E. Gavrish, C. Leslin, L. Ling, S. S. Epstein , « Microbial Scout Hypothesis, Stochastic Exit from Dormancy, and the Nature of Slow Growers » , *Journal List Appl Environ Microbiol* , v.78(9); (2012) .
- [139] R. Erin Sanders, « Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods » , *Journal List J Vis Exp* ; (2012),
- [140] C. Durafford, L. D'Hervicourt J.C Lapraz « Cahiers de phytothérapie Clinique Examen de laboratoire galénique, Elément thérapeutiques Synergiques, 2ème Ed Masson » V.78, 1990, Paris ; (1990).

[141] K. Rakshit, D. Harinder P.S. Makkar , K. Becker « Jatropha Diterpenes aReview Journal of the American Oil Chemists Society », Revue, the American Oil Chemists Society, V 88, P (301–322) ; (2011).

[142] S.Siddhuraju, « Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated *Tamarindus indica* seed coat » LWT -Food Science and Technology , Volume 40, Issue 6, Pages 982-990 ; (2007).

[143] J. Liu, H Yong, X Yao, H Hu, D Yun, L Xiao, « Recent advances in phenolic–protein conjugates: Synthesis, characterization, biological activities and potential applications », Review Article , Royal Society Of Chemistry ; (2019).