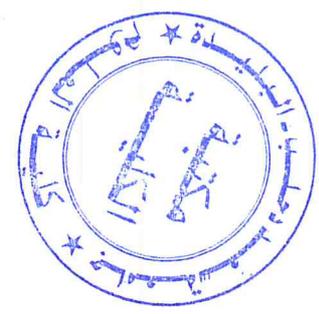


MA-540-67-1

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



Mémoire présenté par
HAMDINI Fatiha

En vue d'obtenir le diplôme de Master

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

Titre

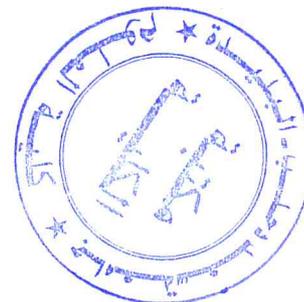
Dosage du phloroglucinol dans l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* par spectrométrie IRTF et des phénols totaux par spectrométrie visible. Etude de l'activité antimicrobienne et l'évaluation du pouvoir antioxydant

Soutenu publiquement en octobre 2013 devant le jury composé de:

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

Promotion 2012-2013

MA-540-67-1



RESUME

Cette étude est consacrée au développement d'une méthode analytique, pour la détermination de phénols dans l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* par spectrométrie IRTF, en utilisant l'extraction liquide-liquide et l'extraction en phase solide (EPS). Le phloroglucinol a été considéré comme étalon pour effectuer cette étude.

La teneur du phloroglucinol a été obtenue par spectrométrie IRTF dans l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia*, préalablement traitée en utilisant les valeurs des aires et des hauteurs des pics des bandes d'absorbance à 827, 1150, 1159 et 1611 cm^{-1} corrigées avec les lignes de base adéquates.

L'évaluation des phénols totaux dans les extraits d'algue brut et traité a été effectuée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu.

Les extraits d'algue brut et traité ont été évalués en employant des tests d'activités antioxydante et antimicrobienne. L'évolution de l'activité antioxydante a été effectuée par les deux méthodes de DPPH et de FRAP. L'activité antimicrobienne a été effectuée par la méthode de diffusion sur gélose.

Mots clés: *Cystoseira tamariscifolia*, phloroglucinol, spectrométrie IRTF, pouvoir antimicrobien, activité antioxydante, DPPH, FRAP

ABSTRACT

This study is devoted to the development of an analytical method for the determination of phenols in the brown seaweed *Cystoseira tamariscifolia* by FTIR spectrometry, using liquid-liquid extraction and solide-liquide extraction. Phloroglucinol was considered as standard to perform this study.

The content of phloroglucinol in the brown seaweed *Cystoseira tamariscifolia* previously treated was obtained by FTIR spectrometry. The absorbance bands at 827, 1150, 1159, 1611 cm^{-1} corrected with a suitable baselines were used.

The total phenolic content (TPC) in extracts was determined by using Folin–Ciocalteu colorimetric methodology.

The radical-scavenging capacity of algal extracts from the brown seaweed *Cystoseira tamariscifolia* was assessed using in parallel colorimetric method DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and electrochemistry one FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power).

The evaluation of the antimicrobial activity was performed by the method of diffusion disks, and showed a high activity of the treated extract against *Staphylococcus aureus*.

Keywords: *Cystoseira tamariscifolia*, phloroglucinol, FTIR spectrometry, antimicrobial and antioxidant activity, DPPH, FRAP.

ملخص

خصصت هذه الدراسة لتطوير طريقة تحليلية من أجل تحديد المركبات الفينولية في الطحلب البني سيستوزيرا تماريسيفوليا بواسطة المطيافية تحت الحمراء بتحويل فوري، وذلك باستخدام طريقة الاستخلاص في الحالة السائلة و الصلبة. أستعمل الفلوروغلوسينول كمعيار للقياس باعتباره الفينول المهيمن في التركيبة. تم الحصول على محتوى من الفلوروغلوسينول في الطحلب البني سيستوزيرا تماريسيفوليا بعد إخضاعه للمعالجة الأولية، بواسطة المطيافية ما تحت الحمراء بتحويل فوري باستخدام الموجات الامتصاصية في 1611 و 1159 و 1150، 827 سم⁻¹ مصححة بقواعد مناسبة.

معايرة المركبات الفينولية الكلية في مستخلصات الطحلب تمت بواسطة الطريقة اللونية Folin-Ciocalteu. بالنسبة لتقييم مستخلصات الطحلب البني المتحصل عليها استخدمت الاختبارات المضادة للأكسدة و المضادة للميكروبات. بالنسبة لدراسة النشاط المضاد للأكسدة، فقد أجريت بطريقتي DPPH و FRAP. في حين أن النشاط المضاد للميكروبات أجري بطريقة الانتشار في وسط آجار.

الكلمات الرئيسية: الطحلب البني سيستوزيرا تماريسيفوليا ، الفلوروغلوسينول، المطيافية ما تحت الحمراء بتحويل فوري، المضادة للأكسدة، المضادة للميكروبات، DPPH، FRAP.

REMERCIEMENT

Ce travail a été réalisé principalement entre le laboratoire de Chimie des Substances Naturelles à l'université de Blida et l'unité bactériologique du laboratoire centrale de l'Etablissement Public Hospitalier de Boufarik.

Je remercie spécialement Madame S.KASMI, maître de conférences à l'Université Blida1, pour sa disponibilité et son aide dans la réalisation de ce travail.

J'adresse mes remerciements les plus sincères et les plus dévoués à Mr M. El Hattab professeur à l'Université Blida1 pour m'avoir donné la chance d'être parmi cette promo de Master.

Mes vifs remerciements à Madame Y. Daghbouche professeur à l'Université Blida1, pour sa gentillesse et son aide, à qui j'exprime ici mon profond respect.

*Je tiens à remercier vivement ma promotrice Madame N .Bouzidi, maître de conférences à l'Université Blida1, de m'avoir encadrée dans ce travail ainsi que pour sa patience, sa disponibilité, ces encouragements et je suis très reconnaissante de tout ce qu'elle m'a apporté.
Merci profondément pour le temps consacré.*

J'adresse mes sincères remerciements à Mr Boutoumi, maître de conférences à l'Université Saad Blida1 pour sa disponibilité et son aide.

Mes vifs remerciements à Docteur Lassas responsable du l'unité bactériologique du laboratoire centrale de l'Etablissement Public Hospitalier de Boufarik pour toute sa disponibilité et son aide.

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux membres de jury, pour l'honneur qu'ils me font de juger ce travail. Qu'ils soient assurés de mon entière reconnaissance.

A mes parents, mes frères, mes sœurs et mes amies : Sonia, khadidja, Nassima: Je n'oublierai jamais ce que vous avez fait pour moi tout au long de la réalisation de ce travail. Que Dieu vous aide à réaliser vos projets les plus chers !

À toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.

DEDICACE

A mes chers parents,

A mes sœurs: Fatma, Meriem, Noura.

*A mes frères: Tayeb, Ahmed, Rezak, Rachid, Hamza,
Fodil, Abdelkader.*

A mes neveux et nièces.

A mes belles sœurs.

A toute la famille HAMDINI.

*A mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux moments au
cours de mon cursus à l'université: Faïza, Leïla.*

*A mes amies de la promotion de master de Chimie des
substances Naturelles.*

A tous ceux qui me sont chers.

TABLE DES MATIERES

RESUME

REMERCIEMENTS

DEDICACES

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION GENERALE 18

Chapitre I SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1	Généralité sur les algues	21
I.1.1	Définition	21
I.1.2	Classes des algues marines	21
I.1.2.1	Chlorophyceae	21
I.1.2.2	Rhodophyceae	22
I.1.2.3	Phéophyceae	22
I.1.3	Notions générales sur les algues brunes	22
I.1.3.1	Caractères généraux	22
I.1.3.2	Distribution phytogéographique mondiale	23
I.2	Etude chimique antérieure des algues brunes de la famille des Sargassaceae	23
I.2.1	Etude chimique du genre Cystoseira	24
I.2.1.1	Terpènes	24
I.2.1.2	Méroditerpènes	25
I.2.1.3	Stérols	25

I.2.1.4	Composés phénoliques	26
I.2.1.4.1	Biosynthèse des composés phénoliques	26
I.2.1.4.2	Structure chimique et source	29
I.3	Biologie des algues brunes du genre <i>Cystoseira</i>	32
I.3.1	Présentation de la famille des Sargassaceae	32
I.3.2	Position systématique de la famille des Sargassaceae	32
I.3.3	<i>Cystoseira</i>	33
I.3.4	Description, biologie et écologie de l'algue <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	33
I.3.4.1	Description	33
I.3.4.2	Position systématique de <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	34
I.4	Composés isolés de <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	35
I.5	Méthodes d'extraction	37
I.5.1	Protocoles d'obtention de composés phénoliques	37
I.5.2	Extraction en phase solide	40
I.6	Méthodes d'analyse	40
I.6.1	Chromatographie sur Couche Mince (CCM)	42
I.6.2	Spectrophotométrie UV/visible	42
I.6.3	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	43
I.7	Activités biologiques de l'algue <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	46
Chapitre II	DOSAGE DU PHLOROGLUCINOL PAR SPECTROMETRIE IRTF ET DES PHENOLS TOTAUX PAR SPECTROPHOTOMETRIE VISIBLE DANS L'ALGUE BRUNE <i>CYSTOSEIRA TAMARISCIFOLIA</i>	
II.1	Introduction	48
II.2	Instrumentation et réactifs	48

II.2.1	Spectrométrie Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	48
II.2.2	Réactifs	49
II.3	Procédure générale	49
II.3.1	Préparation de l'extrait brut	49
II.3.2	Procédé d'isolement et de préconcentration du phloroglucinol dans <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	50
II.3.2.1	Obtention de l'extrait	50
II.3.2.2	Fractionnement et purification de l'extrait	50
II.3.3	Identification du phloroglucinol par CCM	52
II.3.4	Méthode de calibration externe	52
II.3.5	Méthode des additions standards	52
II.4	Résultats et discussions	53
II.4.1	Caractéristiques de l'extrait brut de <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	53
II.4.2	Identification du phloroglucinol par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)	53
II.4.3	Solubilité du phloroglucinol dans le solvant d'analyse	54
II.4.4	Spectre IRTF du phloroglucinol	56
II.4.5	Caractéristiques analytiques du phloroglucinol préparé directement dans CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95/5 : V/V)	57
II.4.6	Comparaison des caractéristiques analytiques du phloroglucinol dissout directement dans le solvant et obtenu après traitement	60
II.4.6.a	Choix de la composition du solvant d'extraction du phloroglucinol	60

II.4.6.b	Choix de la composition du solvant d'extraction en phase solide (solvant d'élution)	62
II.4.7	Caractéristiques analytiques du phloroglucinol après protocole de traitement	63
II.4.8	Détermination de la teneur du phloroglucinol dans l'algue brune <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	66
II.4.8.1	Par la méthode de calibration externe	66
II.4.8.2	Par la méthode des additions standards	69
II.4.9	Conclusion	73
II.5	Analyse quantitative des extraits par la méthode Folin-Ciocalteu	74
II.5.1	Introduction	74
II.5.2	Choix de la méthode de quantification des composés phénoliques	74
II.5.3	Procédure générale	74
II.5.3.1	Etablissement de la courbe d'étalonnage	74
II.5.3.2	Détermination des phénols totaux dans l'algue brune <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	75
II.5.4	Résultats et discussions	75
II.5.4.1	Dosage des phénols totaux par la méthode Folin-Ciocalteu	75
III.5.4.1.1	Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux (PPT)	75
III.5.4.1.2	Détermination du taux de phénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu	77

Chapitre III	EVALUATION DU POUVOIR ANTIOXYDANT ET ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE	
III.1	Estimation du pouvoir antioxydant des extraits de l'algue brune <i>Cystoseira tamariscifolia</i> par deux méthodes	80
III.1.1	Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1picrylhydrazyl)	80
III.1.1.1	Procédure générale	80
III.1.1.2	Résultats et discussions	81
III.1.1.2.1	Evaluation de l'activité antioxydante	81
III.1.2	Pouvoir réducteur (FRAP, Ferric Reducing Antioxydant Power)	86
III.1.2.1	Procédure générale	86
III.1.2.2	Résultats et discussions	87
III.2	Test d'activité antimicrobienne	88
III.2.1	Lieu de travail	88
III.2.2	Matériel microbien et milieu de culture	88
III.2.3	Etude qualitative de l'effet antimicrobien par la méthode de diffusion sur milieu solide (l'aromatogramme)	89
III.2.3.1	Principe	89
III.2.3.2	Technique de l'antibiogramme	90
III.2.4	Résultats et discussions	92
	CONCLUSIONS	97
	PERSPECTIVES	100
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	101

LISTE DES ABREVIATIONS

IRTF: Infrarouge à Transformée de Fourier

CCM: Chromatographie sur Couche Mince

CH₂Cl₂: Dichlorométhane

EtOH: Ethanol

MeOH: Methanol

CHCl₃: Chloroforme

H₂O: Eau

R_F: Rapport frontal

LD: Limite de Détection

LQ: Limite de Quantification

DSR: Déviation Standard Relative

DC: Domaine de Concentration

PT: Phénols totaux

EqPh: Equivalent de phloroglucinol

DPPH: 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle

EC₅₀ (IC₅₀): Concentration inhibitrice à 50 %

FRAP: Capacités réductrices ferriques d'antioxydants

DO: Densité Optique

LISTE DES FIGURES

Figure I.1	Unité isoprénique	24
Figure I.2	Biosynthèse des méroditerpènes	25
Figure I.3	Cholestérol	25
Figure I.4	Voie de shikimate de biosynthèse des composés phénoliques	27
Figure I.5	Voie de phénylpropanoïde de biosynthèse des composés phénoliques	28
Figure I.6	Phloroglucinol	29
Figure I.7	Structures chimiques de différents types de phlorotannins	31
Figure I.8	Structures chimiques de différents types de phlorotannins	31
Figure I.9	Représentation schématique de <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	34
Figure I.10	<i>Cystoseira tamariscifolia</i>	34
Figure I.11	Méroditerpènes linéaires isolés de <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	35
Figure I.12	Méroditerpènes monocyclisés isolés de <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	35
Figure I.13	Méroditerpènes bicyclisés isolés de <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	36
Figure I.14	Méroditerpènes réarrangés isolés de <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	36
Figure I.15	Protocole d'extraction des composés phénoliques à partir Sargassaceae du pacifique	37
Figure I.16	schémas d'extraction et de purification de composé actifs d' <i>Ecklonia cava</i>	38
Figure I.17	Protocole d'extraction, isolement et purification de phlorotannins à partir d' <i>Ecklonia cava</i>	39

Figure I.18	Organigramme d'isolement de phlorotannins chez les céréales	40
Figure I.19	Schéma d'un spectromètre à transformée de Fourier	43
Figure II.1	Montage de flux utilisé pour la détermination du phloroglucinol dans l'algue brune <i>Cystoseira tamariscifolia</i> par spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier	49
Figure II.2	Protocole d'isolement et de préconcentration du phloroglucinol	51
Figure II.3	Identification du phloroglucinol par CCM	53
Figure II.4	Spectre IRFT de phloroglucinol (4 mg.mL ⁻¹) préparé directement dans CH ₂ Cl ₂ /EtOH (80/20 : V/V)	55
Figure II.5	Spectre IRFT de phloroglucinol (4 mg.mL ⁻¹) préparé directement dans CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95/5 : V/V)	56
Figure II.6	Spectre IRFT d'absorbance d'une série d'étalons de phloroglucinol préparée directement dans CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95/5 : V/V), pour un domaine de concentration compris entre 0.35-5 mg.mL ⁻¹	57
Figure II.7	Spectre IRTF d'absorbance d'extrait éthanolique (noir) et du phloroglucinol d'une concentration de 4 mg.mL ⁻¹ (violet) préparé directement dans solvant	61
Figure II.8	Spectre IRTF d'absorbance d'extrait méthanolique (noir) et du phloroglucinol d'une concentration de 4 mg.mL ⁻¹ (violet) préparé directement dans solvant	61
Figure II.9	Spectre IRTF d'absorbance d'une série d'étalon de phloroglucinol traité, pour un domaine de concentration compris entre 0,35-5 mg.mL ⁻¹ .	63
Figure II.10	Spectre IRTF de phloroglucinol (2,5 mg.mL ⁻¹) préparée directement dans CH ₂ Cl ₂ -MeOH 95 :5 (v/v) (violet) et du	66

	phloroglucinol obtenu après traitement de l'algue (noire)	
Figure II.11	Spectre IRTF de l'algue traité sans ajout (rose), algue traité avec ajout de 1 mg.mL ⁻¹ de phloroglucinol (bleu), algue traité avec ajout de 2 mg.mL ⁻¹ de phloroglucinol (vert), algue traité avec ajout de 3 mg.mL ⁻¹ de phloroglucinol (rouge), et de l'algue traité avec ajout de 5 mg.mL ⁻¹ de phloroglucinol (noire).	70
Figure II.12	Courbe d'étalonnage du phloroglucinol	76
Figure II.13	Evaluation des polyphénols totaux des extraits d'algue brune <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	78
Figure III.1	Forme libre et réduite du DPPH	81
Figure III.2	Variation du taux de piégeage du DPPH par l'extrait brut de <i>Cystoseira tamariscifolia</i> en fonction des différentes concentrations	82
Figure III.3	Variation du taux de piégeage du DPPH par l'extrait traité de <i>Cystoseira tamariscifolia</i> en fonction des différentes concentrations	83
Figure III.4	Variation du taux de piégeage du DPPH par l'acide ascorbique en fonction des différentes concentrations	84
Figure III.5	Comparaison des valeurs EC ₅₀ de nos extraits et d'antioxydant standard	85
Figure III.6	Le pouvoir réducteur des deux extraits d'algue	87
Figure III.7	Illustration de la méthode de l'antibiogramme	91
Figure III.8	Activité antimicrobienne des extraits d'algue brune <i>Cystoseira tamariscifolia</i> contre : A) <i>Escherichia coli</i> , B) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , C) <i>Staphylococcus aureus</i> , D) <i>Bacillus subtilis</i> , E) <i>Entérocooccus seacalis</i> F) <i>Staphylococcus epiderium</i> , G) <i>Micrococcus luteus</i> , H) <i>Salmonella enterica</i> , I) <i>Candida</i>	94

albicans

Figure III.9

Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition (en mm) des extraits d'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* sur les différentes souches ATCC.

96

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1	Différentes méthodes d'analyse des phénols	45
Tableau II.1	Caractères organoleptiques de l'extrait brut	53
Tableau II.2	Solubilité du phloroglucinol	54
Tableau II.3	caractéristiques analytiques du phloroglucinol préparée directement dans CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95/5 : V/V) considérant l'aire du pic	58
Tableau II.4	caractéristiques analytiques du phloroglucinol préparées directement dans CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95/5 : V/V) considérant la hauteur du pic	59
Tableau II.5	Analyse du phloroglucinol obtenu après EPS en utilisant des différentes proportions de solvants d'éluion CHCl ₃ /MeOH : (V/V)	62
Tableau II.6	Caractéristiques analytiques du phloroglucinol obtenu après protocole de traitement en considérant l'aire du pic	64
Tableau II.7	Caractéristiques analytiques du phloroglucinol obtenu après protocole de traitement en considérant la hauteur du pic	65
Tableau II.8	Taux du phloroglucinol dans l'algue brune <i>Cystoseira tamariscifolia</i> déterminé par la méthode de calibration externe (hauteur du pic)	68
Tableau II.9	Taux de phloroglucinol dans l'algue brune <i>Cystoseira tamariscifolia</i> déterminé par la méthode des additions standards	71
Tableau II.10	Taux de phloroglucinol dans l'algue brune <i>Cystoseira tamariscifolia</i> déterminé par la méthode des additions standards	72
Tableau II.11	Caractéristiques analytiques du phloroglucinol obtenu par le test de Folin-Ciocalteu	76
Tableau II.12	Quantité des polyphénols totaux dans différents des extraits d'algue brune <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	77

Tableau III.1	Variation du taux de piégeage (I%) du DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits d'algue brune <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	82
Tableau III.2	Variation du taux de piégeage (I%) du DPPH en fonction des différentes concentrations d'acide ascorbique.	83
Tableau III.3	Valeurs EC ₅₀ des extraits d'algue brune <i>Cystoseira tamariscifolia</i> et celles de l'antioxydant standard.	84
Tableau III.4	Valeurs de FRAP des extraits d'algue brune <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	87
Tableau III.5	Souches de références utilisées dans le présent travail.	88
Tableau III.6	Relation entre le diamètre d'inhibition et la sensibilité des souches	92
Tableau III.7	Activité antimicrobienne des extraits d'algue brune <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	95

Introduction générale

L'environnement marin représentant approximativement la moitié de la biodiversité globale, est une énorme ressource pour de nouveaux composés [1]. Seulement 1% des espèces marines identifiées ont été étudiées à ce jour. L'étude des produits d'origine marine a débuté à la fin des années 1960 et a conduit à l'isolement d'environ 10000 substances [2]. Les substances naturelles isolées d'organismes marins se caractérisent souvent par la présence d'éléments chimiques ou de structures rarement observées, voire inconnues en milieu terrestre [3].

Les algues occupent une place importante dans le milieu marin avec plus de 1200 espèces appartenant à tous les niveaux évolutifs, capables de produire des substances dont l'action constitue dans certains cas, un élément de protection contre les prédateurs naturels [4].

Beaucoup de composés isolés présentent une potentialité pharmacologique, bien supérieure à celle de produits naturels provenant de plantes ou d'organismes terrestres [2].

Récemment, les algues marines brunes sont considérées parmi les végétaux qui sont riches en composés phénoliques [5], avec différents effets physiologiques sur la santé humaine [6]. Ces métabolites secondaires, non essentiels à l'organisme, sont présents en quantités variables chez les végétaux vasculaires (on parle de tannins) et chez les algues brunes (on parle de phlorotannins) [7].

Dans ces dernières années, les travaux concernant l'extraction des composés phénoliques ont attiré un intérêt spécial. L'extraction est une étape très importante dans l'isolement, l'identification et l'utilisation des composés phénoliques et il n'y a pas de méthode d'extraction unique et standard. Ces méthodologies impliquent la Co-extraction des substances non-phénoliques, telles que les sucres, les acides organiques et les protéines, exigeant des procédés de purification ultérieurs. L'extraction par solvants, en fonction du statut de biomasse peut être une extraction liquide-liquide ou une extraction solide-liquide [8].

Différentes techniques analytiques sont utilisées dans l'analyse des composés phénoliques. Néanmoins, la spectrophotométrie est la technique la plus sollicitée due à sa simplicité et son coût bas. Un certain nombre de méthodes spectrométriques ont été développées pour la

quantification des polyphénols [8]. Dans ce contexte, la spectrométrie IRTF a été sollicitée surtout pour des analyses qualitatives et complémentaires. Cependant, le développement de nouvelles méthodes d'analyse de ces substances est toujours nécessaire.

Le but principal de ce travail est de contribuer au développement d'une nouvelle méthode analytique de dosage des phénols par spectrométrie IRTF. Une telle méthode, simple, rapide, non couteuse et surtout disponible s'avère nécessaire dans nos laboratoires.

Les objectifs assignés à ce travail sont :

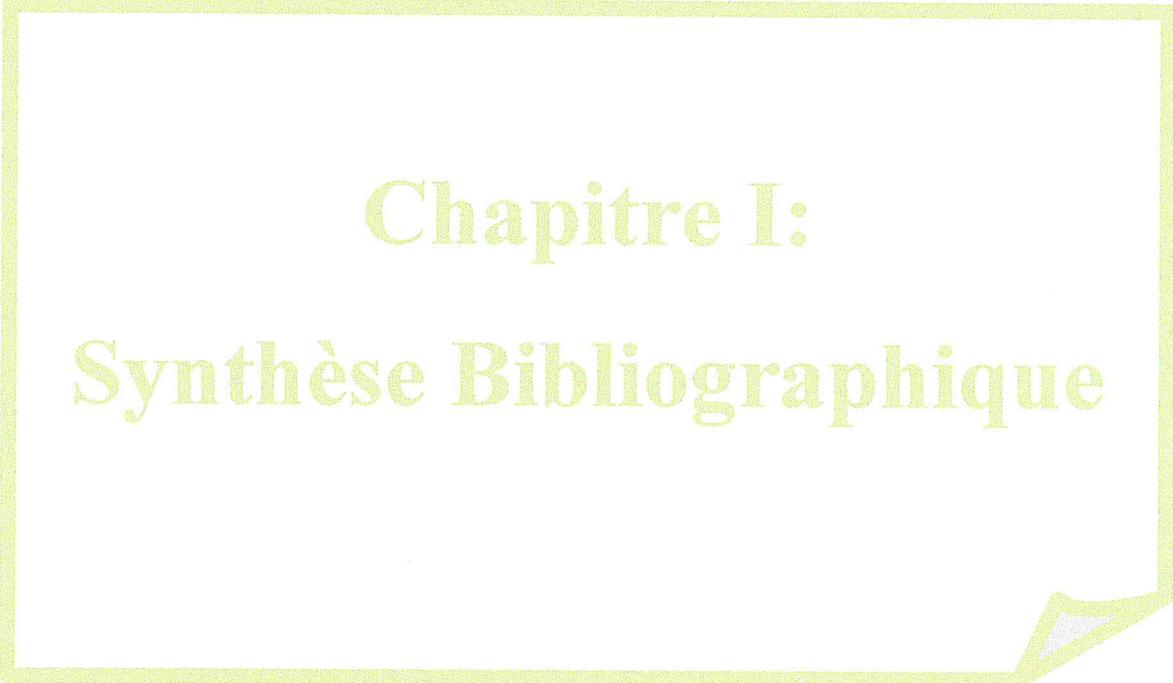
- ❖ Dosage du phloroglucinol dans l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* par spectrométrie IRTF après optimisation du protocole d'extraction adapté;
- ❖ Dosage des phénols totaux par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu;
- ❖ Etude des activités antimicrobienne et évaluation du pouvoir antioxydant;

Le contenu de ce mémoire est subdivisé en trois parties:

La première partie concerne une synthèse bibliographique portant sur les algues brunes du genre *Cystoseira* et plus particulièrement sur *Cystoseira tamariscifolia*. Une revue sur les procédés d'extraction et de purification des composés phénoliques et les différentes techniques de leur analyse a également été présentée.

La deuxième partie porte sur le développement d'une nouvelle méthode de dosage des phénols dans l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* par spectrométrie IRTF et le dosage des phénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu par spectrophotométrie UV- visible. Les phénols sont récupérés par des extractions liquide-liquide (ELL) et en phase solide (EPS).

La troisième partie est consacrée à l'étude de l'activité antimicrobienne et l'évaluation du pouvoir antioxydant.



Chapitre I:
Synthèse Bibliographique

I.1 Généralité sur les algues

Les algues représentent la quasi-totalité des végétaux vivant en milieu marin. On les trouve dans toutes les mers du monde où elles sont en général fixées au fond, mais peuvent également flotter librement à la surface [3]. Elles sont l'un des plus importants producteurs de la biomasse dans le milieu marin. Deux grands types d'algues marines peuvent être identifiés, les macroalgues (algues) et les micro-algues. Les macroalgues occupent la zone littorale [9].

Selon leur équipement pigmentaire, les algues sont classées en Rhodophycées (rouges), Phéophycées (brunes) ou Chlorophycées (vertes). Elles sont considérées comme source de composés bioactifs car elles peuvent produire une grande variété de métabolites secondaires. Ces derniers sont doués d'activités antioxydante, antivirale, antifongique et antimicrobienne [1].

Les algues marines sont des ressources vivantes renouvelables qui sont employées comme nourriture et engrais dans beaucoup de régions dans le monde. Des algues sont également connues pour être comparativement sensibles aux produits chimiques [1].

I.1.1 Définition

L'appellation "algue" est couramment utilisée pour désigner un végétal aquatique, par opposition aux végétaux terrestres. On définit en tant qu'«algue» un végétal chlorophyllien dont l'appareil végétatif, appelé thalle, ne possède aucun organe spécifique (racine, tige, feuille), contrairement aux végétaux supérieurs [7]. Ce thalle peut être très simple, formé d'une seule cellule ou d'un ensemble de cellules identiques, ou plus complexes [3].

I.1.2 Classes des algues marines

En général, les algues sont divisées en trois groupes qui se distinguent par leur couleur [2]. Chaque groupe contient des classes, et chaque classe contient des espèces.

I.1.2.1 Chlorophyceae

Ce sont des algues vertes dont le thalle est de couleur typiquement verte en raison des chlorophylles a et b dominant dans les chloroplastes. Toutefois, l'exposition prolongée aux

fortes intensités lumineuses provoque la synthèse de pigments photoprotecteurs (caroténoïdes), qui confèrent aux thalles des couleurs orangées à jaunâtres.

Ce groupe d'algues peu diversifié dans les eaux tempérées est au contraire riche en espèces et en formes dans les eaux tropicales. Les algues vertes sont présentes dans tous les systèmes aquatiques depuis les milieux marins jusqu'aux eaux douces [2].

I.1.2.2 Rhodophyceae

Les rhodophycées ce sont des algues rouges, elles montrent une originalité particulière avec leur pigments surnuméraires rouges (phycoérythrines) et bleus (phycocyanines) qui viennent masquer la chlorophylle. Les proportions relatives entre les différents pigments, conjuguées avec la forme du thalle, donnent à la lumière toutes les couleurs imaginables depuis le brun noirâtre jusqu'au rose très clair en passant par les rouges pourpres et les orangés.

De plus, pour une même espèce, la couleur varie en fonction de l'exposition aux rayons lumineux : souvent les individus qui se développent aux forts éclaircissements montrent des couleurs délavées, où dominant les jaunes orangés en raison de la forte concentration en pigments caroténoïdes photoprotecteurs [2].

I.1.2.3 Phéophyceae

Au sein des chromophytes, les algues brunes sont regroupées dans la classe des fucophycées appelées autrefois les phéophycées. Ce sont des algues presque exclusivement marines. Elles montrent une grande diversité morphologique depuis les formes filamenteuses relativement simples aux grandes algues brunes. Les algues brunes se sont principalement diversifiées dans les mers froides et tempérées ou elles forment les grandes forêts sous-marines. Dans les eaux tropicales, elles sont moins nombreuses en espèces, mais représentent les plus grands thalles et forment les populations les plus denses [2].

1.1.3 Notions générales sur les algues brunes

1.1.3.1 Caractères généraux

Les algues brunes sont regroupées dans la classe des fucophycées appelées autrefois les phéophycées. Elles sont apparues 200 millions d'années après les vertes, un peu avant ou un peu après les algues rouges.

Ce sont des algues presque exclusivement marines [3], et se rencontrent dans toutes les mers du monde, mais davantage dans les eaux tempérées et froides que dans les eaux chaudes, la principale exception étant les sargasses de la mer du même nom. Avec 99,7% d'espèces marines, environ 1500 – 2000, les algues brunes montrent une grande diversité morphologique depuis les formes filamenteuses relativement simples aux grandes algues brunes dont l'organisation morphologique complexe évoque les tiges feuillées des végétaux supérieurs. Toujours visibles à l'œil nu, car elles sont souvent de grande taille et jamais unicellulaires.

I.1.3.2 Distribution phytogéographique mondiale

Les algues brunes marines 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 [2].

Les algues brunes se rencontrent dans toutes les mers du monde, mais d'avantage elles se sont principalement diversifiées dans les mers froides et tempérées où elles forment les grandes forêts sous-marines. Dans les mers tropicales, elles sont moins nombreuses en espèces, mais représentent les plus grandes thalles et forment les populations des plus denses [3].

Les algues brunes se trouvent en général entre la surface et une profondeur de 15 à 20 mètres dans des eaux souvent agitées où l'efficacité de leurs crampons leur permet de résister aux fortes houles de l'atlantique et du pacifique [3].

I.2 Etude chimique antérieure des algues brunes de la famille des Sargassaceae

La famille des Sargassaceae se compose de plusieurs genres dont certains sont des distributions très limitées (*Acystis*, *Bifurcariopsis*, *Stolonophora*...) ou sont présentes seulement sur le continent australien par exemple (*Acrocarpia*, *Carpoglossum*, *Caulocystis*...). Par contre, d'autres sont largement répandus (*Bifurcaria*, *Cystoseira*, *Halidrys*...). Parmi ces derniers, le genre *Cystoseira* a fait l'objet de plusieurs études chimiques qui ont débuté vers les années 76. Ces études ont abouti à la découverte de plusieurs nouvelles molécules [2].

D'un point de vue chimique, les algues brunes sont caractérisées généralement, par la présence d'un pourcentage (en masse) modéré de stérols et de composés terpéniques. Ces derniers peuvent être regroupés en deux classes: les terpènes et les terpènes à biogénèse mixte dits "méroditerpènes" qui comprennent un noyau méthyle-hydroquinonique sur lequel est fixé un

enchaînement diterpénique. Chaque classe peut être subdivisée en plusieurs groupes: chez les diterpènes, on distingue les linéaires et les cyclisés, chez les méroditerpènes, ce sont les linéaires, les monocyclisés, les bicyclisés et les réarrangés.

Notons que les algues brunes contrairement aux algues rouges ne contiennent pas de structure terpénique halogénée car elles sont dépourvues de l'enzyme responsable des réactions d'halogénéation: l'haloperoxydase [2].

I.2.1 Etude chimique du genre *Cystoseira*

Les algues brunes du genre *Cystoseira* sont connues pour métaboliser majoritairement des terpènes ainsi que des phlorotannins [10].

I.2.1.1 Terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures végétaux, la plupart d'entre eux constituent le principe odoriférant des végétaux. Cette odeur est due à la libération des molécules très volatiles contenant 10, 15, et 20 atomes de carbones, ces molécules sont employées comme condiment ou comme parfum, beaucoup de molécules terpéniques possèdent des propriétés antiseptiques [11].

Les terpènes sont des dérivés de l'isoprène C_5H_8 (figure I.1) et ont pour formule de base des multiples de celle-ci $(C_5H_8)_n$. On peut considérer l'isoprène comme l'un des éléments de construction préférés de la nature.

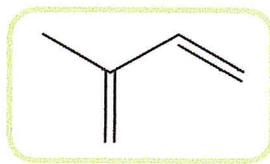


Figure I.1 : Unité isoprénique

Leur squelette de carbone est constitué d'unités isopréniques reliées entre eux. C'est ce que l'on appelle la règle de l'isoprène. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former des cycles [12].

I.2.1.2 Méroditerpènes

Ces phytoconstituants à biogenèse mixte comprennent un noyau hydroquinonique plus ou moins substitué fixé à un enchaînement terpénique, souvent oxygéné qui peut être linéaire, monocyclisé, bicyclisé ou réarrangé.

La première unité isoprénique peut aussi se cycliser avec le groupement phénolique en ortho formant ainsi un noyau chromane [2]. La voie de biosynthèse de la partie hydroquinonique dérive du métabolisme de l'acide shikimique (figure I.2).

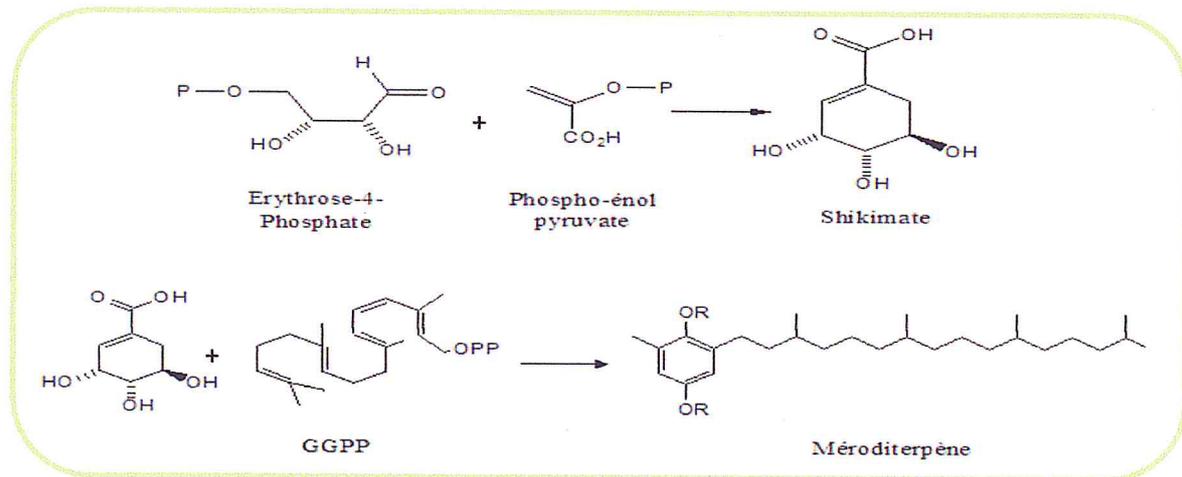


Figure I.2: Biosynthèse des méroditerpènes

I.2.1.3 Stérols

Ce sont des dérivés des phytostérols. Ces composés sont naturellement présents dans la fraction lipidique des plantes. Ils ne sont pas synthétisés par l'homme et l'animal, ils ne peuvent être apportés que par l'alimentation. Plusieurs études ont démontré que les phytostérols et les phytostanols réduisent l'absorption du cholestérol dans l'intestin grêle.

L'exemple le plus courant de stérol est le: cholestérol (figure I.3). Leur structure générale est composée de 4 cycles dont les trois premiers à 6 chaînons et le dernier à 5 [12].

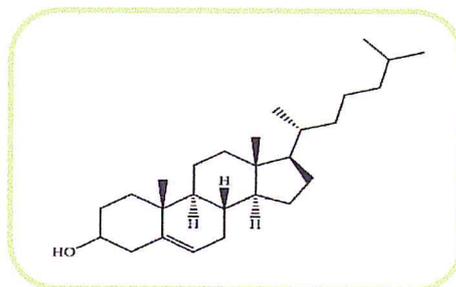


Figure I.3: Cholestérol

I.2.1.4 Composés phénoliques

Le terme « *polyphénols* » est fréquemment utilisé dans le langage courant et même dans des articles scientifiques ou de vulgarisation pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux [12].

Les composés phénoliques sont des molécules qui appartiennent au métabolisme secondaire. Ils constituent un groupe important de métabolites secondaires, environ 10000 composés ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui [13]. Les composés phénoliques sont par définition des dérivés non azotés dont le ou les cycles aromatiques sont issus du métabolisme de l'acide shikimique et/ou de celui d'un polyacétate [13]. Ils sont très largement répandus dans le règne végétal, ils peuvent être regroupés en de nombreuses classes suivant la complexité du squelette de base (noyau C6), le degré de modification de ce squelette (oxydation, hydroxylation ...) et enfin suivant les molécules auxquelles ils sont associés (glucides, lipides, protéines, autres métabolites) [14].

Les groupes principaux de polyphénols sont les flavonoïdes, les acides phénoliques, les tannins, les stilbenes et les lignans [8]. Ils forment un groupe important de produits naturels connus par leur pouvoir antioxydant et activités biologiques [6]. Ils sont présents chez toutes les plantes vasculaires ainsi que les algues [15]. La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées [16], avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées [17].

Les composés phénoliques algaux sont généralement des polymères du phloroglucinol, dont les teneurs sont significativement plus importantes chez les algues brunes (phéophycées) que chez les algues rouges ou vertes. Les fonctions principales attribuées à ces composés chez les végétaux sont la défense des cellules contre l'effort abiotique et biotique [5], la protection contre les pathogènes et les herbivores ainsi que la limitation des dommages dus aux radiations UV. Dans ce cas, ils agissent par effet d'écran et par effet antioxydant [14].

En effet, des études récentes indiquent que les phénols pourraient diminuer le risque d'apparition d'un certain nombre de pathologies, en particulier celles liées au vieillissement et aux lésions oxydatives (cancers, maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives).

I.2.1.4.1 Biosynthèse des composés phénoliques

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromagenèse qui sont la voie du métabolisme de l'acide shikimique et la voie du métabolisme des polyacétates [14]. Certains sont issus d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate entraînant ainsi la formation de composés mixtes [18].

❖ Voie de Shikimate

C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques, elle joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde [19]. La figure 1.4 représente la voie de shikimate.

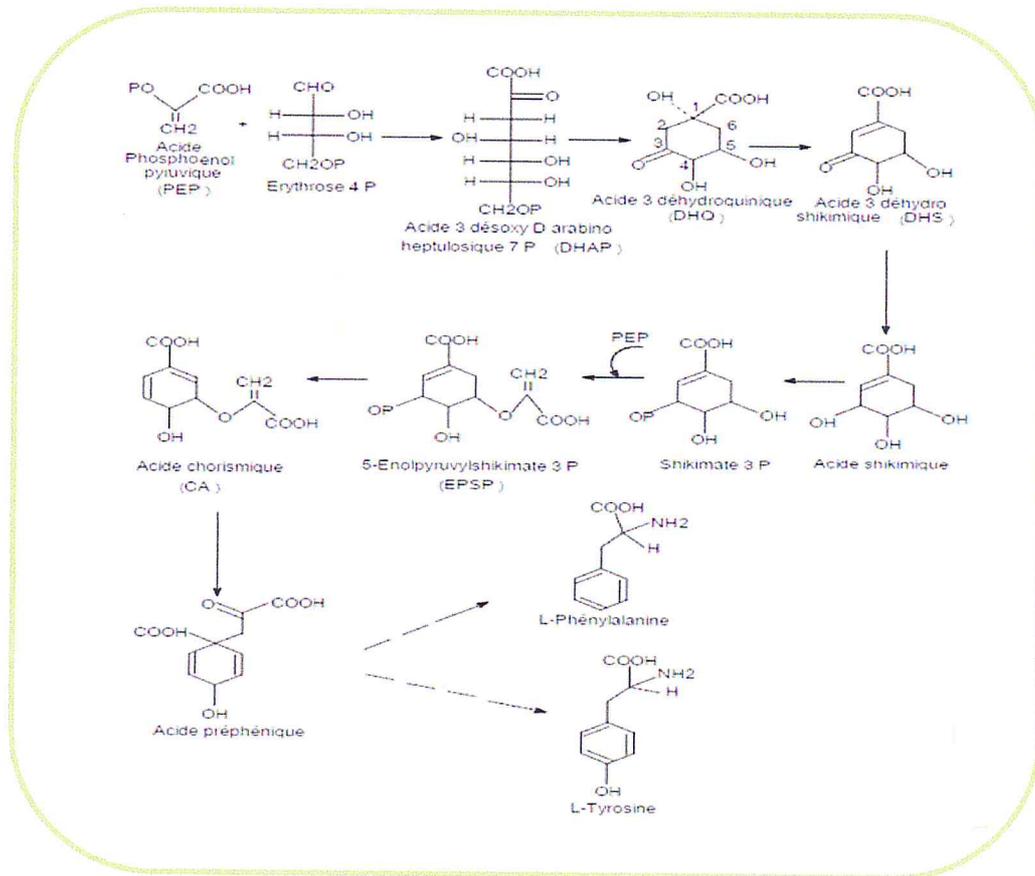


Figure I.4: Voie de shikimate de la biosynthèse des composés phénoliques [20]

❖ Voie de phénylpropanoïde

La voie de phénylpropanoïde (figure I.5) commence par la phénylalanine qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose.

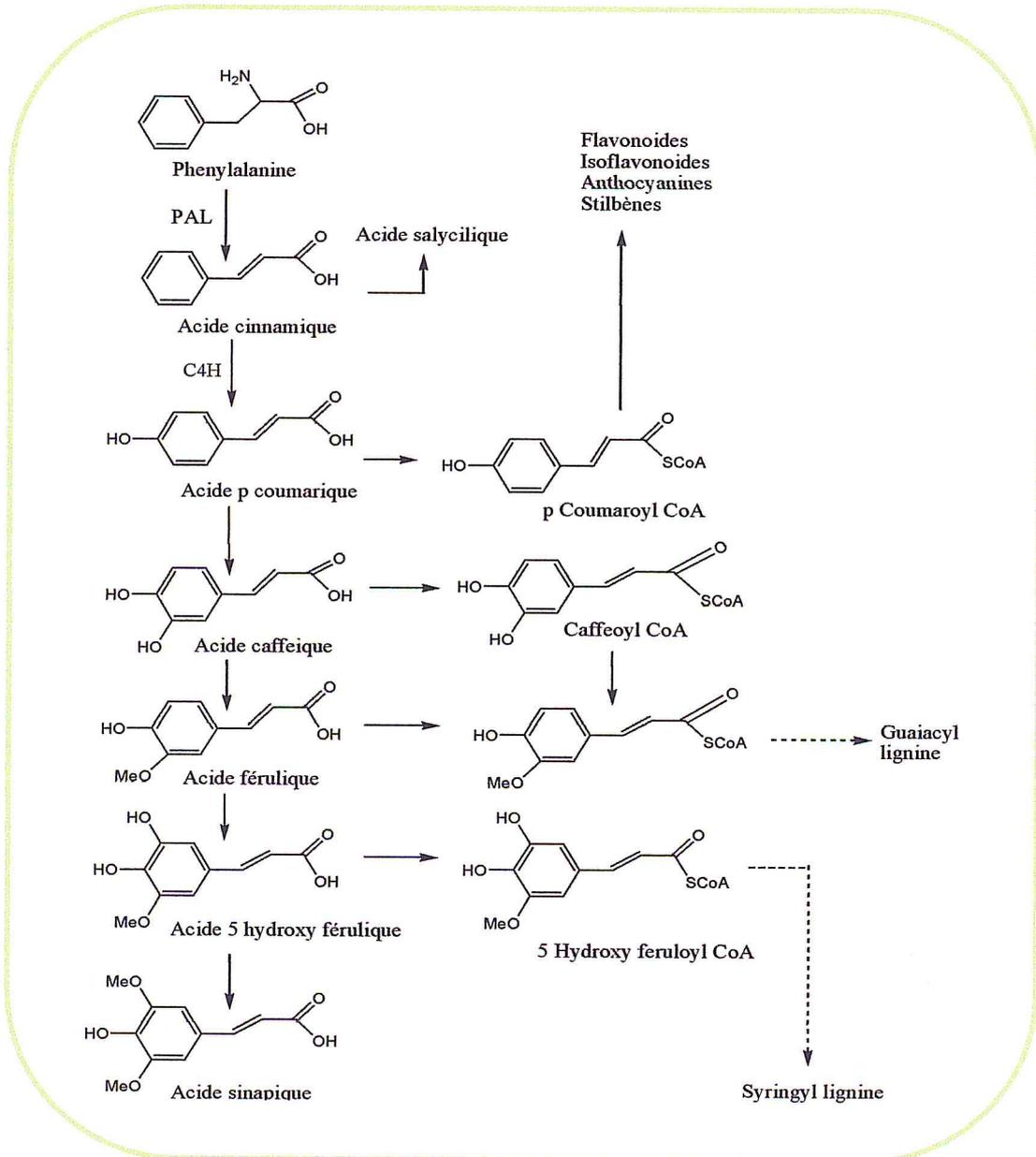


Figure I.5 : Voie de phénylpropanoïde de la biosynthèse des composés phénoliques

[21]

I.2.1.4.2 Structure chimique et source

Les dérivés phénoliques issus des algues brunes peuvent être divisés en deux groupes :

- Les dérivés mono-phénoliques,
- Les dérivés polyphénoliques (phlorotanins).

I.2.1.4.2.a Dérivés mono-phénoliques

Les mono-phénols comme l'indique le nom ne contiennent qu'une seule unité phénolique avec un, deux ou trois groupements hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction. Ils peuvent être classés en trois groupes :

- ❖ Les dérivés du phénol
- ❖ Les dérivés du résorcinol
- ❖ Les dérivés du phloroglucinol

➤ Phloroglucinol

Le phloroglucinol (1, 3,5-trihydroxybenzène; 1, 3,5-benzènetriol) (figure I.6) est le monomère de phlorotannins abondant dans les algues brunes, est un composé bioactif qui a été isolé à partir de *Pseudomonas* marins, d'*Ishige Okamurae*, *Garcinia Subelliptica*, *Fucaceae* et beaucoup d'autres produits naturels [22].

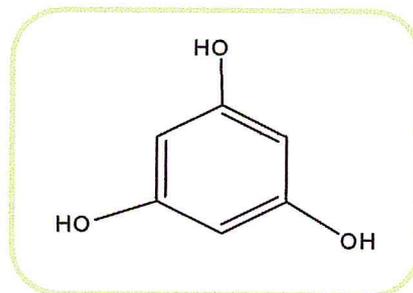


Figure I.6 : Phloroglucinol

I.2.4.2.b Dérivés polyphénoliques

➤ **Phlorotannins**

Dans les pheophyceae, la majorité de composés phénoliques décrits sont des phlorotannins: polymères de phloroglucinol tels que les fucols, les fuhalols, les phlorethols, les eckols et les caracolas [23].

Les phlorotannins, les métabolites secondaires polyphénoliques dominants trouvés seulement en algues brunes (Phaeophyta), ont récemment attiré l'intérêt considérable de recherches en raison de leurs activités antioxydantes supérieures [24]. Ils sont des polymères halogénés du phloroglucinol qui s'accumulent fréquemment en grande quantité [25], peut constituer jusqu'à 15% du poids sec d'algues brunes. Les poids moléculaires des phlorotannins varient de 126 DA à 650 kDa, mais le plus généralement sont trouvés dans la gamme du 10 à 100 kDa [26].

Les phlorotannins sont issus de couplages radicalaires, carbone-carbone ou carbone-oxygène à partir du phloroglucinol (figure I.7.i, ii, iii). Les unités monomériques sont liées par des liaisons aryle-aryle et des liaisons éther de diaryle en formant différents sous-groupes de phlorotannins. Les fucols (figure I.8.i), les phlorethols (figure I.8. ii), les fuhalols (figure I.8. iii), les eckols (figure I.8.iv) [26].

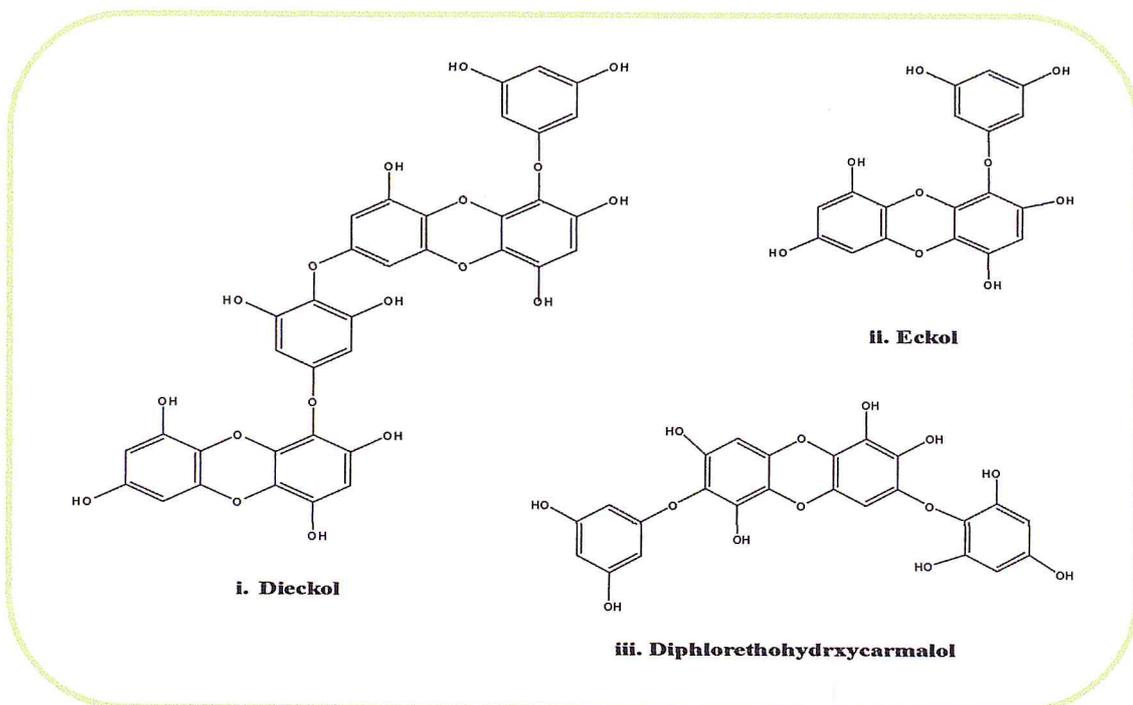


Figure I.7: Structures chimiques de différents types de phlorotannins [26]

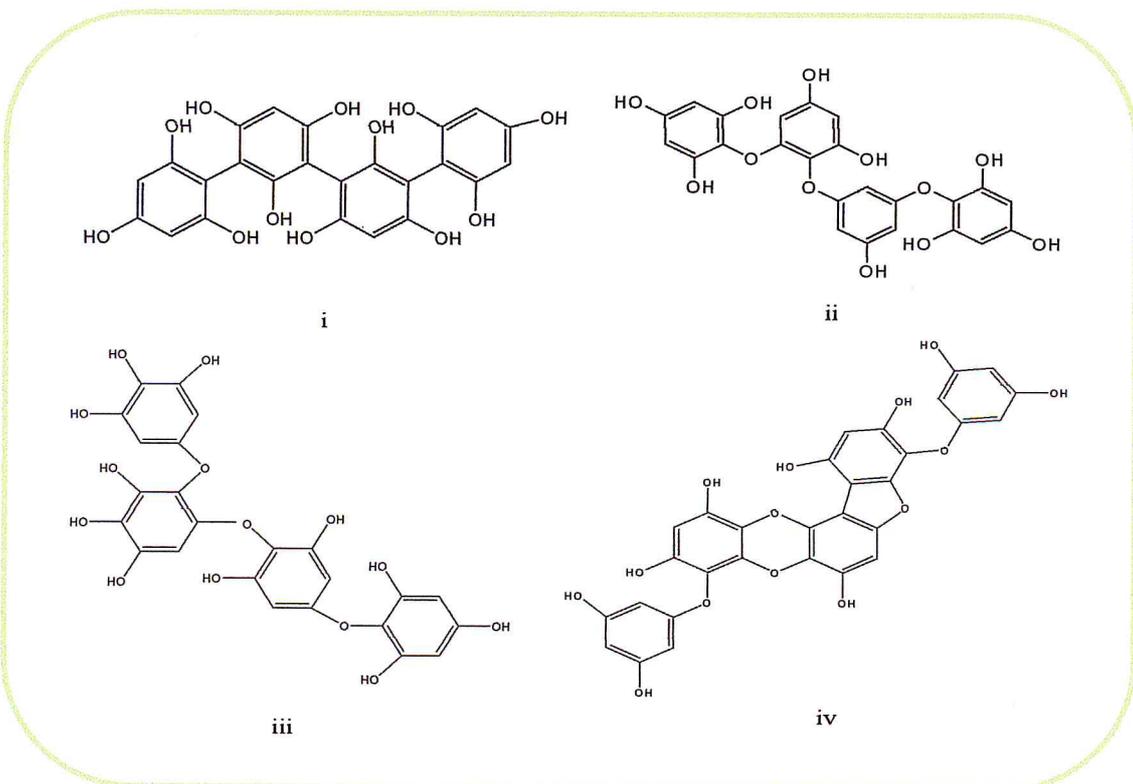


Figure I.8: Structures chimiques de différents types de phlorotannins [tetrafucol A (i), tetraphlorethol B (ii), tetrafuhalol A (iii), phlorofucofuroeckol (iv)] [27]

Les phlorotannins sont connus pour leur d'activité biologique importante [22].

Une étude antérieure portée sur des fractions moins polaires de *Cystoseira tamariscifolia* a montré que les phlorotannins de cette algue sont formés à partir de plus de trois unités de phloroglucinol [28].

Le contenu total de phlorotannins varie en fonction des facteurs environnementaux tels que la salinité, le rayonnement ultraviolet [25].

I.3 Biologie des algues brunes du genre *Cystoseira*

I.3.1 Présentation de la famille des Sargassaceae

La famille des Sargassaceae renferme des algues brunes faisant partie de la classe des phéophycées. Elle a été établie par Kützing en 1843 et comprenait alors plusieurs genres: *Cystoseira*, *Halerica*, *Halidrys*, *Hormophysa*, *Phyllacantha*, *Pycnophycus* (*Bifurcaria*) et *Treptacantha*. Les trois genres *Halerica*, *Phyllacantha* et *Treptacantha* sont actuellement rattachés au genre *Cystoseira* (sauf pour de rares espèces). Les phycologues n'ont pas toujours admis l'existence de cette famille.

Ainsi, De Toni la considérait comme une entité en 1891 mais la fusionnait aux sargassaceae en 1895. En 1962, Nizamuddin a regroupé le plus grand nombre de genres de la famille *Cystoseiraceae*, d'où il a déterminé 21 genres, chacun contient un nombre variable d'espèces.

A la fin du 20^{ème} siècle R. Valls et V. Amico ont apporté de nouveaux éclaircissements grâce à leurs études sur les dosages, les variations et les chimiotaxonomies des *Cystoseiraceae* [29-30].

Actuellement, la famille des Sargassaceae, qui regroupe les anciennes familles des Sargassaceae et des Cystoseiraceae, comprend quatre genres principaux: *Cystophora*, *Cystoseira*, *Sargassum* et *Turbinaria*. Ces genres représentent à eux seuls plus de 90% des espèces de la famille des Sargassaceae et près de 85% des espèces de l'ordre des Fucales [10].

I.3.2 Position systématique de la famille des Sargassaceae

De nos jours, tous les systématiciens admettent l'individualité des *Sargassacées*, toutes ces macroalgues sont des Fucales possédant les particularités qui permettent de les distinguer sans ambiguïté. Les *Sargassacées* sont des algues brunes de l'embranchement de Chromophytes, de la division des Phéophycées et de l'ordre des Fucales. D'autre part, cette famille constitue

plusieurs genres comme nous avons décrit précédemment, et parmi ces genres on trouve: *Bifurcaria* et *Cystoseira* [2].

I.3.3 *Cystoseira*

Le genre *Cystoseira* représente des algues brunes marines appartenant à la classe des Phéophycées; ordre des fucales. Il comprend 50 à 55 espèces dont *Cystoseira tamariscifolia* qui est appelée aussi *Cystoseira éricoïdes* [31]. Ils sont des algues buissonnantes, arborescentes, très ramifiées, très touffues, souvent de grande taille (30 cm à 1 m ou 2 m) d'un aspect particulier et facilement reconnaissable, mais l'attribution de l'espèce est particulièrement difficile. Certaines *Cystoseira* sont remarquables par leur iridescence c'est à dire la belle coloration verdâtre ou bleuâtre qui teinte les rameaux immergés [2].

Plusieurs espèces d'algues brunes du genre *cystoseira* (*Cystoseiraceae*, *Pheophyta*) sont très répandues dans la mer Méditerranée et l'Atlantique [32]. Ce genre d'algues brunes largement distribué est menu d'activités antibactérienne, antifongique et cytotoxique [33].

I.3.4 Description, biologie et écologie de l'algue *Cystoseira tamariscifolia*

I.3.4.1 Description

C'est une algue robuste de 10 à 50 cm de long, de couleur vert olive, iridescente dans l'eau, produisant une sensation rude au toucher. Le thalle est fixé par un disque très solide et comprend un axe principal dont les ramifications portent de nombreux rameaux secondaires plusieurs fois divisés et recouverts de petits ramoules épineux appelés " feuilles "(figure I.9). Elle présente une période de repos l'hiver, elle est alors rude au toucher et réduite (A).

Dès le printemps, elle croît et peut présenter des ramoules non feuillés (B) et souples, elle est beaucoup moins rude au toucher. Par la suite elle devient très touffue (C) [34].

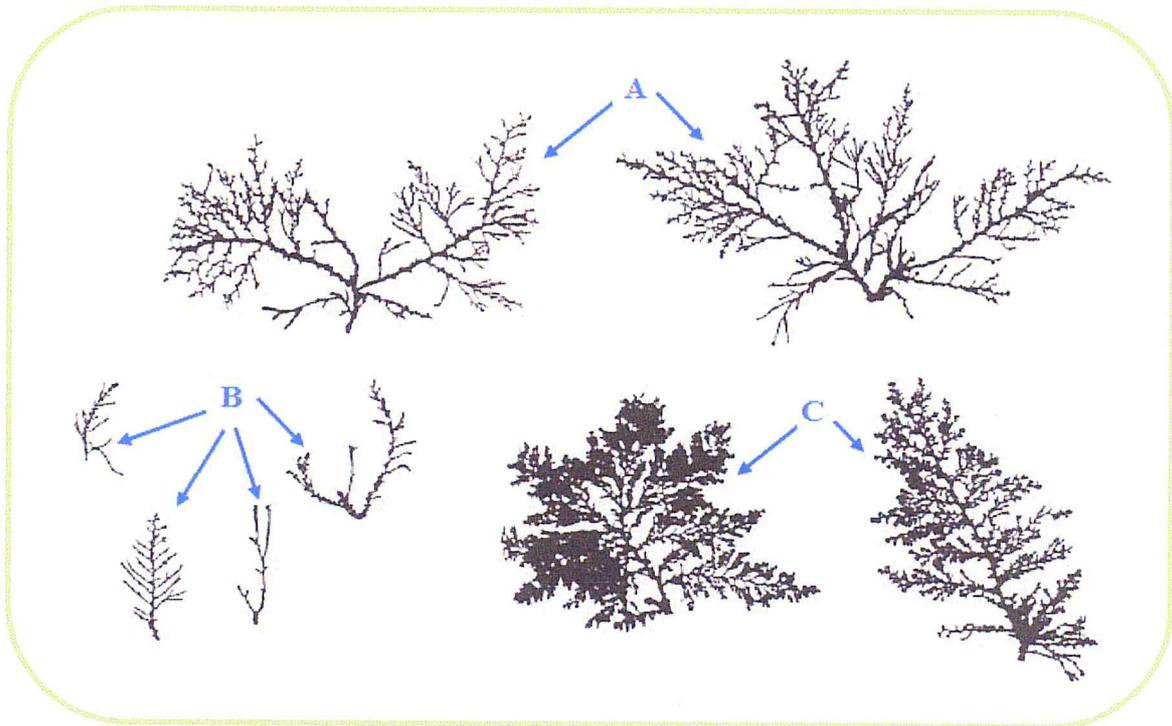


Figure I.9: Représentation schématique de *Cystoseira tamariscifolia*

I.3.4.2 Position systématique de *Cystoseira tamariscifolia*

Cystoseira tamariscifolia (figure I.10) a pour systématique :

Règne: *Eukariota*

Embranchement: *Chromophyta*

Classe: *Phaeophyceae*

Sous classe: *Fucophycidae*

Ordre: *Fucales*

Famille: *Sargassaceae*

Genre: *Cystoseira*

Espèce: *tamariscifolia*

Zone géographique: Mer méditerranée, Océan atlantique



Figure I.10: *Cystoseira tamariscifolia*

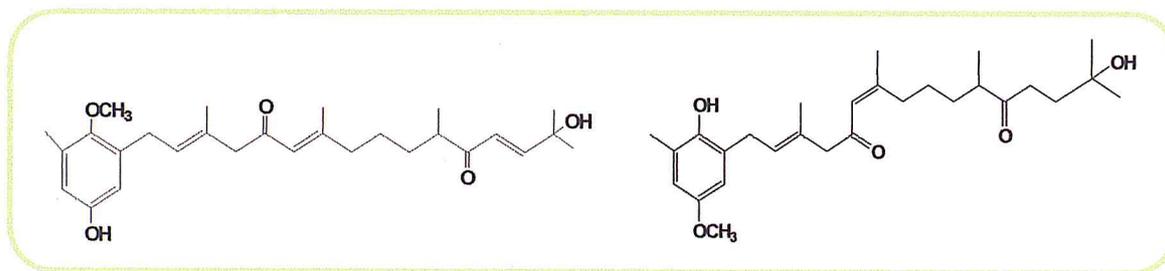
I.4 Composés isolés à partir de *Cystoseira tamariscifolia*

Les études chimiques antérieures sur *Cystoseira tamariscifolia* ont montré la présence de molécules majoritaires méroditerpéniques.

C. Francisco, B. Banaigs et V. Amico ont isolé pendant les années quatre-vingt plusieurs molécules communes entre *Cystoseira tamariscifolia* et les autres genres de *Cystoseira*, certaines présentent un intérêt biologique, on cite: le bifurcarénone, les méditerranéols A, B, C, D, les cystoseirols A, B et C.

En 1993 R. Valls a découvert d'autres méroditerpènes, parmi ces molécules on trouve: le strictakétal, la bléarone, la néobaléarone et l'épinéobaléarone. Ensuite, en 1999, un autre méroditerpène a été isolé par A. Bennamara, le méthoxybifurcarenone [2].

D'autres études chimiques effectuées sur *Cystoseira tamariscifolia* ont permis l'isolement de méroditerpènes linéaires [35] (figure I.11), monocycliques [35,36] (figure I.12), bicycliques [36] (figure I.13) et des méroditerpènes réarrangés [36-40] (figure I.14).



Figures I.11: Méroditerpènes linéaires isolés de *Cystoseira tamariscifolia* [35]

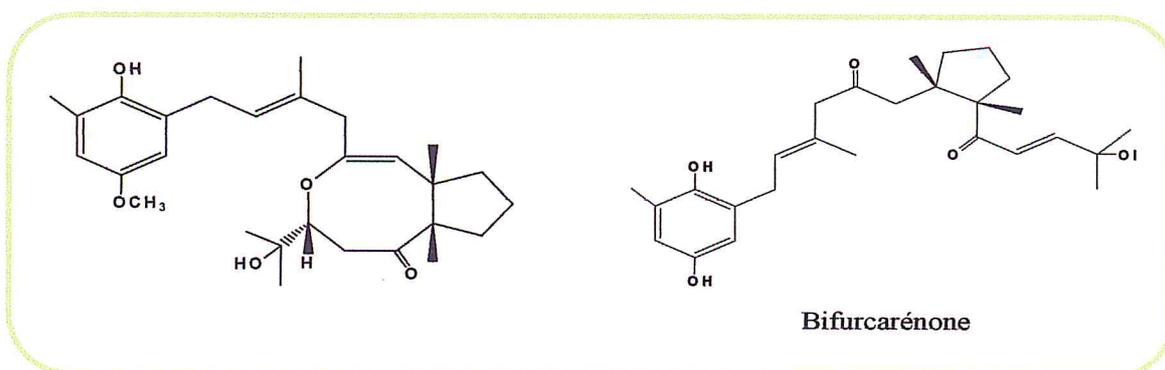
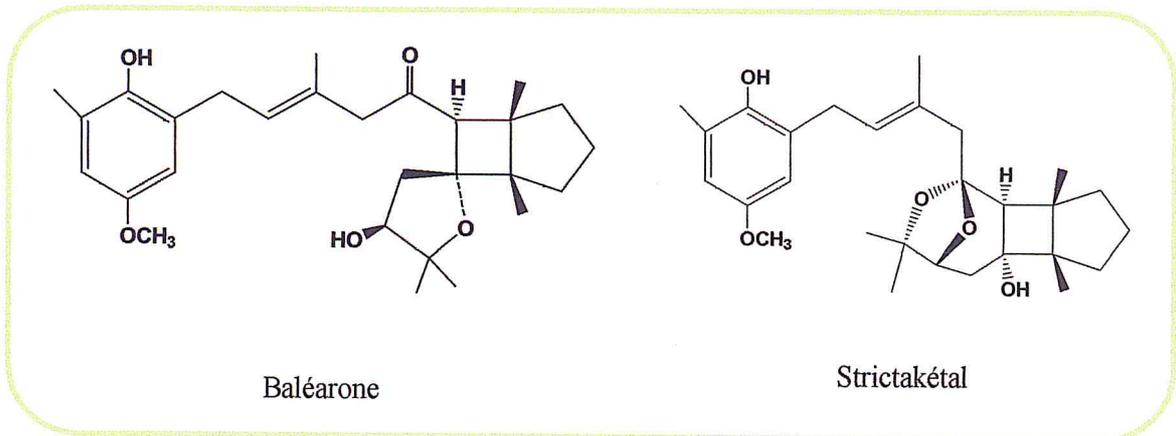


Figure I.12: Méroditerpènes monocyclisés isolés de *Cystoseira tamariscifolia* [35, 36]



Figures I.13: Méroditerpènes bicyclisés isolés de *Cystoseira tamariscifolia* [36]

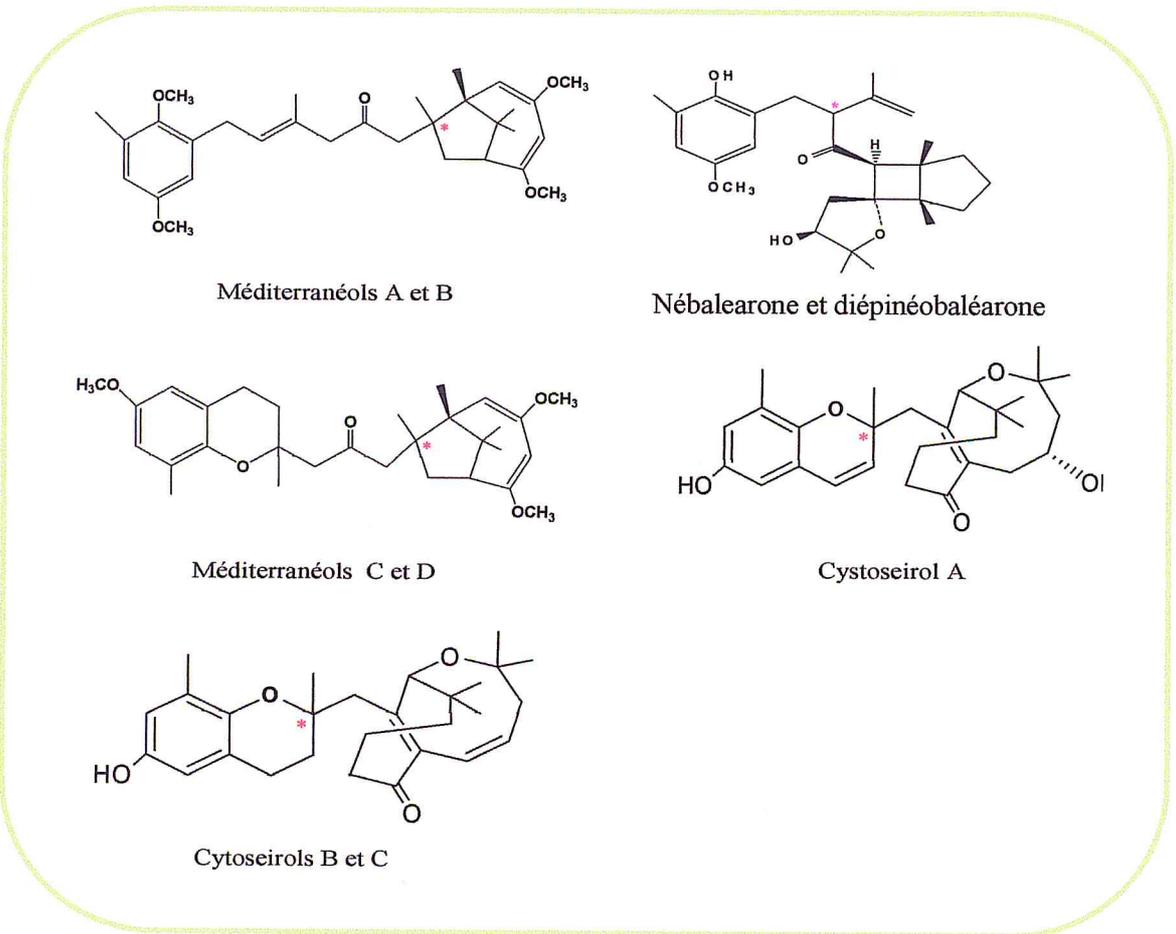


Figure I.14: Méroditerpènes réarrangés isolés de *Cystoseira tamariscifolia* [36 - 40]

I.5 Méthodes d'extraction

D'après la bibliographie étudiée, on constate que les composés phénoliques sont généralement obtenus par extraction par solvant. L'algue est macérée dans le méthanol ou dans un mélange de solvants méthanol-eau avec des proportions différentes, suivi soit d'une centrifugation ou d'une partition et un fractionnement par chromatographie sur colonne. Comme illustré dans les figures (I.15-I.18).

I.5.1 Protocoles d'obtention des composés phénoliques

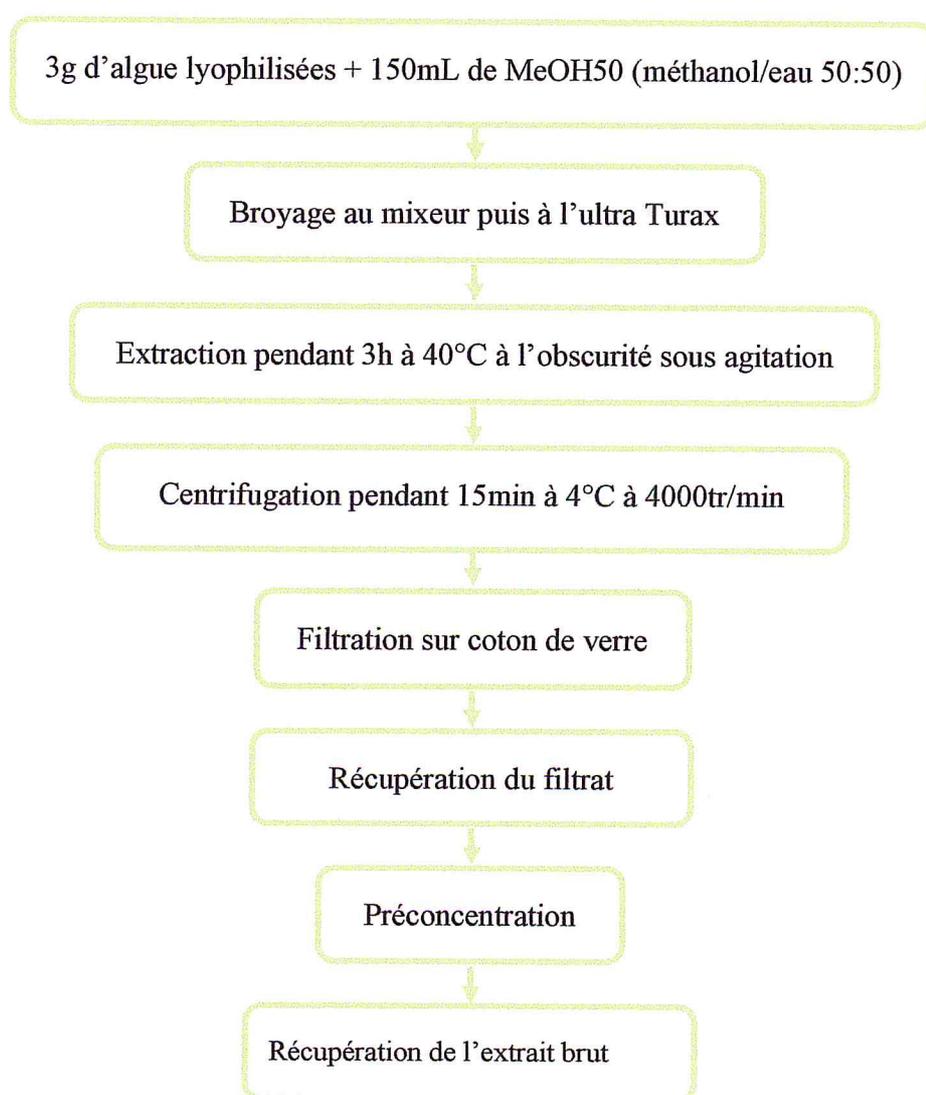


Figure I.15: Protocole d'extraction des composés phénoliques à partir Sargassaceae du pacifique [41]

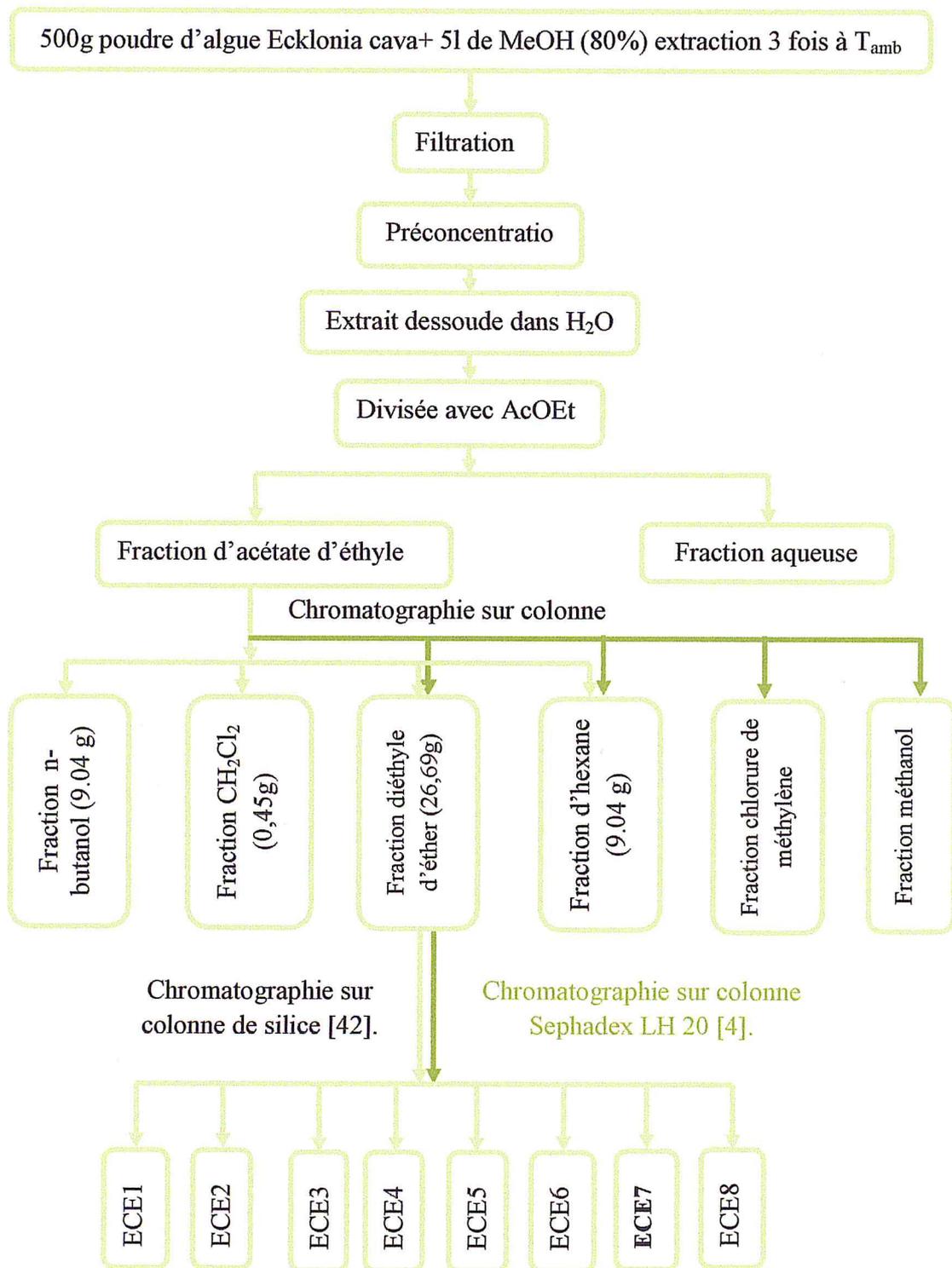


Figure I.16: Schéma d'extraction et de purification de composés actifs d'*Ecklonia Cava* [4, 42]

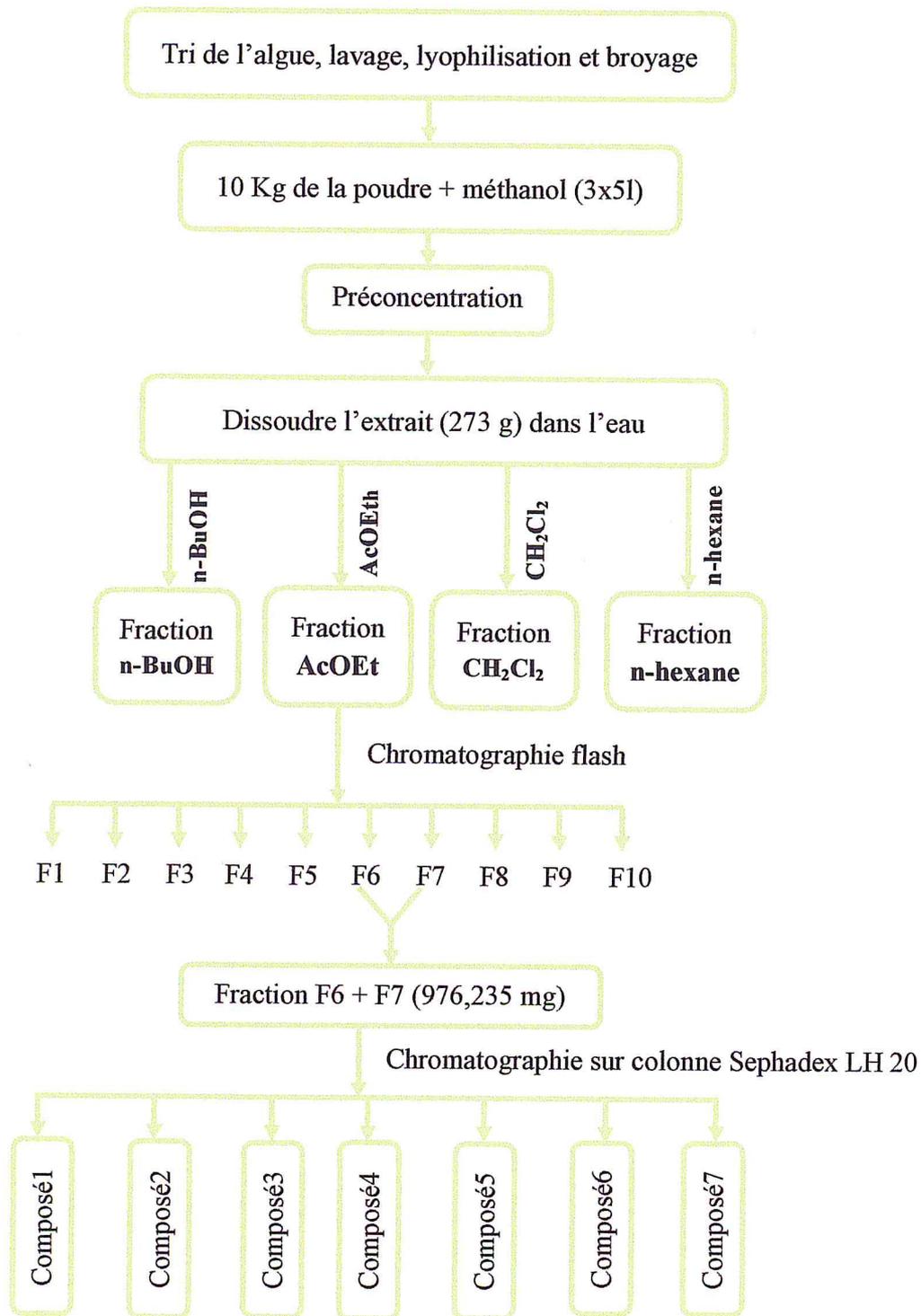


Figure I.17: Protocole d'extraction, isolement et purification de phlorotannins à partir d'*Ecklonia cava* [43]

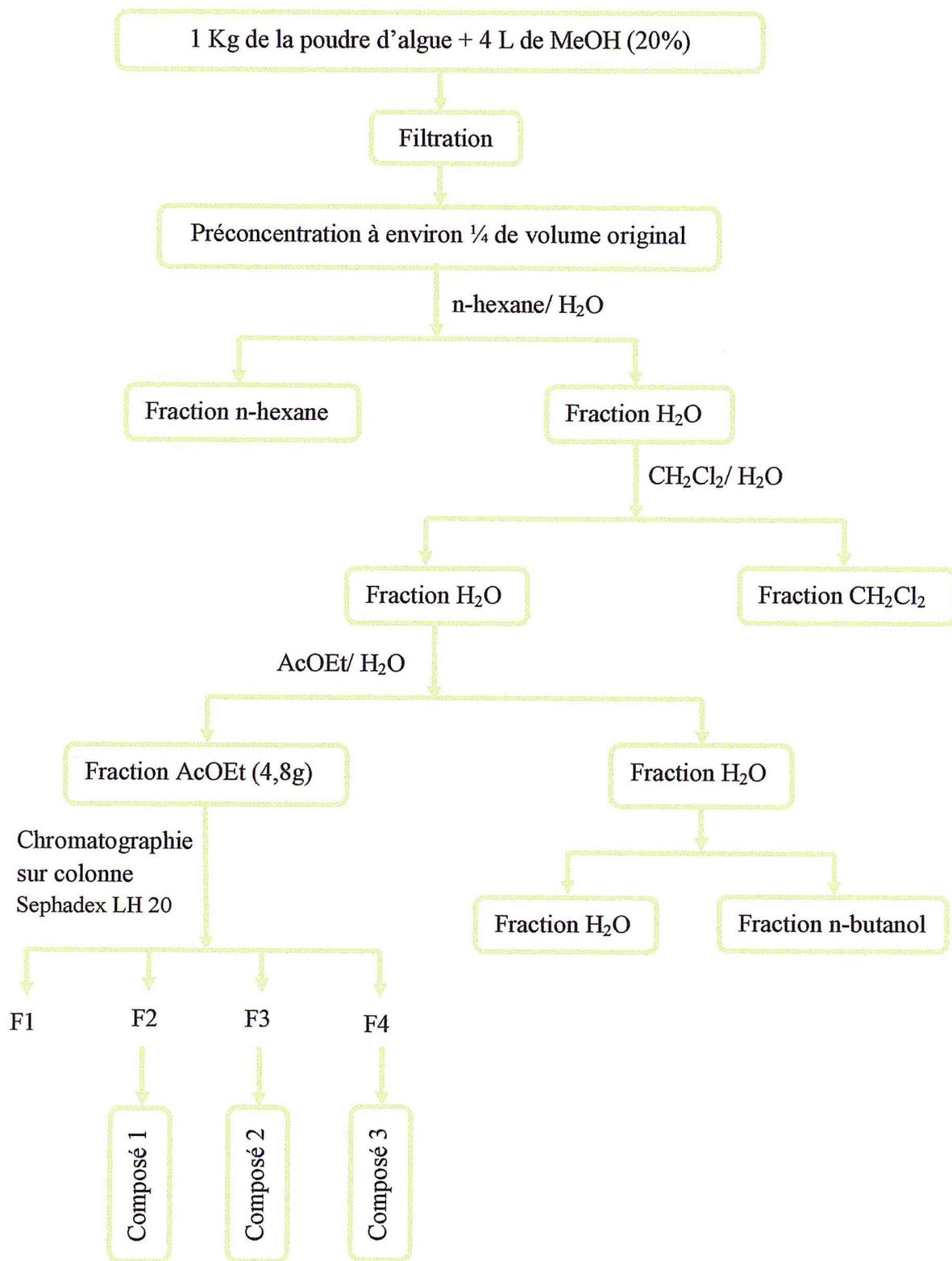


Figure I.18: Organigramme d'isolement de phlorotannins chez les céréales [44]

I.5.2 Extraction en phase solide

L'extraction en phase solide (EPS) a été inventée au milieu des années 1970 comme une alternative à l'extraction liquide-liquide. L'extraction en phase solide est une méthode de préparation de l'échantillon, elle consiste en l'isolement et la purification des analytes dans la solution par la sorption à travers une phase solide contenue dans des colonnes, suivie par l'élution de l'analyte avec un solvant approprié pour l'analyse instrumentale.

Le mécanisme de rétention implique une phase inverse (interaction apolaire), une phase normale (interaction polaire) ou une phase échangeuse d'ions.

Les colonnes d'extraction peuvent être des disques, des cartouches ou des seringues de type seringue barrel. Les cartouches d'EPS consistent en des seringues garnies de phase solide maintenue de part et d'autre par des frittés à base de polypropylène ou de polyéthylène. La cartouche peut contenir de 50 mg jusqu'à 10 g de phase solide et le volume de l'échantillon peut aller de 1 mL jusqu'à un 1 litre. Lors du passage de l'échantillon dissous dans un solvant à travers le support solide, l'analyte concentré sur la phase solide est élué par un solvant adéquat [45-46].

L'EPS grâce à sa simplicité, représente une bonne alternative à l'extraction liquide-liquide pour la préparation des échantillons. En plus de l'important rendement de purification de l'analyte, l'EPS facilite l'automatisation qui fait gagner du temps et décroît le prix de revient de la préparation de l'échantillon [45, 47, 48]. Additionnellement, l'extraction en phase solide permet le changement de solvant et le couplage avec beaucoup d'autres techniques instrumentales.

I.6 Méthodes d'analyse

Il existe plusieurs méthodes analytiques pour la détermination du phénol et ses dérivés. Les méthodes employées couramment sont la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM), la chromatographie liquide à haute performance (CLHP), la chromatographie sur couche mince (CCM), les méthodes électrochimiques, et la spectrophotométrie UV-visible [49].

En raison de la solubilité élevée (dans l'eau et/ou les solvants organiques) des phlorotannins, la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) peut offrir un outil approprié pour l'analyse qualitative et quantitative. Des méthodes de détection modernes, telles que la

spectrométrie de masse (MS) et la résonance magnétique nucléaire (NMR), peuvent être combinées avec la HPLC, permettant l'analyse structurale et l'identification rapide des composés avec une manipulation minimale de l'échantillon [42].

inserté de la tab I.16

I.6.1 Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

La chromatographie est aujourd'hui, une méthode analytique largement utilisée pour la séparation, l'identification et éventuellement le dosage des constituants chimiques dans des mélanges complexes (analyse qualitative et quantitative) [44]. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption. La chromatographie d'adsorption est basée sur la différence d'affinité existant entre ses composés.

La phase mobile «éluant» est un solvant ou un mélange de solvant qui se progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. En outre, chaque composé de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant [50,51].

Dans le cas de substances colorées, on visualise plusieurs taches traduisant une séparation. Dans le cas de substances non colorées, il faut les rendre visible, trois solutions s'offrent : placer la plaque sous lampe UV, utiliser de la vapeur d'iode pour colorer les taches ou utiliser un révélateur chimique [52].

Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale R_f avec : $R_f = \text{hauteur de la tache} / \text{hauteur du front du solvant}$.

Chaque tache correspond à un constituant et on l'identifie par comparaison du R_f avec un témoin [52].

I.6.2 Spectrophotométrie UV/visible

L'ultraviolet (UV) utilisable en analyse s'étend de 190 à 400 nm, et le visible (Vis) de 400 à 800 nm environ.

C'est une technique qui permet de compléter les informations apportées par le comportement chromatographique et la fluorescence du produit à identifier.

Les spectres UV-Vis fournissent des informations sur la structure moléculaires, mais sont surtout utilisés pour une confirmation ou une identification grâce à des règles empiriques et à la comparaison avec des spectres de référence [44].

I.6.3 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

L'infrarouge analytique regroupe plusieurs méthodes d'identification et de dosage non destructif basé sur l'étude de l'absorption (ou la réflexion), par l'échantillon, des radiations électromagnétiques comprises entre 1 et 100 μ m. Cette bande spectrale est elle même divisée en proche I.R (1 à 2.5 μ m), en moyen I.R (2.5 à 25 μ m) et en lointain I.R au delà. La partie la plus riche en information est celle du moyen I.R [52, 53]. Tous les spectromètres I.R conduisent à un document de base, appelé spectre I.R qui représente, pour chaque longueur d'onde, le rapport, des intensités transmises, avec ou sans échantillon. Ce rapport, appelé transmittance T, peut être remplacé par son pourcentage (%T) ou par l'absorbance, $A = \log(1/T)$. Il est fréquent d'exprimer les longueurs d'onde λ sous forme de nombre d'ondes γ (cm⁻¹) sachant que $\gamma = 1/\lambda$.

Il existe beaucoup d'instruments commerciaux qui diffèrent dans leurs conceptions. Dans les appareils séquentiels, les absorptions lumineuses sont mesurées les unes après les autres, en balayant la région spectrale dans un ordre séquentiel (spectre à filtre optique, à monochromateur). Dans les spectromètres multiplexés, le capteur photosensible reçoit simultanément l'information correspondante à plusieurs longueurs d'onde. Les signaux sont donc acquis à l'aide d'un capteur unique. Un système de codage permet d'obtenir les spectres à partir des signaux ainsi obtenus. Les instruments à transformée de Fourier sont des exemples de systèmes multiplexés. Les spectromètres multicanaux ont plusieurs capteurs photosensibles qui peuvent enregistrer indépendamment l'absorption de la lumière à des longueurs d'ondes spécifiques. Les systèmes à barrette de diodes et les caméras appartiennent à ce type [54].

L'infrarouge à transformée de Fourier correspond à un montage à simple faisceau, qui diffère de celui des appareils séquentiels. Le monochromateur étant remplacé par un interféromètre – souvent de type Michelson- placé entre la source et l'échantillon. Le spectre est produit suite à une opération mathématique appelée « transformée de Fourier » (voir figure I.19).

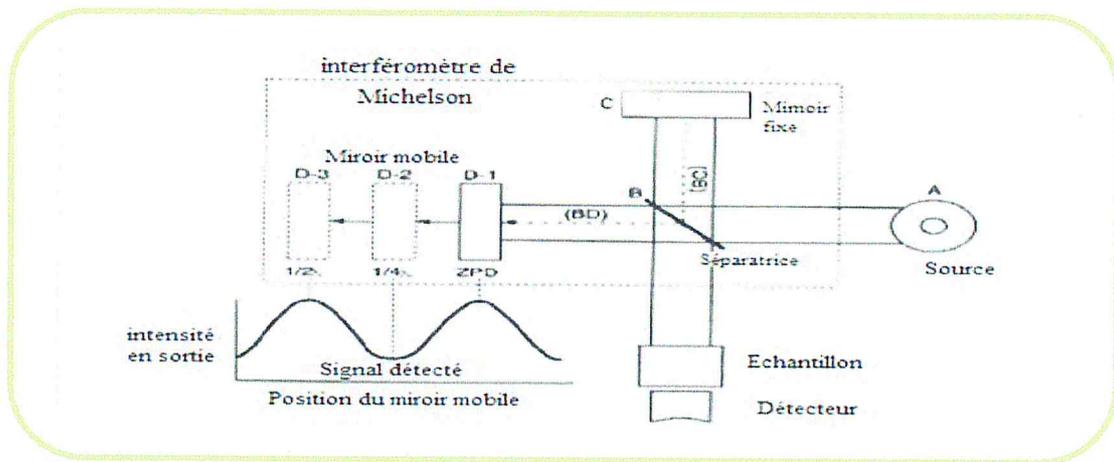


Figure I.19: Schéma d'un spectromètre IR à transformée de Fourier

Le tableau I.1 résume quelques protocoles utilisés dans l'extraction et l'analyse des composés phénoliques provenant de végétaux supérieurs ou inférieurs (algues).

Tableau I.1: Différentes méthodes d'analyse des phénols

Réf/ année	Matrice	Analyte	But de travail	Méthode d'analyse	
				Techniques/ Conditions d'analyse	Type d'analyse
55- 2012	Pulpe de raisin	Tannins	Extraction et caractérisation	FT-IR, Spectrométrie de MALDITOF	Structurale
56- 2010	<i>Acacia leucocephala</i>	Composés phénoliques	Détermination du potentielle d'application de la poudre d'écorce.	Spectrophotométrie UV, FT-IR	Qualitative
57- 1994	<i>Sargassum Spinuligerum</i>	Dérivés de phloroglucinol	Identification	HPLC, ¹ H RMN	Structurale
58- 1999	<i>Carpophyllum angustifolium</i>	Dérivés de phloroglucinol	Caractérisation	HPLC, CCM, RMN, UV (254 nm), (MS)	Structurale
59- 2011	fruits et légumes	Composés phénoliques	Caractérisation des composés polyphénoliques	RMN, CCM, HPLC	Quantitative
44- 2012	<i>Ecklonia maxima</i>	Phlorotannins	activité inhibitrice de phloroglucinol	CCM, ¹³ C NMR, ¹ H NMR	Qualitative
60- 2011	<i>Ecklonia cava</i>	2.7'' phloroglucinol -6,6'-bieckol	Isolement et identification d'un nouveau composé	LC/MS, ¹³ C NMR, ¹ H NMR, HPLC-MS, HPLC	Qualitative

I.7 Activités biologiques de l'algue *Cystoseira tamariscifolia*

Sur le plan pharmacologique, la présence de différentes activités a été mise en évidence depuis longtemps chez plusieurs espèces d'algues marines [4].

Les activités antibactériennes [61], antivirale, antitumorale et d'autres propriétés comme celle qui entre dans la régulation du taux du cholestérol sanguin ou dans la régulation du système immunitaire ont été également étudiées [4].

Les algues brunes présentent différentes activités biologiques, leurs dérivés phénoliques interviennent comme antimicrobiens et antiappétents vis-à-vis des herbivores. Les phlorotannins isolés à partir de l'espèce *Ecklonia kurome* sont fortement bactéricides vis-à-vis de 25 souches de bactéries résistantes à la Méthicilline [62].

Les études effectuées sur les algues du genre *Cystoseira* montrent un large spectre d'activité antimicrobienne, cette activité a été vérifiée vis-à-vis de l'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus klebsiella*, *Proteusmorganii*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Mucor ramaniannus* etc... [61,63-66].

Le phloroglucinol et ses dérivés ont été largement étudiés pour des utilisations dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques, textiles, peintures, teinture, adhésifs et pour des applications médicales. Le phloroglucinol et catéchol ont été signalés pour leur pouvoir d'absorber le radical diphenyl picryl hydrazyl, et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) [22].

Le phloroglucinol et ses polymères présentent des activités antioxydantes importantes [67-68], et aussi montrent diverses activités, telle que: la cytotoxicité, l'effet anti-inflammatoire, les activités de la boucle-scission d'ADN et de l'inhibition d'enzymes [69], des activités antithrombique et profibrinolytique [70]. Ils présentent également des effets anticancéreux, antidépresseur, antimicrobien, anti protozoaire, antispasmodique et antiviral [71].

Chapitre II:
Dosage du phloroglucinol
par spectrométrie IRTF et
les phénols totaux par
spectrophotométrie visible
dans l'algue brune
Cystoseira tamariscifolia

II.1 Introduction

Ce chapitre est consacré au dosage du phloroglucinol contenu dans l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* par spectrométrie IRTF. La séparation et la purification ont été réalisées en utilisant une extraction liquide-liquide suivi par une extraction en phase solide (EPS). La détermination des phénols totaux a été effectuée par le test colorimétrique en adaptant la méthode de Folin-Ciocalteu modifiée. L'étalon choisi pour effectuer cette étude est le phloroglucinol. Etant donné que ce dernier est le phénol dominant dans cette espèce [73] Néanmoins, la CCM a été utilisée dans l'analyse qualitative de l'extrait de cette algue.

II.2 Instrumentation et réactifs

II. 2.1 Spectrométrie Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) de marque (Jasco) type IRTF-8900 (figure II.1), a été utilisé pour effectuer des mesures dans un intervalle de nombre d'ondes entre $4000-400\text{cm}^{-1}$ (infrarouge moyen), équipé d'un détecteur sulfate triglicinedeuteré (DTGS), d'un rayonnement laser, d'une séparatrice de radiation en KBr et d'une fente type globar. Les fenêtres utilisées sont en chlorure de sodium (NaCl), et une entretoise en téflon de 0.5 mm. L'acquisition des spectres a été effectuée avec une résolution de 4cm^{-1} et en accumulant 10 balayages par spectre.

L'introduction des solutions se fait par écoulement bloqué « stop flow ». Pour cela une cellule conventionnelle a été modifiée au niveau de notre laboratoire en une cellule de flux. L'avantage d'une telle cellule est d'éviter les inconvénients relatifs au nettoyage et au remplissage des cellules conventionnelles, de minimiser la consommation des solvants organiques et de réduire le temps d'analyse.

L'échantillon est introduit dans la cellule à l'aide d'une pompe péristaltique de marque Desaca (Heidelberg, Allemagne).

Le chargement est réalisé en utilisant des tubes de chlorure de polyvinyle de diamètre intérieur de 2.79 mm et des tubes de téflon de diamètre intérieur de 0.8 mm, en fixant un débit de 1.5 mL mn^{-1} , comme le montre le montage de la figure II.1. Le flux est stoppé momentanément, une fois la cellule est remplie. À ce moment un spectre correspondant à l'échantillon est enregistré entre $600\text{ et }4000\text{ cm}^{-1}$.

Les spectres enregistrés sont traités à l'aide d'une macro qui a été construit à partir de l'option « ApPro » développée par Winfirst.

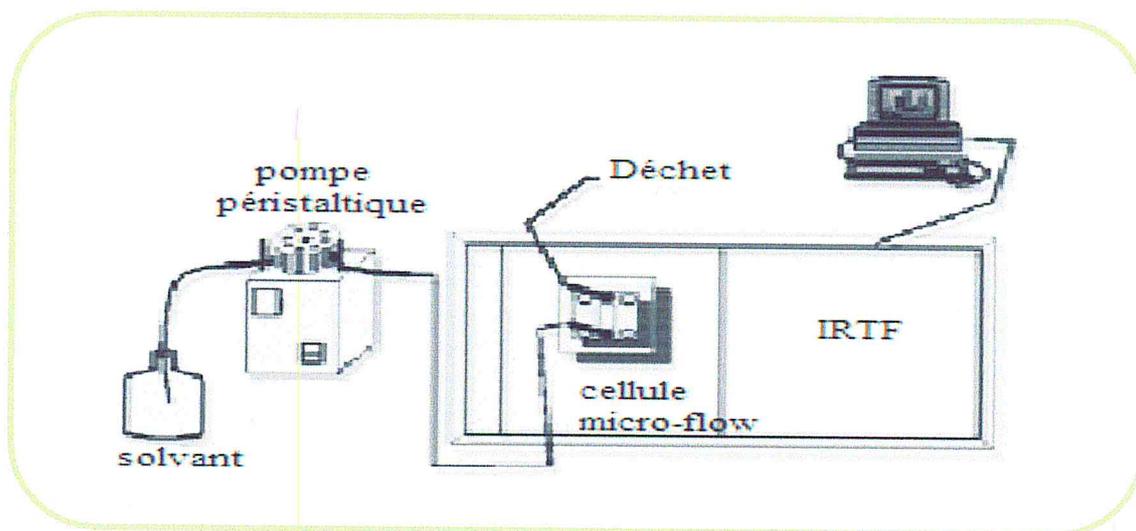


Figure II.1: Montage de flux utilisé pour la détermination du phloroglucinol dans l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* par spectrométrie IRTF

II.2.2 Réactifs

Tous les réactifs utilisés dans cette étude; le dichlorométhane stabilisé avec l'amyène, l'hexane, le chloroforme, méthanol, acétate d'éthyle et l'éthanol sont de grade analytique.

II.3 Procédure générale

II.3.1 Préparation de l'extrait brut

Le solvant d'extraction des phénols est un mélange de méthanol/eau (1/1: V/V). 4g de poudre d'algue sont extraites avec 100 mL de solvant sous agitation magnétique et à l'obscurité. Les flacons contenant le mélange sont disposés dans un bain marie maintenu à 40°C. L'extraction dure trois heures, puis l'extrait brut est filtré sur papier filtre et centrifugé à 2000 tours/min pendant 10 min et à température ambiante. Ensuite le méthanol est récupéré par évaporation rotative. Le volume est ajusté à 20 mL avec l'eau distillée. L'extrait est conservé au besoin.



II.3.2 Procédé d'isolement et de préconcentration du phloroglucinol dans *Cystoseira tamariscifolia*

II.3.2.1 Obtention de l'extrait

L'extraction des phénols est réalisée selon le protocole évoqué au paragraphe II.3.1. Le procédé a été répété plusieurs fois pour effectuer les expériences d'analyse.

II.3.2.2 Fractionnement et purification de l'extrait

Nous détaillons dans ce qui suit les manipulations opérées sur l'extrait obtenu (figure II.2).

a) Extraction liquide-liquide: eau / hexane

L'hexane est utilisé pour sa capacité de solubiliser les composés apolaires, et notamment les pigments (chlorophylle a, fuxantine etc...), les stérols et diverses forme de lipides.

Dans une ampoule à décanter 16 mL d'hexane sont ajoutés aux 20 mL d'extrait brut. L'ensemble est homogénéisé, puis l'émulsion est rompue par centrifugation (2000 tr/min à température ambiante, pendant 10 minutes) et les deux phases (eau et hexane) sont séparées. Ce lavage est réalisé trois fois. La phase hexanique est éliminée et l'extrait est récupéré.

b) Extraction liquide –liquide: eau / dichlorométhane

L'ajout de dichlorométhane a pour but de dégraisser d'avantage l'extrait obtenu. Ainsi, dans une ampoule à décanter 16 mL de solvant sont ajoutés aux 20 mL d'extrait en solution aqueuse. Le mélange est agité, et séparés après décantation. Cette opération est réitérée 3 fois.

c) Extraction liquide –liquide: eau / acétate d'éthyle

Dans une ampoule à décanter, 20 mL d'acétate d'éthyle sont ajoutés aux 20 mL d'extrait en solution aqueuse. Les deux phases sont énergiquement mélangées puis séparées par décantation. L'opération a été répétée 3 fois.

d) Extraction en phase solide (EPS)

Une cartouche de capacité de 3 mL contenant 500 mg de silice (silice en phase normale, 0,63-200mm, Merck) est conditionnée dans 2mL d'acétate d'éthyle. L'extrait obtenu précédemment dans l'acétate d'éthyle est déposé en haut de cartouche, et une fraction est récupérée par élution de 2 mL du mélange chloroforme/méthanol (85/15: V/V).

La figure II.2 résume de protocole adapté dans la purification du phloroglucinol dans *Cystoseira tamariscifolia*.

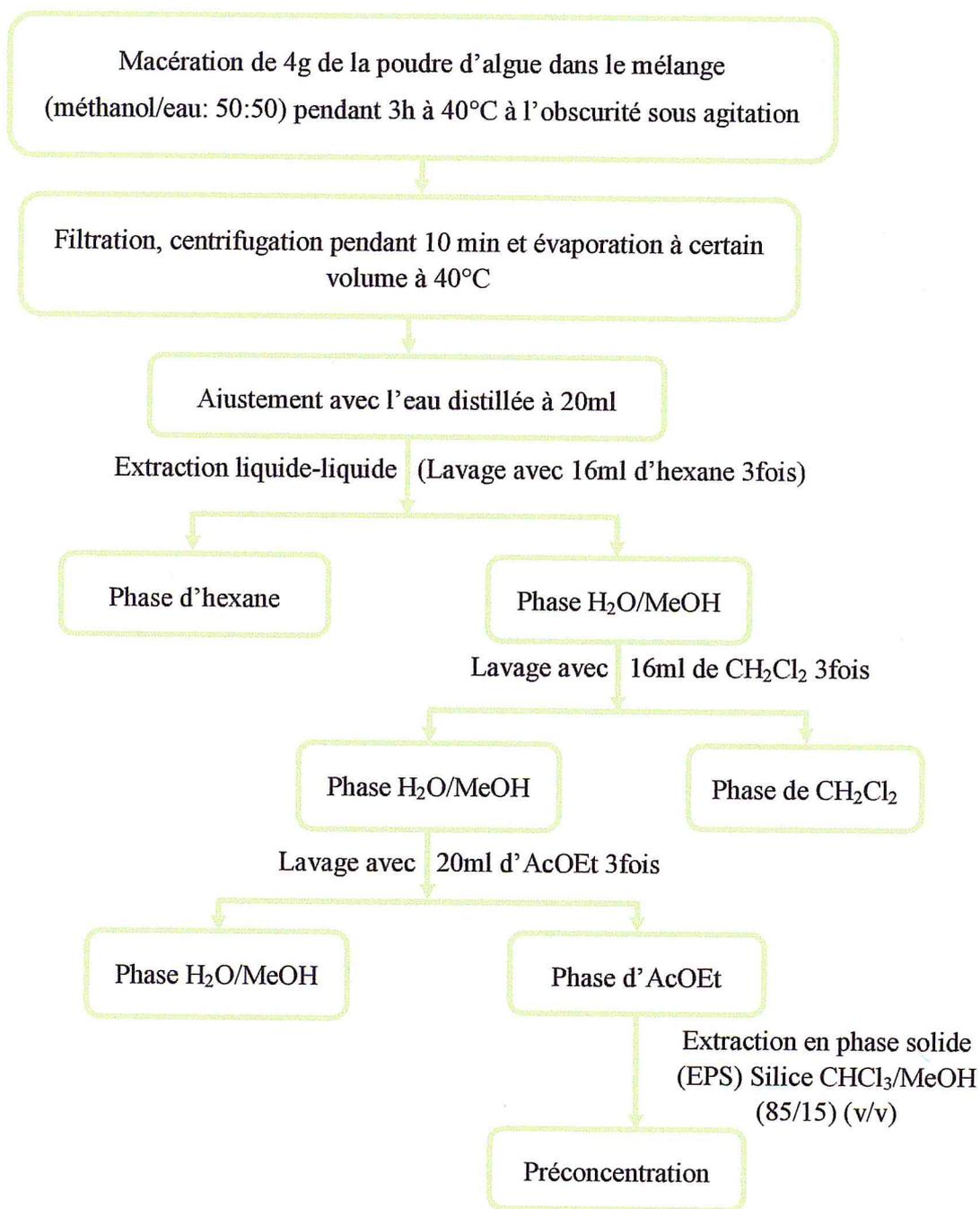


Figure II.2: Protocole d'isolement et de préconcentration du phloroglucinol

II.3.3 Identification du phloroglucinol par CCM

L'objectif de cette manipulation est de vérifier la présence du phloroglucinol dans les extraits (brut et traité) de *Cystoseira tamariscifolia*.

Les plaques CCM utilisées sont des feuilles d'aluminium recouvertes de gel de silice Si 60 (De marque Merck). L'élution est réalisée avec un mélange de dichlorométhane/méthanol dans les proportions: 4:1 (v/v). La révélation est effectuée par le diiode.

II.3.4 Méthode de calibration externe

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

II.3.5 Méthode des additions standards

L'addition standard peut être la méthode de choix, en raison de certaines interférences dues à la nature complexe de la matrice, ou bien lorsqu'on ne peut pas reproduire la composition de l'échantillon. Ceci est très fréquent lorsqu'il s'agit d'échantillonnage environnemental ou biologique. Donc, cette méthode permettra de réduire les erreurs de manipulation et de calculer d'une manière précise la concentration de l'analyte dans la matrice complexe.

Ici, une série d'échantillons est préparée. Chaque échantillon est enrichi par une quantité bien précise d'analyte, à l'exception d'un seul échantillon ou aucun analyte supplémentaire n'est ajouté. Ensuite, les échantillons préparés sont soumis à l'analyse. Une droite d'étalonnage est établie en représentant l'absorbance de chaque solution préparée en fonction de sa concentration. L'extrapolation de la droite de calibration à l'absorbance nulle, au point de l'intersection avec l'axe des abscisses donne la concentration inconnue de l'analyte dans l'échantillon.

II.4 Résultats et discussions

II.4.1 Caractéristiques de l'extrait brut de *Cystoseira tamariscifolia*

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

Les propriétés organoleptiques des extraits sont regroupées dans le tableau II.1.

Tableau II.1: Caractéristiques organoleptiques de l'extrait brut

Caractéristiques organoleptiques				
	Aspect	Couleur	Odeur	Rendement (%)
Extrait brut de l'algue <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	pâteux	marron	Forte odeur caractéristique	29.06

II.4.2 Identification du phloroglucinol par chromatographie sur couche mince (CCM)

L'analyse de la plaque CCM (figure II.3) dans les conditions indiquées dans la section II.3 montre l'apparition de taches pour les extraits (brut et traité) de *Cystoseira tamariscifolia* et de l'extrait traité plus ajout presque au même niveau que celui de phloroglucinol (figure II.3), les rapports frontales sont respectivement $R_{f \text{ Extrait brut}} = 0,73$, $R_{f \text{ Extrait traité}} = 0,73$, $R_{f \text{ Extrait enrichi}} = 0,73$ et $R_{f \text{ Phloroglucinol}} = 0,8$, cette différence de rapport frontal peut se relier au dépôt des échantillons.

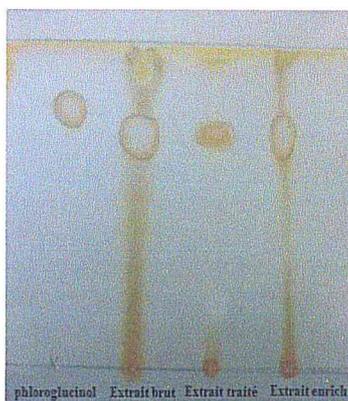


Figure II.3: Identification du phloroglucinol par CCM

II.4.3 Solubilité du phloroglucinol dans le solvant d'analyse

La première difficulté rencontrée lors de la réalisation de ce travail était la solubilité du phloroglucinol dans les solvants chlorés. Pour résoudre ce problème une série de tests de solubilité a été effectuée dans le but de modifier la polarité du solvant d'analyse (CH_2Cl_2) en ajoutant des proportions différentes d'éthanol (EtOH) ou de méthanol (MeOH).

Le tableau II.2 résume la solubilité de 5mg et 15mg de phloroglucinol dans les mélanges de solvants CH_2Cl_2 -EtOH ou CH_2Cl_2 -MeOH avec différentes proportions.

Tableau II.2: Solubilité du phloroglucinol

Composition du solvant (v/v)	Solubilité du phloroglucinol	
	Concentration de phloroglucinol ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
	5	15
$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ (96/4)	Insoluble	Insoluble
$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ (90/10)	Soluble	Insoluble
$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ (88/12)	Soluble	Insoluble
$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ (80/20)	Soluble	Soluble
$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (97/3)	Insoluble	Insoluble
$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (96/4)	Insoluble	Insoluble
$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95/5)	Soluble	Insoluble
$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (90/10)	Soluble	Insoluble
$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (80/20)	Soluble	Soluble

Nous avons constaté que l'éthanol a un effet mauvais sur la qualité des spectres infrarouge (figure II.4), cependant, l'amélioration de ces spectres peut se faire par l'utilisation de MeOH. Nous avons également vérifié que pour une concentration de l'ordre 5 mg.mL^{-1} , la solubilité du phloroglucinol dans un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ (80 /20 : v/v) est complète.

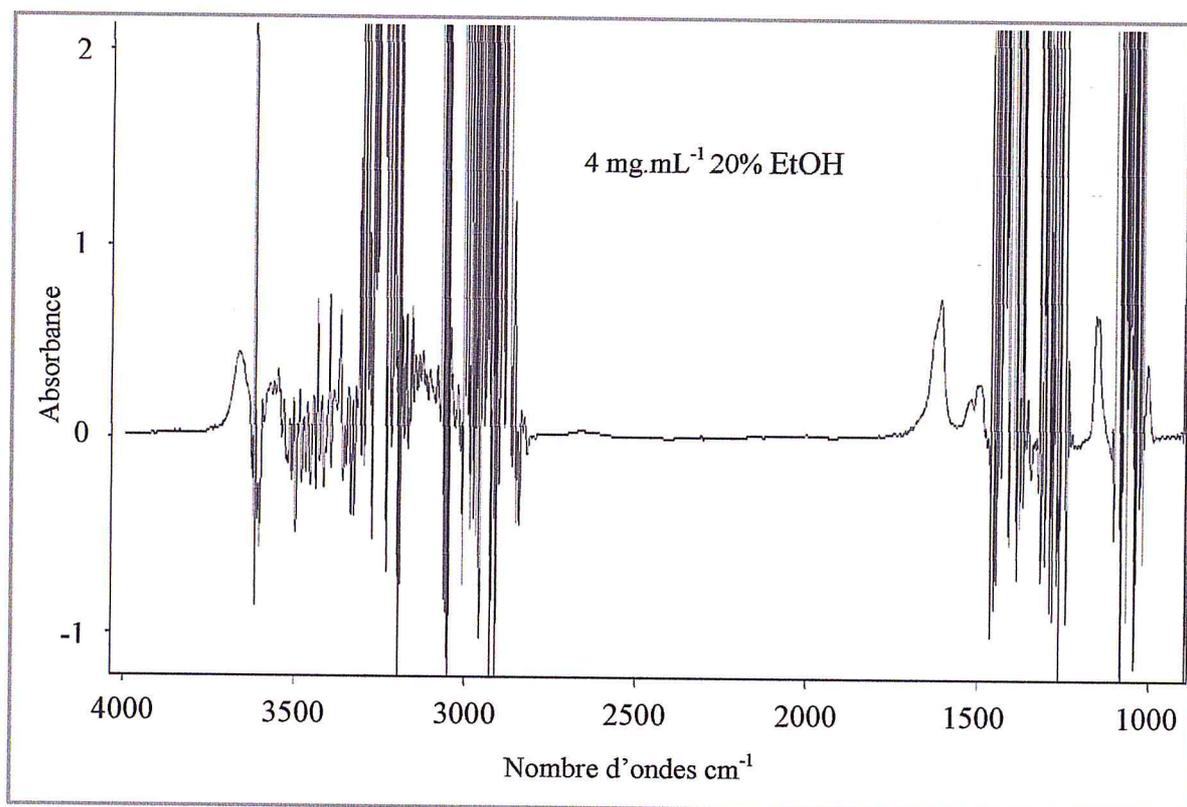


Figure II.4: Spectre IRTF de phloroglucinol (4 mg.mL^{-1}) préparé dans $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ (80/20 : v/v)

II.4.4 Spectre IRTF du phloroglucinol

Une étude détaillée relative au mode de mesure des valeurs d'absorbance et aux différentes alternatives de correction de ces valeurs par spectrométrie IRTF a été réalisée. La gamme étudiée s'étale de 600 à 4000 cm^{-1} car au dessous de 600 cm^{-1} les fenêtres sont opaques.

Le spectre IRTF du phloroglucinol préparé directement dans le mélange de solvants $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95/5 : V/V) (figure II.5) montre une bande large entre 3400 à 3100 cm^{-1} due à l'élongation de la liaison O-H (liaison pont d'hydrogène). Deux bandes à 1611 cm^{-1} et 1497 cm^{-1} , caractéristiques de la vibration de valence de la double liaison C=C sont également observées. Les deux bandes à 1159 cm^{-1} et 1150 cm^{-1} correspondent à l'élongation =C—O d'un phénol. La bande à 827 cm^{-1} correspond à la déformation de la liaison =C-H d'un aromatique dont l'hydrogène est entouré de deux substituants.

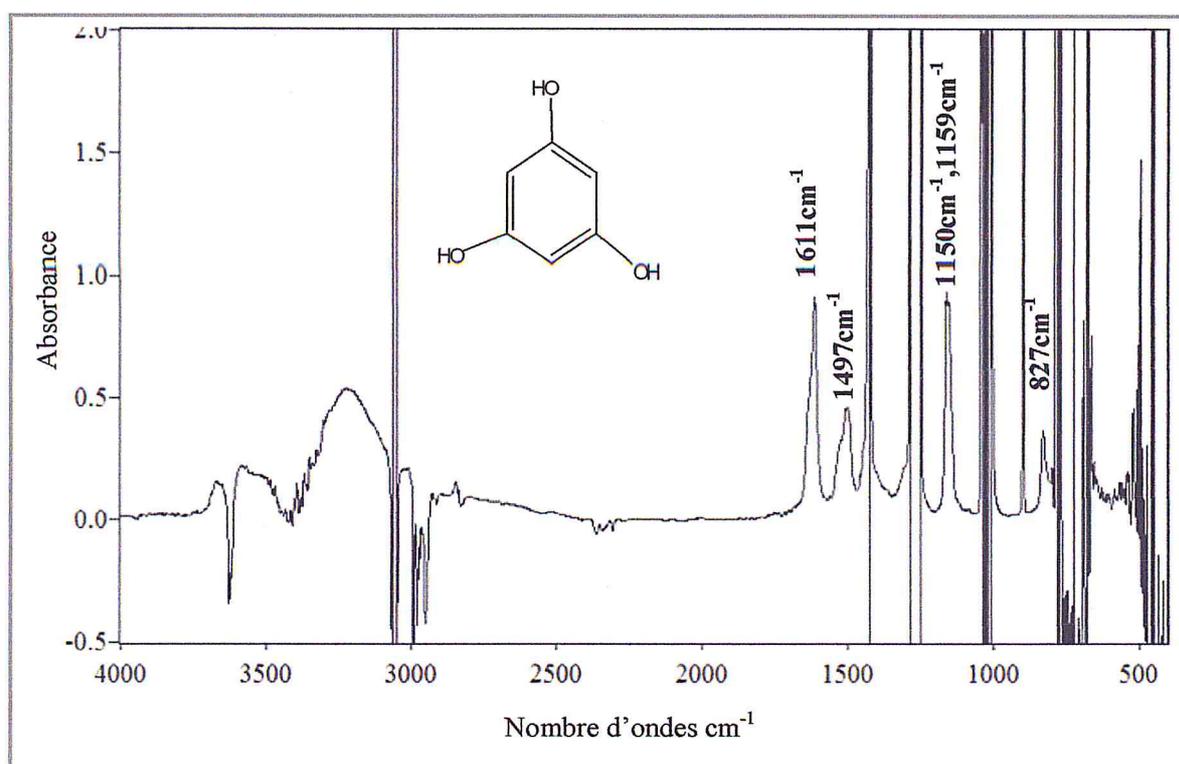


Figure II.5: Spectre IRTF de phloroglucinol (4 mg.mL^{-1}) préparé directement dans $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95/5 : V/V)

Afin de sélectionner la bande ou les bandes spécifiques du phloroglucinol pour réaliser la détermination quantitative, les spectres d'absorbance pour une série de solutions de phloroglucinol sont établis (figure II.6). Les solutions sont diluées directement dans le solvant d'analyse. Le domaine de concentration varie de 0.35 à 5 mg.mL⁻¹.

II.4.5 Caractéristiques analytiques du phloroglucinol préparé directement dans CH₂Cl₂/MeOH (95/5 : V/V)

Les caractéristiques analytiques du phloroglucinol préparé directement dans CH₂Cl₂/MeOH (95/5 : V/V) obtenues pour une série de solutions étalons préparée dans un domaine de concentration allant de 0,35 à 5 mg.mL⁻¹ (figure II.6) sont résumées dans les tableaux II.3 et II.4 selon le mode de mesure.

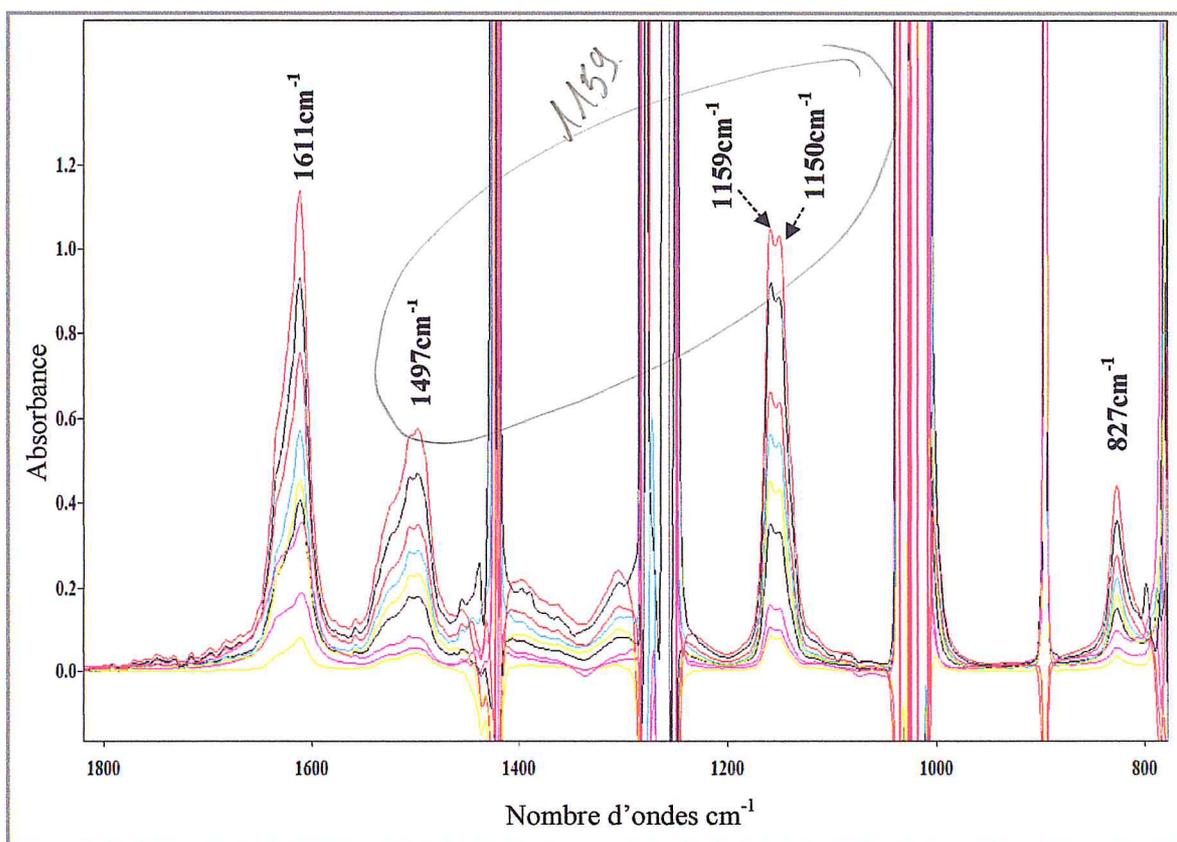


Figure II.6: Spectres IRTF d'absorbance d'une série d'étalons de phloroglucinol préparée directement dans CH₂Cl₂/MeOH (95/5:V/V), pour un domaine de concentration compris entre 0,35-5 mg.mL⁻¹

Tableau II.3: Caractéristiques analytiques du phloroglucinol préparé directement dans $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95/5 : V/V) en considérant l'aire du pic.

Mode de mesure	Aire du pic						
Max: cm^{-1} (lignes de base)	Paramètres analytiques	Droite de calibration	Coefficient de corrélation	LD ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	D.S.R.% (n=10)	Domaine de concentration ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
827: (880-810)		$A = 0,6768C - 0,1961$	0,9997	0,01	0,02	1,5	
1150, 1159: (1200-1084)		$A = 5,7983C + 0,1325$	0,9995	0,17	0,56	0,13	0,35-5
1611: (1714-1565)		$A = 6,6147C + 0,0270$	0,9999	0,01	0,04	0,35	

C: concentration ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); D.S.R.: Déviation Standard Relative en % (pour $C = 2,5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); LD: Limite de détection en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ obtenue pour un niveau de confiance de 99,6% ($K=3$); LQ: Limite de quantification en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour un niveau de confiance de 99,6% ($K=3$).

Conditions expérimentales: Chemin optique 0,5 mm, Résolution nominale 4cm^{-1} , Nombre de balayage 10, Background de la cellule remplie avec $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95/5 : V/V).

Tableau II.4: Caractéristiques analytiques du phloroglucinol préparé directement dans CH₂Cl₂/ MeOH (95 / 5 : V/V) en considérant la hauteur du pic.

Mode de mesure Max: cm ⁻¹ (lignes de base)	Hauteur du pic						
	paramètres analytiques	Droite de calibration	Coefficient de corrélation	LD (µg.mL ⁻¹)	LQ (µg.mL ⁻¹)	D.S.R% (n=10)	Domaine de concentration (mg.mL ⁻¹)
827: (880-810)		A= 0,0608C-0,0006	0,9997	0,10	0,32	1,3	
1150:(1200-1084)		A= 0,2059C+ 0,0014	0,9996	0,03	0,10	1,9	0,35-5
1159:(1200-1084)		A= 0,2088C+ 0,0086	0,9994	0,04	0,12	0,03	
1611:(1714-1565)		A= 0,2062C+ 0,0378	0,9965	0,02	0,08	0,83	

C: concentration (mg.mL⁻¹); **D.S.R:** Déviation Standard Relative en % (pour C= 2 mg.mL⁻¹); **LD:** Limite de détection en µg.mL⁻¹ obtenue pour un niveau de confiance de 99,6% (K=3); **LQ:** Limite de quantification en µg.mL⁻¹ pour un niveau de confiance de 99,6% (K=3).

Conditions expérimentales: Chemin optique 0,5 mm, Résolution nominale 4cm⁻¹, Nombre de balayage 10, Background de la cellule remplie avec CH₂Cl₂/MeOH (95/5 : V/V).

II.4.6 Comparaison des caractéristiques analytiques du phloroglucinol dissout directement dans le solvant et obtenu après traitement

a) Choix de la composition du solvant d'extraction du phloroglucinol

Avant d'établir les caractéristiques analytiques du phloroglucinol après préconcentration, il nous semble nécessaire de vérifier les pourcentages de récupération du phloroglucinol en fonction de la composition du solvant d'extraction.

Environ 4g d'algue ont subi un traitement de préconcentration, détaillé dans la figure II.2, en utilisant comme solvant d'extraction: soit le mélange MeOH/H₂O (50/50: V/V) soit le mélange EtOH/H₂O (50/50: V/V).

La figure II.7 montre les spectres d'une solution étalon de phloroglucinol et de l'extrait éthanolique après préconcentration.

La comparaison des deux spectres montre d'une part, que l'intensité des bandes de l'extrait est faible par rapport à celle de l'étalon et de l'autre part, il y a l'apparition de bandes supplémentaires dans l'extrait éthanolique. Par contre, La superposition des deux spectres montrés sur la figure II.8 laisse comprendre que le traitement adapté en utilisant le Mélange MeOH/H₂O (50/50: V/V) comme solvant d'extraction a mené plutôt à une purification du phloroglucinol.

De ce fait, le mélange de solvant MeOH/H₂O (50/50: V/V) sera considéré comme solvant adéquat pour l'extraction du phloroglucinol à partir de *Cystoseira tamariscifolia*.

Il y a lieu de noter que les spectres IRTF sont enregistrés par rapport à un background stabilisé préalablement dans les mêmes conditions instrumentales avec une cellule remplie d'un mélange de solvant pur utilisé pour la dilution CH₂Cl₂/MeOH (95/5 : V/V).

*En montrant le spectre de 1600-400
on pourrait - peut-être confirmer avec certitude
qu'il s'agit d'un traitement
de purification*

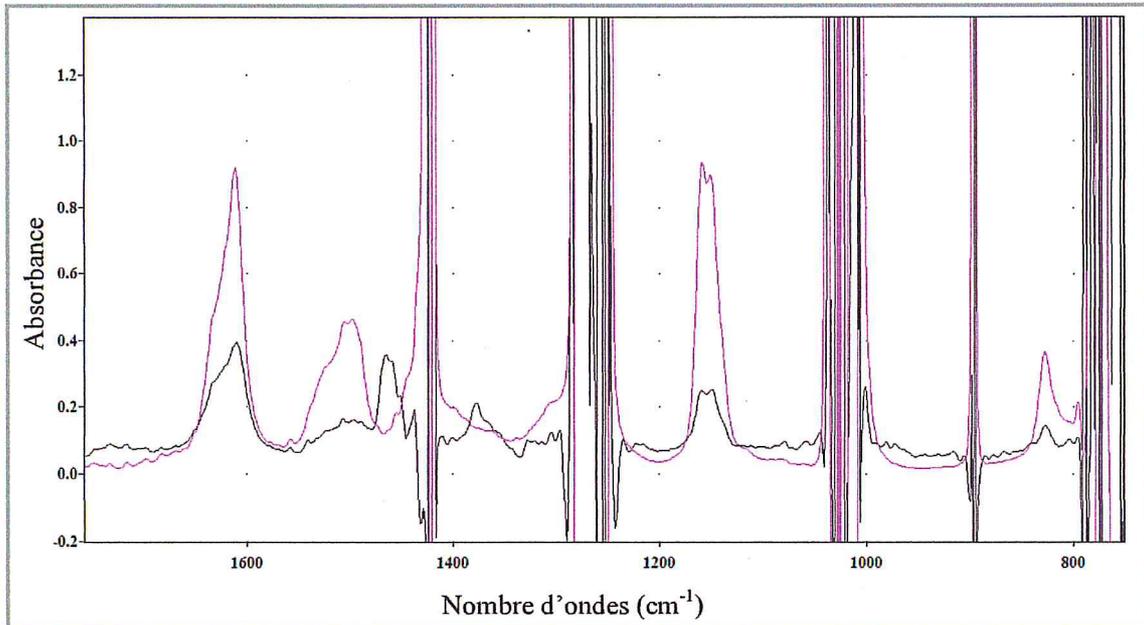


Figure II.7: Spectres IRTF d'absorbance de l'extrait éthanolique (noir) et du phloroglucinol d'une concentration de 4 mg.mL⁻¹ (rose) préparés directement dans le solvant

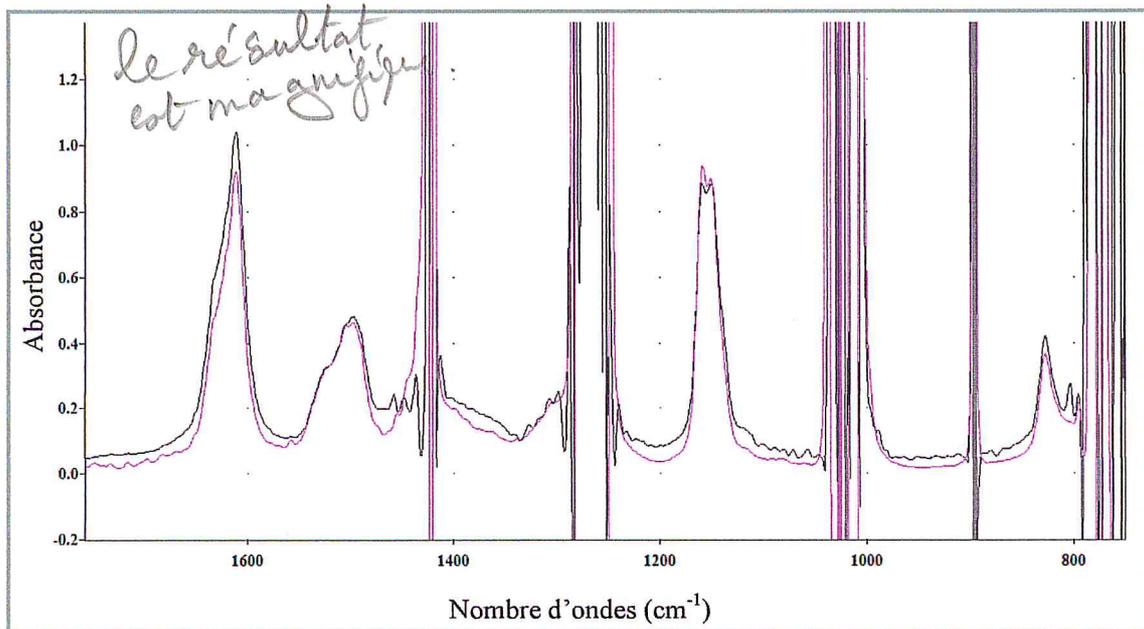


Figure II.8: Spectres IRTF d'absorbance de l'extrait méthanolique (noir) et du phloroglucinol d'une concentration de 4 mg.mL⁻¹ (rose) préparés directement dans le solvant

b) Choix de la composition du solvant d'extraction du phloroglucinol en phase solide (solvant d'élution)

Avant d'établir les caractéristiques analytiques du phloroglucinol après préconcentration, il nous semble nécessaire de vérifier les pourcentages de récupération du phloroglucinol en fonction de la composition du solvant d'élution.

Environ 4mg de standard phloroglucinol ont subi un traitement de préconcentration, détaillé dans la figure II.2, en utilisant dans l'étape d'extraction en phase solide comme solvant d'élution le mélange $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ avec différentes proportions. Le pourcentage de récupération du phloroglucinol donné comme étant le rapport de la hauteur du pic d'étalon après traitement sur la hauteur du pic de l'étalon préparé directement dans le solvant d'analyse.

Les résultats sont montrés sur le tableau II.5

Tableau II.5: Analyse du phloroglucinol obtenu après EPS en utilisant de différentes proportions de solvant d'élution $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (V/V)

Max: cm^{-1} (lignes de base)	Composition du solvant d'élution $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	Récupération (%)
827: (880-810)	95/5	11,74
	90/10	54,54
	85/15	100,75
	80/20	77,80
1150: (1200-1084)	95/5	3,74
	90/10	59,72
	85/15	96,41
	80/20	75,08
1159: (1200-1084)	95/5	3,86
	90/10	58,77
	85/15	89,47
	80/20	74,17
1611: (1714-1565)	95/5	19,81
	90/10	62,31
	85/15	89,35
	80/20	55,81

D'après les résultats du tableau II.5, nous pouvons conclure que le mélange $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (85/15 : V/V) extrait quantitativement le phloroglucinol. Les pourcentages de récupération du phloroglucinol en considérant les bandes à 827 cm^{-1} , 1150 cm^{-1} , 1159 cm^{-1} et 1611 cm^{-1} sont respectivement de l'ordre 100.75%, 96.41%, 89.47%, 89.35%.

II.4.7 Caractéristiques analytiques du phloroglucinol après protocole de traitement

Les caractéristiques analytiques du phloroglucinol après traitement de préconcentration dans les conditions optimisées sont établies et résumées dans les tableaux II.6 et II.7. Le pourcentage de récupération du phloroglucinol est établi comme étant le rapport de la pente de la droite de calibration de la série des étalons après traitement (figure II.9) sur la pente de la droite de calibration de la série des étalons préparés directement dans le solvant.

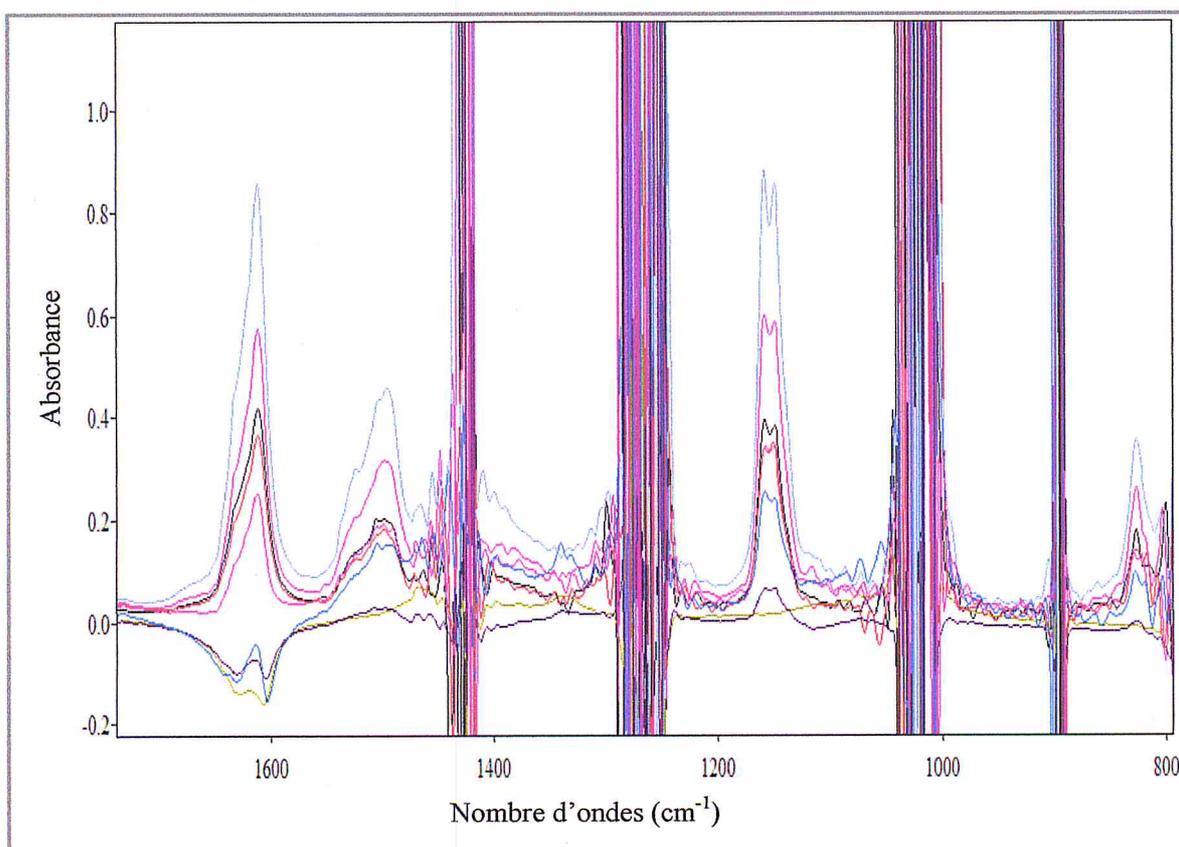


Figure II.9: Spectres IRTF d'absorbance d'une série d'étalon de phloroglucinol traité, pour un domaine de concentration compris entre $0,35\text{-}5\text{ mg.mL}^{-1}$

Tableau II.6: Caractéristiques analytiques du phloroglucinol obtenu après protocole de traitement en considérant l'aire du pic

Mode de mesure Max: cm ⁻¹ (lignes de base) Paramètre analytique	Aire du pic						
	Droite de calibration	Coefficient de corrélation	LD (µg.mL ⁻¹)	LQ (µg.mL ⁻¹)	D.S.R.% (n=10)	Domaine de concentration (mg.mL ⁻¹)	Récupération (%)
827: (880-810)	A= 0,3968C+ 0,2758	0,9990	0,99	3,3	0,45		58,6
1150, 1159: (1200-1084)	A= 4,3865C+ 0,0892	0,9966	0,02	0,07	0,61	0,35-5	75,7
1611: (1714-1565)	A= 3,2321C+7,9163	0,9976	0,02	0,07	0,49		48,9

C: concentration (mg.mL⁻¹); **D.S.R.:** Déviation Standard Relative en % (pour C= 2,5mg.mL⁻¹); **LD:** Limite de détection en µg.mL⁻¹ obtenue pour un niveau de confiance de 99,6% (K=3); **LQ:** Limite de quantification en µg.mL⁻¹ pour un niveau de confiance de 99,6% (K=3).

Conditions expérimentales: Chemin optique 0,5 mm, Résolution nominale 4cm⁻¹, Nombre de balayage 10, Background de la cellule remplie avec CH₂Cl₂/MeOH (95/5: V/V).

Tableau II.7: Caractéristiques analytiques du phloroglucinol obtenu après protocole de traitement en considérant la hauteur du pic

Mode de mesure Max: cm^{-1} (lignes de base) Paramètre analytique	Hauteur du pic						
	Droite de calibration	Coefficient de corrélation	LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	D.S.R.% (n=10)	Domaine de concentration (mg.mL^{-1})	Récupération (%)
827:(880-810)	A=0,0604C-0,0059	0,9930	0,06	0,21	0,94		94,8
1150:(1200-1084)	A=0,2009C-0,0400	0,9897	0,01	0,03	0,58	0,35-5	97,6
1159:(1200-1084)	A=0,2003C-0,0452	0,9820	0,01	0,04	0,12		96
1611:(1714-1565)	A=0,2049C-0,0793	0,9833	0,02	0,06	1,7		99,3

C: concentration (mg.mL^{-1}); D.S.R: Déviation Standard Relative en % (pour C= $2,5\text{mg.mL}^{-1}$); LD: Limite de détection en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ obtenue pour un niveau de confiance de 99,6% (K=3); LQ: Limite de quantification en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour un niveau de confiance de 99,6% (K=3).

Conditions expérimentales: Chemin optique 0,5 mm, Résolution nominale 4cm^{-1} , Nombre de balayage 10, Background de la cellule remplie avec $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95/5: V/V).

Les résultats obtenus montrent que les caractéristiques analytiques de phloroglucinol obtenu après traitement sont optimales en considérant la hauteur du pic au lieu de l'aire du pic. Ce fait la hauteur de pic est le mode de mesure choisi pour effectuer le dosage.

II.4.8 Détermination de la teneur du phloroglucinol dans l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia*

II.4.8.1 Par la méthode de calibration externe

Une masse de 4g de l'algue *Cystoseira tamariscifolia* préalablement traitée selon le protocole décrit dans la partie expérimentale (section II.3.2). Le phloroglucinol récupéré est analysé par spectrométrie IRTF, le spectre est montré sur la figure II.10.

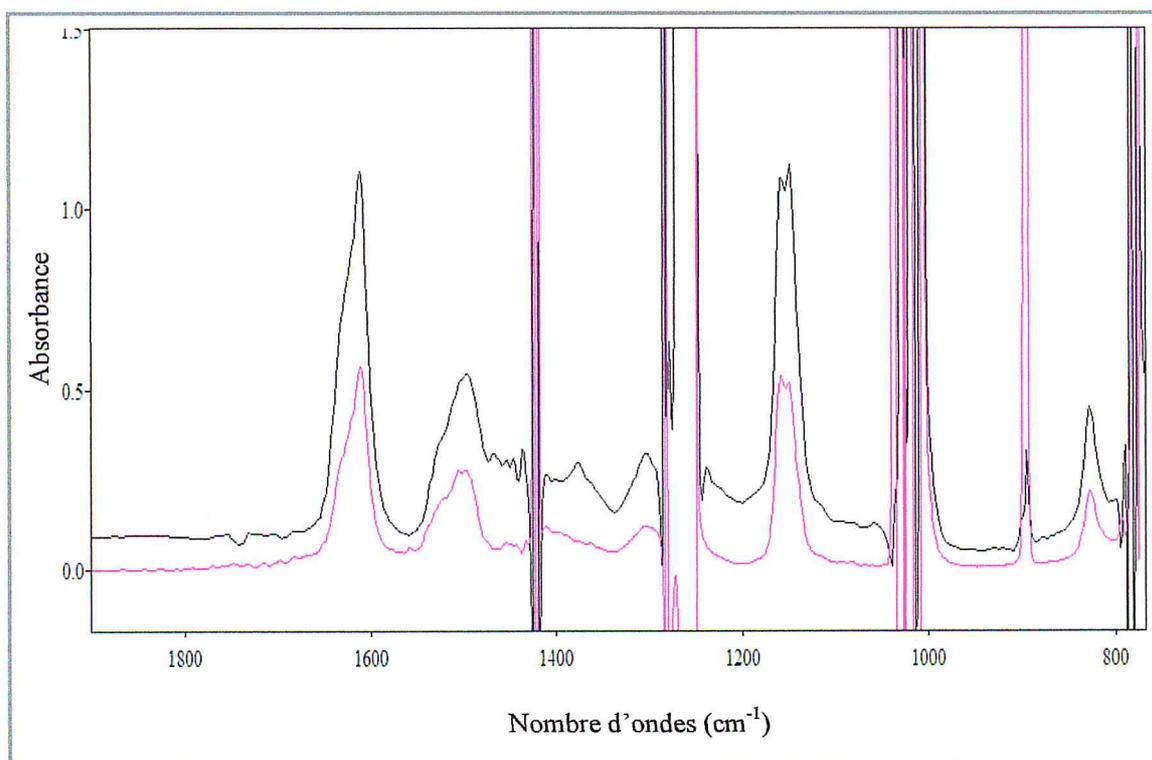


Figure II.10: Spectres IRTF de phloroglucinol ($2,5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) préparé directement dans CH_2Cl_2 - MeOH 95 :5 (v/v) (violet) et du phloroglucinol obtenu après traitement de l'algue (noir)

Le contenu du phloroglucinol dans l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* est obtenu en extrapolant les valeurs d'absorbance obtenues pour l'échantillon dans la droite de calibration établie pour le phloroglucinol traité de la même façon que les échantillons réels. Les résultats sont résumés dans le tableau II.8.

Comme on le voit, dans le cas où on considère la hauteur du pic, le taux de phloroglucinol dans les échantillons analysés est de l'ordre de 0,11%. Une très bonne répétabilité est confirmée pour trois analyses indépendantes de chaque échantillon étudié.

Tableau II.8: Taux du phloroglucinol dans l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* déterminé par la méthode de calibration externe (hauteur du pic)

Quantité d'algue	Max: cm ⁻¹ (lignes de base)	Hauteur du pic	Concentration (mg.mL ⁻¹)	Taux (%)	Taux (%)
4g	827: (880-810)	0,265326 ± 0,007037	4,49	0,112	0,113±0,005
		0,278042 ± 0,009975	4,70	0,118	
		0,255593 ± 0,008866	4,33	0,108	
	1150: (1200-1084)	0,931209 ± 0,001672	4,83	0,121	0,112±0,010
		0,873978 ± 0,007107	4,55	0,114	
		0,777935 ± 0,014757	4,07	0,102	
	1159: (1200-1084)	0,879636 ± 0,00460	4,62	0,115	0,109±0,005
		0,802149 ± 0,006114	4,23	0,106	
		0,809585 ± 0,005830	4,27	0,107	
	1611: (1714-1565)	0,920900 ± 0,001960	4,88	0,122	0,113±0,009
		0,850395 ± 0,002931	4,54	0,113	
		0,777531 ± 0,004358	4,18	0,105	

* g de phloroglucinol dans 4g d'algue

Valeur moyenne ± déviation standard de trois mesures indépendantes

II.4.8.2 Par la méthode des additions standards

Une quantité de 4g d'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* enrichie par une masse connue de phloroglucinol soit 1, 2, 3, ou 5 mg est traitée selon le protocole décrit dans le paragraphe II.3.2 et analysée par spectrométrie IRTF. Les Spectres IRTF des extraits traités sont présentés dans la figure II.11.

Le contenu du phloroglucinol dans l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* est obtenu par la méthode des additions standards indiquée dans la section II.3.5.

Les résultats sont résumés dans les tableaux II.9.

Comme on le voit, le taux de phloroglucinol dans les échantillons analysés varie entre 0,091% et 0,166% en considérant les bandes à 1150 cm^{-1} et 1611 cm^{-1} .

Sachant que d'une part, la loi de Beer-Lambert a un domaine de validité limité et n'est applicable qu'à des concentrations faibles et pour des solutions limpides et de l'autre part, l'erreur relative minimale sur la concentration est obtenue pour une absorbance comprise entre 0,7 et 1,0, alors on a considéré dans le cas de la méthode des additions standards les quantités de 1 et 2 mg d'analyte. Les résultats sont donnés dans le tableau II.10. On constate que le taux de phloroglucinol dans *Cystoseira tamariscifolia* obtenu par la méthode de quantification dite des additions standards est proche de celui obtenu par la méthode de calibration externe.

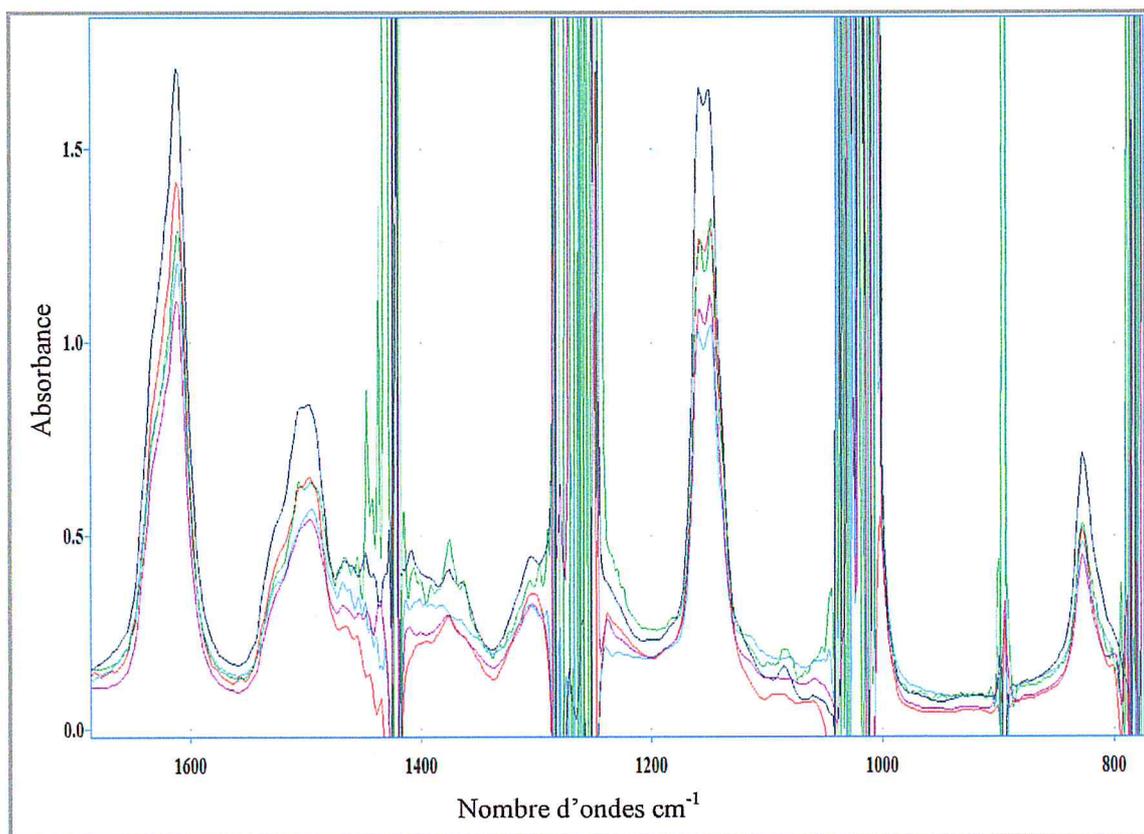


Figure II.11: Spectres IRTF de l'algue traitée sans ajout (rose), algue enrichi par 1mg.mL^{-1} de phloroglucinol (bleu), algue enrichi par 2mg.mL^{-1} de phloroglucinol (vert), algue enrichi par 3mg.mL^{-1} de phloroglucinol (rouge), et de l'algue enrichi par 5mg.mL^{-1} de phloroglucinol (noir)

Tableau II.9: Taux de phloroglucinol dans l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* déterminé par la méthode des additions standards

Quantité d'algue (g)	Masse ajoutée (mg)	Max: cm ⁻¹ (Lignes de base)	Hauteur du pic	Droite de calibration	Concentration (mg.mL ⁻¹)	Taux (%)
1			0,266756± 0,004			
2		827:	0,309542 ± 0,006	0,036300C+0,231954	6,39	0,159
3		(880-810)	0,336348 ± 0,013			
5			0,414470 ± 0,020			
1			0,852948± 0,007			
2		1150:	1,036242± 0,068	0,193028C+0,702778	3,64	0,091
3		(1200-1084)	1,447147± 0,008			
5			1,598239± 0,028			
1			0,839454 ± 0,006			
2		1159:	0,991458 ± 0,005	0,167835C+0,662884	3,95	0,098
3		(1200-1084)	1,159271 ± 0,044			
5			1,507472 ± 0,054			
1			0,999507 ± 0,071			
2		1611:	1,119263± 0,033	0,129908C+0,865242	6,66	0,166
3		(1714-1565)	1,255271 ± 0,0003			
5			1,515971± 0,006			

Tableau II.10: Taux de phloroglucinol dans l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* déterminé par la méthode des additions standards

Quantité d'algue (g)	Masse ajoutée (mg.mL ⁻¹)	Max: cm ⁻¹ (Lignes de base)	Hauteur de pic	Droite de calibration	Concentration (mg.mL ⁻¹)	Taux (%)
4	1	827: (880-810)	0,266756± 0,004	0,042786C+0,22397	5,23	0,131
	2		0,309542 ± 0,006			
	1	1150: (1200-1084)	0,852948± 0,007	0,183294C+0,669654	3,65	0,091
	2		1,036242± 0,068			
	1	1159: (1200-1084)	0,839454 ± 0,006	0,15200C+0,687450	3,95	0,113
	2		0,991458 ± 0,005			
	1	1611: (1714-1565)	0,999507 ± 0,071	0,119756C+0,879751	7,34	0,184
	2		1,119263± 0,033			

II.5 Analyses quantitatives des extraits par la méthode Folin-Ciocalteu

II.5.1 Introduction

Détermination quantitative des phénols totaux a été effectuée sur les extraits d'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* par la méthode Folin-Ciocalteu.

II.5.2 Choix de la méthode de quantification des composés phénoliques

Les métabolites secondaires constituent une large gamme de molécules végétales, dont leur nature chimique et teneurs sont extrêmement variables d'une espèce végétale à l'autre.

Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des polyphénols totaux. L'analyse par le réactif de Folin-Ciocalteu (FCR) est souvent utilisée.

Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et l'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Lors de l'oxydation, il se réduit en un mélange d'oxyde bleu. Le réactif de Folin-Ciocalteu de couleur jaune vire au bleu (la quantité d'oxydes métalliques formes) en solution après la réaction avec les composés phénoliques totaux. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans l'extrait analysé [80].

La teneur en phénols totaux des extraits (brut et traité) d'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* qui font l'objet d'analyse a été déterminée par la méthode de Nathalie Blanc et al [80].

II.5.3 Procédure générale

II.5.3.1 Etablissement de la courbe d'étalonnage

La quantification des phénols totaux dans les extraits nécessite de tracer une courbe d'étalonnage d'un phénol étalon le phloroglucinol. Nous avons utilisé comme référence une gamme d'étalons préparés à partir d'une solution mère de phloroglucinol de 2 mg.mL^{-1} , avec des concentrations variant de $0,03$ à $0,08 \text{ mg.mL}^{-1}$.

A l'aide d'une pipette, 1 mL de chaque solution étalon est introduit dans des tubes à essais, suivi de l'addition de 5 mL d'eau distillée et $0,5 \text{ mL}$ du réactif de Folin-Ciocalteu, après 1 minutes 6 mL de carbonate de sodium Na_2CO_3 à 29% (m/v) ont été ajouté (favoriser un milieu alcalin pour déclencher la réaction d'oxydoréduction), par la suite ces solutions sont maintenus à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante avant d'être analysé par spectrophotométrie visible.

La lecture de l'absorbance de chaque solution est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible de marque (UV-1700 PharmaSpec) à une longueur d'onde de 760nm contre un blanc analytique ce qui nous permet de tracer une courbe d'étalonnage.

II.5.3.2 Détermination des phénols totaux dans l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia*

Pour la quantification de phénols totaux dans l'algue, une masse de 4g d'algue sèche a subit de traitement décrit dans les sections II.3.1 et II.3.2. Une quantité de 4mg d'extrait traité de la même manière que les étalons est analysée par cette technique.

La quantité des polyphénols totaux est calculée par l'équation suivante:

$$T = (c * V)/m \quad [74]$$

T: contenu total des polyphénols (mg équivalent phloroglucinol/g d'extrait d'algue).

c: concentration de phloroglucinol (mg.mL^{-1}).

V: volume de l'extrait (mL).

m: masse de l'extrait pur d'algue (g).

II.5.4 Résultats et Discussions

II.5.4.1 Dosages des phénols totaux par la méthode Folin-Ciocalteu

II.5.4.1.1 Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux (PPT)

Cette courbe est établie en utilisant le phloroglucinol comme référence et les résultats sont exprimés en mg équivalent de phloroglucinol par gramme de matière sèche (mg éqPh/ g MS).

La courbe d'étalonnage est établie avec un coefficient de corrélation $R= 0,9996$ (figure II.12).

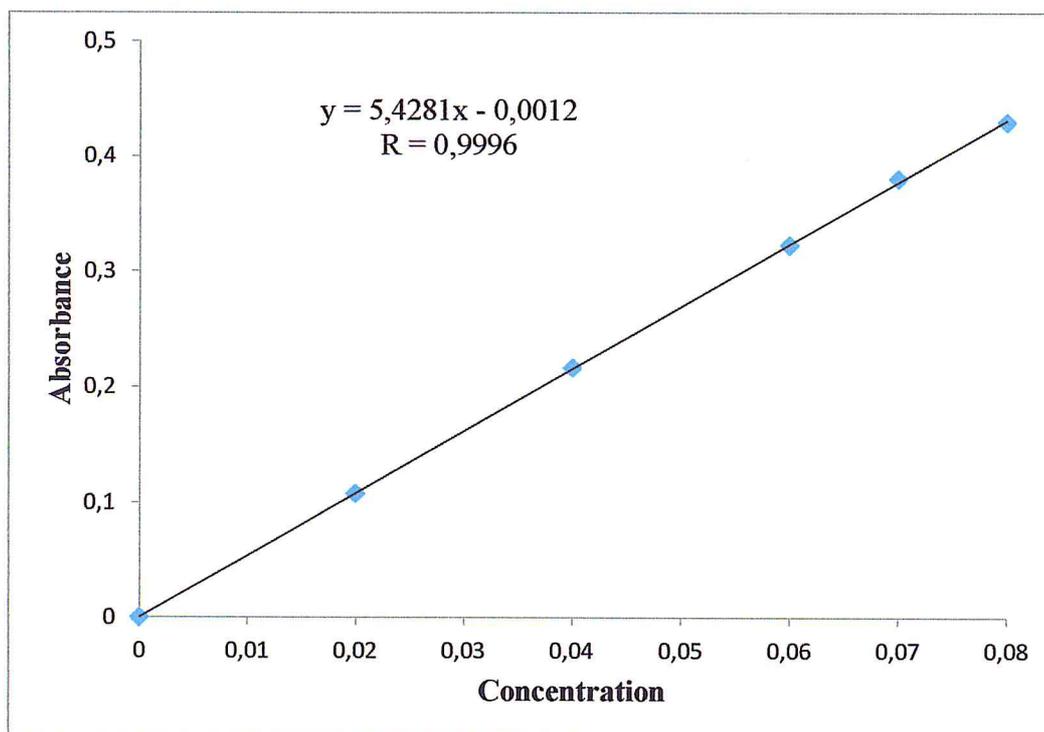


Figure II.12: Courbe d'étalonnage du phloroglucinol

Les caractéristiques analytiques du phloroglucinol obtenu selon le test Folin-Ciocalteu sont résumées dans le tableau II.11.

Tableau II.11: Caractéristiques analytiques du phloroglucinol obtenu par le test de Folin-Ciocalteu

Droite de calibration	Coefficient de corrélation	Limite de détection ($\mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$)	Limite de quantification ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Déviati on standard relative
5.4281C-0.0012	0.9996	0,78	2,6	0,34

II.5.4.1.2 Détermination du taux de phénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu

Les résultats de l'évaluation quantitative des phénols totaux contenus dans les extraits d'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* étudiés sont résumés dans le tableau II.12.

Tableau II.12: Quantité des polyphénols totaux dans différentes des extraits d'algue brune *Cystoseira tamariscifolia*

	Les extraits	Le taux des PT (mg éq Phloroglucinol/g)
<i>Cystoseira tamariscifolia</i>	Extrait brut	116,25
	Extrait traité	573,75

Les résultats des analyses quantitatives des extraits d'algues étudiées sont représentés ci-dessous (figure II. 12). Dans cette composition nous constatons que l'extrait traité est quantitativement plus riche en composés phénoliques (polyphénols) que l'extrait brut.

Etant donné que le phloroglucinol est le phénol majoritaire dans l'algue *Cystoseira tamariscifolia* alors ce taux peut être exprimé en pourcentage par rapport à l'algue sèche. Le taux du phloroglucinol dans l'extrait brut exprimé en pourcentage par rapport à l'algue sèche est de 3,371%, par contre ce taux dans l'extrait traité exprimé en pourcentage par rapport à l'algue sèche est de 0,235%. Cette différence est due essentiellement au fait que le réactif de FC dose également des composés non phénoliques car il n'est pas sélectif, une purification préalable de l'extrait brut s'avère nécessaire.

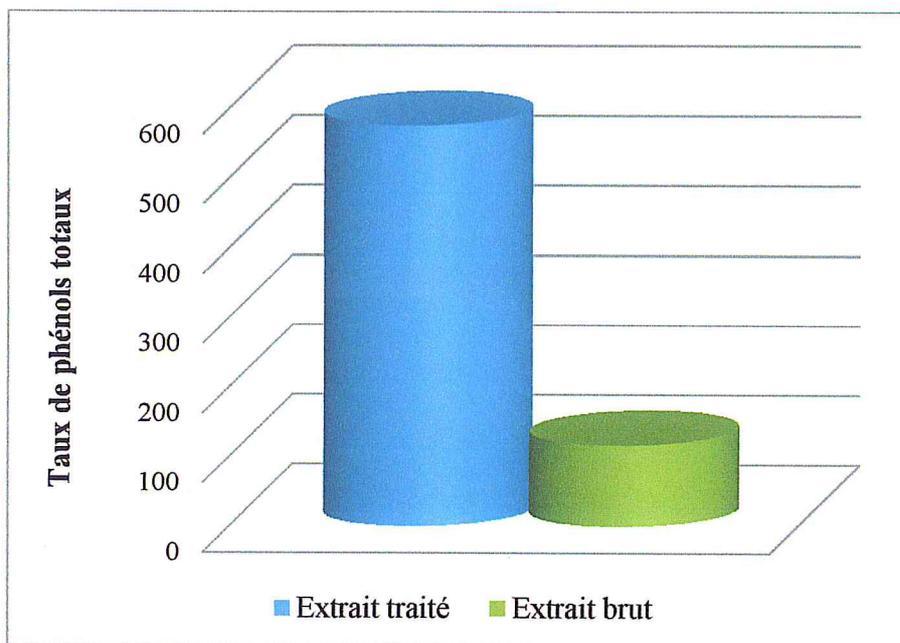


Figure II.13: Evaluation des phénols totaux des extraits d'algue brune *Cystoseira tamariscifolia*

Le dosage par spectrométrie IRTF du phloroglucinol dans l'extrait traité de l'algue *Cystoseira tamariscifolia* donne une teneur de 0,122 g de phloroglucinol dans 100 g d'algue sèche, alors que le dosage par la méthode Folin-Ciocalteu dans l'extrait traité donne une teneur de 0,235ég g de phloroglucinol dans 100 g d'algue sèche. Les valeurs montrées indiquent que la méthode de détermination par spectrométrie IRTF est plus précise et spécifique au phloroglucinol. La teneur obtenue par la méthode de Folin-Ciocalteu est presque le double ce qui est dû probablement à la présence de phlorotannins qui réagissent avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Cette interférence est masquée peut être dans le spectre IRTF de l'extrait traité dans les zones opaques voir figure II.8.

Chapitre III:
**Evaluation du pouvoir
antioxydant et Etude de
l'activité antimicrobienne**

III.1 Estimation du pouvoir antioxydant des extraits de l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* par deux méthodes

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* de nos extraits a été réalisée par deux techniques chimiques à savoir: la réduction du fer (FRAP) et le piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1 picrylhydrazyl).

III.1.1 Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1 picrylhydrazyl)

III.1.1.1 procédure générale

Le pouvoir antioxydant de nos extraits a été testé par la méthode au DPPH [74].

Des séries de solutions de l'extrait traité et de l'acide ascorbique (antioxydant de référence) de concentrations allant de 0,002 à 0,020 mg.mL⁻¹ et d'extrait brut variant de 0.02 à 0.12mg.mL⁻¹ sont préparées dans le méthanol. Un volume de 1 mL de chaque série de solution, est mélangé à 1 mL de DPPH (4mg.mL⁻¹) préparé également dans le méthanol. Après homogénéisation, le mélange est incubé à la température ambiante (25°C) à l'abri de la lumière. Après 30 minutes d'incubation, l'absorbance est lue à 517 nm contre un « blanc » qui ne contient que du méthanol.

La valeur EC₅₀ est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur). Ou encore, c'est la concentration de l'échantillon exigé pour donner une diminution de 50% de l'absorbance de la solution contrôle constituée de méthanol et de la solution de DPPH.

❖ Détermination du pouvoir antioxydant

Pour obtenir la concentration efficace qui réduit la concentration initiale de DPPH à 50% (EC₅₀), les résultats sont exprimés en activité antioxydante, qui exprime la capacité de piégeage du radical libre et elle est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol. L'activité antioxydante « AA% » est donnée par la formule suivante:

$$\text{Inhibition du DPPH (\%)} = (1 - (\text{DO essai} / \text{DO blanc})) \times 100$$

Soit:

Abs blanc: Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm de la solution méthanol +DPPH

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

III.1.1.2 Résultats et discussions

III.1.1.2.1 Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante exprime la capacité de réduction des radicaux libres. Pour nos extraits, nous avons employé la méthode au DPPH, ce radical libre synthétique présente une coloration violette sombre, lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes, la forme réduite conférée à la solution une coloration jaune pâle (figure III.1), le virage vers cette coloration et l'intensité de la couleur jaune reflète la capacité antiradicalaire de la molécule, et dépend de la nature, la concentration et la puissance de cette molécule.

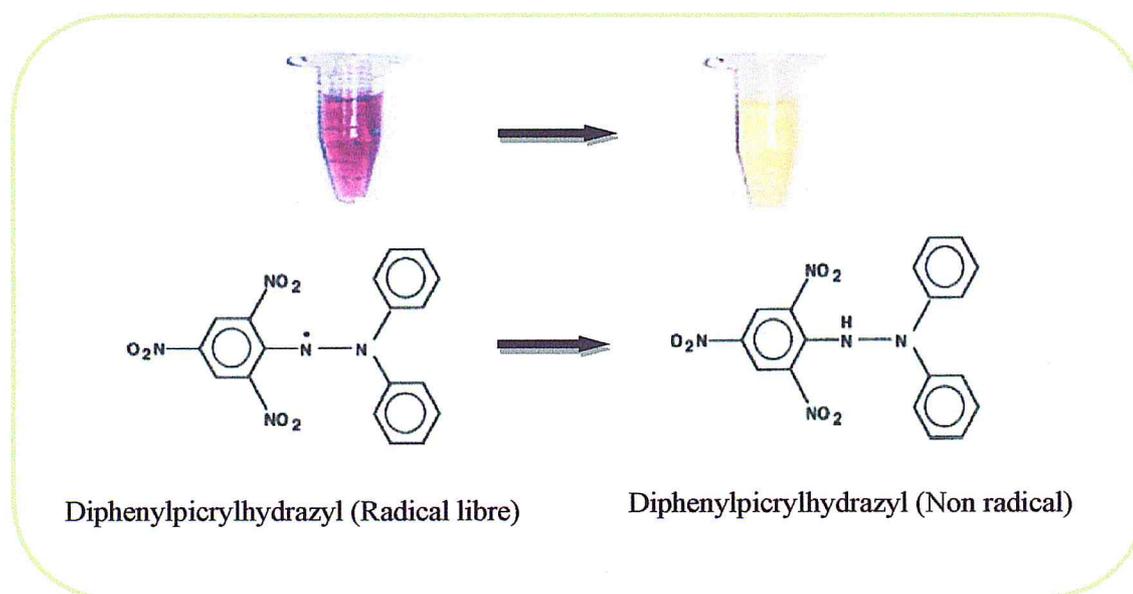


Figure III.1: Forme libre et réduite du DPPH [75]

Pour le DPPH l'absorbance mesurée à 517 nm montre une chute rapide dans un intervalle très réduit de la dose des extraits (brut et traité) de l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia*, comme le montre le tableau III.1 et les figures III.2 et III.3.

Tableau III.1: Variation du taux de piégeage (I%) du DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits d'algue brune *Cystoseira tamariscifolia*.

Tube (n°)	Concentration d'extrait traité (mg.mL ⁻¹)	I (%)	Concentration d'extrait brut (mg.mL ⁻¹)	I (%)
1	0.002	10	0.02	35.68
2	0.0035	33.18	0.04	55
3	0.006	59.77	0.06	67.5
4	0.008	68.9	0.08	73.68
5	0.01	71.14	0.1	76.36
6	0.02	77.27	0.12	79.32

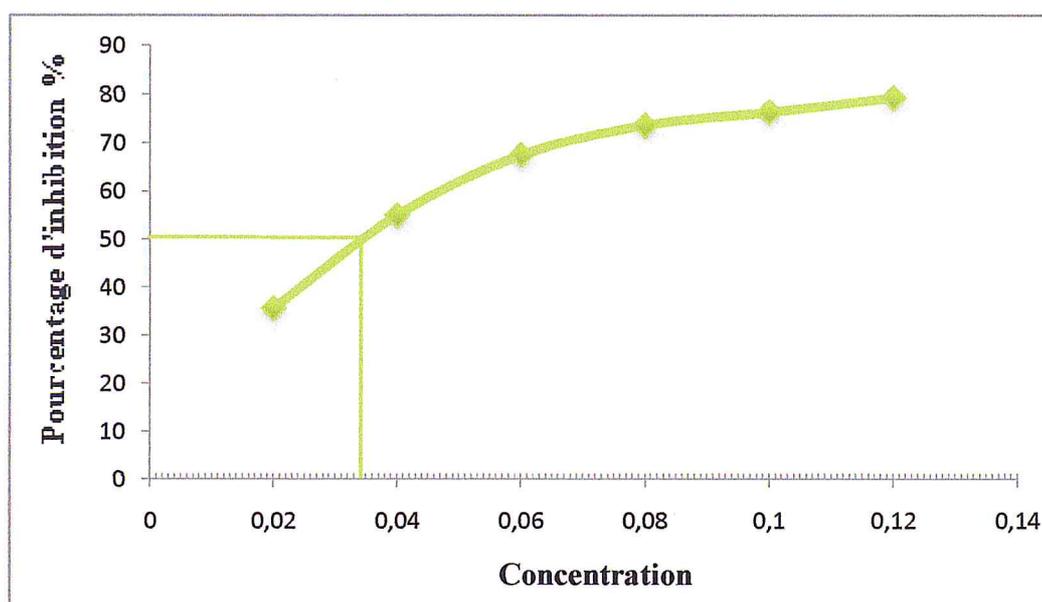


Figure III.2: Variation du taux de piégeage du DPPH par l'extrait brut de *Cystoseira tamariscifolia* en fonction des différentes concentrations

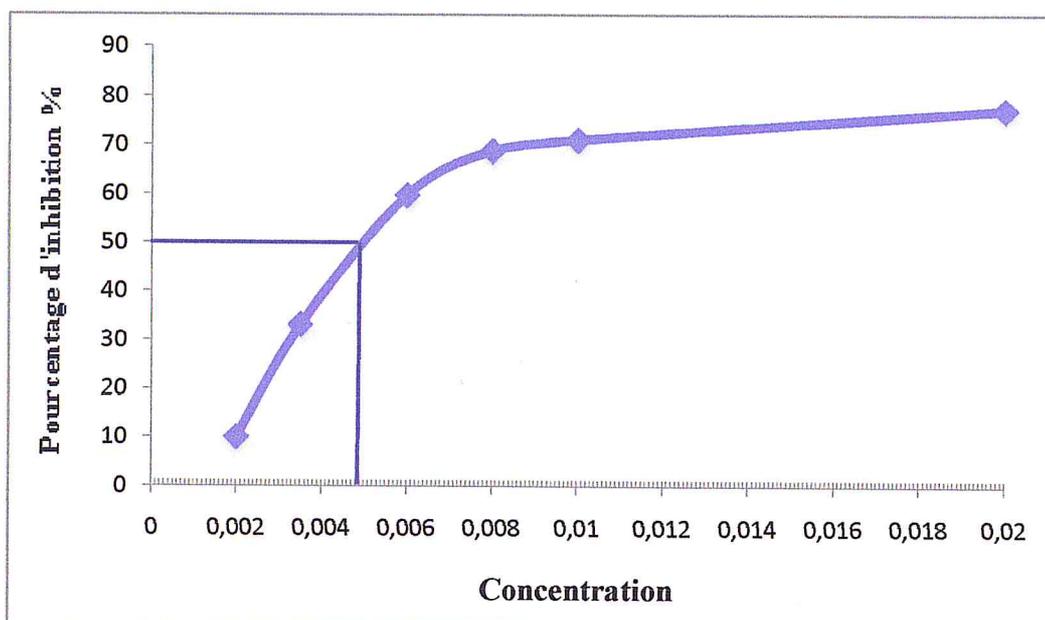


Figure III.3: Variation du taux de piégeage du DPPH par l'extrait traité de *Cystoseira tamariscifolia* en fonction des différentes concentrations

Pour montrer la capacité antioxydante des extraits d'algue brune *Cystoseira tamariscifolia*, nous avons effectué un test du taux de piégeage de radical libre DPPH sur la vitamine C. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau III.2 et illustrés par la figure III.4.

Tableau III.2: Variation du taux de piégeage (I%) du DPPH en fonction des différentes concentrations d'acide ascorbique.

Standard	Tube (n°)	Concentration d'extrait brut (mg.mL ⁻¹)	I (%)
Vitamine C	1	0.004	13.25
	2	0.006	59.32
	3	0.008	85.69
	4	0.010	97.02
	5	0.014	98.59
	6	0.016	99.3

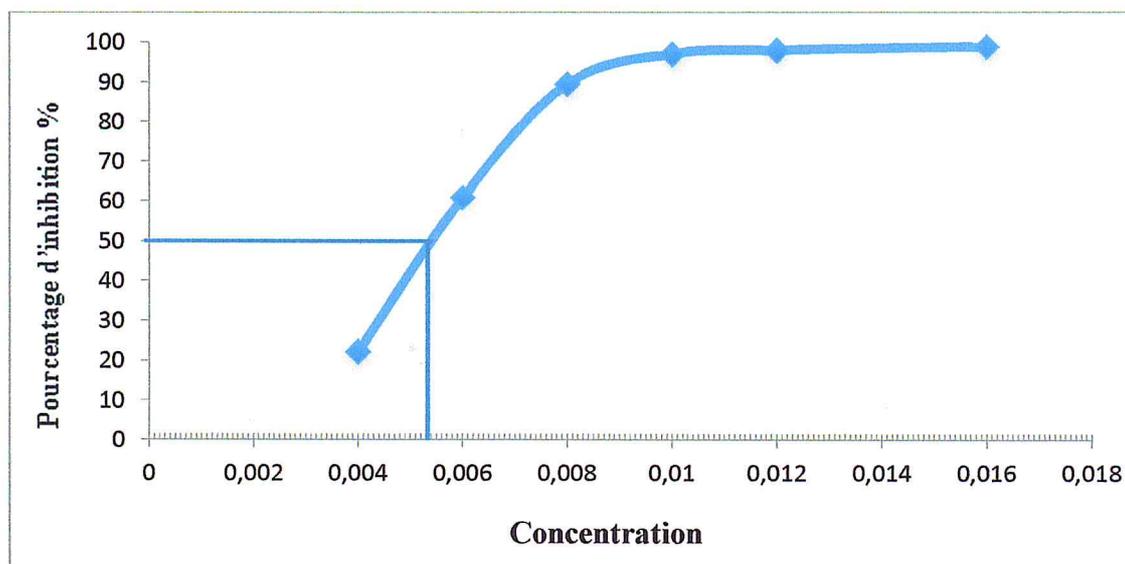


Figure III.4: Variation du taux de piégeage du DPPH par l'acide ascorbique en fonction des différentes concentrations

❖ Détermination de la valeur EC_{50}

L' EC_{50} a été introduit par Brand-williams et ses collaborateurs et elle a été ensuite employée par plusieurs groupes de chercheurs pour représenter leurs résultats. Elle définit la concentration efficace de substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical libre « DPPH » [76].

Les EC_{50} des extraits d'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* et d'antioxydant standard sont déterminées graphiquement, dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait et l'ordonnée représente l'activité antioxydante en (%). Les résultats déduits sont regroupés dans le tableau III.3.

Tableau III.3: Valeurs EC_{50} des extraits d'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* et d'antioxydant standard.

Composés	EC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Extrait brut	34
Extrait traité	4,8
La vitamine C	5,1

❖ Comparaison entre les EC₅₀

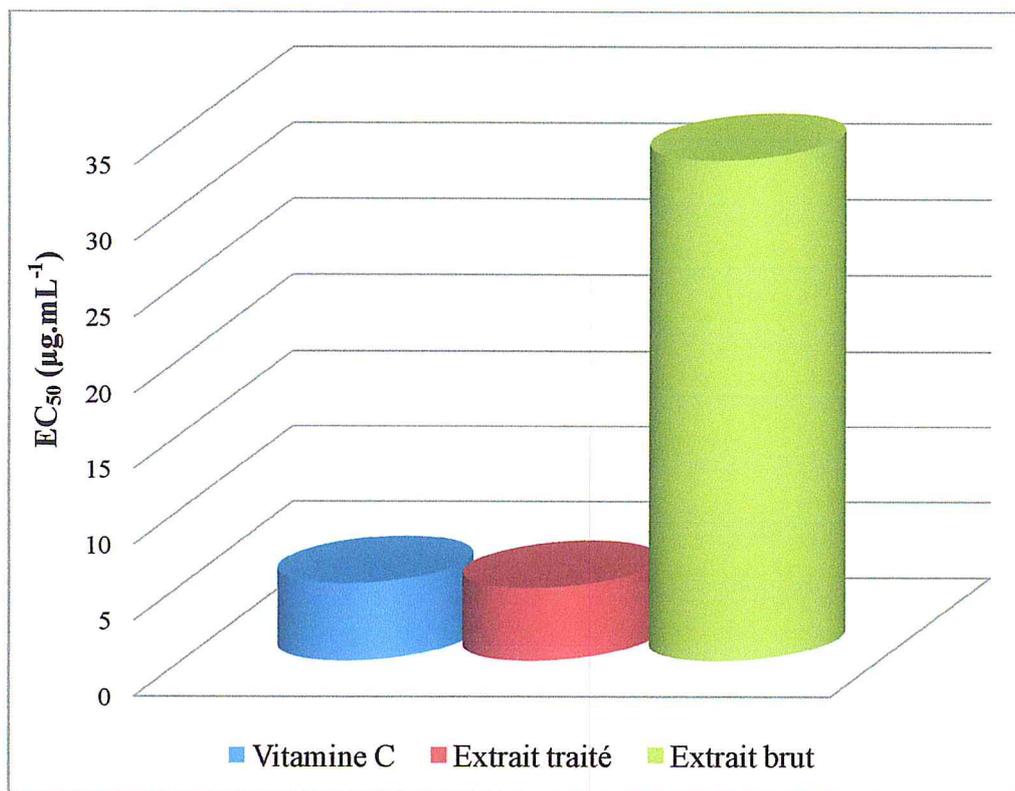


Figure III.5: Comparaison des valeurs EC₅₀ de nos extraits et d'antioxydant standard

Comme c'est illustré par l'histogramme de la figure III.5, l'extrait traité d'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* possède des capacités de piégeage du radicale libre DPPH puissantes. Par contre l'extrait brut d'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* possède des capacités de piégeage du radicale libre DPPH très faible.

Comme figurant dans le tableau ci-dessus l'antioxydant standard Vitamine C a montré une activité antioxydante puissante avec une EC₅₀ de l'ordre de 5,1 µg.mL⁻¹.

Parmi les deux extraits d'algue brune *Cystoseira tamariscifolia*, l'extrait traité représente l'extrait le plus actif avec une EC₅₀ de l'ordre de 4,8 µg.mL⁻¹, par contre une très faible activité anti-radicalaire a été constatée pour l'extrait brut une EC₅₀ de 34 µg.mL⁻¹.

D'après les résultats, nous remarquons que l'extrait traité possède une capacité de neutralisation du radical libre DPPH puissante.

III.1.2 Pouvoir réducteur (FRAP, Ferric Reducing Antioxydant Power)

Le pouvoir réducteur mesure la capacité d'un antioxydant à donner un électron.

La réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}) est mesurée par l'intensité de l'absorbance de la solution bleue verte qui en résulte. Cette dernière absorbe à une longueur d'onde de 700 nm. Une augmentation de l'absorbance est l'indice d'un pouvoir réducteur élevé [77, 78].

III.1.2.1 Procédure générale

Cette méthode est déterminée en utilisant la technique d'Oyaizu [79]. Les différentes concentrations des extraits dans le méthanol (2.5mL) sont mélangées avec 1.25mL de la solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 1.25mL de ferricyanure de potassium [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$](1%). Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20 min. Après, 1.25 mL de l'acide trichloracétique (10%) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours/min pendant 10 min.

A la fin, 1.25 mL du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 1.25 mL de l'eau distillée et 0.25 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (0.1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm.

L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de fer. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif.

La valeur FRAP est donnée par la formule suivante:

$$\text{La valeur FRAP} = \frac{(\text{Abs}_{\text{essai}} - \text{Abs}_{\text{blanc}})}{(\text{Abs}_{\text{standard}} - \text{Abs}_{\text{blanc}})} \times [\text{Standard}] \quad [80]$$

Soit:

Abs_{essai}: Absorbance à 517 nm de l'échantillon.

Abs_{blanc}: Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm des réactifs sans l'échantillon.

Abs_{standard}: Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm de l'acide ascorbique.

[Standard]: La concentration de standard.

III.1.2.2 Résultats et discussions

Les résultats déduits sont regroupés dans le tableau III.4.

Tableau III.4: Valeurs de FRAP des extraits d'algue brune *Cystoseira tamariscifolia*

Composés	Concentration mg.mL ⁻¹	La valeur FRAP
Extrait brut	0.24	0.0161
Extrait traité		0.6841

Pour explorer les résultats obtenus, nous avons tracé l'histogramme des valeurs FRAP obtenues en fonctions des concentrations des deux extraits d'algue étudiée (figure III.6).

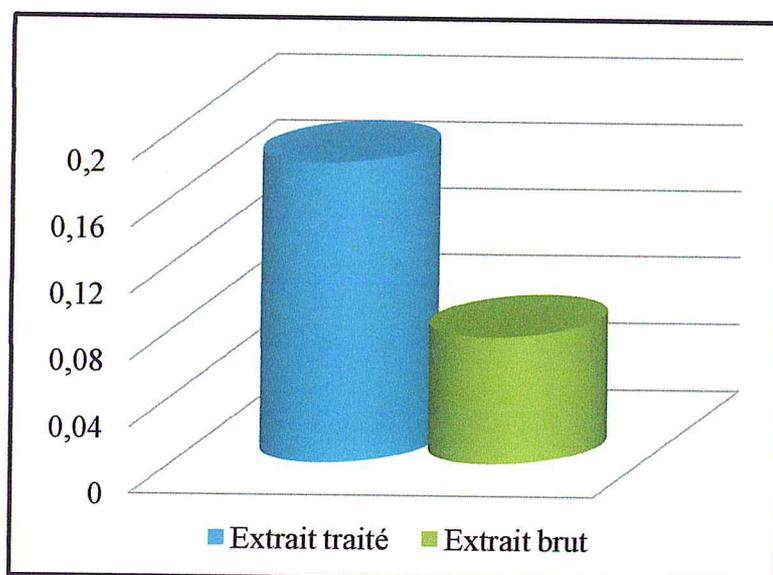


Figure III.6: Le pouvoir réducteur des deux extraits d'algue

La valeur FRAP de l'extrait traité est plus grande que celle de l'extrait brut qui confirme les résultats de test DPPH.

En fonction des résultats obtenus, nous pouvons dire que l'extrait traité d'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* possède une bonne activité antioxydante en comparaison avec l'extrait brut. Ce qui est dû principalement à son composé phénolique majoritaire, le phloroglucinol, qui a été préconcentré dans l'extrait selon le protocole adapté. Cela est en très bonne concordance avec le résultat obtenu par spectrométrie IRTF.

III.2 Tests d'activité antimicrobienne

III.2.1 Lieu de travail et milieu de culture

Le travail a été réalisé au sein de l'unité de bactériologie de la clinique de laboratoire central de l'Établissement Public Hospitalier de Boufarik.

III.2.2 Matériel microbien

Nous avons utilisé des souches de références ATCC fournies par le laboratoire d'antibiothérapie et d'hygiène de l'institut Pasteur d'Alger agréé par l'OMS (Tableau III.5).

Tableau III.5: Souches de références utilisées dans notre travail

Souches	Nom	ATCC
Gram+	<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9314
	<i>Staphylococcus epiderium</i>	ATCC 43300
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 663
	<i>Entérocooccus seacalis</i>	ATCC51299
Gram-	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
	<i>Salmonella enterica</i>	CIP 81.3
Levures	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231

Nous avons utilisé dans notre étude deux milieux de cultures différents:

- ◆ Muller Hinton comme milieu de culture pour les bactéries.
- ◆ Milieu Sabouraud comme milieu de culture pour les levures.

III.2.3 Etude qualitative de l'effet antimicrobien par la méthode de diffusion sur milieu solide (l'aromatogramme)

III.2.3.1 Principe

L'aromatogramme est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles. Différents types d'aromatogrammes, en milieu solide, liquide, sont exploitables. Cependant, en pratique quotidienne, c'est le milieu solide qui est le plus simple et le plus facilement reproductible [81].

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée « antibiogramme » ou « méthode par diffusion en milieu gélosé » ou encore « méthode des disques ».

Cette méthode consiste à mettre en évidence une éventuelle activité antimicrobienne des extraits d'algue brune *Cystoseira tamariscifolia*, en la mettant en présence des germes testés. Placés dans une étuve à 37°C, dans des conditions optimales de culture, les germes pathogènes se développent rapidement sur le milieu nutritif. Sur ces colonies microbiennes, plusieurs séries de petits disques de papier buvard imprégné de différents extraits à tester sont ensuite disposées. Après un temps de latence à 37,5 °C, le diamètre du halo d'inhibition (zone d'inhibition) entourant les disques est alors mesuré. Chaque halo, une zone claire, montre la destruction des germes pathogènes et donne une indication précise de l'activité antibactérienne des extraits utilisées. L'aromatogramme représente cependant un point de repère essentiel puisque sa technique est identique à celle utilisée pour mesurer l'activité bactéricide des antibiotiques (Figure III.7) [82].

La méthode est validée par le fascicule de Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS fourni par NCCLS (National Comitee for Clinical Laboratory Standars). Son principe est tiré du titrage des antibiotiques (test d'antibiogramme).

III.2.3.2 Technique de l'antibiogramme

La méthode que nous avons utilisée est l'ensemencement par écouvillonnage préconisé [83] par NCCLS (National Comitee for Clinical Laboratory Standars) et recommandé par l'OMS(figure III.7).

Milieu

- Gélose Muller-Hinton (MH) (bactéries non exigeantes); coulée en boite de pétri sur une épaisseur de 4 mm.
- Les géloses sont séchées avant l'emploi.

Inoculum

- A partir d'une culture pure de 18h sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Bien décharger l'anse dans 5 à 10 mL d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être à 0,5 Mc Farland.
- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique s'il est trop fort.
- L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum.

Ensemencement

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries séries.
- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boite de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Dans le cas on l'on ensemence plusieurs boites de pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

Dépôts des disques

- A l'aide d'une pince stérile, prélever à chaque fois un disque stérile de 09 mm de diamètre. Ce dernier est imbibé avec les extraits qu'on veut tester, en mettant seulement en contact le bout du disque, celle-ci va être absorbée progressivement jusqu'à imprégnation totale du disque.
- Déposer les disques sur la surface de la gélose.
- Laisser diffuser sur paillasse pendant 30 min.

Incubation

- 24 heures à 37°C pour les bactéries.
- 48 heures à 25°C pour les champignons.

Lecture

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée.
- Comparer ces résultats aux valeurs critiques des ATCC.
- Classer la bactérie dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistante.

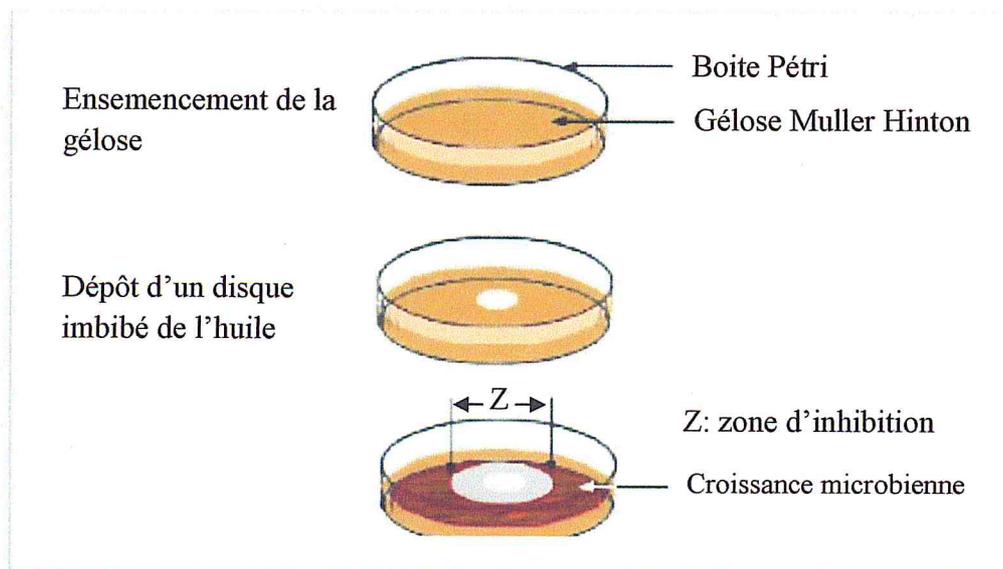


Figure III.7: Illustration de la méthode de l'antibiogramme

III.2.4 Résultats et discussion

L'activité antimicrobienne des extraits est évaluée en fonction du diamètre (mm ou cm) des zones d'inhibitions de la croissance microbienne [84].

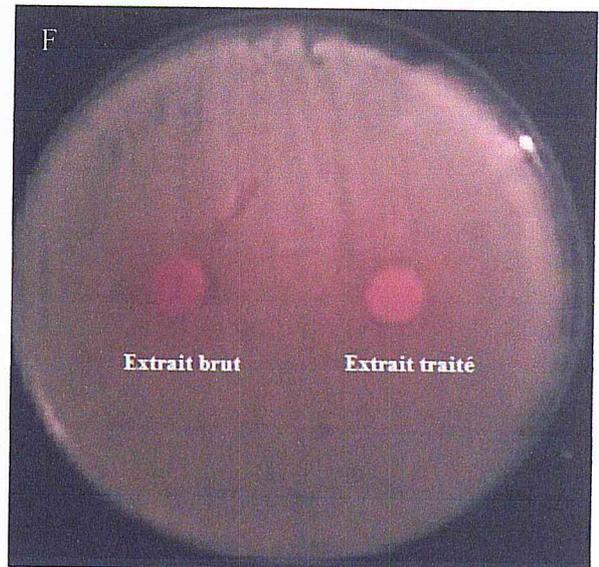
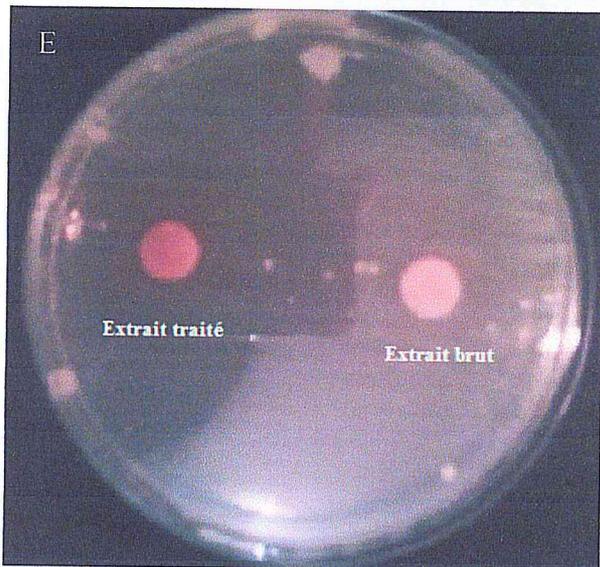
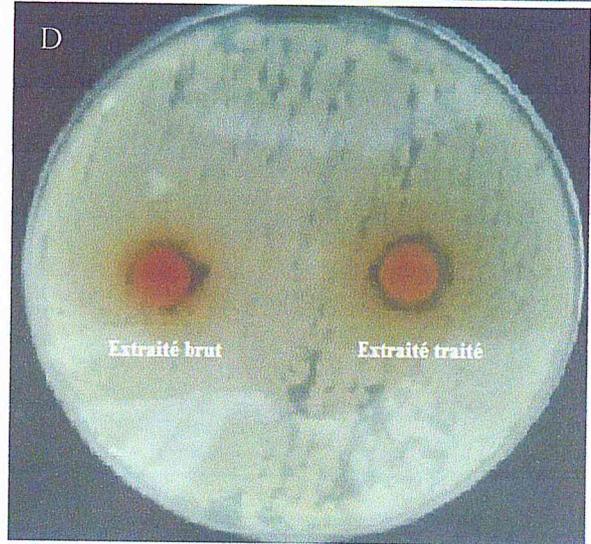
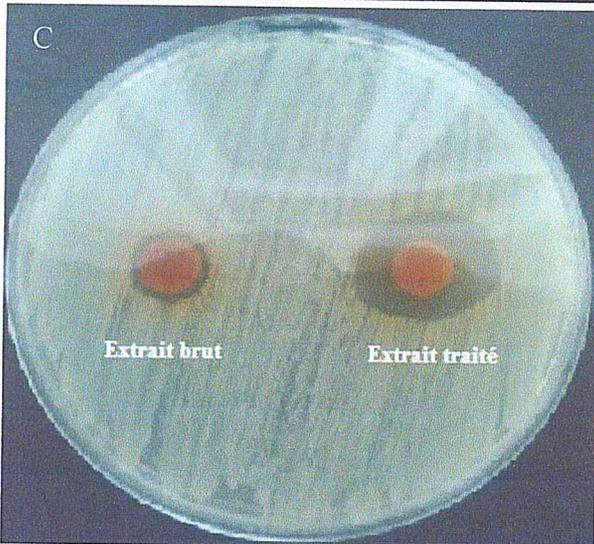
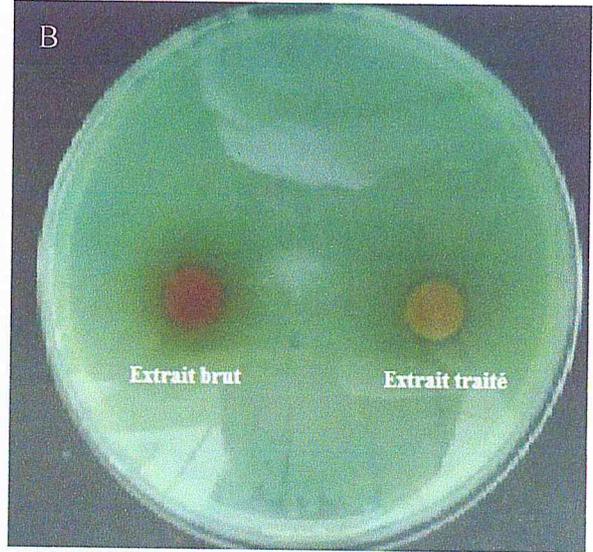
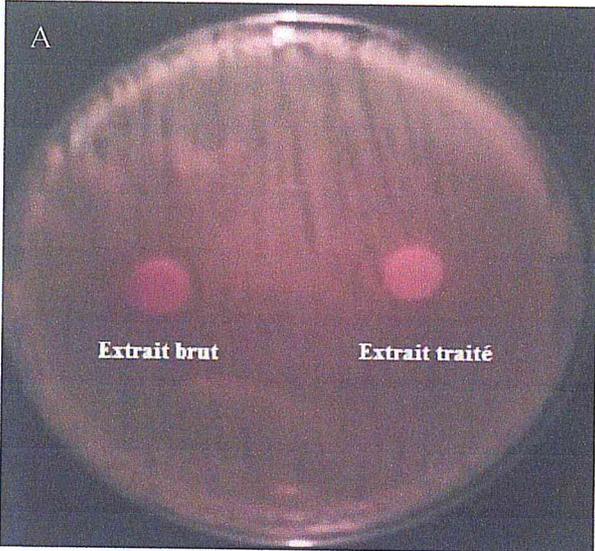
Le diamètre des zones d'inhibition nous permet d'estimer la résistance ou la sensibilité des différents germes testés à l'extrait, en adoptant la méthode de Chifundra et al (1990) appliquée aux antibiotiques [85].

Tableau III.6: Relation entre le diamètre d'inhibition et la sensibilité des souches [85].

Diamètre d'inhibition (mm)	Sensibilité des souches
0-9	Souche résistante
10-15	Souche peu sensible
16-20	Souche sensible ou intermédiaire
>20	Souche très sensible

Les résultats qualitatifs du pouvoir antimicrobien des extraits d'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* sur les souches pathogènes étudiées sont représentés en photographies par la figure III.8 et en histogramme par la figure III.9.

Le tableau III.7 montre les résultats qualitatifs des extraits conventionnels sur les bactéries pathogènes.



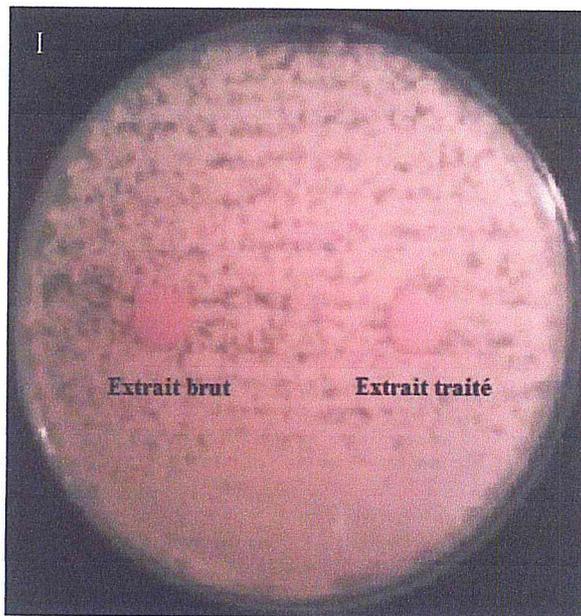
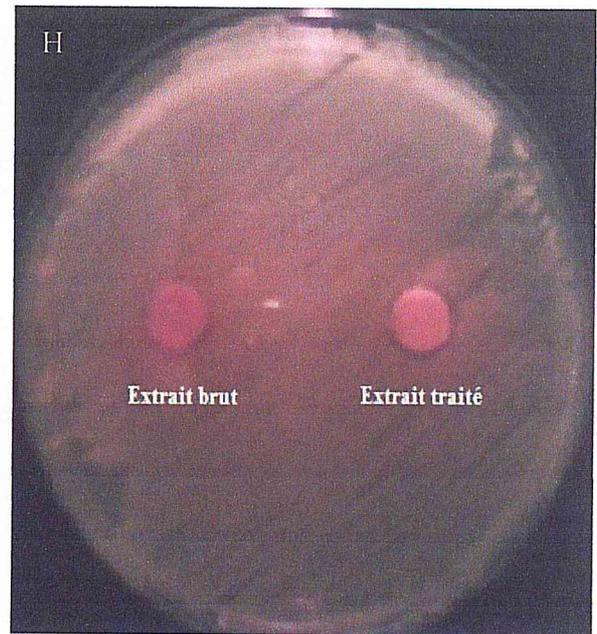
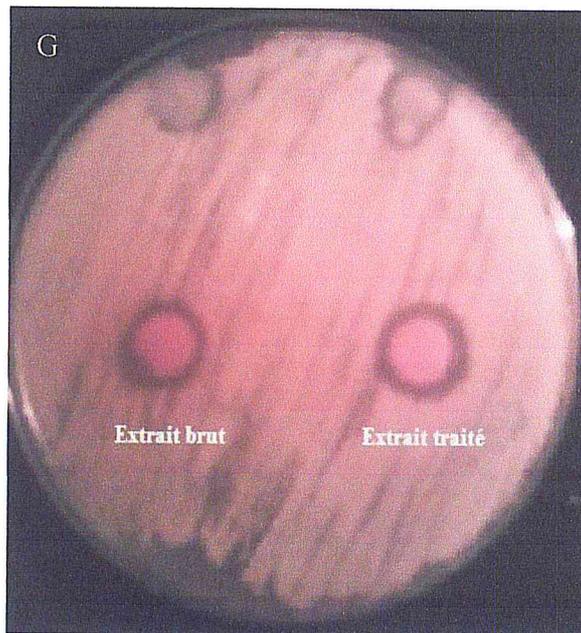


Figure III.8: Activité antimicrobienne des extraits d'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* contre : A) *Escherichia coli*, B) *Pseudomonas aeruginosa*, C) *Staphylococcus aureus*, D) *Bacillus subtilis*, E) *Entérocooccus seacalis*, F) *Staphylococcus epiderium*, G) *Micrococcus luteus*, H) *Salmonella enterica*, I) *Candida albican*

Tableau III.7: Activité antimicrobienne des extraits d'algue brune *Cystoseira tamariscifolia*

	Souches	Diamètre d'inhibition (mm)
Extrait brut	<i>Escherichia coli</i>	9
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
	<i>Staphylococcus aureus</i>	11
	<i>Bacillus subtilis</i>	11
	<i>Entérocooccus seacalis</i>	10
	<i>Staphylococcus epiderium</i>	9
	<i>Micrococcus luteus</i>	12
	<i>Salmonella enterica</i>	9
	<i>Candida albicans</i>	9
Extrait traité	<i>Escherichia coli</i>	9
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
	<i>Staphylococcus aureus</i>	22
	<i>Bacillus subtilis</i>	12
	<i>Entérocooccus seacalis</i>	14
	<i>Staphylococcus epiderium</i>	10
	<i>Micrococcus luteus</i>	14
	<i>Salmonella enterica</i>	10
<i>Candida albicans</i>	9	

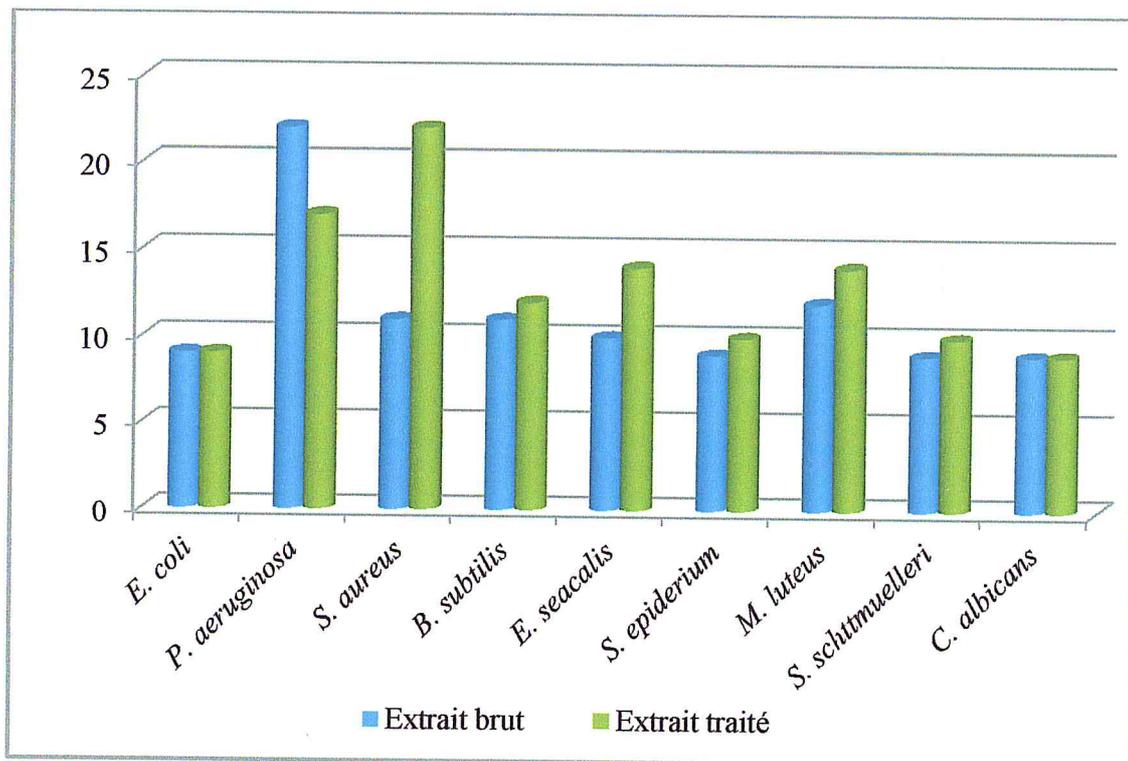


Figure III.9: Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition (en mm) des extraits d'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* sur les différentes souches ATCC

D'après l'histogramme représenté par la figure III.9, nous pouvons constater que l'extrait traité d'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* ayant une bonne activité antimicrobienne contre les souches testées que l'extrait brut ayant une bonne activité antimicrobienne contre *Pseudomonas aeruginosa*.

Le composé phénolique (phloroglucinol) de l'extrait traité a montré une activité antimicrobienne très intéressante vue l'importance des zones d'inhibition apparues autour des microorganismes testés.

Parmi les bactéries testées, la Gram⁺ *Staphylococcus aureus* s'est avéré la plus sensible à l'action de notre extrait traité avec un diamètre d'inhibition de 22mm et la Gram⁻ *Pseudomonas aeruginosa* avec un diamètre d'inhibition de 22 mm pour l'extrait brut. Ce résultat confirme le travail d'Abouriche effectué sur la même espèce d'origine marocain [61].

Conclusions

Notre travail a été consacré au développement pour la première fois d'une méthode analytique de dosage des phénols dans l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* par spectrométrie IRTF.

L'extraction des phénols a été réalisée par macération de l'algue dans un mélange de solvant MeOH/H₂O (50% : V/V) avec des rendements de l'ordre de 29,06% en extrait brut et de 0,41 % en extrait traité.

Les phénols sont analysés globalement sous forme du phloroglucinol étant donné que ce dernier est le phénol majoritaire dans cette algue.

Les bandes spécifiques du phloroglucinol à 827, 1150, 1059 et 1611 cm⁻¹ stabilisées respectivement avec les lignes de base à 810-880, 1084-1200 et 1565-1714 cm⁻¹, en considèrent les valeurs de la hauteur des pics et le background constitué d'un mélange de solvant MeOH / H₂O (95/5 :V/V) ont été utilisées.

Le contenu du phloroglucinol dans l'algue sèche *Cystoseira tamariscifolia* obtenu par la méthode de calibration externe varie entre 0,109 ± 0.005 % et 0.112 ± 0,010 %. Cependant, le taux de phloroglucinol obtenu par la méthode des additions standards est entre 0.091 % et 0.113 % en considérant les deux bandes à 1150 et 1159 cm⁻¹. Les deux autres bandes donnent des taux légèrement supérieurs.

Ce résultat obtenu par la méthode de calibration externe est de même ordre de grandeur que celui obtenu par la méthode des additions standards.

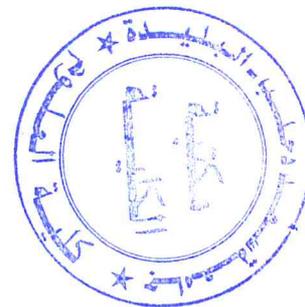
La teneur en composés phénoliques totaux des extraits a été mise en évidence par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. Dans l'extrait brut la valeur est de 3,37 % et dans l'extrait traité elle est de 0,235 %. Les valeurs montrées indiquent qu'il est nécessaire de ne pas doser directement les phénols à partir des extraits hydrométhanoliques bruts.

Le taux de phloroglucinol obtenu par la méthode de Folin-Ciocalteu est presque le double par rapport à celui obtenu par spectrométrie IRTF. Ceci est dû probablement à la présence des phlorotannins qui réagissent avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Cette interférence est masquée peut être dans le spectre IRTF de l'extrait traité dans les zones opaques.

Les valeurs montrées indiquent que la méthode de détermination par spectrométrie IRTF est plus précise et spécifique au phloroglucinol.

Les tests d'activité antimicrobienne effectués sur les extraits brut et traité de l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* ont montré des actions différentes vis-à-vis des souches testées. La bactérie *Staphylococcus aureus* qui ne présente aucune activité par rapport à l'extrait brut s'est avérée sensible vis-à-vis de l'extrait traité. Cette activité antimicrobienne pourrait être due à la présence dans l'extrait de composés phénoliques qui possèdent un large spectre d'action.

L'activité antioxydante des extraits a été évaluée par les deux méthodes de DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle) et de FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power). La valeur FRAP de l'extrait est plus importante que celle de l'extrait brut. Ce résultat est en parfaite concordance avec le résultat obtenu par le test au DPPH et confirme le résultat obtenu par spectrométrie IRTF.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. S. Chanda, R. Dave, M. Kaneria and K. Nagani, « Seaweeds: A novel, untapped source of drugs from sea to combat Infectious diseases », Ed. A. Mendez-Vilas, 2010.
2. T. Ainane, « Valorisation de la biomasse algale du Maroc: Potentialités pharmacologiques et Applications environnementales, cas des algues brunes *Cystoseira tamariscifolia* et *Bifurcariabifurcata* », Thèse de doctorat, Université Hassan II – Casablanca, 2011.
3. J-M. Kornprobst, « Substances naturelles d'origines marine », Ed. TEC&DOC, France, 2005.
4. F. Younes, S. Etahiri et O. Assobhei, « Activité antimicrobienne des algues marines de la lagune d'Oualidia (Maroc): Criblage et optimisation de la période de la récolte », *Journal of Applied Biosciences*, 24 (2009) 1543-1552.
5. S-M. Kang, S-J. Heo, K-N. Kim, S-H. Lee, Y-J. Jeon, « Isolation and identification of new compound, 2,7''-phloroglucinol-6,6'-bieckol from brown algae, *Ecklonia cava* and its antioxidant effect », *Journal of functional foods*, 4 (2012) 158–166.
6. L. Onofrejová, J. Vašičkova, « Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques », *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51 (2010) 464-470.
7. S-P. Valérie, « Connaissance chimiotaxonomique du genre *Turbinaria* et Etude des composés de défense de différentes espèces de Sargassacées des Iles Salomon (Pacifique Sud) », Master sciences de la mer et du littoral, université de Bretagne occidentale, 2006,
8. I. Ignat, I. Volf, I. Valentin, Popa, « A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables », *Food Chemistry*, 126 (2011) 1821-1835.

9. T-S. Vo, D-H. Ngo, Quang Van Ta, Se-Kwon Kim, « Marine organisms as a therapeutic source against herpès simplex virus infection », *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44 (2011) 11–20.
10. L. Piovetti, C. Gérald, « Recherche de molécules non-toxiques actives en antifouling à partir d'organismes marins de Méditerranée », Thèse de doctorat, Université du Sud Toulon-Var, 2010.
11. D. Loomis, R. Croteau, « Biochemistry of terpénoids: A comprehensive Treatis. In: O.K. Stumpf and E. E. conn (eds) *The biochemistry of plants. Lipids: Structure and Function* », Academic Press, 4 (1980) 364-410.
12. F-N. Muanda, « Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques », Thèse de doctorat, Université Paul Verlaine-Metz, 2010.
13. J. Bruneton, « Pharmacognosie: Phytochimie-Plantes médicinales », Ed. TEC&DOC, France, 1993.
14. C. Bénard, « Etude de l'impac de la nutritionazotée et des conditions de culture sur le contenu en polyphénols chez la tomate », Thèse du doctorat, Nancy-Université-INRA, 2009.
15. E. Ar Gall, Deslandes, M.A. Bessieres, « Thème 1: les substances naturelles des végétaux marins », Ed, Deslandes, France.
16. J.J. Macheix, Fleuri et A. Allemand –C. Jay, « Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique », Presses polytechnologiques et universitaires romandes, 2005.
17. I. Urquiaga, F. Leighton, « Plant polyphenols antioxydants and oxidative stress », *Biological Research*, 33 (2000) 55-64.
18. R. Gayon, « les composés phénoliques des végétaux », Ed Dunod, Paris, 1968.

19. Y. Kening, D.L. Vincenzo, B. Normand, « Creation of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato to *Phytophthora infestans*, the plant cell », *The Plant Cell*, 7 (1995) 1787-1799.
20. H.G. Floss, « Natural products derived from unusual variants of the shikimate pathway », *Natural Product Reports*, 14 (1997) 433-434.
21. L. Hoffmann, S. Besseau, P. Geoffroy, C. Ritzenthaler, D. Meyer, C. Lapierre, B. Pollet, « Silencing of hydroxycinnamoyl coenzyme a shikimate / quinate hydroxycinnamoyl transferase affects phenylpropanoid biosynthesis », *The Plant cell*, 16 (2004) 1446-1465.
22. M-C. Chang, H-H. Chang, C-P. Chan, H-Y. Chou, « Antiplatelet effect of phloroglucinol is related to inhibition of cyclooxygenase, reactive oxygen species, ERK/p38 signaling and thromboxane A₂ production », *Toxicology and Applied Pharmacology*, 263 (2012) 287–295.
23. B. Stengel, Dagmar Solène Connan, Zoë A. Popper, « Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application », *Biotechnology Advances*, 29 (2011) 483–501.
24. T. Wang, R. Jónsdóttir, H. Liu, L. Gu, Hordur G. Kristinsson, « Antioxidant Capacities of Phlorotannins Extracted from the Brown Algae *Fucus vesiculosus* », *Journal of agricultural and food chemistry*, (2012) 2261–2266.
25. R. T. Abdala-Díaz, Æ A. Cabello-Pasini, E. Pérez-Rodríguez, R. M. Conde Álvarez F. L. Figueroa, « Daily and seasonal variations of optimum quantum yield and phenolic compounds in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyta) », *Marine Biology*, 148 (2006) 459–465.
26. R. Koivikko, « Brown algal phlorotannins improving and applying chemical methods », *Annales universitatis turkuensis*, Turku, 2008.
27. S. Gupta and N. Abu-Ghannam, « Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds », *Trends in Food Science & Technology*, 22 (2011) 315-

326.

28. W. Knöss and K-W. Glombitza, « A phenolsulphatase from the marine brown alga *cystoseira tamariscifolia* », *Phytochemistry*, 32 (1993) 1119-1123.
29. R. Valls, L. Piovetti, « The chemistry of the cystoseiraceae (Fucales: Pheophyceae): Chemotaxonomic relationships », *Biochemical Systematics and Ecology*, 23 (1995) 723-745.
30. V. Amico, « Marine brown algae of family Cystoseiraceae: Chemistry and chemotaxonomy », *Phytochemistry*, 39 (1995) 1257-1279.
31. Z. Souhaili, H. Mohammadi, N. Habti et M. Faid, « Effet létal de l'extrait aqueux de l'algue brune marine (*Cystoseira tamariscifolia*) sur la Souris et sur les cellulés tumorales du myélome murin », *Afrique science*, 04 (2008) 580-590.
32. A. Bennamaraa, A. Abourrichea, M. Berradaa, M. Charroufa, N. Chaibb, M. Boudouma, « Methoxybifurcarenone: an antifungal and antibacterial meroditerpenoid from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia* », *Phytochemistry*, 52 (1999) 37-40.
33. K. Mahnaz, N. Maryam, S. Nargess, S.A. Mohammadreza, « Cytotoxic activity of some marine brown algae against cancer cell lines », *Biol Res*, 43 (2010) 31-37.
34. A. Abourriche, « Etude chimique et potentialités pharmacologiques de l'ascidie simple *Cynthia savigniet* de l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* de la côte atlantique Marocaine. Synthèse et valorisation biologique de nouveaux alcaloïdes à base de la 8-hydroxyquinoléine », Thèse d'Etat, Université Hassan II, Casablanca, Maroc, 1999.
35. V. Amico, M. Piatelli, « Metabolites of mixed biogenesis from *Cystoseira tamariscifolia* », *Gazetta Chimica Italiana*, 119 (1989) 467-470.
36. C. Francisco, B. Banaigs, J.T Este, A. Cave « Mediterraneols: a Novel Biologically Active Class of Rearranged Diterpenoid Metabolites from *Cystoseira mediterranea*

- (Pheophyta) », *Journal Organic Chemical*, 51 (1986) 1115-1120.
37. C. Francisco, « Défense chimique des algues brunes de la famille des Cystoseiraceae: étude de nouveaux méroditerpènes chez *Cystoseira mediterranea* », *Journal of Organic Chemistry*, 51 (1986) 1115-1120.
 38. R. Valls, L. Piovetti., B. Banaigs, A. Praud, « Secondary metabolites from Morocco brown algae of the genus *Cystoseira* », *Phytochemistry*, 32 (1993) 961-966.
 39. V. Amico, M. Piattelli, F. Cunsolo, G. Ruberto, G. Bruno, « Structure of the Algal Metabolite iso-Strictaketol », *Acta Crystallographica*, 44 (1988) 686-689.
 40. C. Francisco, B. Banaigs, M. Rakba, J. Teste, A. Cave, « Cystoseirols: Novel Rearranged Diterpenoids of Mixed Biogenesis from Cystoseiraceae (brown marine algae) », *Journal of Organic Chemistry*, 51 (1986) 2707-2711.
 41. F. Claire, « Étude de la teneur en composés phénoliques et du potentiel antioxydant associé à ces composés, de plusieurs espèces de Sargassaceae du Pacifique Sud ». Mémoire de master, 2008.
 42. K. Sung-Myung, C. Seon-Heui, K. Ju-Young, K. Min-Cheol, K. Daekyung, H. Soo-Jin, K. Jin-Soo, H. Min Soo, K. Yong-Tae, J. Won-Kyo, J. You-Jin, « Neuroprotective effects of phlorotannins isolated from a brown alga, *Ecklonia cava*, against H₂O₂-induced oxidative stress in murine hippocampal HT22 cells », *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34 (2012) 96-105.
 43. L. Yong, Q. Zhong-Ji, R. Bomi, L. Sang-Hoon, K. Moon Moo, et K. Se-Kwon, « chemical components and its antioxydant properties in vitro: an edible marine brown alga, *Ecklonia cava* », *Journal Biorg & Medicin. chem.*, 17 (2009) 1963-1973.
 44. L. Bellebcir, « Etude des composés phénoliques en tant que marqueurs de biodiversité chez les céréales », Mémoire, Université Mentouri de Constantine, 2008.

45. E. M., Thurman, Mills, M. S, « Solid phase extraction: Principles and practice », Willey Interscience, New York, 1998.
46. S.E. Ebeler, and Ebeler, J.D. « SPE methodologies for the separation of lipids », *INFORM*, 7 (1996) 1094-1103.
47. G. Fiorentino, R. Spaccini and A. Piccolo, « Separation of molecular constituents from humic acid by solid phase extraction following a trans esterification reaction », *Talanta*, 68 (2006) 1135-1142.
48. Ph. Hubert, P. Chiap, M. Moors, B. Bourguignon, D. L. Massart and, J. Crommen, « Knowledge-based system for the automated solid-phase extraction of basic drugs from plasma coupled with their liquid chromatographic determination: application to the biodetermination of β -receptor blocking agents », *Journal Chromatogr. A*, 665 (1994) 87-99.
49. Ni. Yongnian, X. Zhenzhen, K. Serge, « A kinetic spectrophotometric method for simultaneous determination of phenol and its three derivatives with the aid of artificial neural network », *Journal of Hazardous Materials*, 192 (2011) 722–729.
50. J.M. Robbitt, A. Schwarting, R.J. Gritter, « Introduction à la chromatographie », Ed. gauthier-villars, Paris, 1972.
51. G. Burgot, J.L. Burgot, « Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications : Méthodes chromatographiques, électrophorèses et méthodes spectrales », Ed. Tec & Doc, Paris, France, 2002.
52. D.R. Browing, « Méthodes spectroscopiques », Ed Masson et Cie, Paris, France, 1974.
53. D. Bertrand, « La spectroscopie proche infrarouge et ses applications dans les industries de l'alimentation animale », *INRA Prod. Anim.*, 15 (2002) 209-219.
54. M. Dubernet, « Analyse instantanée de la qualité des raisins et des mouts par IR-TF », France, 2002.

55. L. Ping, A. Pizzi, Z. Ding Guo, N. Brosse, « Condensed tannins from grape pomace: Characterization by FTIR and MALDI TOF and production of environment friendly wood adhesive », *Industrial Crops and Products*, 40 (2012) 13-20.
56. N. Siva Kumar And K. Min, « Removal Of Phenolic Compounds From Aqueous Solutions By Biosorption Onto *Acacia Leucocephala* Bark Powder: Equilibrium And Kinetic Studies », *Journal Chil. Chem. Soc*, 56 (2011) 539-545.
57. M. keusgen and K-w. Glombitza, « Phlorethols, Fuhalols And Their Derivatives From The Brown Alga *Sargassum Spinuligerum* », *Phytochemistry*, 4 (1995) 957-985.
58. K-W. Glombitza, A. Schmidt, « Trihydroxyphlorethols from the brown alga *Carpophyllum angustifolium* », *Phytochemistry*, 51 (1999) 1095-1100.
59. N. Balasundram, K. Sundram, S. Samman, « Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses », *Food Chemistry*, 99 (2006) 191–203.
60. R. Rengasamy, R. Kannan, A. MutalibAderogba, R. AshwellNdhlala, A. Wendy Stirk, Johannes Van Staden, « Acetylcholinesterase inhibitory activity of phlorotannins isolated from the brown alga, *Ecklonia maxima* (Osbeck) Papenfus », *Food Research International*, xxx (2012) xxx–xxx.
61. A. Abourriche, M. Charrouf, M. Berrada, A. Bennamra, N. Chaib, C. Francisco. « Antimicrobial activities and cytotoxicity of the brown alga *Cystoseira tamariscifolia* », *Fitoterapia*, 70 (1999) 611-614.
62. Nagayama et al., « Antioxidant Activity of Abietane-Type Diterpenes from Heart wood of *Taiwaniacryptomerioides* Hayata », *Holzforschung* 56 (2002) 487-492.
63. K. Saidani, F. Bedjou, F. Benabdesselamet N. Touati, « Antifungal activity of methanolic extracts of four Algerian marine algae species », *African Journal of Biotechnology*, 11 (2012) 9496-9500.

64. Z. Souhaili, M. Lagzouli, M. Faid, Kh. Fellat-Zerrouck, « Inhibition of growth and mycotoxins formation in moulds by marine algae *Cystoseira tamariscifolia* », *African Journal of Biotechnology*, 3 (1) (2004) 71-75.
65. N. Eloutassi et B. Louaste, « Etude in vitro de l'activité anti-*Fusariumoxys porumf.* sp. lycopersici de l'algue marine *Cystoseira tamariscifolia* In vitro study anti-*Fusariumoxys porumf.* sp. Lycopersici from *Cystoseira Tamariscifolia* », *ScienceLib Mersenne*, 4 (2012) 2111-4706.
66. Y. Farid, M. Chennaoui, O. Assobhei, S. Etahiri, « Evaluation de l'effet du lieu de récolte des algues marines des côtes atlantiques marocaines sur l'activité antibactérienne et anti-inflammatoire », *Rev. Microbiol. Ind. San et Environ*, 6 (2012) 54-66.
67. K.A. Kang, K.H. Lee, S. Chae, R. Zhang, M.S. Jung, Y.M. Ham, J.S. Baik, N.H. Lee et J.W. Hyun, « Cytoprotective effect of phloroglucinol on oxidative stress induced cell damage via catalase activation », *Journal of Cell. Biochem*, 97 (2006) 609–620.
68. B. Quéguineur, L. Goya, S. Ramos, M. Angeles-Martín, R. Mateoset L. Bravo, « Phloroglucinol: Antioxidant properties and effects on cellular oxidative markers in human HepG2 cell line », *Food and Chemical Toxicology*, 50 (2012) 2886–2893.
69. C. J. Barwell, G. Blunden et P.D. Manandhar, « Isolation and characterization of brown algal polyphenols as inhibitors of a-amylase, lipase and trypsin », *Journal of Appl. Phycol*, 1 (1989) 319–323.
70. J.-S. Bae, « Antithrombotic and profibrinolytic activities of phloroglucinol », *Food Chem. Toxicol*, 49 (2011) 1572–1577.
71. M. Zubia, M.S. Fabre, V. Kerjean, K.L. Lann, V. Stiger-Pouvreau, M. Fauchon et E. Deslandes, « Antioxidant and antitumouralactivities of some Phaeophyta from Brittany coasts », *Food Chem*, 116 (2009) 693–701.

72. C. Jégou, « Etude du genre *Cystoseira* de côtes bretonnes taxinomie, Ecologie et caractérisation de substances naturelles », Thèse de doctorat, université de Bretagne, France, 2011.
73. G. Miliauskas, P.R. Venskutonis, T.A. Van Beek, « Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract », *Food chemistry*, 85 (2004) 231-237.
74. A.Y. Loo, K. Jain et I. Darah, « Antioxydant activity of compound isolated from the pyroligneous acid, *Rhizophora apiculata* ». *Food chemistry*, 107 (2008) 1151-1160.
75. S. A. Adesegun, A. Fajana, C. I. Orabueze et H. A. B. Coker, « Evaluation of Antioxydant Properties of *Phaulopsis fasciculata* C.B.Cl. (Acanthaceae) », *eCAM*, 6 (2009) 227-231
76. S.Y. Wang, J.H. Wu, L.F. Shyur, Y.H. Kuo, S.T. Chang, « Antioxydant Activity of Abietane-Type Diterpenes from Heartwood of *Taiwania cryptomerioides* », *Hayata, Holzforschung*, 56 (2002) 487-492.
77. N. Balasundram, Ai T.Y., R. Sambanthanmurthi, K. Sundram and S. Samman « Antioxydant properties of palm fruits extracts », *Asia Pac J Clin Nutr*, 4 (2005) 319-324.
78. A. Wojdylo, J. Oszmianska and, R. Czemerys, « Antioxydant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs » *Journal of food chemistry*, 105 (2007) 940-949.
79. M. Oyaizu, « Studies on products of browning reaction Antioxydative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine », *Japanese Journal of Nutrition*, 44 (1986) 307-315.
80. F. Iris, F. Benzie, « An Automated, Specific, Spectrophotometric Method for Measuring Ascorbic Acid in Plasma (EFTSA) », *Clinical Biochemistry*, 29 (1996) 111-116.



81. M.C Pibiri, « Assainissement microbiologiques de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles ». Thèse de Doctorat, Suisse, 2005.
82. A. Zhiri, « L'aromathérapie », Nutranews Fondation pour le libre choix, 2006.
83. Anonyme, « Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale », 5ème édition avec la collaboration de l'OMS, 2008.
84. Pharmacopée européenne, Direction de la qualité du médicament, Ed Council of Europe, 2002.
85. K. Chifundra, W. M.Buryet Kizungub, « Screening photochimique et antibactérien des extraits de *Ficus sycomocus L.* », short communication phytothérapie, 1990.