

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE
MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Chimie moléculaire

Option : Chimie organique

Intitulé du thème

Extraction et caractérisation des alginates à partir d'algues locales : application dans l'encapsulation du jus de betterave

Proposé et dirigé par :

Pr. Y. BAL

Mr. R. BENFARES

Présenté par :

M^{elle} BOUARAB Manel

Soutenu le 03 / 11 / 2015, devant le jury composé de:

Mr. R.AIAD

Maitre assistant A

USDB

President

Mr. M.ZOUIKRI

Maître de conférences A

USDB

Examinateur

Mr. Y.BAL

Professeur

USDB

Directeur de thèse

Année Universitaire 2014/2015

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, je remercie ALLAH, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

Ce travail a été effectué au sein du Laboratoire de Physico-chimie au CNRDPA (Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture, Bou-Ismaïl - Tipaza).

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Mr le Pr Y.BAL qui a accepté d'être mon directeur de thèse. Je le remercie tout particulièrement pour sa disponibilité et son aide précieuse.

Je remercie vivement, Mr le Pr R.BELAL pour tous les précieux conseils qu'il nous a apportés durant nos années de formation.

Ma gratitude s'adresse également à mon co-promoteur Mr R.BENFERES et à Mme A.KORD pour le aide et le soutien qui mon apportés toute au long de mon stage au CNRDPA.

Je remercie tous les membres de jury d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

En fin, j'exprimer mes vifs remerciements à tous ceux et celles qui ont contribués, de près ou de loin à la réalisation de ce travail, tous particulièrement aux membres du laboratoire du CNRDPA, pour leur accueil et leur bonne humeur.

Dédicace

A celle qui a attendu avec patience les fruits de sa bonne éducation...

Ma Mère.

A celui qui m'a indiqué la bonne voie en me rappelant que la volonté fait toujours les grands hommes...

Mon Père.

A mon petit frère : Mohamed Islem.

A ma sœur : Imen.

A toutes ma familles : mes grands parents, mes tentes : Fahima, Lydia, Lamia, Sadjia, mes oncles surtout à dada Lamara et sa femme tata Amani, et mes cousines plus particulièrement à mouna et sousou.

A toutes mes amies : L.Ahlem, Z.Kaouthar, A.Sadia, A.Amina, T.soumiya, S.Hind, T.Lydia et a tous ceux qui me sont chers...

Qu'Allah vous garde.

Résumé

« Extraction et caractérisation des alginates à partir d'algues locales : application dans l'encapsulation du jus de betterave »

L'étude présentée dans ce mémoire comporte deux volets essentiels : dans le premier volet, l'extraction et la caractérisation d'alginates à partir d'algues locales est exposée alors que dans le second, l'aptitude de ces alginates à encapsuler un principe actif de nature 'bio' (le jus de betterave) est envisagée. En effet, la caractérisation physico-chimique du biopolymère extrait et purifié à partir de *Cystoseira stricta*, *Dictyota dichotoma*, *Dictyopteris membranacea* et *Sargassum vulgare* qui sont des algues marines brunes de la côte algérienne a été effectuée à l'aide de plusieurs méthodes qui ont démontré son identification par rapport à un produit de référence commercial.

Par ailleurs, l'encapsulation du jus de betterave dans des capsules obtenues par extrusion-réticulation de l'alginate a été possible conformément à une procédure que nous avons optimisée. Les capsules obtenues ont été analysées par microscopie optique, MEB, FTIR, DRX et par UV-Visible. En outre, une étude sur l'activité antiradicalaire de ce principe actif à l'état encapsulé a montré que celle-ci peut être conservée pendant longtemps ce qui permet de dire que l'alginate peut être un bon support pour l'encapsulation, la protection et l'utilisation du jus de betterave (concentré) en tant que supplément alimentaire ou thérapeutique.

Mots clés : Algues brunes, alginate de sodium, encapsulation, jus de betterave, activité antiradicalaire.

Abstract

« Extraction and Characterization of alginates from local algae: application to red beet juice encapsulation»

The study presented upon here has two parts: in the first, the extraction and characterization of alginates from local seaweed is exposed while in the second, the ability of these alginates to encapsulate a 'bio' active agent (beet juice) is envisaged. Indeed, the physicochemical characterization of the biopolymer extracted and purified from *Cystoseira stricta*, *Dictyota dichotoma*, *Dictyopteris membranacea* and *Sargassum vulgare* which are brown seaweeds of the Algerian coast was performed using several methods that have demonstrated identification with respect to a commercial reference product.

Moreover, the encapsulation of beet juice in capsules obtained by crosslinking-extrusion process of alginate has been possible according to a procedure that has been optimized in this work. The capsules obtained were analyzed by optical microscopy, SEM, FTIR, XRD and UV-Vis. In addition, a study on the antiradical activity of the active ingredient in encapsulated state shows that it can be preserved for a long time which indicates that the alginate can be a good support for the encapsulation, protection and use of beet juice in various forms as a therapeutic or dietary supplement.

Keywords: Brown algae, sodium alginate, encapsulation, beet juice, antiradical activity.

المخلص

استخراج وتحليل ألبينات من طحالب محلي : التطبيق في كبسلة عصير البنجر

الدراسة التي قدمت في هذه الأطروحة إحتوت على جزئين أساسيين : الجزء الأول، إستخراج وتحليل الألبينات من طحالب بحري محلي يعرض بينما في الثاني، قدرة هذه الألبينات على كبسلة مادة نشطة ذات طابع "حيوي" (عصير البنجر). بالفعل إن التحليل الفيزيائي-الكيميائي للبوليمر الحيوي المستخرج والمطهر من *Cystoseira stricta* الذين هم طحالب بحرية بنية من الساحل الجزائري باستخدام العديد من التقنيات أثبتت مطابقتها بالنسبة لمنتج ذو مرجعية تجارية. علاوة على ذلك، فإن كبسلة عصير البنجر في الكبسولات التي حصل عليها بواسطة تشابك- قذف في الألبينات ممكن وفقا للإجراءات المتلى اللاتي قمنا بها. تم تحليل الكبسولات التي حصل عليها بالمجهر الضوئي، SEM، FTIR، XRD والأشعة فوق البنفسجية-المرئية. بالإضافة إلى ذلك، دراسة عن نشاط المضادة الراديكالية لهذا العنصر النشط في الحالة المكبسلة بين أنه يمكن الحفاظ عليه لفترة طويلة والتي تمكنا من قول أن الألبينات يمكن أن يكون دعما جيدا للكبسلة، حماية واستخدام عصير البنجر (مركز) كمكمل علاجي أو غذائي.

الكلمات المفتاحية : الطحالب البنية ، ألبينات الصوديوم ، الكبسلة ، عصير البنجر ، النشاط المضادة الراديكالية.

TABLE DES MATIERES

Remerciements

Dédicace

Résumé

Abstract

المخلص

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des symboles et des abréviations

Introduction générale..... 01

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Généralités sur les algues

I.1. Définition des algues.....	03
I.2. Les alginophytes	03
I.3. Les algues brunes source d'alginate	04
I.4. Position systématique des algues brunes étudiées	05
I.5. Industrie des algues et marché des phycocolloïdes	06

II. Généralités sur les alginates

II.1. L'alginate de sodium	09
II.2. Composition chimique	09
II.3. Propriétés physico-chimiques	11
II.3.1. Caractères organoleptiques.....	11
II.3.2. Solubilité	12
II.3.3. Rapport M/G	12
II.3.4. Viscosité	12
II.3.5. Gélification	12
II.4. Procédé d'extraction de l'alginate	14
a) Préparation de la matière première	15
b) Formation de l'alginate	15
c) Lixiviation (ou acidification)	15

d) Carbonatation	15
e) Flottation et filtration.....	16
f) Précipitation de l'acide alginique.....	16
g) Déshydratation.....	16
II.5. Application de l'alginate de sodium	17
III. L'alginate : un matériau d'encapsulation	
III.1. La microencapsulation.....	18
III.1.1. Définition	18
III.1.2. Caractéristiques générales des microparticules.....	18
III.1.3. Rôle de l'encapsulation.....	19
III.1.4. Mécanismes de libération des substances encapsulées dans des microcapsules.....	20
III.2. L'alginate : support pour la microencapsulation.....	21
III.2.1. Techniques d'encapsulation à partir d'alginate.....	21
III.2.1.1. La coacervation complexe : procédé physico-chimique.....	21
III.2.1.2. Gélification de gouttes : procédé mécanique.....	22

Chapitre II : Matériels et méthodes

Partie 1 : Extraction et caractérisation des alginates

II.1. Introduction	23
II.2. Matériel végétal.....	23
II.3. Méthodes.....	23
II.3.1. Identification des espèces.....	23
II.3.2. Le broyage.....	24
II.3.3. Extraction des alginates	25
II.3.4. La purification	25
II.3.5. Le séchage par lyophilisation	25
II.3.6. Conservation des alginates.....	26
II.3.7. Détermination du rendement.....	26
II.4. Caractérisation des alginates	26
II.4.1. Caractérisation par spectroscopie infrarouge	26
II.4.2. Le test de viscosité.....	27

a) Préparation de la solution d'alginate.....	27
b) Mesure de la viscosité	28
II.4.3. Caractérisation par diffraction des rayons X (DRX).....	28
Partie 2 : Encapsulation du jus de betterave	
II.1. Introduction	29
II.2. Principe actif à encapsulé (La betterave rouge).....	29
II.3. Préparation des billes.....	30
II.3.1. Préparation du jus de betterave	30
II.3.2. Synthèse des billes	30
II.3.3. Conservation des billes.....	33
II.4. Caractérisation des billes	33
II.4.1. Morphologies des billes.....	33
II.4.2. Taille, Taux de gonflement des billes S (%) et Taux d'humidité TH (%)...	34
II.4.3. Caractérisation par spectroscopie infrarouge	35
II.4.4. Caractérisation par diffraction des rayons X (DRX)	35
II.4.5. Caractérisation par spectroscopie UV-Visible	35
II.4.5.1. Détermination du taux d'encapsulation (%)	36
a) Détermination de la longueur d'onde du jus de betterave	36
b) Établissement de la courbe d'étalonnage	36
II.4.5.2. Estimation du pouvoir antiradicalaire par la méthode au DPPH	37
Chapitre III : Résultats et discussion	
Partie 1 : Extraction et caractérisation des alginate	
III.1. Extraction d'alginate	38
III.1.1. Le rendement en alginate	38
III.1.2. Propriétés organoleptiques	41
III.2. Caractérisation des alginate.....	43
III.2.1. Caractérisation par spectrométrie infrarouge	43
III.2.2. Le test de viscosité	49
III.2.3. Caractérisation par diffraction des rayons X (DRX)	50

Partie 2 : Encapsulation du jus de betterave

III.1. Morphologies des billes	54
III.2. Taille, Taux de gonflement S (%) et Taux d'humidité TH (%) des billes.....	57
III.3. Caractérisation par spectrométrie infrarouge	58
III.4. Caractérisation par diffraction des rayons X	62
III.5. Caractérisation par UV-Visible	63
III.5.1. Evaluation du taux d'encapsulation	63
III.5.2. Estimation du pouvoir antiradicalaire par la méthode au DPPH.....	65
Conclusion générale	69

Références bibliographiques**Annexes**

Liste des figures

Figure I.01 :	Représentation d'un thalle de <i>Fucus vesiculosus</i> , un exemple d'algue brune.	04
Figure I.02 :	Classification des quatre algues récoltées.....	05
Figure I.03 :	Aspect générale des quatre algues brunes étudiées : a : <i>Cystoseira stricta</i> , b : <i>Dictyota dichotoma</i> , c : <i>Dictyopteris membranacea</i> , d : <i>Sargassum vulgare</i>	06
Figure I.04 :	Répartition des tonnages utilisés dans les quatre grands domaines d'exploitation des algues (en tonnes fraîches).....	07
Figure I.05 :	Mise en évidence de la place des phycocolloïdes parmi les colloïdes utilisés pour épaissir ou gélifier les solutions aqueuses.....	08
Figure I.06 :	<i>Laminaria digitata</i>	09
Figure I.07 :	Monomères de la chaîne alginatée.....	10
Figure I.08 :	Structure chimique de la chaîne d'alginate de sodium.....	10
Figure I.09 :	Interactions entre les unités M.....	11
Figure I.10 :	Interactions entre les unités G.....	11
Figure I.11 :	Gélification ionotropique de l'alginate. Modèle "egg-box".....	13
Figure I.12 :	Liaisons covalentes des ions calcium avec les résidus poly-G des polymères d'alginate.....	13
Figure I.13 :	Rétention du calcium par un réseau tridimensionnel de segments poly-M ou poly-G définissant une structure de type "egg-box".....	14
Figure I.14 :	Microsphère (a) et microcapsule (b).....	19
Figure I.15 :	Représentation schématique du processus de coacervation complexe. (a) Dispersion du produit à encapsuler dans une solution du matériau d'enrobage ; (b) séparation du coacervat de la solution; (c) coating du matériel par des microgouttes du coacervat.....	22
Figure I.16 :	Procédé de gélification de gouttes d'alginate et structure atomique d'une bille d'alginate.....	22
Figure II.01 :	Aspect général des quatre algues brunes étudiées vu à l'œil nu. a : <i>Cystoseira stricta</i> , b : <i>Dictyota dichotoma</i> , c : <i>Dictyopteris membranacea</i> , d : <i>Sargassum vulgare</i>	23
Figure II.02 :	Aspect général de <i>Sargassum vulgare</i> après séchage vu à l'œil nu.....	24
Figure II.03 :	Lyophilisateur ALPHA 1-2 LD plus.	26

Figure II.04 :	Spectrophotomètre FTIR-ATR ALPHA-P.....	27
Figure II.05 :	a : Viscosimètre vibrant SV 10, b : Cuve Cuve échantillon en polycarbonate.....	28
Figure II.06 :	Représentation schématique de la synthèse par extrusion mise en œuvre pour la synthèse des billes d'alginate.....	32
Figure II.07 :	Lyophilisation des billes d'alginate.....	33
Figure II.08 :	Spectrophotomètre UV-Visible JASCO V-630.....	35
Figure II.09 :	Les extraits aqueux a : extrait du jus betterave lyophilisé b : extrait des billes d'alginate.....	38
Figure III.01:	Spectres IR de l'alginate commercial.....	43
Figure III.02 :	Spectres IR de l'alginate extrait de <i>Dyctyota dichotoma</i> (DA).....	44
Figure III.03 :	Spectres IR de l'alginate extrait de <i>Dictyopteris membranacea</i> (DS)....	44
Figure III.04 :	Spectres IR de l'alginate extrait de <i>Sargassum vulgare</i> (S).....	45
Figure III.05 :	Spectres IR de l'alginate extrait de <i>Cystoseira stricta</i> (Cys).....	45
Figure III.06 :	Superposition des spectres IR des alginates (DA, DS, Commercial et Cys).....	46
Figure III.07 :	Superposition des spectres IR des alginates (S et Commercial).....	46
Figure III.08 :	Diagrammes des rayons X de l'alginate S.....	51
Figure III.09 :	Diagrammes des rayons X de l'alginate DA.....	51
Figure III.10 :	Diagrammes des rayons X de l'alginate Cys.....	52
Figure III.11 :	Diagrammes des rayons X de l'alginate DS.....	52
Figure III.12 :	Diagrammes des rayons X de l'alginate commercial.....	53
Figure III.13 :	Morphologie des billes B.C : a : bille fraîche observée à la loupe, b : bille fraîche observée au microscope optique, c : bille lyophilisée observée à la loupe, d : bille lyophilysée observée au microscope optique.....	54
Figure III.14 :	Morphologie de bille B.S lyophilisée observée au microscope optique	55
Figure III.15 :	Cliché de microscope à balayage électronique : bille B.C lyophilisée.....	56
Figure III.16 :	Clichés MEB à différents agrandissements : bille B.C lyophilisée (vue de l'extérieur).....	57
Figure III.17 :	Spectre IR des billes l'alginate B.C	59

Figure III.18 :	Spectre IR des billes l'alginate B.S	59
Figure III.19 :	Spectre IR du jus de betterave lyophilisé.....	60
Figure III.20 :	Superposition des spectres IR a : jus betterave lyophilisé, b : billes B.C , c : billes B.S	60
Figure III.21 :	Diagramme de diffraction des rayons X de l'alginate de sodium commercial.....	62
Figure III.22 :	Diagramme de diffraction des rayons X des billes d'alginate B.C	62
Figure III.23 :	Spectre de balayage UV-Visible du jus de betterave fraiche à 1ml /l.....	64
Figure III.24 :	Droite d'étalonnage de la solution de CaCl_2	64
Figure III.25 :	Droite d'étalonnage de l'extrait méthanolique du BHT.....	66
Figure III.26 :	Droites d'étalonnage des extraits aqueux.....	66
Figure III.27 :	Droites d'étalonnage des extraits aqueux des billes B.jl selon la durée de conservation.....	67

Liste des tableaux

Tableau I.01 :	Teneurs en acide alginique de divers alginophytes.....	03
Tableau I.02 :	Répartition de la production mondiale des alginates (en tonnage) entre les différents secteurs industriels et exemples d'applications.....	17
Tableau II.01:	Essais préliminaires à la synthèse des capsules d'alginates.....	31
Tableau III.01 :	Comparaison des teneurs en alginates des espèces étudiées par rapport aux principales alginophytes dans l'Algérie et le monde.....	39
Tableau III.02 :	Caractères organoleptiques des alginates extraits des quatre algues brunes étudiées.....	41
Tableau III.03 :	Photos des alginates extraits avant et après séchage.....	42
Tableau III.04 :	Les principales bandes caractéristiques des alginates.....	47
Tableau III.05 :	Comparaison du rapport M/G des espèces étudiées avec celui d'autres Phéophycées.....	48
Tableau III.06 :	La viscosité (mPa.s) à 1% de l'alginate de sodium commercial et des alginates extraits des quatre espèces étudiées.....	49
Tableau III.07 :	La viscosité (mPa.s) d'alginates de sodium extraits de trois espèces d'algues brunes de la côte Marocaine.....	49
Tableau III.08 :	Valeurs des diamètres, S(%) et TH(%) des différentes billes synthétisées.....	58
Tableau III.09 :	Les principales bandes des spectres IR des billes et du jus de betterave.....	61
Tableau III.10 :	Valeurs des CI ₅₀ de l'extrait méthanolique BHT et des extraits aqueux déterminées par le test du DPPH.....	67
Tableau III.11 :	Valeurs des CI ₅₀ des extraits aqueux des billes B.jl par le test au DPPH.....	68

Liste des symboles et des abréviations

°C	Degré Celsius
Alg	Alginate
ATR	Attenuated Total Reflection
B.C	Bille synthétisée avec l'alginate commercial
BFL	Betterave frais lyophilisé
BHT	Hydroxy toluene butylé
B.jl	Bille synthétisée avec le jus de betterave lyophilisé
B.S	Bille synthétisée avec l'alginate extrait de <i>Sargassum vulgare</i>
C	Commercial
cm	Centimètre
CI ₅₀	Concentration inhibitrice à 50%
Cys	<i>Cystoseira stricta</i>
DPPH	1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
DA	<i>Dictyota dichotoma</i>
DRX	Diffraction des rayons X
DS	<i>Dictyopteris membranacea</i>
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
g	Gramme
h	Heures
l	Litre
µg	Microgramme
µm	Micromètre
M	Molaire
m	Mètre
mbar	Millibar
mPa.s	Millipascal-seconde
MEB	Microscope électronique à balayage
mg	Milligramme
min	Minutes
ml	Millilitre
mm	Millimètre
nm	Nanomètre
RMN 1H	Résonance magnétique nucléaire du proton
S	<i>Sargassum vulgare</i>
UV/VIS	Radiation ultraviolette/ Visible
λ	Longueur d'onde

Introduction générale

L'environnement marin est un écosystème rendu unique en raison de la diversité des organismes qu'il abrite. Des estuaires aux fosses abyssales jusqu'aux sources hydrothermales, les algues font preuve d'une incroyable plasticité écologique. Une nouvelle espèce est d'ailleurs identifiée par semaine et des projections estimaient en 1994 que les 36 000 espèces répertoriées ne représentaient en fait que 17 % des 200 000 espèces supposées existantes (Radmer et al., 1994). Utilisées depuis des millénaires par les populations littorales pour leurs hautes valeurs nutritives, les algues constituent aujourd'hui un enjeu majeur de développement économique. Ainsi, la masse monétaire brassée chaque année par l'industrie algale est croissante et estimée en 2003 entre 5,5 et 6 milliards de dollars (McHugh, 2003).

Les principales substances extraites sont les polysaccharides de la famille des agars, des carraghénanes et des alginates dont les propriétés physicochimiques gélifiantes ou stabilisantes intéressent de nombreux secteurs industriels. Les domaines agroalimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques ou textiles en ont valorisé près de 8 millions de tonnes en 2003 ce qui représente une valeur marchande supérieure à 2 milliards de dollars. Depuis plusieurs années, un regard particulier est porté sur la recherche de nouvelles substances d'intérêts biotechnologiques.

Les alginates, peu connus du grand public, sont pourtant des produits aujourd'hui utilisés dans de nombreux domaines. Chacun de nous les consomme ou les utilise régulièrement sans même le savoir. Cette lacune vient notamment du fait de l'incompréhension des ingrédients contenus dans les produits commercialisés qui s'avère un défi compliqué en raison de l'utilisation de nombreux symboles. En effet, comment peut-on deviner à quoi correspond l'ingrédient E400 sur une étiquette ?

Les emplois des alginates sont nombreux et concernent de multiples industries. Ils sont utilisés dans l'industrie textile, alimentaire, pharmaceutique, dans l'imprimerie,... mais toutes ces industries y trouvent une propriété commune : la capacité de gélification de ce produit naturel, origine qui est très bien perçue actuellement dans notre société.

La betterave rouge est une source riche de pigments (bétalaïnes), qui peuvent protéger contre les maladies liées à l'âge. Les bétalaïnes peuvent être utilisés comme additif naturel pour les produits alimentaires, les cosmétiques et les médicaments sous forme de jus ou de poudre de betterave. Ces pigments ont été classés comme des antioxydants (composés qui arrêtent ou retardent les processus d'oxydation).

Toutefois, les pigments naturels peuvent être sensibles à l'environnement ou aux conditions du procédé technologique comme la température, le pH, la présence de l'oxygène, l'activité de l'eau, la lumière, les rayons ultraviolets et de rayons gamma, la présence de certains ions métalliques et des enzymes redox (Krajka-Kuzniak et al., 2012). Par conséquent, l'industrie devrait accorder plus d'attention à la microencapsulation végétale.

Le but de cette étude est l'extraction des alginates d'une part, et l'étude de la possibilité d'encapsuler un principe actif bio (le jus de betterave) dans ce biopolymère, d'autre part.

Ce mémoire est structuré en trois chapitres :

- 1) Le chapitre I : Synthèse bibliographique, organisée en trois parties :
 1. Généralités sur les algues : définition, les alginophytes, industrie des algues et marché des phycocolloïdes.
 2. Généralités sur les alginates : structure chimique, propriétés physicochimiques, procédé d'extraction et applications.
 3. L'alginate comme un matériau d'encapsulation: définition, caractéristiques générales des microparticules, rôle de l'encapsulation, mécanismes de libération des substances encapsulées, enfin techniques d'encapsulation à partir d'alginates.

- 2) Le chapitre II : Matériels et méthodes, ce chapitre est consacré aux produits utilisés, méthodes expérimentales, et les différentes techniques de caractérisations employées. Il est organisé en deux parties :
 1. Extraction et caractérisation des alginates.
 2. Encapsulation du jus de betterave.

- 3) Le chapitre III : Résultats et discussions, ce chapitre illustre les résultats obtenus, suivi des interprétations et discussions.

Enfin, une conclusion générale sera présentée. Elle résumera les principaux résultats obtenus lors de ce travail de mémoire et donnera différentes perspectives pour les études futures.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Généralités sur les algues

I.1. Définition des algues

Les algues regroupent un ensemble de végétaux photosynthétiques très divers et dont l'appareil végétal relativement simple est appelé « thalle », elles ont des formes et des dimensions très variables. Certains sont microscopiques et d'autres mesurent plusieurs mètres de longueur, mais elles ont toutes des caractères communs. Elles sont essentiellement aquatiques dans les eaux douces ou marines, et certains vivent sur la neige ou la glace des régions polaires et des hautes montagnes. D'autres au contraire supportent dans les eaux des sources thermales de températures élevées « algues thermales » (Kornprobst, 2005).

I.2. Les alginophytes

Une espèce est considérée comme étant un bon alginophyte, lorsque sa teneur en acide alginique est supérieure à 18%. Et qu'elle constitue des peuplements suffisamment importants pour assurer le fonctionnement de l'usine durant toute l'année (Pérez et al., 1992).

Tableau I.01 : Teneurs en acide alginique de divers alginophytes (Pérez et al., 1992).

Espèces	Teneur en % de Matière sèche
<i>Laminaria</i>	24 à 30
<i>Sargassum</i>	13 à 16
<i>Macrocystis</i>	18 à 21
<i>Alaria</i>	30 à 35
<i>Ecklonia</i>	35 à 38
<i>Ascophyllum</i>	15 à 20
<i>Pelagophycus</i>	16 à 18
<i>Lessonia</i>	15 à 19
<i>Fucus</i>	18 à 28
<i>Turbinaria</i>	20 à 22
<i>Hlmanthalla</i>	35 à 38
<i>Pelvetia</i>	15 à 21
<i>Sacchoriza</i>	22 à 25
<i>Cystoseira</i>	17 à 20

I.3. Les algues brunes source d'alginate

Les Phéophycées (algues brunes) peuvent être considérées comme quasi exclusivement marines. Ces algues appartiennent à la « lignée brune », leur couleur est due à l'abondance des pigments bruns, la fucoxanthine, qui masque les chlorophylles a et c. Les formes primitives de ces algues sont filamenteuse tandis que, les formes les plus évoluées présentent une différenciation morphologique et biochimique du thalle qui est formé de trois parties distinctes : Le crampon, le stipe et la fronde (Kornprobst, 2005).

Elles sont moins nombreuses en espèces, mais représentent les plus grands thalles et forment les populations les plus denses. Les algues brunes sont toujours visibles à l'œil nu, et elles se rencontrent dans toutes les mers du monde, mais d'avantage dans les eaux tempérées et froides que dans les eaux chaudes (Kornprobst, 2005).

De nombreuses espèces d'algues brunes contiennent de l'acide alginique à des teneurs variables. L'industrie n'utilise que celles permettant d'obtenir un acide alginique de qualité (Pérez et al., 1992).

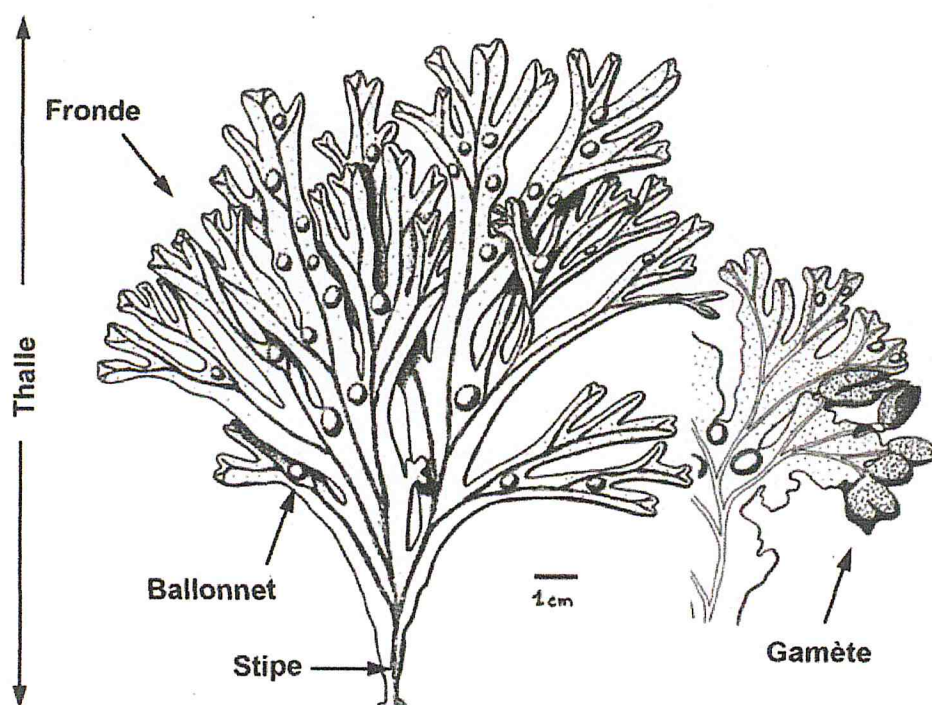


Figure I.01 : Représentation d'un thalle de *Fucus vesiculosus*, un exemple d'algue brune.

Adapté de Noailles (Noailles, 2003).

I.4. Position systématique des algues brunes étudiées

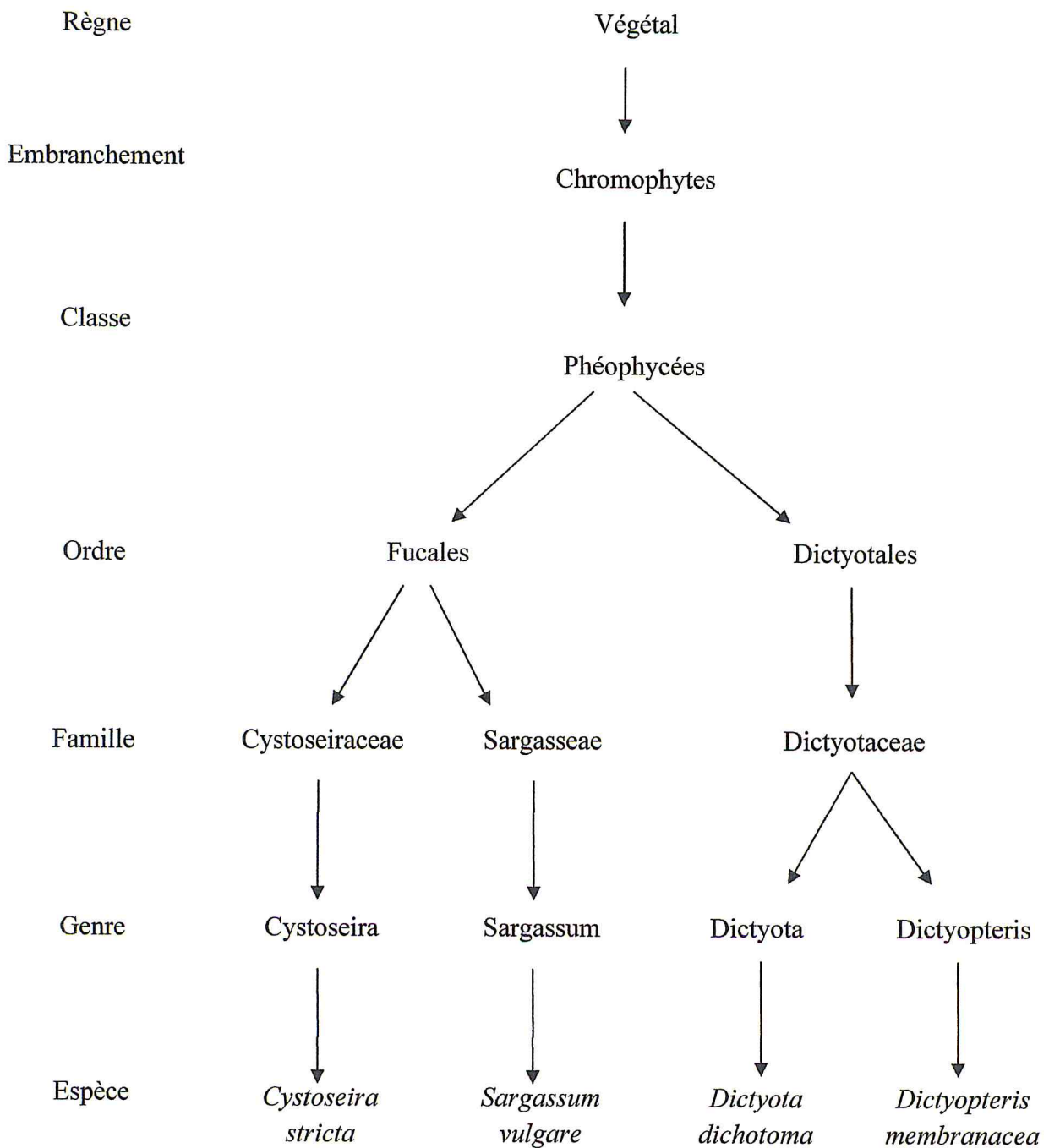


Figure I.02 : Classification des quatre algues récoltées (Agardh, 1817 et Feldmann, 1937).

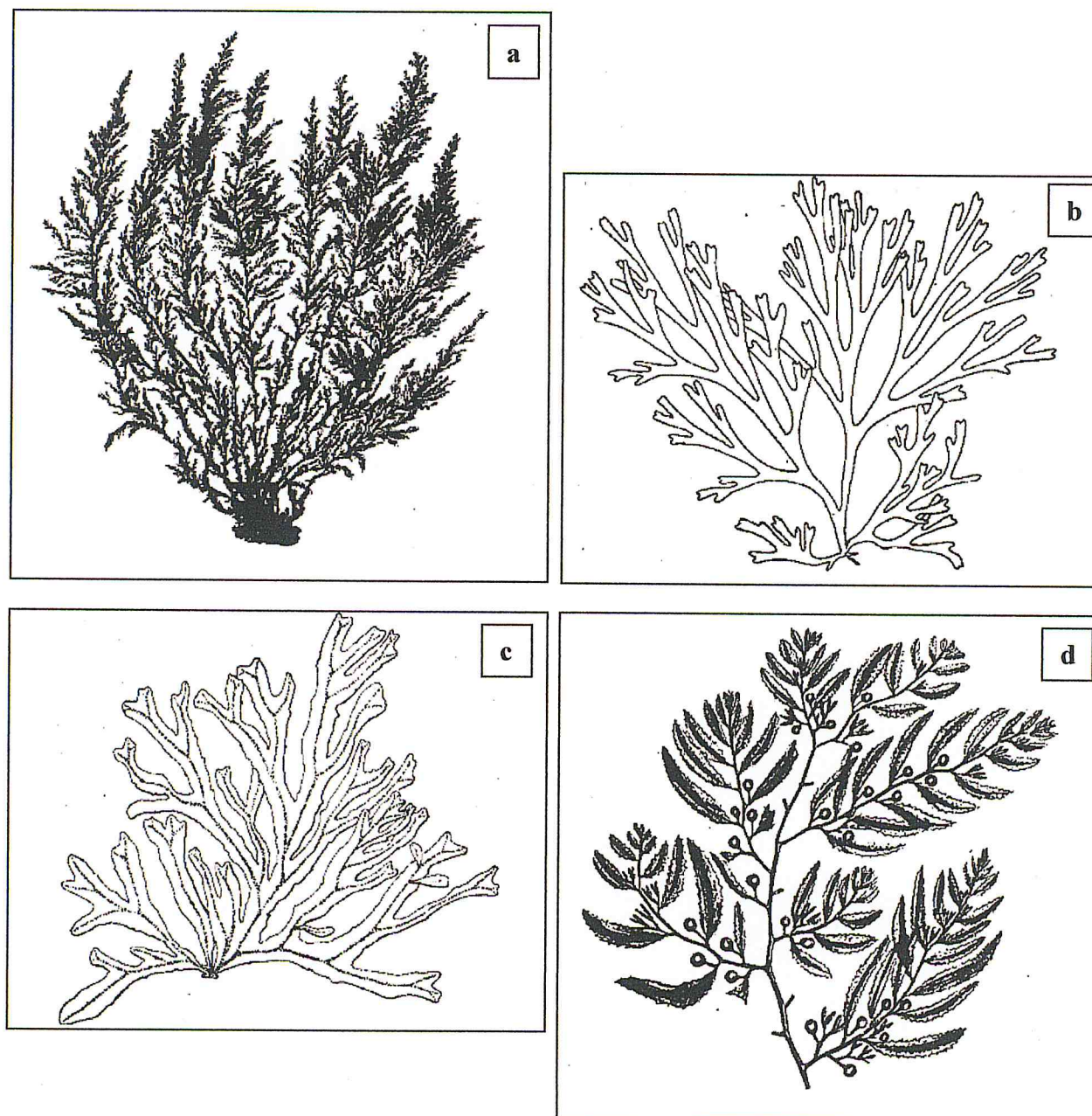


Figure I.03 : Aspect générale des quatre algues brunes étudiées **a** : *Cystoseira stricta*, **b** : *Dictyota dichotoma*, **c** : *Dictyopteris membranacea*, **d** : *Sargassum vulgare*. (Source: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/x0169f/X0169F13.pdf>)

I.5. Industrie des algues et marché des phycocolloïdes

D'après la FAO (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture) (McHugh, 2003), l'industrie des algues exploite environ 8 millions de tonnes d'algues fraîches chaque année, et fournit une grande variété de produits qui représentent un marché total annuel de 6 milliards de dollars. Les algues proviennent soit de champs naturels, soit de

l'algoculture, qui s'est développée à partir des années 1950 et se pratique aujourd'hui dans une trentaine de pays. Depuis les années 1980, la part d'algues cultivées dépasse celle des algues prélevées sur les peuplements naturels. Elle représente aujourd'hui près de 80% du tonnage total exploité. Par rapport à l'aquaculture mondiale (25.4 millions de tonnes, 38.2 milliards d'euros de marché), l'algoculture se place au deuxième rang en tonnage (26%), et en chiffre d'affaire (20%), après l'aquaculture des poissons d'eau douce.

Les 8 millions de tonnes d'algues fraîches exploitées chaque année alimentent quatre grands débouchés: l'alimentation humaine, la production de phycocolloïdes, les utilisations agricoles et le domaine parapharmacie/cosmétique (figure I.04).

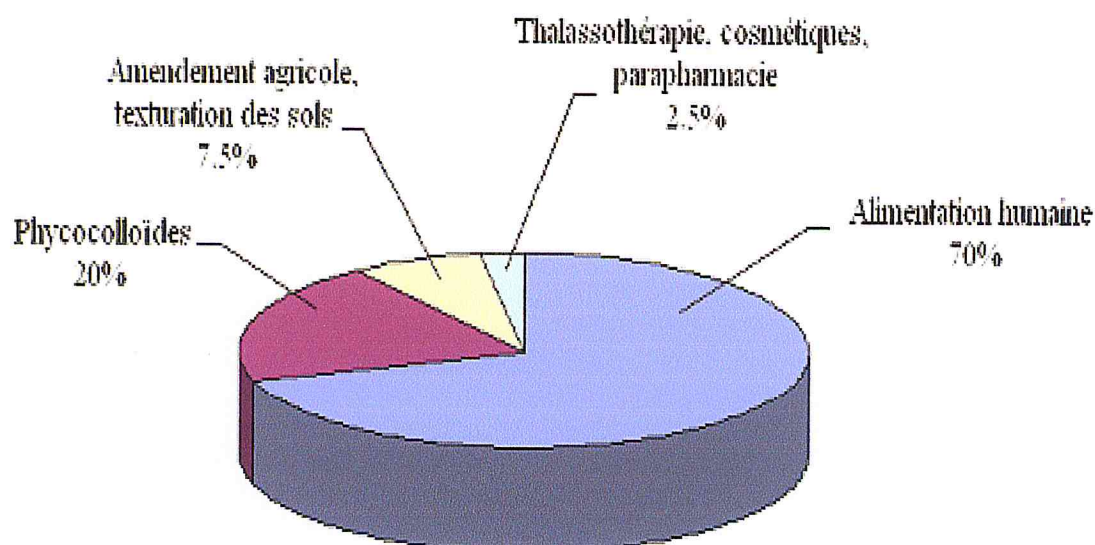


Figure I.04 : Répartition des tonnages utilisés dans les quatre grands domaines d'exploitation des algues (en tonnes fraîches).

L'alimentation humaine est la principale utilisation des algues. Leur consommation est localisée dans les pays du sud/est asiatique, principalement en Chine, au Japon et en Corée, avec des produits comme le nori, le kombu ou le wakame. Le deuxième grand secteur d'exploitation des algues est la production de phycocolloïdes (colloïdes issus des algues).

On distingue trois familles de phycocolloïdes: les alginates, les agars et les carraghénanes. Ce sont des polysaccharides extraits d'algues rouges et brunes. Ils sont utilisés dans de nombreuses applications industrielles pour leurs propriétés rhéologiques.

Les applications industrielles des phycocolloïdes se sont développées après la seconde guerre mondiale, mais ont parfois été freinées par manque de matière première. L'algoculture s'est alors développée et fournit aujourd'hui une grande partie de la matière première pour la production de phycocolloïdes. Les alginates constituent une exception : ils sont souvent extraits à partir d'algues issues de champs naturels car la culture des algues brunes est trop coûteuse sauf en Chine où une partie des récoltes est orientée vers la production de gommes alimentaires. Les phycocolloïdes représentent près de 40% des colloïdes produits dans le monde, soit un marché de près de 585 millions de dollars (figure I.05).

En dehors de l'alimentation humaine et de la production de phycocolloïdes, qui sont les deux grandes voies d'exploitation des algues (90% du tonnage annuel), les algues sont également utilisées en amendement agricole (rétention d'eau et apport de minéraux), et dans les domaines de la pharmacie, thalasso thérapie, parapharmacie et cosmétique.

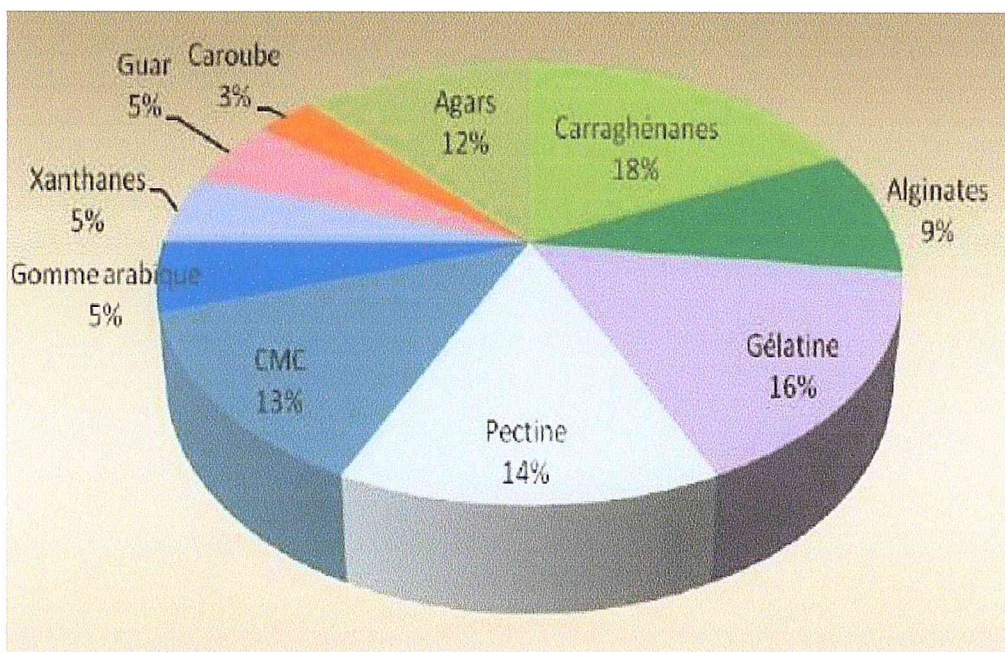


Figure I.05 : Mise en évidence de la place des phycocolloïdes parmi les colloïdes utilisés pour épaissir ou gélifier les solutions aqueuses (Pérez, 1997).

II. Généralités sur les alginates

II.1. L'alginate de sodium

L'alginate de sodium est un polysaccharide de structure linéaire, biopolymère anionique, extrait des algues brunes, et il peut être produit par voie bactérienne (Mjahed, 2009). Au niveau industriel, il est essentiellement issu de certaines espèces d'algues brunes : *Macrocystis pyrifera* récoltée aux Etats-Unis, *Laminaria digitata* (figure I.06), *Laminaria hyperborea* ou encore *Ascophyllum nodosum* récoltée en Europe.

L'alginate est le polysaccharide le plus abondant de ces organismes, constituant plus de 40% de leur poids sec, couramment utilisé dans des applications biologiques notamment dans le domaine de l'encapsulation cellulaire et de la délivrance contrôlée de molécules à effet thérapeutique. Ce succès est dû notamment à son mode de gélification et à sa biocompatibilité largement démontrée dans la littérature (Wang et al., 2003).

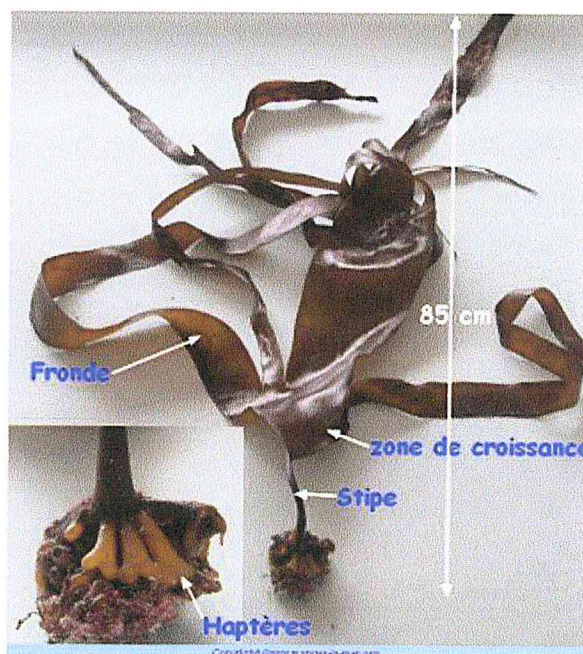


Figure I.06 : *Laminaria digitata* (<http://manger-la-mer.org/>).

II.2. Composition chimique

Les alginates sont des sels d'acide alginique, constitués de deux monomères saccharidiques de base : acide α - L - guluronique (G) et acide β - D - mannuronique (M), dont la séquence varie (figure I.07).

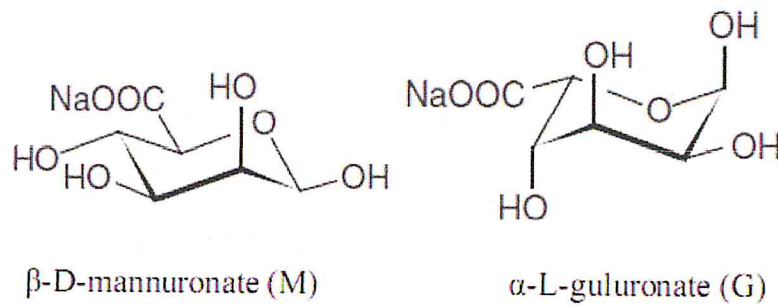


Figure I.07 : Monomères de la chaîne alginate.

La séquence des différents blocs (M) et (G) dépend du type d'algue, de son âge ainsi que de la partie dont est isolé l'alginate. La saison de récolte affecte de même la composition en blocs et les séquences (Jorgensen et al., 2007).

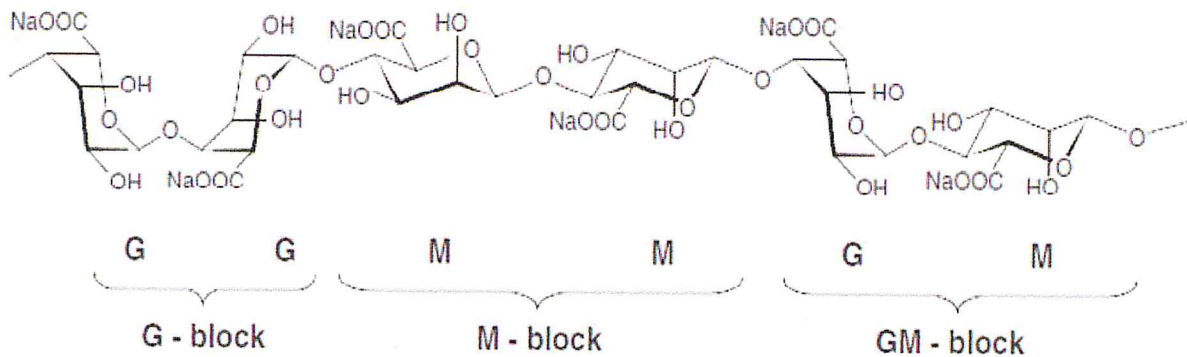


Figure I.08 : Structure chimique de la chaîne d'alginate de sodium.

De plus, les alginates possèdent les quatre types de liaisons glycosidiques possibles (figure II.08) : diéquatorial (MM), diaxial (GG), équatorial-axial (MG) et axial-équatorial (GM).

La structure des segments polyacide mannuronique est très proche de celle de la cellulose. Les liaisons diéquatoriales entre unités M donnent à ces segments une structure aplatie, de type ruban. Cette structure est stabilisée grâce à des liaisons Hydrogène (figure I.09). Par exemple, le groupement hydroxyle en C3 du monomère M+1 interagit avec l'atome d'oxygène du cycle du monomère M.

organiques. Il gonfle dans l'eau mais ne s'y dissout pas. Il se dissout dans les solutions d'hydroxydes alcalins. »

Ses sels monovalents sont quant à eux parfaitement hydrosolubles.

II.3.2. Solubilité

La solubilité dans l'eau des alginates dépend des cations associés au groupement carboxyle, ainsi, les alginates sous la forme de sels formés avec des ions monovalents Na^+ , K^+ , NH_4^+ , ainsi que sous la forme propylène-glycol et alginate de triéthanolamine, à faible poids moléculaire, sont solubles dans l'eau (Pérez, 1997).

II.3.3. Rapport M/G

Les propriétés viscoélastiques d'une suspension d'alginate sont liées au rapport M/G (Storz et al., 2010). Ce rapport dépend du type d'algue brune, de la période de récolte de l'algue, et de la partie de l'algue étudiée (Donati et al., 2005). Le rapport M/G conditionne la fonctionnalité technologique des alginates.

II.3.4. Viscosité

La viscosité est considérée comme l'un des principaux critères de qualité du point de vue commercial. La viscosité des alginates dépend du degré de polymérisation, la concentration, la température, le pH et la présence d'ions di ou trivalents (Pérez et al., 1992).

II.3.5. Gélification

La principale caractéristique de l'alginate est sa capacité à gélifier en présence de cations multivalents. Cette transition sol/gel n'est pas influencée par la température (Vandamme et al., 2002).

Les sels d'alginates sont solubles dans l'eau et sont capables de gélifier en présence de cations multivalents tels que les ions Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} ou encore Al^{3+} grâce à la formation d'une jonction impliquant plusieurs chaînes polysaccharidiques. Cette interaction est décrite par le modèle « egg-box » dans lequel chaque ion divalent peut interagir avec deux résidus G adjacents ou appartenant à deux chaînes opposées (figure I.11) (Grant et al., 1973)p

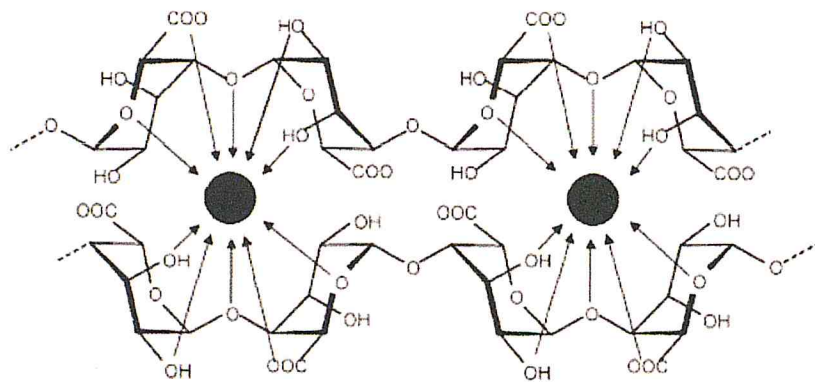


Figure I.11 : Gélification ionotropique de l'alginate. Modèle "egg-box".

L'ion chélateur divalent impliqué dans les liaisons intra et intermoléculaire de l'alginate possède une affinité variable avec les résidus G suivant le type de cation considéré, à savoir : $Pb > Cu > Cd > Ba > Sr > Ca > Co, Ni, Zn > Mn$ (Haug et Larsen, 1970).

Le sel de cation divalent généralement utilisé pour la gélification de l'alginate est le chlorure de calcium en raison de sa bonne solubilité en milieu aqueux et de la forte disponibilité en ions calcium qu'il apporte. Il a été montré que 90% des ions sodium contenus dans une solution d'alginate de sodium peuvent être facilement déplacés par les ions calciques (Seely et Hart, 1974). Les ions calcium s'associent préférentiellement aux fragments poly-guluronate plutôt qu'aux fragments poly-mannuronate (figure I.12).

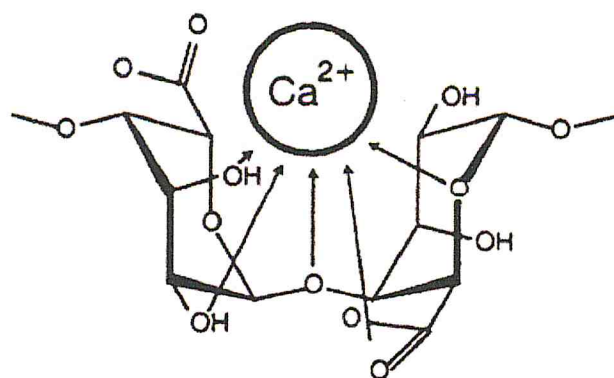


Figure I.12 : Liaisons covalentes des ions calcium avec les résidus poly-G des polymères d'alginate (Stequert, 2009).

En effet, les blocs poly-guluronate, en raison de leur conformation spatiale, permettent une chélation plus énergétique des ions. Ces derniers sont retenus dans une « cage » et

interagissent avec les fonctions carboxylates et les atomes d'oxygène des fonctions hydroxyles. Les ions calcium sont beaucoup mieux retenus que par de simples liaisons ioniques.

Cet enchaînement régulier de type « egg box » (figure I.13) se reproduit périodiquement : il se forme un réseau tridimensionnel à zones organisées reliées par les segments poly-M ou poly-(M-G).

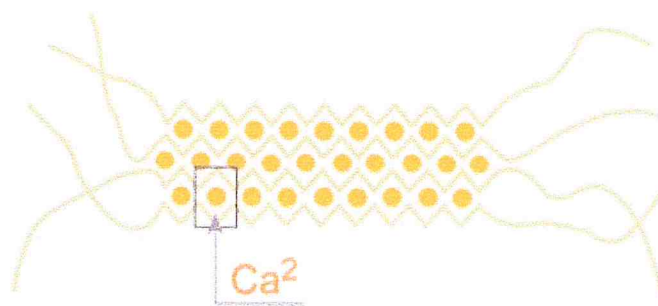
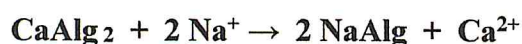


Figure I.13 : Rétention du calcium par un réseau tridimensionnel de segments poly-M ou poly-G définissant une structure de type "egg-box" (www.cargilltexturizing.com/).

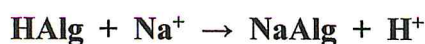
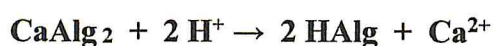
La structure du polymère est donc l'élément déterminant du comportement rhéologique des gels d'acide alginique : la proportion des blocs poly-G et leur longueur conditionnent la formation et la force des gels obtenus en présence de calcium.

II.4. Procédé d'extraction de l'alginate

Dans les algues brunes, les alginates sont présents sous forme de sels insolubles (principalement de calcium). Le principe de l'extraction est de convertir ces sels insolubles en sels de sodium soluble. L'algue pourrait être traitée par une solution alcaline, le processus étant alors un échange d'ions (Bashford et al., 1950) :



Cependant, de nombreux auteurs ont montré qu'un prétraitement avec un acide minéral permet d'améliorer l'extraction (Haug, 1964 ; Secconi, 1967 ; Myklestad, 1968 ; Hernandez- Carmona et al., 1992).

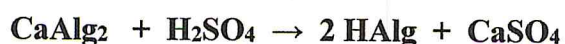


En industrie, il existe deux protocoles classiquement utilisés pour extraire les alginates, la méthode dite directe et la méthode dite indirecte, qui reprennent toutes les deux le principe du prétraitement acide suivi d'une extraction alcaline. C'est le mode de précipitation utilisé ensuite qui différencie la méthode directe de la méthode indirecte. Le choix de l'une ou l'autre est lié à l'espèce d'algue traitée (Pérez et al., 1992).

a) Préparation de la matière première : C'est généralement le formol qui est utilisé, car il présente plusieurs avantages : il est peu coûteux, il provoque une dépigmentation des algues (amélioration de la blancheur du produit final) et une libération des phénols. Les algues sont plongées dans un bain de formol à environ 1% puis stockées. Avant utilisation, les algues sont rincées, puis découpées en fragments de 20 à 30 cm de longueur pour faciliter le transport par pompage. Si les thalles ont été conservés sèches, il faut les réhydrater.

b) Formation de l'alginate : L'alginate se trouve dans les cellules de l'algue sous forme de sels de sodium, calcium et magnésium. Les alginates de calcium et magnésium étant insolubles, les étapes de lixiviation et de carbonatation décrite ci-après permettent de les transformer en sel de sodium soluble dans l'eau.

c) Lixiviation (ou acidification) : Les algues sont immergées dans une solution d'acide sulfurique à environ 0,5N pendant plusieurs heures. Les sels d'alginates insolubles situés dans les cellules de l'algue passent sous forme d'acide alginique insoluble et les ions calcium, sodium et magnésium sont libérés sous forme de sulfates avec les eaux de rinçage. Deux à trois rinçages à l'eau douce sont nécessaires.



d) Carbonatation : Les algues sont immergées dans une solution de carbonate de sodium à environ 4 %. L'acide alginique insoluble présent dans les cellules de l'algue réagit avec le carbonate de sodium pour donner de l'alginate de sodium soluble, qui passe en phase aqueuse. Au terme de cette opération, on obtient un «jus de carbonatation» : la matière algale est décomposée sous forme de particules en suspension dans la solution d'alginate de sodium.



Suivant l'espèce d'algue traitée et la gamme de viscosité que l'on désire obtenir pour le produit final, on peut faire varier la température et le temps de contact. Pour *Laminaria digitata*, on préfère opérer à froid ou à 25-30°C de façon à préserver une haute viscosité.

e) Flottation et filtration : Il s'agit de séparer la solution d'alginate de sodium des particules de matière algale en suspension. Théoriquement, la séparation pourrait se faire par simple filtration. En fait, les particules de cellulose et autres composés insolubles sont si fins et si mucilagineux qu'ils colmatent rapidement les filtres. Dans l'industrie, on utilise le plus couramment l'émulsification (injection d'air dans le jus de carbonatation dilué) puis la flottation. En laboratoire, on utilise le plus souvent la centrifugation.

f) Précipitation de l'acide alginique : L'acide alginique est précipité par ajout d'acide sulfurique à la solution d'alginate de sodium, de façon à ce que le pH soit inférieur à 2. Le carbonate de sodium reste en excès dans la solution se décompose en libérant du gaz carbonique qui se prend dans les fibres d'acide alginique en formation et les amène à la surface : il se forme une « mousse » d'acide alginique, qui s'épaissit et se tasse progressivement.

g) Déshydratation : Dans l'industrie, des systèmes de filtre-pressé ou de presse à vis sont utilisés, parfois associés à de l'alcool, pour déshydrater la mousse d'acide alginique. A la sortie de la presse, on obtient un acide alginique à environ 30% d'humidité. Ce produit est ensuite traité avec les bases adéquates pour produire les différents sels d'alginate qui sont commercialisés :

- l'acide alginique (E400),
- l'alginate de sodium (E401),
- l'alginate de potassium (E402),
- l'alginate de calcium (E403),
- l'alginate d'ammonium (E404),
- l'alginate propylène glycol (E405),
- l'alginate de triéthanolamine.

III. L'alginate : un matériau d'encapsulation

III.1. La microencapsulation

III.1.1. Définition

C'est le piégeage d'un composé ou d'un système au sein d'un matériau dispersé en vue de son immobilisation, sa protection, le contrôle de son transfert, sa structure et sa fonctionnalisation. En développant cette technique l'homme n'a fait que reproduire la nature.

La possibilité des structures à encapsuler est grande et peut aller de molécules très simples à très complexes telles que des médicaments. La diversité des formes de capsules est très grande. Pour un puriste, une microcapsule est une membrane contenant un liquide. Dans la réalité, cela peut aller de la forme la plus simple : une molécule creuse dans laquelle s'insère un principe actif, jusqu'à des formes complexes de type liposomes, ...etc.

En résumé l'encapsulation comprend un ensemble de structures solides semi-solides ou liquides obtenues par séchage, agglomération, émulsification ou enrobage de particules solides ou tout autre substrat liquide. Les particules obtenues se divisent en 3 groupes: microparticules, nanoparticules et liposomes (Vincent, 2010).

III.1.2. Caractéristiques générales des microparticules

Les microparticules sont composées d'un matériau enrobant constitué de polymères synthétiques ou naturels ou encore de lipides et, en général, d'une matière active. Elles présentent une taille comprise entre 1 et 1000 μ m. Leur distribution granulométrique est de type gaussien, varie avec le procédé de fabrication choisi et est déterminée par granulométrie à variation de résistance électrique ou diffraction laser. La morphologie des microparticules peut être observée par microscopie optique ou électronique. Deux structures peuvent exister : les microsphères et les microcapsules (figure 1.14). Les premières sont formées d'une matrice continue de polymère ou de lipide au sein de laquelle le principe actif est dissout ou dispersé. Les microcapsules sont quant à elles des réservoirs constitués d'un cœur de principe actif sous forme liquide, solide ou éventuellement gazeux, entouré par une membrane de matériau enrobant (Benoît et al., 2009).

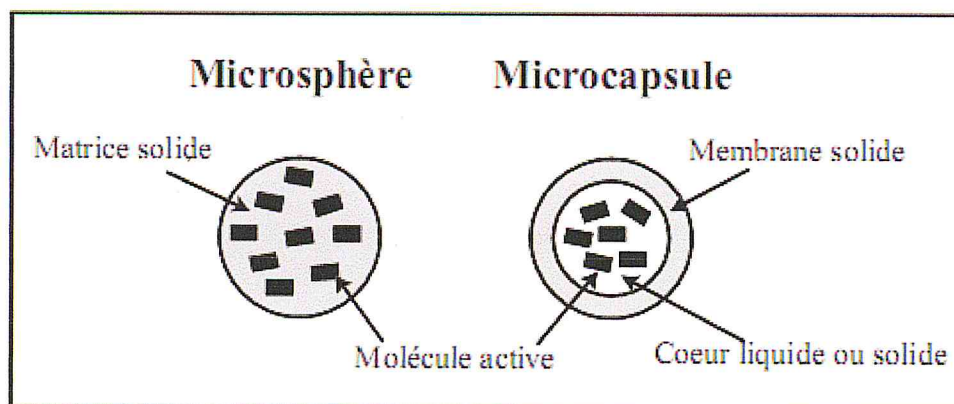


Figure 1.14 : Représentation schématique d'une microsphère et d'une microcapsule.

Les polymères formant le matériau enrobant peuvent être d'origine naturelle (gélatine, chitosane, alginate de sodium, agarose...), hémisynthétique (dérivés de la cellulose...) ou synthétique comme les copolymères des acides lactique et glycolique couramment utilisés. Selon le domaine d'application des microparticules, des propriétés de biocompatibilité et/ou de biodégradabilité seront requises. Les lipides (acides gras, alcools gras, glycérides, cholestérol...) seront plutôt utilisés sous forme solide, de même que les cires naturelles ou minérales. D'autres matériaux tels que des stabilisants (tensioactifs, dispersants, anti-mottants...) ou des cryoprotecteurs peuvent être ajoutés à la formulation des microparticules. L'ensemble des composés va intervenir dans le profil de libération de la matière active (Benoît et al., 2009).

III.1.3. Rôle de l'encapsulation

La microencapsulation est une technique qui a pour objectif les 5 propriétés suivantes (Vandamme et al., 2007) :

- **Immobiliser ou isoler :** le but est de limiter le contact entre certaines parties d'un système. Cet objectif est notamment retrouvé dans les médicaments où il est souhaitable que les deux réactifs n'entrent en contact qu'au moment de la rupture de la capsule.
- **Protéger :** certains composés sont très fragiles et sont rapidement dégradés au contact du milieu environnant ; la microencapsulation leur permet donc d'être protégés de cet environnement néfaste. Pour exemple il est possible de citer certains médicaments qui sont détruits par le pH acide de l'estomac. Cette technique leur permet donc de traverser cet organe sans être dénaturés et d'agir au niveau intestinal.

- **Contrôler la libération** : Dans de nombreux cas un profil de libération particulier est recherché. En effet certains médicaments doivent suivre une cinétique bien définie pour leur libération.
- **Structurer** : la microencapsulation est une technique de galénique qui permet d'être très homogène dans la répartition du principe actif et d'éviter les effets de dilution qui peuvent exister. En effet, le mélange d'un litre de liquide avec une tonne de poudres et rarement homogène, l'encapsulation permet de solutionner ce problème.
- **Fonctionnaliser** : un système peut acquérir des fonctions nouvelles avec ce type de structure. Par exemple l'activité d'un biocatalyseur peut être régulée en modifiant la perméabilité de la membrane qui l'entoure.

III.1.4. Mécanismes de libération des substances encapsulées dans des microcapsules

Plusieurs mécanismes sont possibles mais dépendent de la façon dont le principe actif doit être libéré, ainsi que des capacités du principe actif (Vandamme et al, 2007). Les différentes pratiques sont :

- **La pression externe** : le contenu de la capsule est libéré par rupture de la membrane suite à l'écrasement de cette dernière.
- **La pression intérieure** : ceci n'est possible que si le principe actif produit des composants gazeux qui augmente la pression à l'intérieur de la capsule jusqu'à l'éclatement.
- **L'abrasion** : la capsule est progressivement usée jusqu'à la libération de la substance la contenant.
- **La chaleur** : le contenu est libéré suite à la fusion de l'enveloppe de la microcapsule.
- **La combustion-décomposition** : les substances extinctrices d'incendie libèrent leurs contenus suite à la combustion ou la décomposition de l'enveloppe.
- **La lumière** : la capsule sensible aux UV se décompose au contact de la lumière, libérant ainsi le contenu.
- **Les solvants** : certaines microcapsules sont destinées à être dissoutes dans un solvant spécifique.
- **Le pH** : la libération du principe actif par dissolution de la membrane au contact d'une substance à pH donné permet de libérer le produit dans un site spécifique.
- **La dégradation enzymatique** : cela permet de libérer la substance à un endroit donné c'est-à-dire où les enzymes sont présentes et digèrent la membrane.

- **La perméabilité** : la membrane étant perméable, le contenu est libéré progressivement par diffusion, dissolution ou évaporation. La membrane peut également être semi-perméable pour le substrat qui va diffuser à travers la membrane.

III.2. L'alginate : support pour la microencapsulation

De nombreux polymères d'origine biologique sont utilisés pour la microencapsulation : les polysaccharides, les protéines et lipides.

Cinq critères spécifiques aux biopolymères peuvent être recherchés pour la conception de microcapsules (Vincent, 2010):

- Perméabilité aux gaz,
- Caractéristiques chimiques et fonctionnelles,
- Emulsifiant naturel,
- Nombreuses possibilités de modification et de réticulation chimiques.

Selon l'utilisation souhaitée, chaque biopolymère, possédant des indications différentes, va posséder une indication précise.

III.2.1. Techniques d'encapsulation à partir d'alginate

L'alginate de sodium est utilisé pour divers domaines et le procédé de microencapsulation adapté pour l'alginate de sodium est de deux types (Vincent, 2010) :

- la coacervation complexe,
- la gélification de gouttes

III.2.1.1. La coacervation complexe : procédé physico-chimique

Cette technique se définit comme la séparation d'un système colloïdal en deux phases liquides. La phase la plus concentrée est la phase coacervée, l'autre phase étant la solution d'équilibre. La coacervation se produit par interaction directe entre biopolymères. Les interactions sont de nature hydrogène, hydrophobe ou encore électrostatique. Le polymère est compressé à la surface du colloïde ou de la gouttelette et le dépôt de coacervat à la surface provient de l'abaissement de pH (Vincent, 2010), (figure I.15).

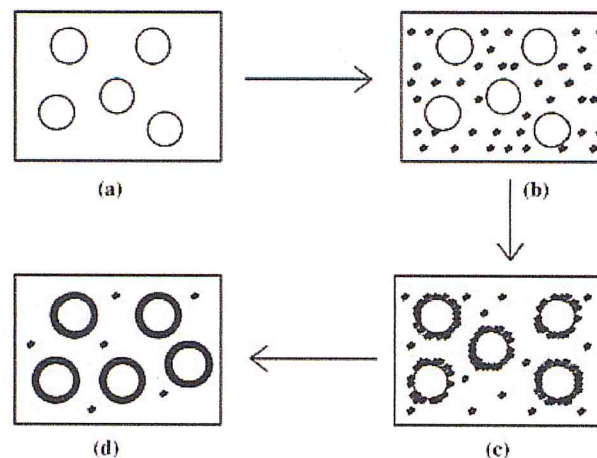


Figure I.15 : Représentation schématique du processus de coacervation complexe. (a) Dispersion du produit à encapsuler dans une solution du matériau d'enrobage ; (b) séparation du coacervat de la solution; (c) coating du matériel par des microgouttes du coacervat.

III.2.1.2. Gélification de gouttes : procédé mécanique

Il est également appelé procédé d'extrusion. La solution de biopolymères tombe goutte à goutte dans un bain contenant le milieu séquestrant, conduisant à la gélification des gouttes ou à la formation d'une membrane autour de ces gouttes sphériques (figure I.16). La co-extrusion est basée sur le même principe mais permet d'entourer le matériel liquide à encapsuler dans une membrane de biopolymère (Hernandez, 2002).

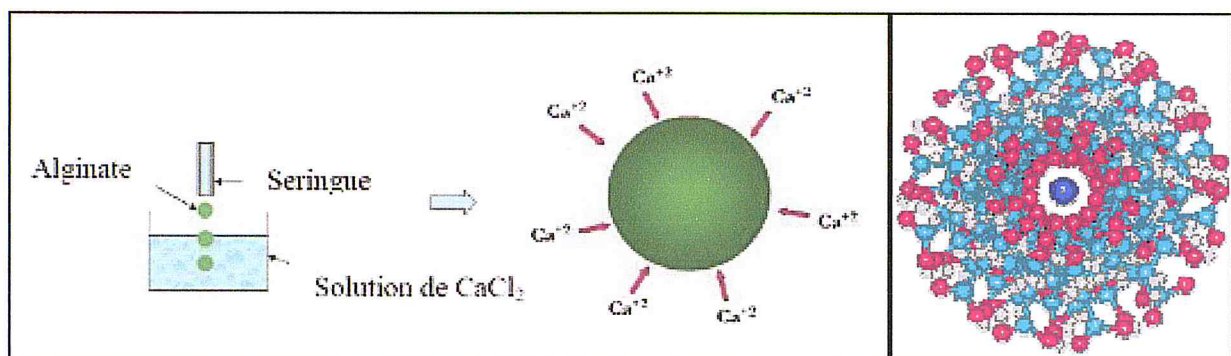


Figure I.16 : Procédé de gélification de gouttes d'alginate et structure atomique d'une bille d'alginate.

Partie 1 : Extraction et caractérisation des alginates

II.1. Introduction

Cette partie du travail s'inscrit dans le cadre d'un programme national de recherche en cours de réalisation au niveau du CNRDPA « Valorisation des végétaux aquatiques, inventaire et valorisation des algues marines dans la région centre d'Algérie ».

Cette présente étude a porté sur l'extraction de phycocolloïdes alginiques à base de quatre Phéophycées (algues brunes) de la côte algérienne. L'extraction et quelques analyses ont été réalisées au niveau du laboratoire physico-chimique du CNRDPA durant 06 mois de stage.

II.2. Matériel végétal

Notre étude a été faite sur quatre algues marines brunes nommées : *Cystoseira stricta*, *Dictyota dichotoma*, *Dictyopteris membranacea* et *Sargassum vulgare*. La récolte a été effectuée pendant le mois de février 2014 au niveau de deux sites : l'anse de Kouali qui se situe à 500m à l'Est du complexe touristique de Tipaza et Saadiya à Bouharoune, Tipaza.

La récolte a été réalisée à la main à environ 0,5-1m de profondeur, les échantillons ont été immédiatement conservés dans des sacs en plastique avec un peu d'eau de mer.

Les algues prélevées sont transportées au laboratoire où elles sont lavées à l'eau, ensuite, étalées sur papier absorbant. Le séchage se fait à l'ombre à une température ambiante pendant une à trois semaines. On a complété cette opération en mettant nos algues pré-séchées à l'étuve à 40°C pendant une heure.

Une partie d'échantillon est conservée dans le formol à 4% pour l'identification. Les échantillons doivent être fraîchement prélevés sur le terrain avec leur base, celle-ci étant souvent un caractère fondamental de reconnaissance.

II.3. Méthodes

II.3.1. Identification des espèces

L'identification des quatre espèces récoltées s'est faite au niveau du CNRDPA et cela par l'observation détaillée des différentes parties végétatives et appareils reproducteurs des quatre algues. Il s'agit de *Cystoseira stricta*, *Dictyota dichotoma*, *Dictyopteris membranacea* et *Sargassum vulgare* (figure II.01).

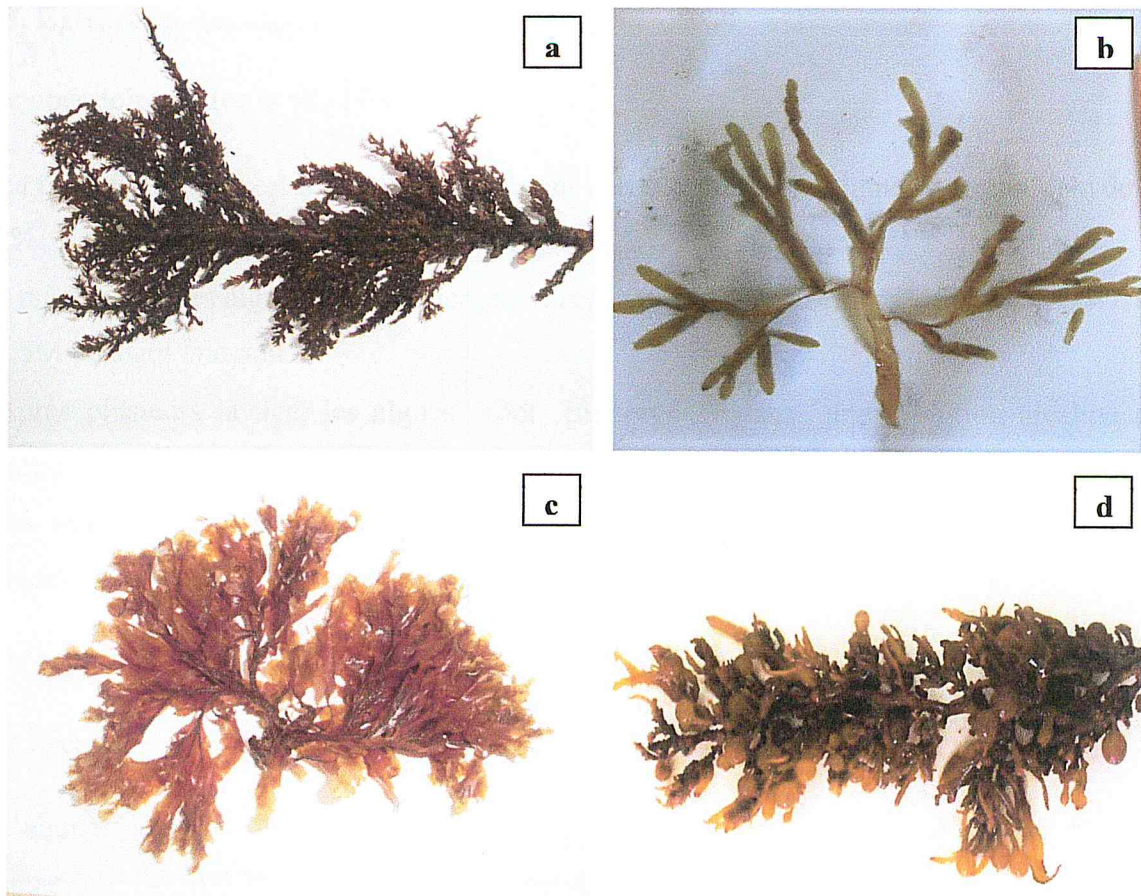


Figure II.01 : Aspect général des quatre algues brunes étudiées vu à l'œil nu. **a :** *Cystoseira stricta*, **b :** *Dictyota dichotoma*, **c :** *Dictyopteris membranacea*, **d :** *Sargassum vulgare*.

II.3.2. Le broyage

Après séchage nos algues ont été broyées selon la méthode de Pelligrini et al (1971) consistant en la pulvérisation des algues dans un broyeur électrique, afin d'obtenir une poudre de quelques microns de diamètre.



Figure II.02 : Aspect général de *Sargassum vulgare* après séchage vu à l'œil nu.



Figure II.03 : Lyophilisateur ALPHA 1-2 LDplus.

II.3.6. Conservation des alginates

L'alginate doit être conservé dans un endroit fermé hermétiquement, sec et frais car ce produit est hygroscopique, et perd de sa viscosité en présence de chaleur. Une contamination microbienne peut entraîner une dépolymérisation de l'alginate de sodium conduisant à une diminution de la viscosité. Il est donc nécessaire de conserver ce produit en présence d'un antimicrobien ou de le stériliser (Vincent, 2010).

II.3.7. Détermination du rendement

Les rendements d'extraction ont été calculés selon l'équation suivante :

$$\text{Rendement \%} = (M_{\text{Alg}} / M_{\text{s}}) \times 100$$

M_{Alg} : masse sèche d'alginate obtenue.

M_{s} : masse sèche de la poudre végétale utilisée pour l'extraction.

II.4. Caractérisation des alginates

II.4.1. Caractérisation par spectroscopie infrarouge

La spectroscopie FTIR constitue une méthode de choix pour déterminer les groupements chimiques caractéristiques d'alginate de sodium.

Les spectres infrarouges ont été réalisés au centre de recherche d'analyse physico-chimique (CRAPC), à l'aide d'un spectrophotomètre FTIR-ATR ALPHA-P (figure II.04), logiciel **Opus**. Le domaine spectral étudié s'étend de 4000 cm^{-1} à 400 cm^{-1} .

Cinq spectres ont été réalisés et comparés : l'alginate commercial (Alg.C), l'alginate extrait de *Cystoseira stricta* (Cys), l'alginate extrait de *Dictyota dichotoma* (DA), l'alginate extrait de *Dictyopteris membranacea* (DS) et l'alginate extrait de *Sargassum vulgare* (S).



Figure II.04 : Spectrophotomètre FTIR-ATR ALPHA-P.

II.4.2. Le test de viscosité

La viscosité est l'une des techniques expérimentales les plus utilisées pour caractériser les polymères en solution. Outre son faible coût, les données obtenues sont très facilement exploitables.

a) Préparation de la solution d'alginate

La viscosité des alginates se mesure à la concentration de 1 % à pH 8, à 20°C (Pérez et al., 1992). On a préparé des solutions des alginates extraits des quatre espèces étudiées ainsi que celle de l'alginate commercial.

La manière dont a été préparée la solution influe sur la viscosité. Selon qu'on agite fortement ou lentement, pendant plus ou moins de temps, la viscosité sera différente. De même, une solution à 1 %, créée à partir d'une solution à 3 % que l'on a diluée, n'a pas la même viscosité qu'une solution préparée directement à partir de 1 % d'alginate (Pérez et al., 1992).

b) Mesure de la viscosité

La viscosité est mesurée avec un viscosimètre vibrant à onde sinusoïdale SV 10 (figure II.05), ce type de viscosimètre mesure la viscosité en détectant le courant électrique de commande qui est nécessaire pour faire résonner deux plaques de capteur à la fréquence constante de 30Hz et à l'amplitude de moins de 1mm (Manuel viscosimètre vibrant, Réf : CO_SV10).

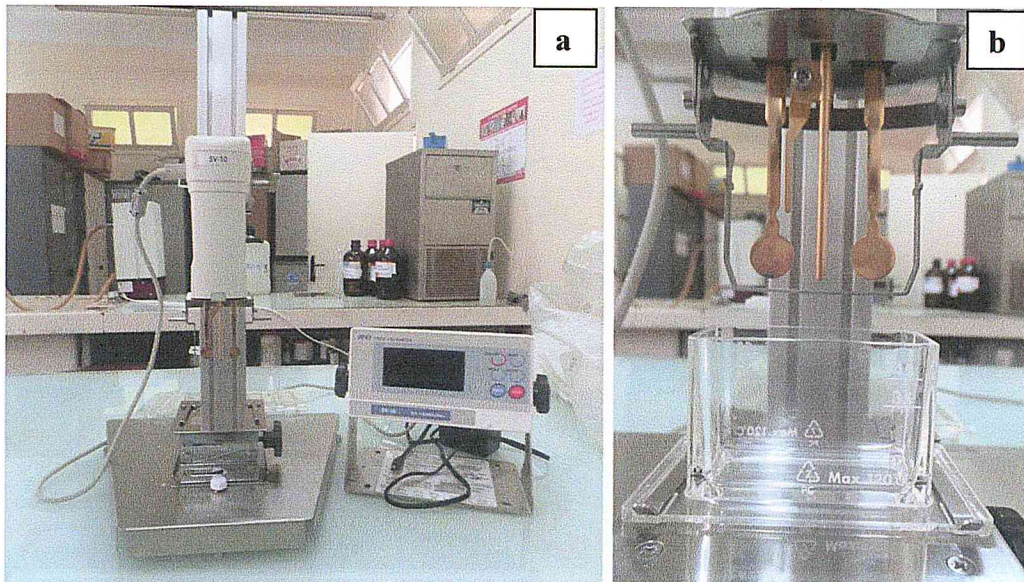


Figure II.05 : a : Viscosimètre vibrant SV 10, b : Cuve échantillon en polycarbonate.

II.4.3. Caractérisation par diffraction des rayons X (DRX)

La technique de diffraction des rayons X permet de déterminer rapidement la nature cristallographique des solides. Cette technique est non destructive et nécessite la mise en jeu d'une faible masse d'échantillon (environ 30 mg). Elle est systématiquement utilisée pour identifier les phases présentes dans le solide et déterminer les caractéristiques structurales de celle-ci.

Cinque diffractogrammes ont été réalisés et comparés : l'alginate commercial (Alg.C), l'alginate extrait de *Cystoseira stricta* (Cys), l'alginate extrait de *Dictyota dichotoma* (DA), l'alginate extrait de *Dictyopterus membranacea* (DS) et l'alginate extrait de *Sargassum vulgare* (S).

Partie 2 : Encapsulation du jus de betterave

II.1. Introduction

Dans le cadre de ce travail, on a encapsulé le jus de betterave dans des billes d'alginate. On a choisi d'utiliser pour cela la synthèse par extrusion dont la mise en œuvre est simple. Cette méthode conduit à la formation de billes de taille millimétrique, ce qui permettra d'encapsuler facilement le jus de betterave envisagé.

On a synthétisé trois types de billes, cela afin d'évaluer la différence des propriétés des billes lors du changement du précurseur ou du principe actif :

- Pour évaluer l'influence de la différence des propriétés des alginate, deux types de précurseur sont utilisés : l'alginate commercial (produit Labosi, de faible poids moléculaire) et l'alginate extrait de *Sargassum vulgare* (on a opté pour S car c'est l'alginate qui a le pH le plus proche de l'alginate commercial).
- Pour évaluer l'influence de la différence de la concentration du principe actif, on a encapsulé le jus de betterave frais puis le jus de betterave lyophilisé.

II.2. Principe actif à encapsulé (Le jus de betterave rouge)

Propriétés colorantes et antioxydantes

Les bétalaïnes sont des pigments végétaux, dont la couleur varie d'un remarquable jaune foncé à un violet intense, la couleur et la stabilité des bétalaïnes dépendent du pH. Il existe deux catégories des bétalaïnes :

- Les bétacyanines, pigments de couleur rouge à violet (bétanine).
- Les bétaxanthines, pigments de couleur jaune à orange (indicaxanthine).

La plus étudiée des bétalaïnes est la bétanine (ou bétacyanine), n'appartient pas au groupe des anthocyanes (les pigments rouges les plus répandus dans le règne végétal). Ce pigment de nature azotée est éliminé partiellement par voie urinaire. La bétanine, qui est dotée de propriétés colorantes particulièrement puissantes, constitue le "rouge de betterave", un colorant utilisé dans l'industrie pharmaceutique et autorisé comme additif alimentaire (désigné par le numéro de code E162).

Tableau II.01: Essais préliminaires à la synthèse des capsules d'alginate.

Essais (pour 10ml d'eau)	pH	Observations
Alginate C à 1% + 10ml de jus de betterave frais	4,2	Billes déformées + Changement de couleur après 45 min
Alginate C à 1% + 4ml de jus de betterave frais	5,2	Billes sphériques + Changement de couleur après 12 h
Alginate S 1% + 4ml de jus de betterave frais	5,6	Billes plates + Changement de couleur après 12 h
Alginate S 2% + 4ml de jus de betterave frais	5,3	Bille sphérique + Changement de couleur après 12 h
Alginate C 1% + 3g de jus de betterave lyophilisé	3,1	Pas de formation de billes + Changement de couleur après 15 min
Alginate C 1% + 1g de jus de betterave lyophilisé	5,0	Billes sphériques + Changement de couleur après 8 h

Bilan

- Le pH est le facteur le plus influençant, il influe directement sur la qualité et les propriétés du jus de betterave. Plus la concentration en jus de betterave est élevée plus le pH devient acide. Un pH trop acide peut entraver la formation des capsules et changé la couleur du jus de betterave.
- D'après nos observations les capsules ne se forment pas pour un pH supérieur à 5.5 et inférieur à 3,8. Dans notre cas le pH **optimum** de la solution est entre (5 – 5,3).
- La capsule n'est pas formée pour une quantité très faible ou très importante d'alginate car il y a un équilibre entre les deux réactifs qu'il faut respecter. Nous avons vu que la formation de capsule était possible que pour les quantités de 1% pour l'alginate C et 2% pour l'alginate S.

Donc d'après les essais préliminaires le protocole expérimental est défini comme suit :

- Préparation du mélange de matériaux précurseurs : on ajoute dans un bécher des masses d'alginate de sodium et de jus de betterave comme suit (quantité pour 10ml d'eau) :
 - Alginate C à 1% + 4ml de jus de betterave frais → billes B.C.
 - Alginate S à 2% + 4ml de jus de betterave frais → billes B.S.
 - Alginate C à 1% + 1g de jus de betterave lyophilisée → billes B.jl.
- Le mélange est agité durant 30 min à l'aide d'un agitateur magnétique afin d'obtenir un gel bien homogène. L'agitation est arrêtée quelques instants afin de permettre aux éventuelles bulles d'air de s'éliminer de la solution visqueuse obtenue.
- La solution est versée goutte à goutte dans un bain de chlorure de calcium à 1% de volume 200 ml. Le goutte à goutte est effectué à l'aide d'une seringue sous agitation lente, la hauteur de chute des billes est d'environ de 5 cm (figure II.06).
- Les billes sont laissées au repos dans le bain de calcium pendant 20 min, ce temps a été largement suffisant pour une gélification complète. Le temps de maturation varie de 15 min à 15h en fonction de la concentration en cations, de la force ionique et du pH.

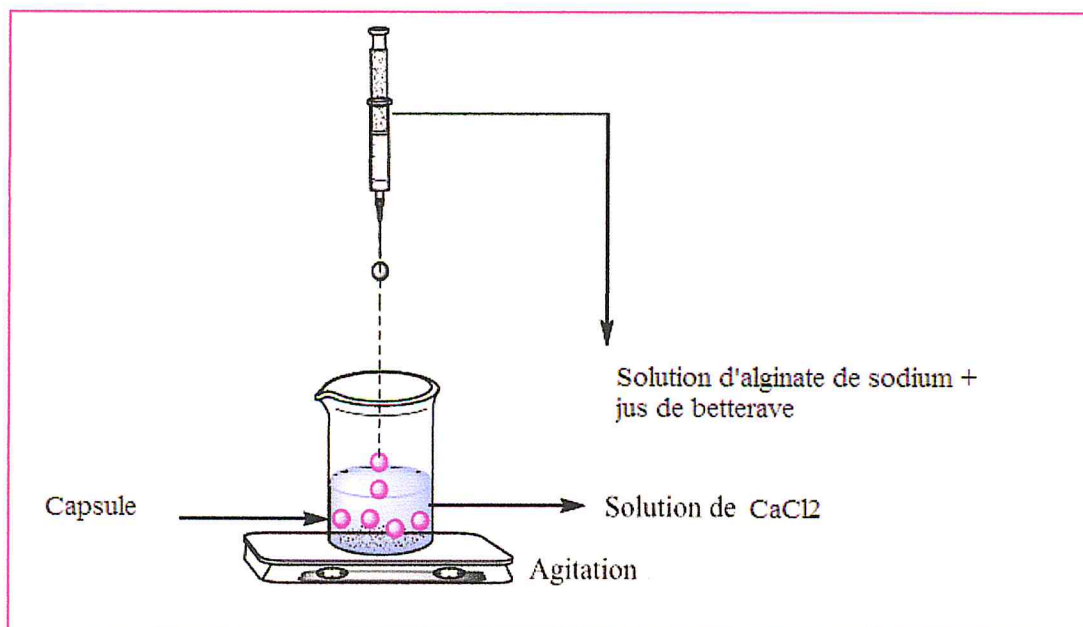


Figure II.06: Représentation schématique de la synthèse par extrusion mise en œuvre pour la synthèse des billes d'alginate.

- Les billes sont filtrées puis lavées avec de l'eau distillée, pesées par des échantillons de 20g pour chaque type.

- Après lavage, les billes sont immédiatement congelées (pour conserver les propriétés du jus), puis lyophilisées dans un lyophilisateur **ALPHA 1-2 LDplus**, sur des échantillons de 20g pendant 12 h à -52°C à la pression 0,044 mbar. La lyophilisation est un procédé permettant d'augmenter la durée de conservation des billes, en effet, les billes lyophilisées, comparées aux billes fraîches, ont été celles qui se sont mieux conservées.

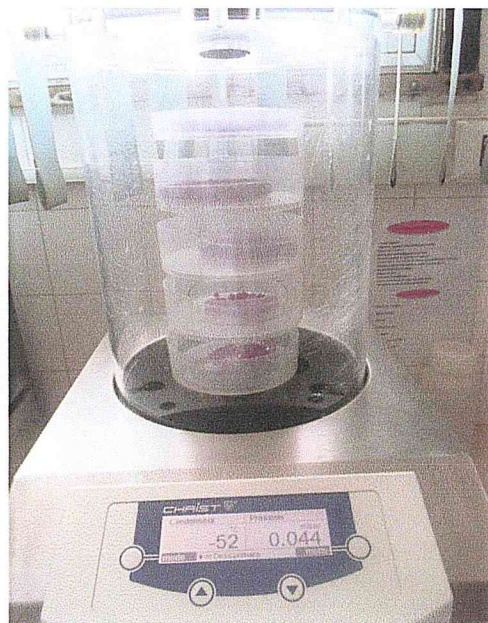


Figure II.07 : Lyophilisation des billes d'alginate.

II.3.3. Conservation des billes

La conservation consiste à mettre les billes dans des boîtes de pétri hermétiquement fermée, au frais et à l'abri de la lumière et de l'humidité.

II.4. Caractérisation des billes

II.4.1. Morphologies des billes

Etude microscopique et macroscopique

Des images des billes obtenues ont été prises à l'état frais avec une loupe **Leica MZ6**, équipé d'un objectif de faible grossissement ($G\times 0,8$), ces mêmes billes ont été aussi observées au microscope optique **Motic** avec un grossissement ($G\times 4$).

L'absence de microscope électronique à balayage (dont nous ne disposons pas au CNRDPA), n'a pas permis de visualiser les billes à l'état frais. C'est l'une des raisons pour lesquelles les billes ont été lyophilisées.

L'analyse par MEB a été réalisée au Centre de Développement des Technologies Avancées (CDTA), à l'aide d'un microscope à balayage électronique **Jeol JSM-6360 LV**.

Préparation des échantillons pour l'analyse MEB

La qualité des images obtenues en microscope à balayage électronique dépend grandement de la qualité de l'échantillon analysé. Celui-ci doit être absolument propre, de dimension relativement modeste (inférieure au centimètre) et surtout, il doit conduire l'électricité afin de pouvoir évacuer les électrons. Les billes d'alginate sont des matériaux isolants. Une étape de métallisation avec une couche (Au/Pd) d'une épaisseur de 5nm a été nécessaire avant l'observation au MEB.

Les images MEB vont nous permettre d'apprécier la taille, la forme et la texture des billes lyophilisées.

II.4.2. Taux de gonflement des billes S (%) et Taux d'humidité TH (%)

Le taux de gonflement est déterminé par la pesée des masses de capsules sèches et humides. Le taux de gonflement des capsules est déterminé selon l'équation de Gupta et Ravi Kumar (Kumar, 2000):

$$S \% = [(M_t - M_0) / M_0] \times 100$$

Où : S % : taux de gonflement.

M_t : masse de capsule au temps t.

M_0 : masse de capsule sèche au temps t = 0.

Les billes dites sèches contiennent encore un pourcentage d'eau. Pour déterminer le taux d'humidité, les billes dites « sèches » sont chauffées à $105^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ jusqu'à poids constant (Twidwell et al, 2002). Le taux d'humidité est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$TH (\%) = [(M_1 - M_2) / M_1] \times 100$$

Où : TH (%) = taux d'humidité exprimé en pourcentage.

M_1 = poids de l'échantillon avant séchage.

M_2 = poids de l'échantillon après le séchage.

II.4.3. Caractérisation par spectroscopie infrarouge

La spectroscopie FTIR constitue une méthode de choix pour déterminer les groupements chimiques caractéristiques des billes d'alginate de calcium et du jus de betterave. Nous pouvons ainsi mettre en évidence l'apparition ou la disparition de certaines bandes de façon très significative lors de la formation des billes.

Les spectres infrarouges ont été réalisés au centre de recherche d'analyse physico-chimique (CRAPC), à l'aide d'un spectrophotomètre FTIR-ATR : **ALPHA-P**. Trois spectres ont été réalisés et comparés : les billes d'alginate (B.C), les billes d'alginate (B.S) et le jus de betterave lyophilisée.

II.4.4. Caractérisation par diffraction des rayons X (DRX)

La technique de diffraction des rayons X permet de déterminer rapidement la nature cristallographique des billes d'alginate. Deux diffractogrammes ont été réalisés et comparés : les billes d'alginate (B.C), et l'alginate commercial.

II.4.5. Caractérisation par spectroscopie UV-Visible

La spectrophotométrie UV-Visible est utilisée pour doser les molécules présentes en solution lorsque celles-ci sont capables d'absorber des photons dans la gamme de longueurs d'onde 200nm - 800nm. Cette technique sera utilisée pour déterminer, en premier lieu le taux d'encapsulation puis l'estimation du pouvoir anti-radicalaire. Ces analyses ont été réalisées au CNRDPA, le spectrophotomètre utilisé au cours de cette thèse est **JASCO V-630**.



Figure II.08: Spectrophotomètre UV-Visible JASCO V-630.

II.4.5.1. Détermination du taux d'encapsulation (%)

Quelle que soit l'application envisagée, les effets observés sont généralement dépendant de la dose utilisée et il convient donc de déterminer au préalable, la quantité de molécules encapsulées. Différents paramètres servent à quantifier le contenu interne des capsules.

Le pourcentage d'encapsulation (taux d'encapsulation) est l'un des paramètres qui peut mesurer l'efficacité de l'encapsulation, il est défini comme étant la proportion associée aux capsules par rapport à la quantité initialement présente.

On a opté pour ce paramètre car c'est le plus simple à réaliser, vu qu'il est mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible.

$$\text{Taux d'encapsulation \%} = (C_f / C_0) \times 100$$

C_f : Concentration finale encapsulée.

C_0 : Concentration initialement présente.

a) Détermination de la longueur d'onde du jus de betterave :

Nous avons déterminé la longueur d'onde, pour le jus de betterave, qui correspondent à une densité optique maximale (pic d'absorbance dans l'UV). Ces pics sont obtenus en traçant le spectre UV d'une solution ($C = 1\text{ml/l}$) par balayage spectral de 200 à 800 nm, et ceci après l'alignement de la ligne de base à zéro avec le solvant (eau distillée).

b) Établissement de la courbe d'étalonnage :

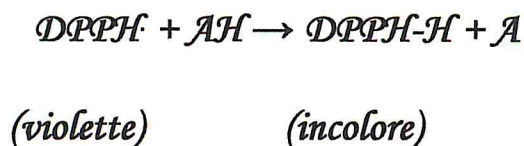
Pour obtenir la courbe d'étalonnage de la solution mère de CaCl_2 restante après la synthèse des capsules, nous avons préparé, par dilutions successives, une série de solutions de concentrations connues (5, 10, 15, 20, 25, 30 et 35 ml/l). Ces solutions sont ensuite analysées à l'aide du spectrophotomètre UV/VIS pour établir une courbe d'étalonnage représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration pour la longueur d'onde appropriée.

II.4.5.2. Estimation du pouvoir antiradicalaire par la méthode au DPPH

Principe

Le DPPH est un radical libre stable violet en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm, cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl hydrazine par un composé à propriété anti-radicalaire, entraînant ainsi une décoloration. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno, 2002).

On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation:



Où : (AH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphényle picryl hydrazine (jaune) (Brand-William et al., 1995).

Mode opératoire (modifié) :

1ml de solution méthanolique de DPPH (0,1M) est ajouté à 1ml de la solution d'extraits, le mélange est vigoureusement agité, puis les tubes sont incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min.

Le blanc est représenté par le méthanol/eau, Le témoin négatif est composé de 1 ml de la solution méthanolique de DPPH et 1 ml d'eau (les billes ont été extrait avec de l'eau distillée car le jus de betterave est moyennement soluble dans le méthanol, de plus le méthanol a changé la couleur de l'extrait), le témoin positif est représenté par une solution méthanolique d'un antioxydant standard : le BHT.

La longueur d'onde d'absorption maximale a été préalablement déterminée. Toutes les lectures sont effectuées à 517 nm. L'activité anti-radicalaire est estimée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Activité antiradicalaire} = (\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs contrôle}) \times 100$$

La CI_{50} a été déterminée pour chaque extrait, elle est définie comme étant la concentration qui donne la diminution de la plus basse rapportée pour donner une inhibition complète (Canillac et Mourey, 2001).

Remarque : Dans ce travail le but d'évaluer le pouvoir anti-radicalaire est de prouver ou pas que les propriétés antioxydantes du jus encapsulé ont été conservées au cours du temps.

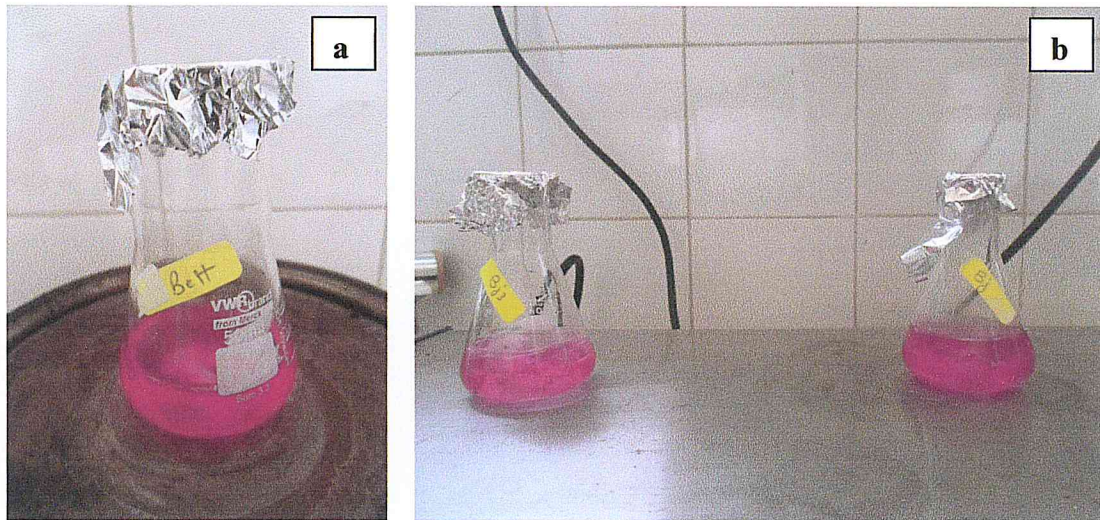


Figure II.09 : Les extraits aqueux **a** : extrait du jus betterave lyophilisé **b** : extrait des billes d'alginate.

Chapitre III : Résultats et discussion

Partie 1 : Extraction et caractérisation des alginates

III.1. Extraction d'alginate

III.1.1. Le rendement en alginate

Selon la littérature, dont Pelligrini et al (1971). Les résultats sont à $\pm 2\%$ près afin de compenser les pertes lors des différentes manipulations, surtout lors des filtrations.

Les rendements obtenus sont comparés à ceux d'autres Fucales étudiées en Algérie et au monde, à titre indicatif, certains résultats sont fournis ci-dessous (tableau III.01) :

Tableau III.01 : Comparaison des teneurs en alginate des espèces étudiées par rapport aux principales alginophytes dans l'Algérie et le monde.

Espèces	Teneur en alginate (% Poids Sec)	Références
<i>Macrocystis pyrifera</i>	18 – 21	
<i>Laminaria japonica</i>	20 – 26	
<i>Ascophyllum nodosum</i>	15 – 20	Pérez, 1997
<i>Fucus serratus</i>	18 – 28	
<i>Ecklonia cava</i>	35 – 38	
<i>Lessonia trabeculata</i>	25.67	Chandía et al., 2001
<i>Saccharina longicruris</i>	20	Rioux, 2005
<i>Dictyopteris polypodioides</i>	21.92	
<i>Dilophus ligulatus</i>	8.8	Belattmania et al., 2015
<i>Halopteris scoparia</i>	4.16	
<i>Cystoseira barbata</i>	5.31	Benali et Karali, 2006
<i>Sargassum vulgare</i>	6.10	
<i>Cystoseira stricta</i>	6.02	
<i>Dictyota dichotoma</i>	4.68	Notre étude
<i>Dictyopteris membranacea</i>	5.13	
<i>Sargassum vulgare</i>	8.42	

Discussion

Nos rendements sont proches à ceux obtenus pour les autres algues brunes étudiées en Algérie et au Maroc, mais ils sont inférieurs aux rendements compris dans l'intervalle de Larpent et al (1990) ; [14 - 40%]. Ceci pourrait être dû comme cité ci-dessus aux pertes enregistrées lors des manipulations. Nous pensons aussi aux facteurs suivants :

➤ N'ayant pas fait l'objet de travaux d'extraction d'alginate auparavant, on pourrait penser que ces espèces présentent tout simplement un faible taux en alginate.

➤ Le taux d'humidité de la poudre.

➤ Le facteur « Pollution »

Bien que n'ayant pas de données concernant l'impact direct de la pollution sur le taux d'alginate dans une algue, on pourrait penser à l'impact de la pollution sur l'activité enzymatique en général. Sachant que la biosynthèse des alginate est sous le contrôle d'enzymes telle que la 5-épimérase.

➤ Beaucoup des individus récoltés avaient perdu une partie de leur fronde, qui pourrait contenir un meilleur taux d'alginate que les autres parties restantes de l'appareil végétatif.

➤ Le facteur dessiccation

L'exposition des algues à l'air, constitue un stress dû à la déshydratation, cette dernière se traduit par l'incapacité des cellules à absorber les nutriments, les algues subissent donc le phénomène de dessiccation (Daws, 1997), en effet certains individus étaient à une profondeur de 50cm environ. Le facteur dessiccation pourrait expliquer les faibles teneurs en alginate obtenus.

➤ L'épiphytisme

Nous avons constaté un important épiphytisme des thalles de nos algues, que nous n'avons pu entièrement éliminer par lavage. Donc, la poudre algale, ne serait pas constituée uniquement des espèces récoltées. L'épiphytisme notamment dû aux algues calcaires, pourrait induire une diminution de la pénétration de la lumière dans l'algue. Ce qui provoquerait une diminution de la photosynthèse ; Source principale de la biosynthèse de l'alginate.

III.1.2. Propriétés organoleptiques

Les caractères organoleptiques des alginate des quatre espèces étudiées sont fournis dans le tableau suivant (tableau III.02) :

Tableau III.02 : Caractères organoleptiques des alginates extraits des quatre algues brunes étudiées.

Espèces Caractères organoleptiques	Cys	DA	DS	S
L'aspect avant séchage	Gel d'alginate fortement visqueux	Gel d'alginate fortement visqueux	Gel d'alginate faiblement visqueux	Gel d'alginate moyennement visqueux
L'aspect après séchage	Poudre filamenteuse	Poudre très filamenteuse	Poudre	Poudre moins filamenteuse
Odeur	Aucune			
Couleur après séchage	Brun jaune	Brun jaune pale	Blanche	Brun jaune pale

Discussion



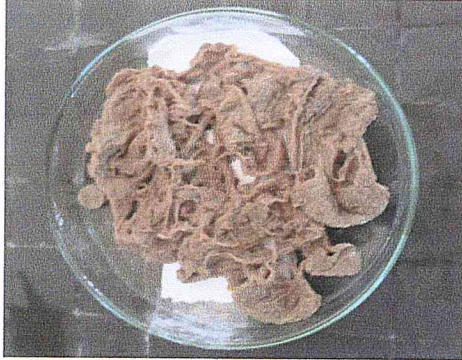





L'aspect des alginates extraits varient selon l'espèce, ils sont poudreux plus au moins filamenteux selon l'origine. On remarque que plus le gel d'alginate était visqueux lors de l'extraction plus la poudre est filamenteuse.

La couleur varie aussi selon l'espèce, elle est de blanc à brun-jaune plus ou moins foncé. Les pigments présents dans l'algue sont les responsables de la couleur de la poudre d'alginate.

Remarque : les alginates lyophilisés reprennent leur couleur avant séchage en solution.

Les alginates extraits ont été photographiés avant et après séchage (lyophilisation), les photos sont fournies dans le tableau suivant (tableau III.03):

Tableau III.03 : Photos des algines extraits avant et après séchage.

Espèces	Algines extraits avant séchage	Algines extraits après séchage
<i>Cystoseira stricta</i>		
<i>Dictyota dichotoma</i>		
<i>Dictyopteris membranacea</i>		
<i>Sargassum vulgare</i>		

III.2. Caractérisation des alginates

III.2.1. Caractérisation par spectrométrie infrarouge

L'analyse des alginates par spectroscopie infrarouge (FTIR - ATR) nous a permis de déterminer les groupes fonctionnels caractéristiques des alginates extraits des quatre algues brunes étudiées et de les comparées au spectre IR de l'alginate commercial.

Les résultats obtenus sont présentés dans les figures suivantes (figure : III.01, figure : III.02, figure : III.03, figure : III.04, figure : III.05). Les principales bandes caractéristiques des alginates sont fournis dans un tableau (tableau.III.04) :

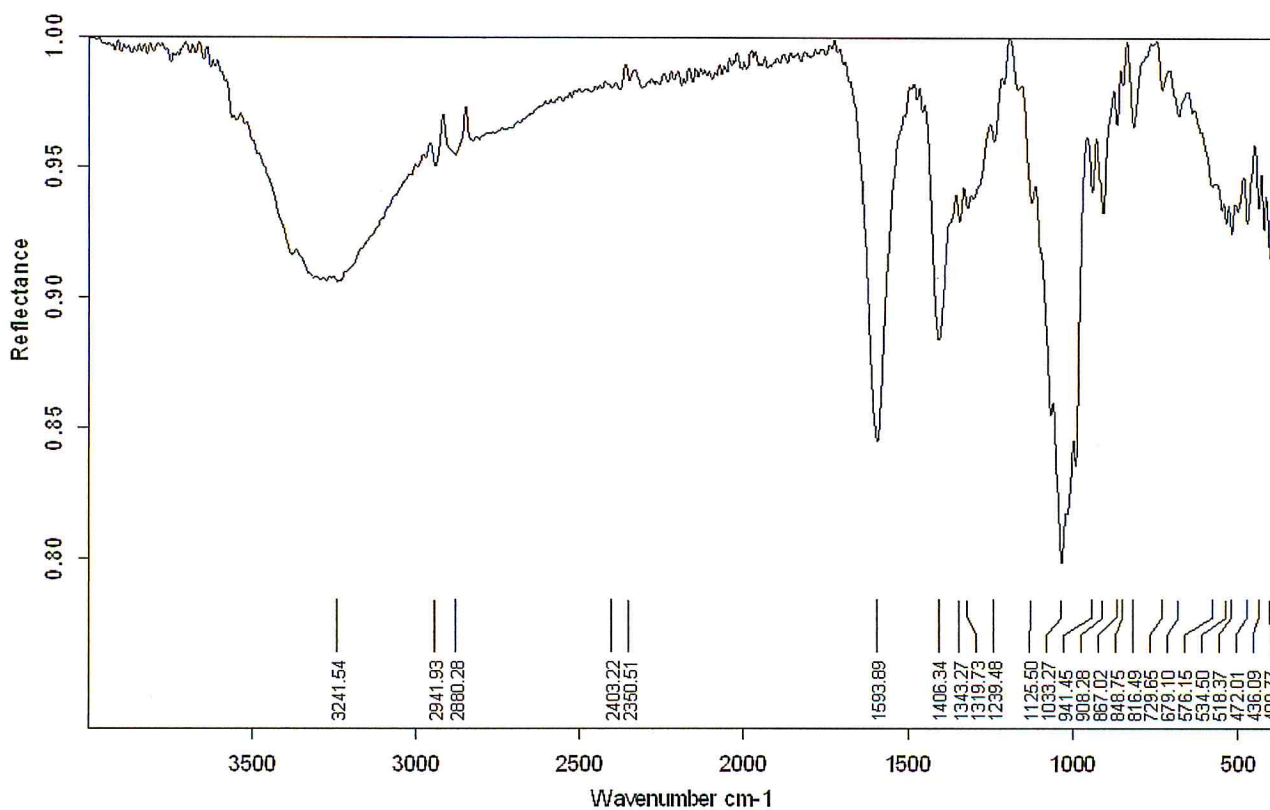


Figure III.01 : Spectre IR de l'alginate commercial.

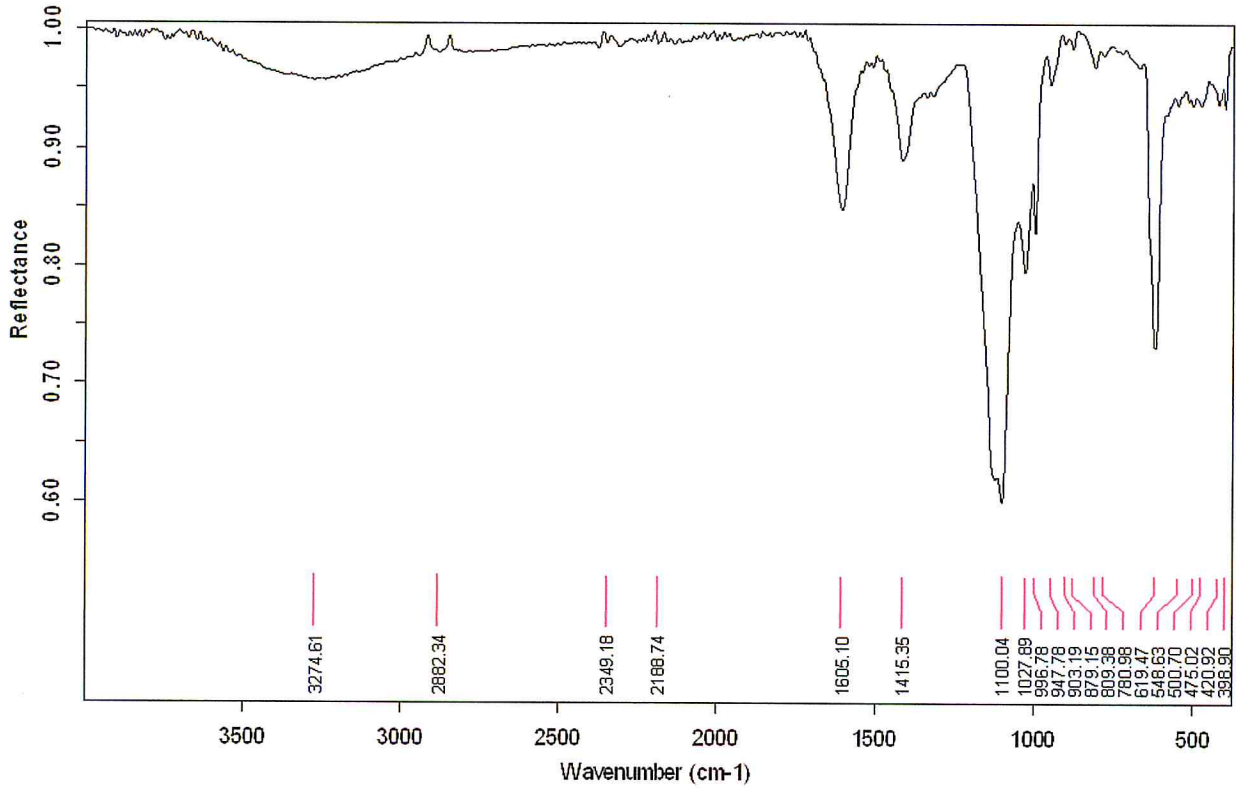


Figure III.02 : Spectre IR de l'alginate extrait de *Dictyota dichotoma* (DA).

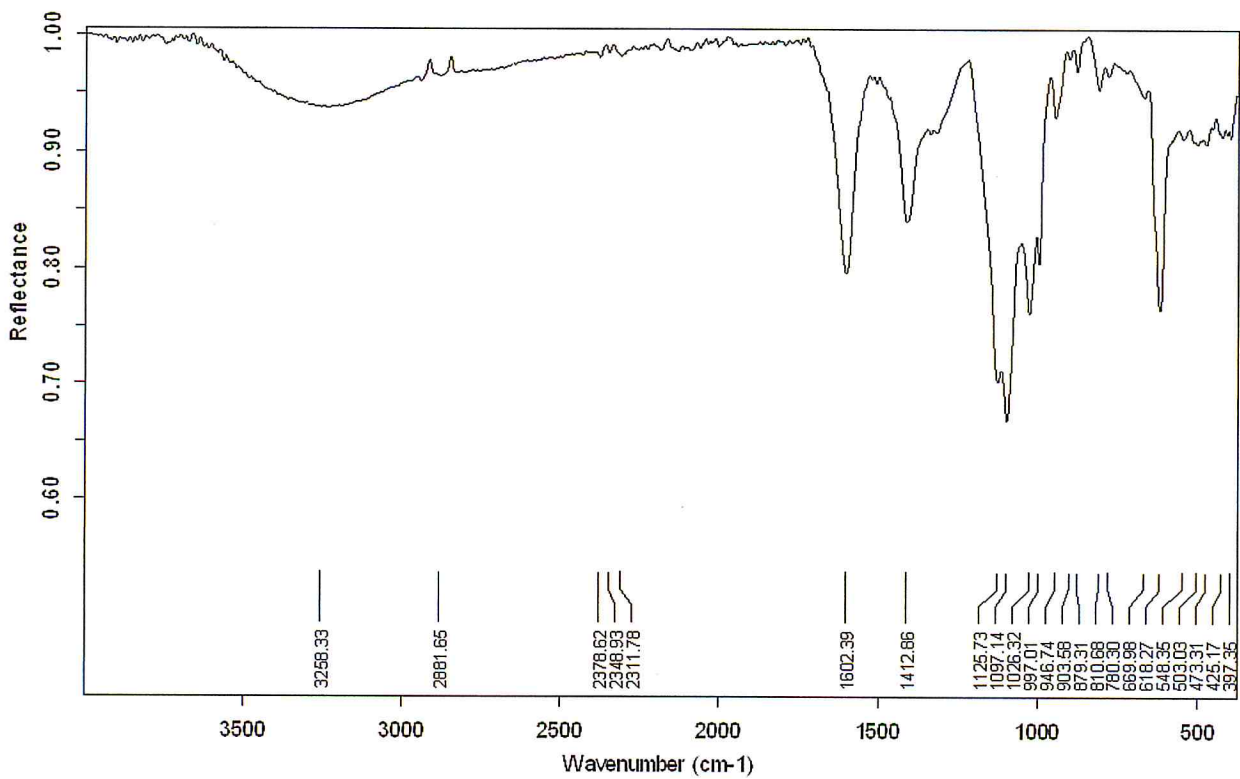


Figure III.03 : Spectre IR de l'alginate extrait de *Dictyopteris membranacea* (DS).

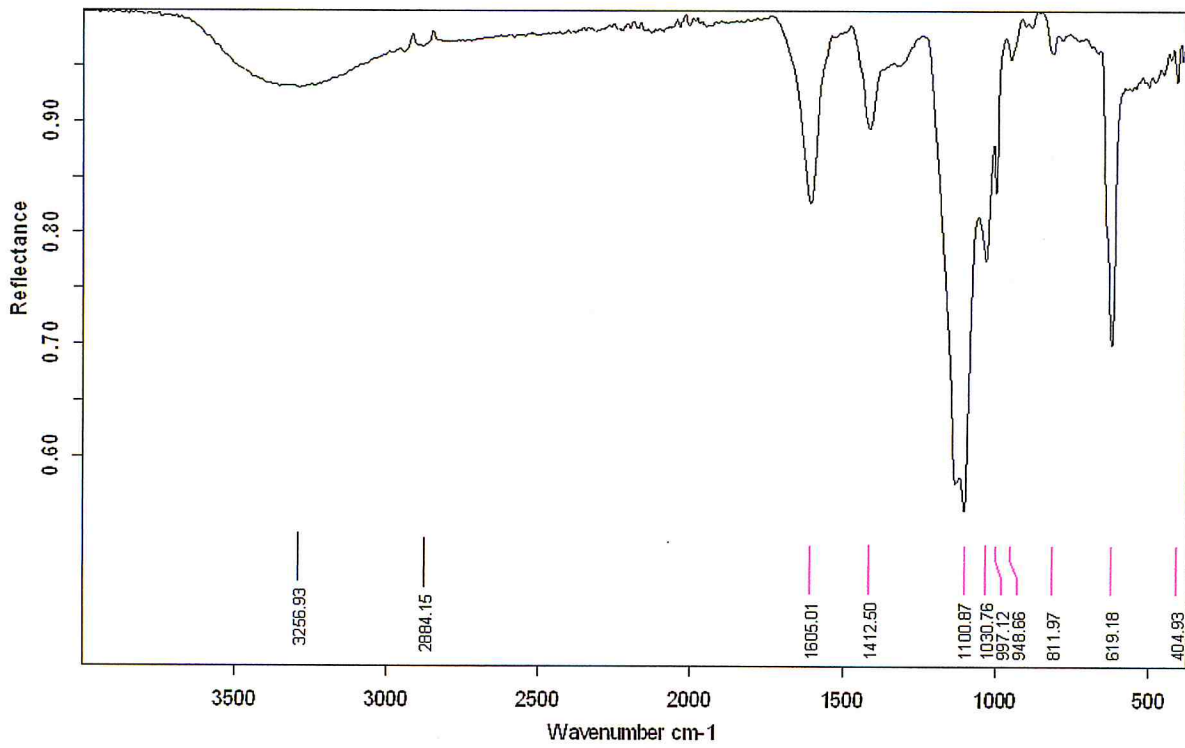


Figure III.04 : Spectre IR de l'alginate extrait de *Sargassum vulgare* (S).

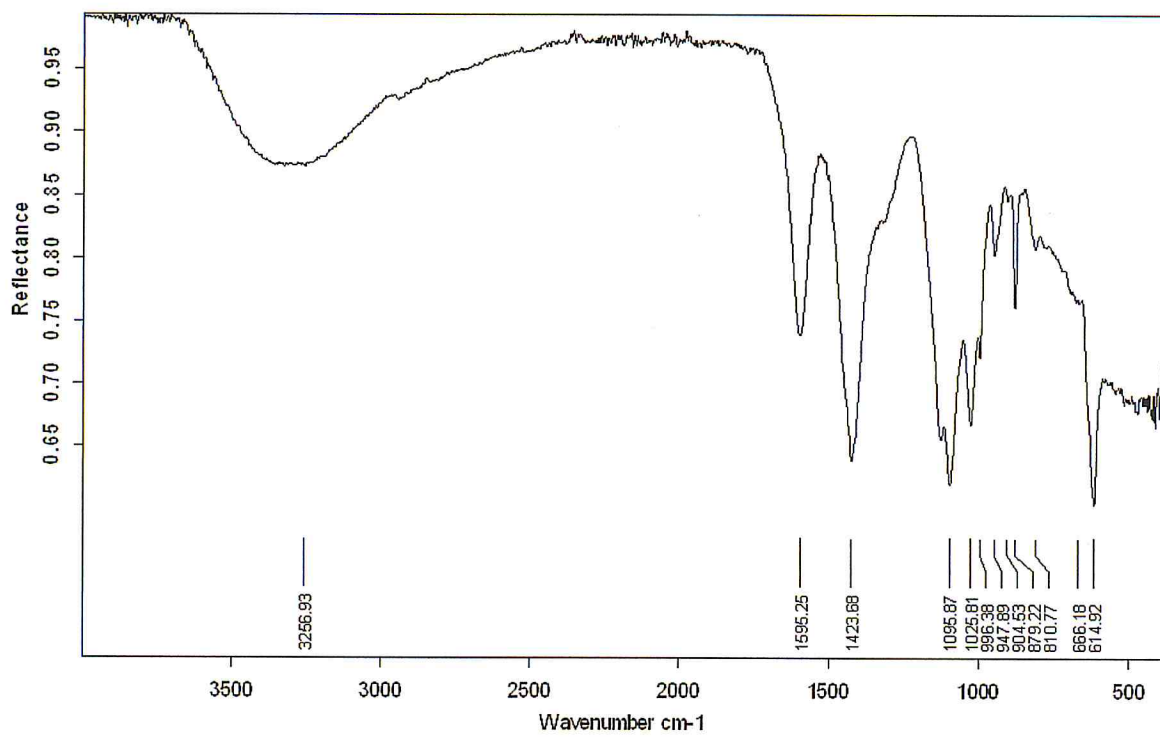


Figure III.05 : Spectre IR de l'alginate extrait de *Cystoseira stricta* (Cys).

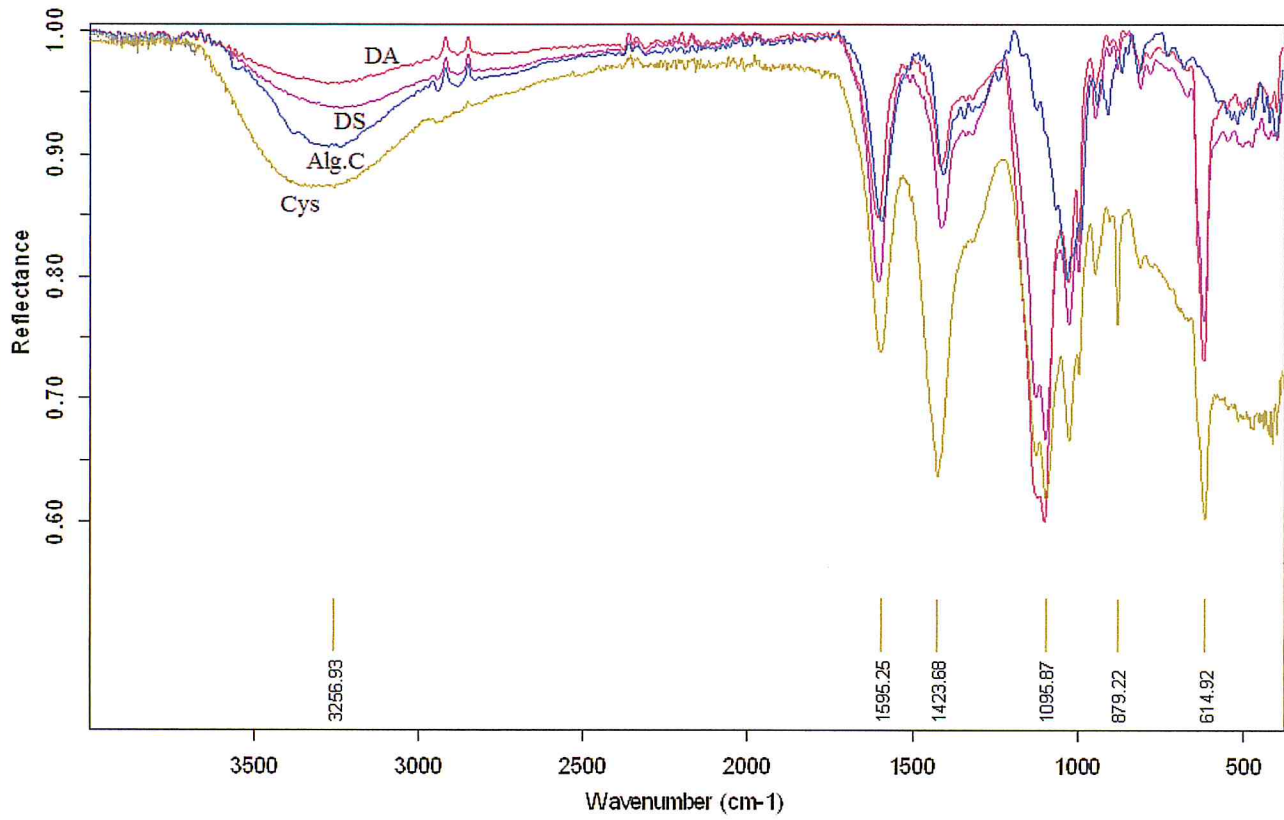


Figure III.06 : Superposition des spectres IR des alginates (DA, DS, commercial et Cys).

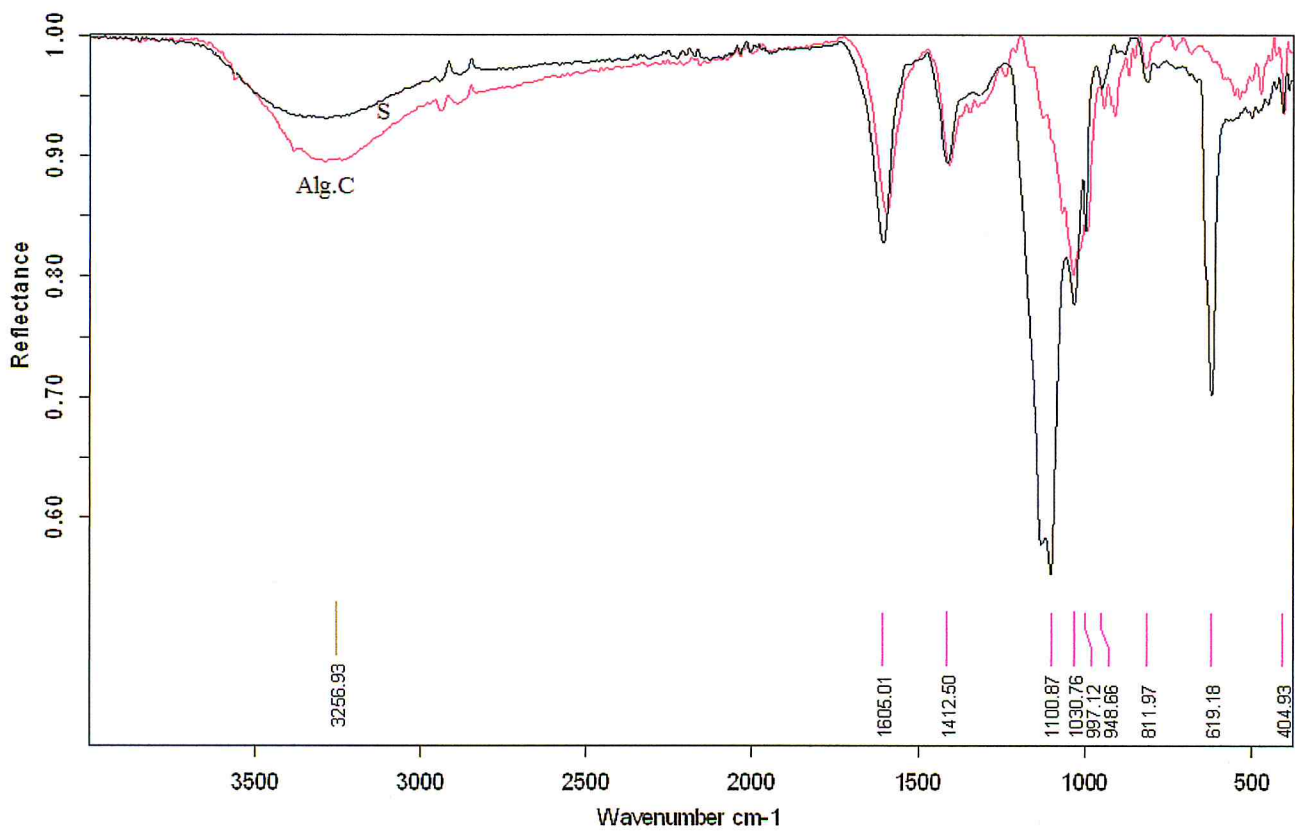


Figure III.07 : Superposition des spectres IR des alginates (S et commercial).

Tableau III.04 : Les principales bandes caractéristiques des alginates.

Bandes d'absorption (cm ⁻¹)					Attribution
Alg.C	Alg.S	Alg.DA	Alg.DS	Alg.Cys	
3241	3256	3274	3258	3256	Vibration d'élongation du groupement —OH
1593	1605	1606	1601	1595	Vibration d'élongation asymétrique du COO ⁻
1406	1412	1417	1410	1423	Vibration d'élongation symétrique du COO ⁻
946	948	947	946	946	Vibration d'élongation -C-O d'acide uronique

Discussion

Les spectres IR des alginates : S, DA, DS, Cys ainsi que celui de l'alginate commercial mettent en évidence la présence de plusieurs bandes caractéristiques. La bande large vers 3300 cm⁻¹ est relative à la vibration d'élongation du groupement —OH. Les deux bandes vers 1600 cm⁻¹ et 1415 cm⁻¹ sont spécifiques des vibrations d'élongation carboxylate (COO⁻) asymétrique et symétrique, respectivement (Papageorgiou et al., 2010). Les bandes mesurées à 1090 et 1033 cm⁻¹ peuvent être attribuées à C -O vibrations d'élongation et C -O (et C-C) vibrations d'élongation des anneaux pyranose, respectivement. Le groupe à 946 cm⁻¹ est indicatif de la présence d'acide uronique (Chandia et al., 2001).

Tous les spectres des alginates extraits se montrent typiques par rapport au spectre de l'alginate commercial (on remarque une différence dans le IR de Cys, où le pic vers 1400 cm⁻¹ montrent plus intense que celui de 1600 cm⁻¹ ce qui n'est pas le cas dans les autres spectres).

Les propriétés physico-chimiques des solutions et des gels d'alginate en milieux aqueux dépendent de leur structure, c'est-à-dire de la proportion des résidus mannuroniques par rapport à ceux guluroniques (rapport noté M/G) ainsi que du nombre et de la

longueur des blocs MM, GG et MG. La technique la plus utilisée pour calculer ce rapport est la RMN du proton (RMN 1H). Plusieurs auteurs tentent également l'estimation de ce rapport moyennant la spectroscopie infrarouge. Par exemple, (Filippov et al., 1974) ont établi le calcul en utilisant le rapport entre l'absorbance du pic 1125 et le pic 1030 cm⁻¹. Vu qu'on n'a pas pu effectuer des analyses par RMN, on a tenté d'estimer le rapport M/G en adoptant cette technique. Ce dernier est de : **0.76, 0.96, 0.81, 0.91** et **1.07** pour **S, Cys, DA, DS** et **alginate commercial**, respectivement.

En comparaison avec les données de la littérature (tableau III.05), les quatre espèces semblent présenter des rapports M/G supérieurs à ceux de certaines alginophytes telles que *Lessonia trabeculata* (M/G = 0.43) et *Laminaria hyperborea* (M/G = 0.41) et restent tout de même inférieurs à ceux de *Duroillaea antarctica* (M/G = 3) et *Laminaria digitata* (M/G = 1.5). On remarque que *Sargassum filipendula* (M/G = 0.67-0.78) et l'espèce étudiée *Sargassum vulgare* (M/G = 0.76) ont des rapports M/G très proches, idem pour *Dictyopteris polypodioides* (M/G = 0.99) et l'espèce étudiée *Dictyopteris membranacea* (M/G = 0.91).

Tableau III.05 : Comparaison du rapport M/G des espèces étudiées avec celui d'autres Phéophycées.

Alginophyte	Origine	M/G	Références
<i>Durvillaea antarctica</i>	Nouvelle Zélande	3	Miller, 1996
<i>Lessonia trabeculata</i> (lame)	Chili	0.43	Chandía et al., 2001
<i>Laminaria digitata</i>	Norvège	1.5	Stokke et al., 1991
<i>Laminaria hyperborea</i> (stipe)	Norvège	0.41	Grasdalen, 1983
<i>Laminaria hyperborea</i> (lame)	Norvège	0.96	
<i>Sargassum filipendula</i>	Brésil	0.67-0.78	Bertagnolli et al., 2014
<i>Dictyopteris polypodioides</i>		0.99	
<i>Dilophys ligulatus</i>	Maroc	0.99	Belattmania et al., 2015
<i>Halopteris scoparia</i>		1.0	
<i>Cystoseira stricta</i>		0.96	
<i>Dictyota dichotoma</i>	Algérie	0.81	
<i>Dictyopteris membranacea</i>		0.91	Notre étude
<i>Sargassum vulgare</i>		0.76	

A la lumière de ces résultats, nous pouvons avancer que nos échantillons d'alginate sont aptes à former des gels souples et élastiques. Penman et Sanderson (1972) rapportent, en effet, que des gels cassants sont obtenus à partir d'alginate à faible rapport M/G tandis que des gels élastiques sont formés à partir d'alginate avec un rapport M/G élevé. Comme déjà mentionné en synthèse bibliographique ce rapport dépend du type d'algue brune, de la période de récolte de l'algue, et de la partie de l'algue étudiée (Donati et al., 2005).

III.2.2. Le test de viscosité

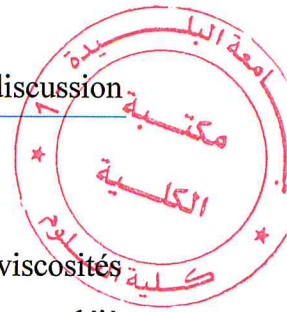
Les résultats du test de viscosité sont mentionnés dans le tableau (tableau III.06), ils sont ensuite comparés aux résultats d'une autre étude (tableau III.07) :

Tableau III.06 : La viscosité (mPa.s) à 1% de l'alginate de sodium commercial et des alginate extraits des quatre espèces locales étudiées.

Alginates Paramètres	Alg.S	Alg.DA	Alg.DS	Alg.Cys	Alg.C
T(C°)	22,5	21,8	22,1	21,6	22,2
pH	8,6	10,6	10,2	12,7	8,3
Viscosité (mPa.s) à 1%	19,4	59,1	8,7	3,6	94,3

Tableau III.07 : La viscosité (mPa.s) d'alginate de sodium extraits de trois espèces d'algues brunes de la côte Marocaine.

Espèces	<i>Halopteris scoparia</i>	<i>Dictyopteris polypodioides</i>	<i>Dilophus ligulatus</i>	Référence
Viscosité (mPa.s) à 1%	1.92	3.59	15.75	Belattmania et al., 2015



Discussion

Les viscosités de DA et S (tableau III.06) appartiennent à la gamme des basses viscosités proposées dans le commerce vont de : 75 à 1 500 centipoises (15 à 300 mPa.s). Comme déjà mentionnée dans la synthèse bibliographique la viscosité des alginates dépend de plusieurs facteurs, elle dépend du degré de polymérisation, la concentration, la température, le pH et la présence d'ions di ou trivalents (Pérez et al., 1992).

- Pour l'alginate extrait de *Cystoseira stricta*, on remarque une très grande diminution de la viscosité, en sachant que lors de l'extraction, le gel d'alginate extrait de Cys était plus visqueux que celui de S et de DS, on constate alors qu'il y a une dépolymérisation à cause de son pH >11 : Il n'y a pas de variation de viscosité entre pH 5 et pH 11. Au-dessus de pH 11, il y a une dépolymérisation et baisse de la viscosité (Pérez et al., 1992).
- L'alginate extrait de *Dictyota dichotoma* est le plus visqueux des extraits, ce résultat est en accord avec les résultats de l'étape de l'extraction, sa viscosité est proche de l'alginate commercial.
- L'alginate extrait *Dictyopteris membranacea* avait le gel le moins visqueux lors de son extraction, sa viscosité est effectivement la plus faible.
- L'alginate extrait de *Sargassum vulgare* possède le pH le plus proche de l'alginate commercial, sa viscosité est inférieure à celle de DA et supérieure à DS, ces résultats sont en accord avec les résultats de l'étape de l'extraction.

En comparant nos valeurs de viscosité à ceux du (tableau III.06), on constate une certaine similarité à ceux obtenus pour les Fucales étudiées au Maroc, les valeurs de viscosité des extraits S et DA sont supérieures à ceux du (tableau III.06), or ceux de DS et Cys sont inférieurs à l'espèce *Dilophus ligulatus*.

La viscosité de nos extraits a été influencée par plusieurs paramètres : le pH a été le principal facteur, l'origine de l'algue et le taux d'humidité de la poudre d'alginate ont eux aussi pu influencés les valeurs de la viscosité des extraits.

III.2.3. Caractérisation par diffraction des rayons X (DRX)

La caractérisation structurale a été effectuée par diffraction des rayons X, les diffractogrammes de l'alginate commercial et des quatre alginates extraits sont fournis dans les figures suivantes :

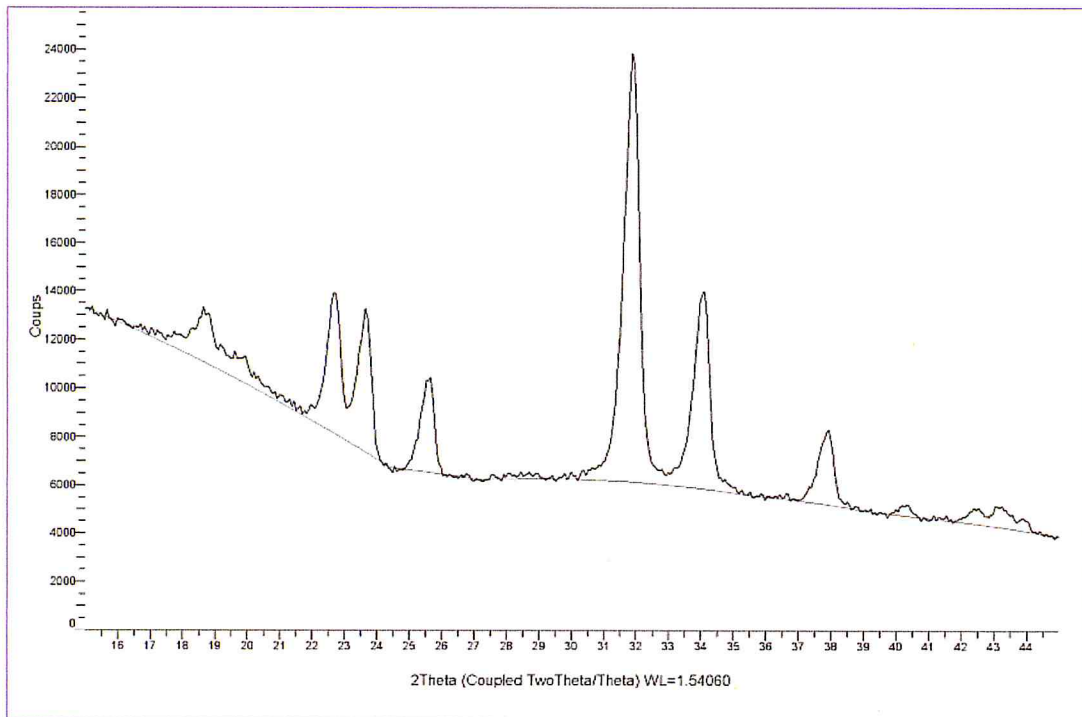


Figure III.08 : Diagramme de diffraction des rayons X de l'alginate S.

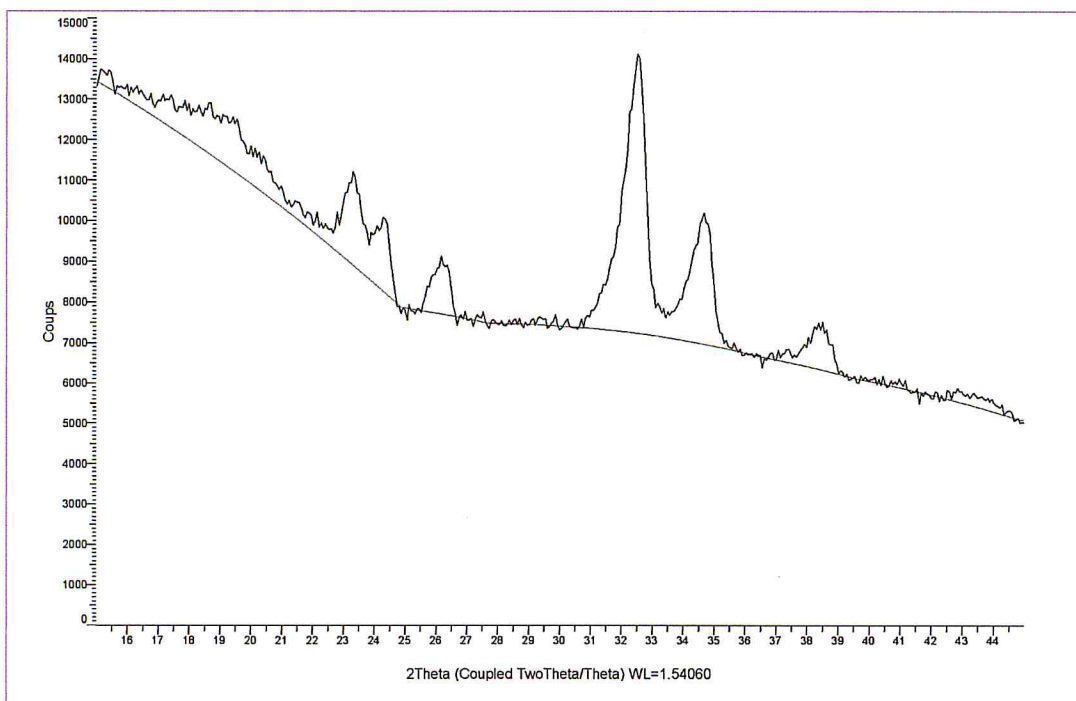


Figure III.09 : Diagramme de diffraction des rayons X de l'alginate DA.

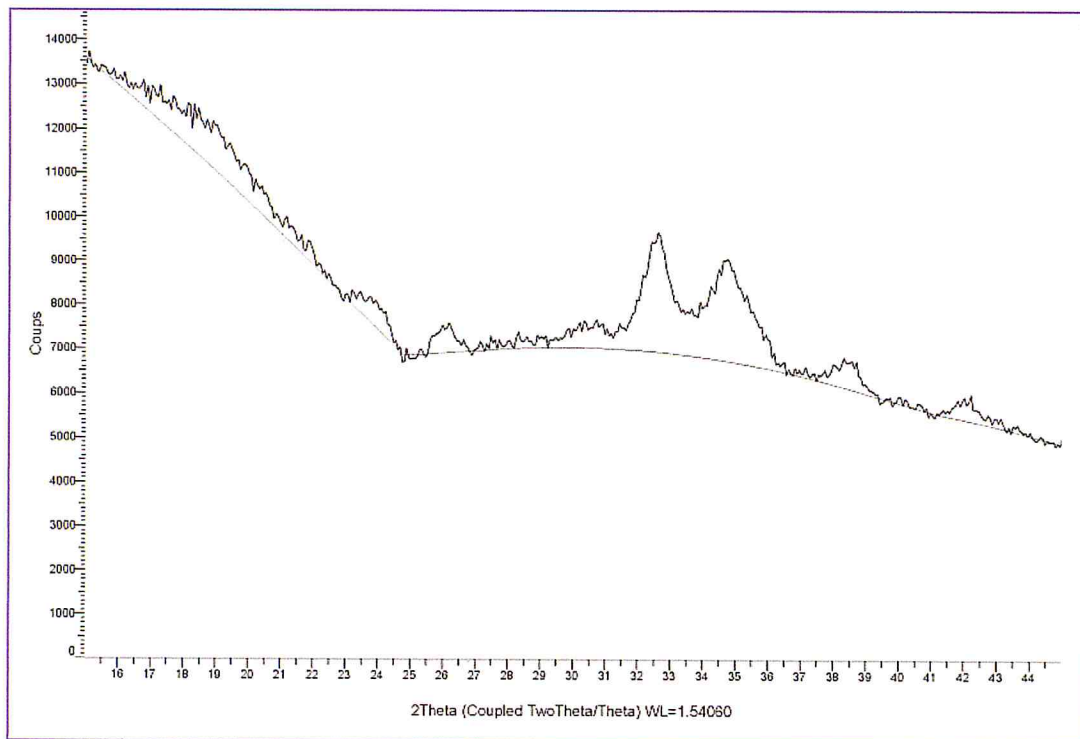


Figure III.10 : Diagramme de diffraction des rayons X de l'alginate Cys.

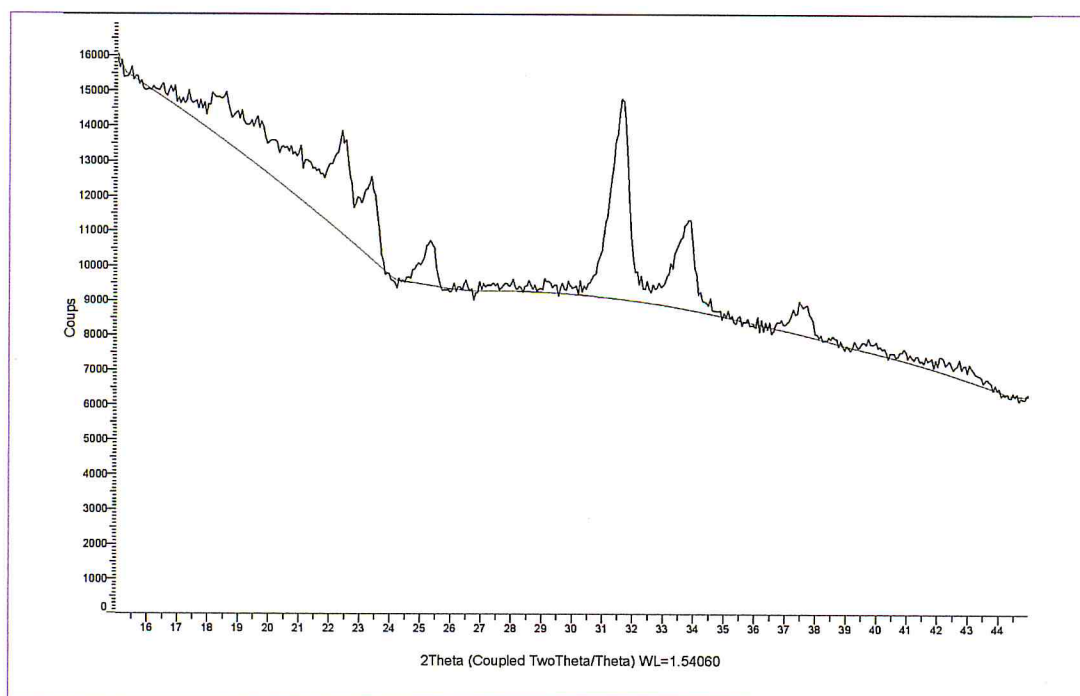


Figure III.11 : Diagramme de diffraction des rayons X de l'alginate DS.

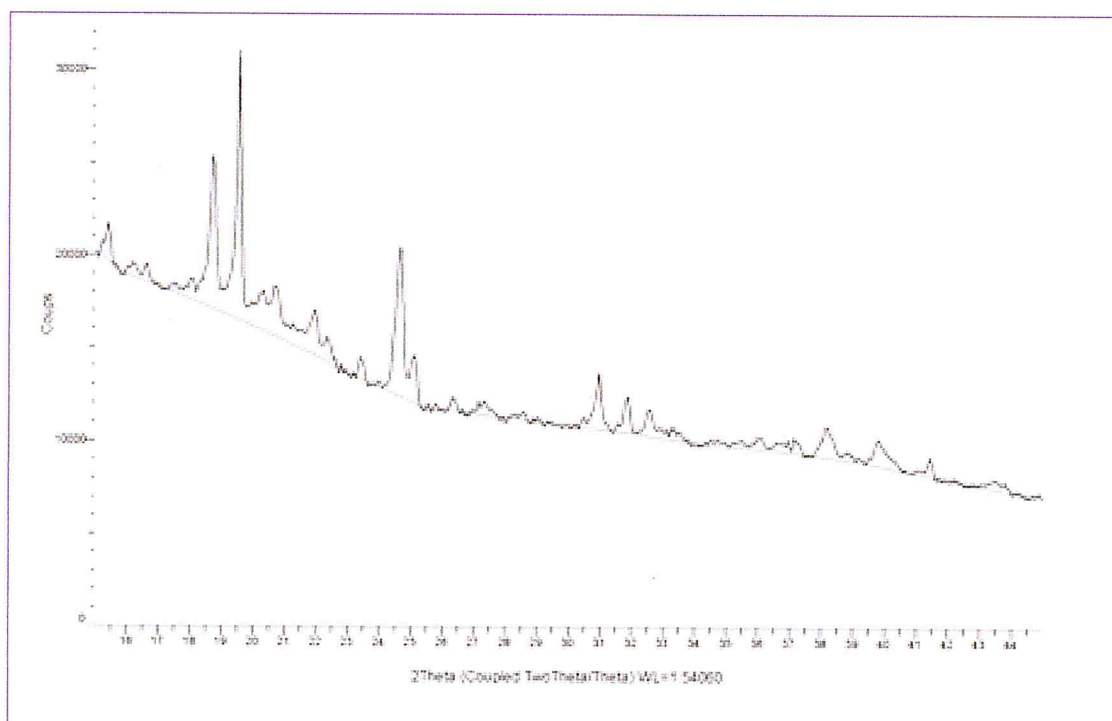


Figure III.12 : Diagramme de diffraction des rayons X de l'alginate commercial.

Discussion

Cette analyse a permis de mettre en évidence la différence structurale entre la poudre d'alginate de sodium commercial et les poudres des alginates extraits. On constate la présence de pics intenses à différentes positions pour l'alginate commercial et pour les quatre alginates extraits, ce qui montre que toutes les poudres présentent un certain taux de cristallinité.

L'alginate de sodium a généralement un certain taux de cristallinité due à une forte interaction intermoléculaire entre les chaînes d'alginate par l'intermédiaire de liaison hydrogène (Fang et al., 2011), or on a remarqué que le taux de cristallinité des alginates varie selon l'origine de l'algue, les pics sont plus au moins intense selon l'espèce.

Partie 2 : Encapsulation du jus de betterave

III.1. Morphologies des billes

Les billes préparées pour cette étude ont été observées avec une loupe puis au microscope optique (figure III.13 et figure III.14).

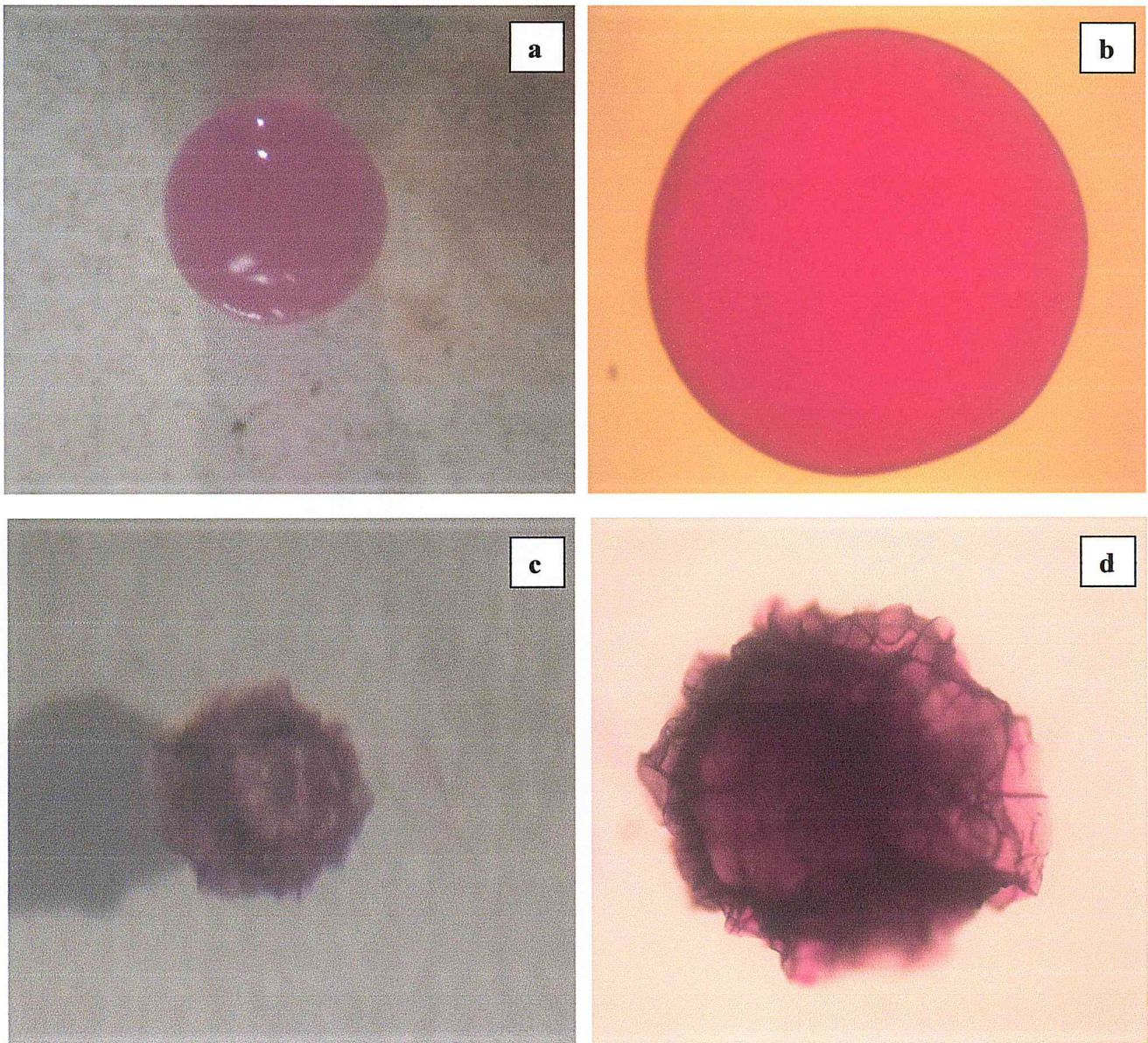


Figure III.13: Morphologie des billes B.C : **a** : bille fraîche observée à la loupe, **b** : bille fraîche observée au microscope optique, **c** : bille lyophilisée observée à la loupe, **d** : bille lyophilisée observée au microscope optique.

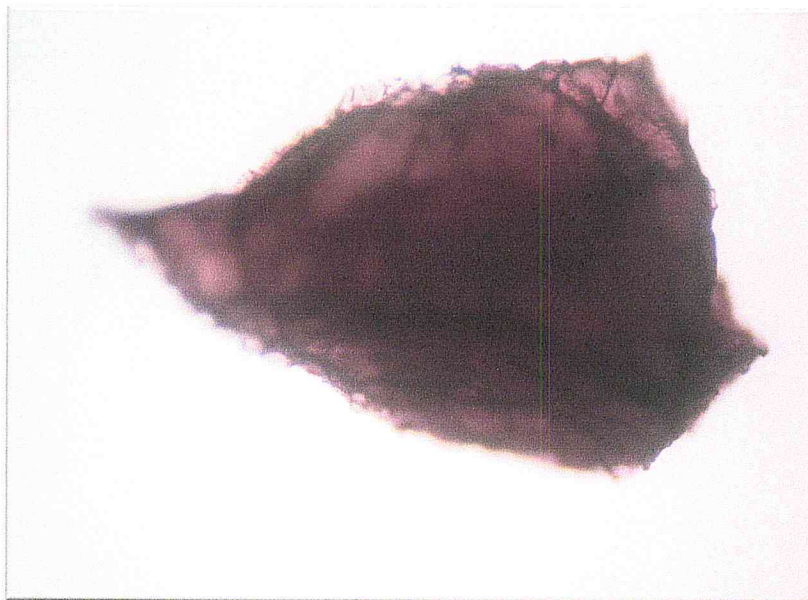


Figure III.14 : Morphologie de bille **B.S** lyophilisée observée au microscope optique.

Discussion

Les billes humides **B.C** sont sphériques et restent sphériques lors du séchage (figure III.13) , les billes préparées avec l'alginate extrait de *Sargassum vulgare* **B.S** prennent une forme un peu allongée (figure III.14).

Les billes fraîches présentent une surface lisse (figure III.13 a,b). Lors du séchage, la surface devient irrégulière (figure III.13 c,d et figure III.14), on remarque que les billes **B.S** ont une surface plus régulière que celle des billes **B.C**, on pense que c'est à cause de la différence de viscosité et du rapport M/G entre l'alginate commercial et l'alginate **S**.

Les billes **B.C** (figure III.13) ont un diamètre d'environ 3 mm pour les billes fraîches et d'environ 1 mm pour les billes lyophilisées. Ces dimensions sont proches pour les billes d'alginate **B.S**.

Microscope à balayage électronique (MEB) :

Les billes **B.C** ont été analysées par microscopie électronique à balayage **MEB**, cette méthode de caractérisation va nous permettre d'apprécier la morphologie et la surface des billes.

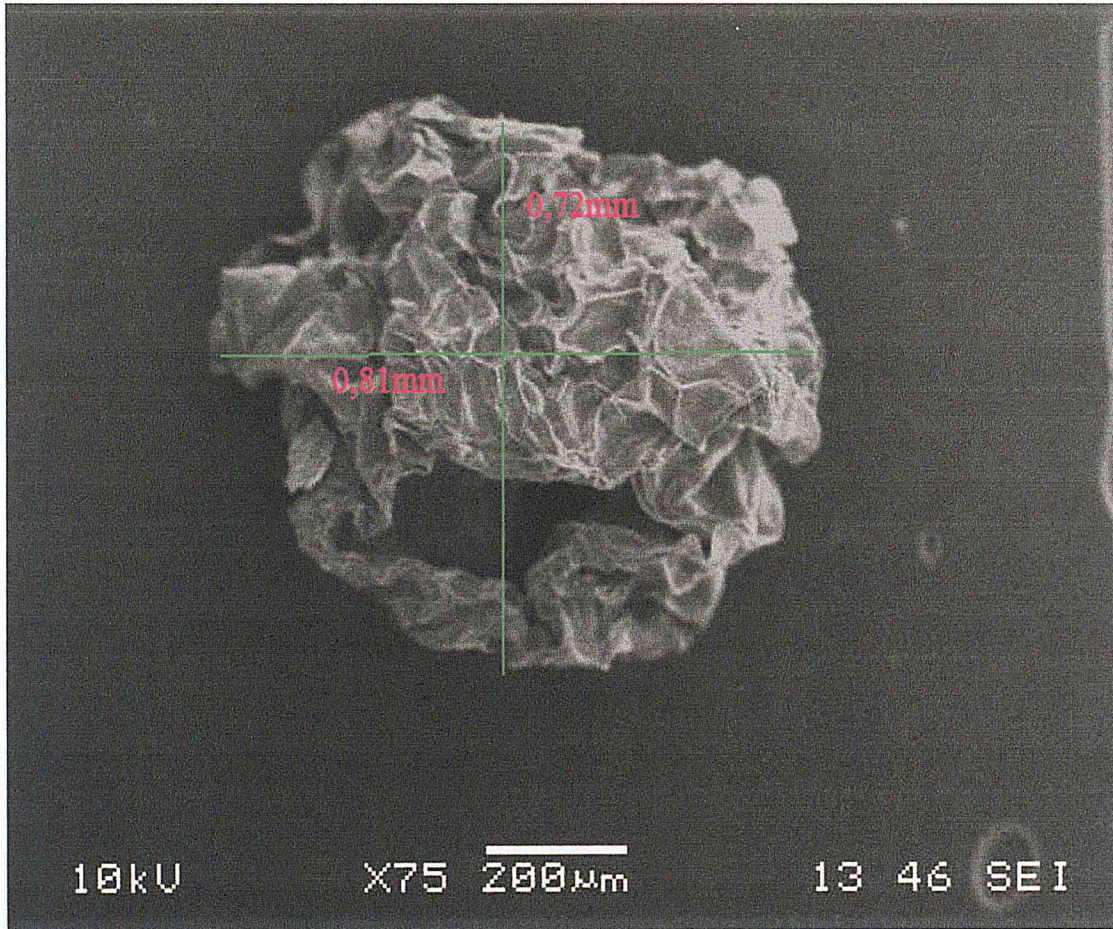


Figure III. 15 : Cliché de microscope à balayage électronique : bille B.C lyophilisée.

Discussion

Les microcapsules ont subi un écrasement important dans leur réseau, elles n'apparaissent plus sphériques mais aplaties avec une surface très irrégulière et rugueuse. Elles ont de plus l'aspect d'une coquille plus au moins recroquevillée sur elle-même avec un système poreux à l'intérieur qui apparaît similaire à celle d'une éponge. (figures III.15 et figure III.16)

Les billes humides contiennent environ 97% d'eau en masse. Le mode de séchage a une grande influence sur les propriétés morphologiques et texturales des billes obtenues à base d'alginate. La pression utilisée (0,044 mbar) au cours du processus de séchage lyophilisation a été la responsable de la déformation de la surface des billes.

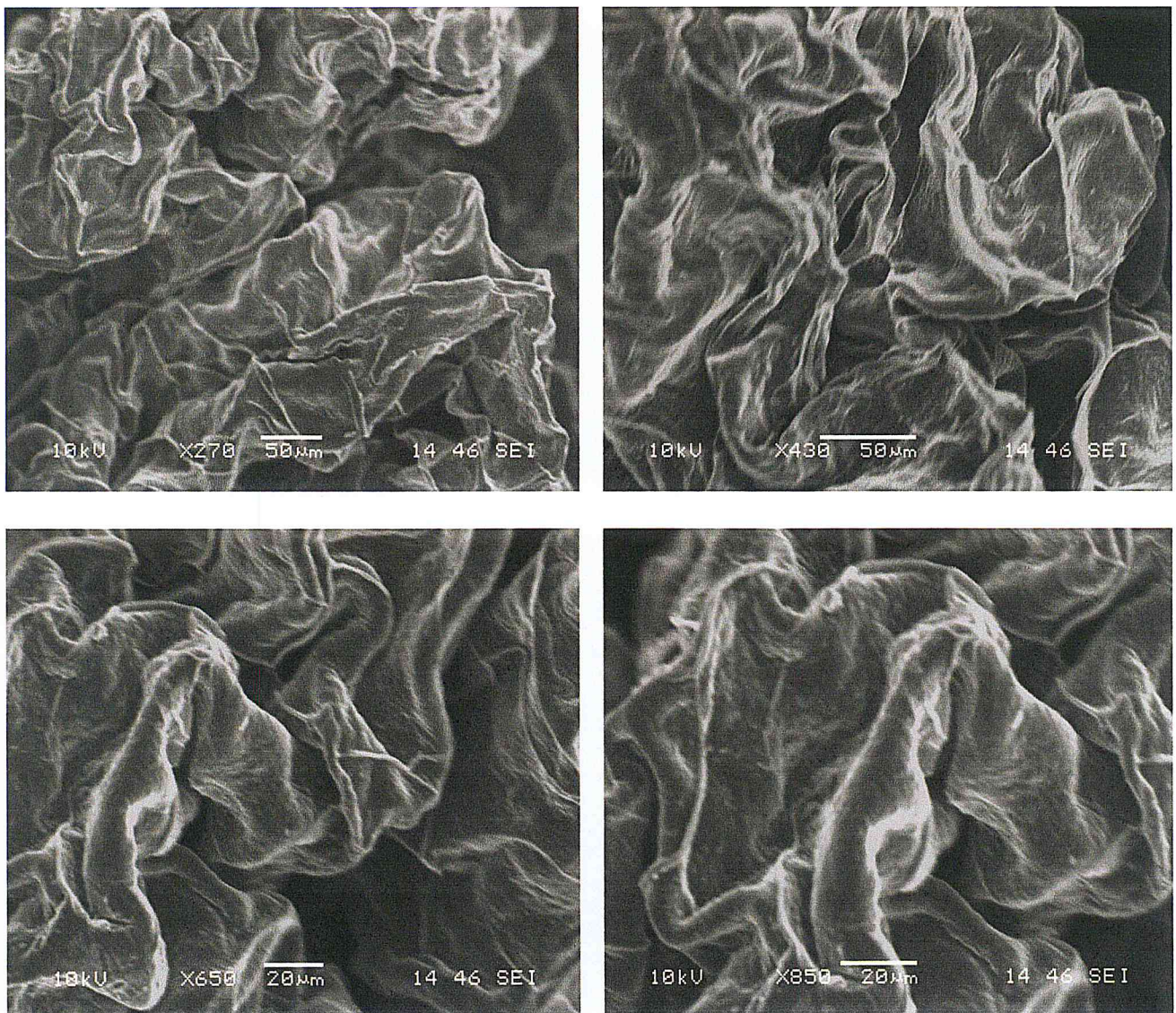


Figure III. 16 : Clichés MEB à différents agrandissements : bille B.C lyophilisée (vue de l'extérieur).

III.2. Taille, Taux de gonflement S (%) et Taux d'humidité TH (%) des billes

Les résultats obtenus des diamètres, des taux d'humidité ainsi que des taux de gonflement des billes sont reportés ci-dessous (tableau III.08) :

Tableau III.08 : Valeurs des diamètres, S(%) et TH(%) des différentes billes synthétisées

Billes	B.C	B.S	B.jl
Diamètre			
(mm) humide	2,7 ± 0,2	3,1 ± 0,2	2,6 ± 0,1
Diamètre			
(mm) sèche	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,8 ± 0,1
S(%)	97,59	92,34	94,72
TH(%)	12,9	13,21	11,33

Discussion

Les billes sont relativement homogènes en taille ; la taille augmente légèrement lorsque les billes encapsulent une plus grande quantité de principe actif (jus de betterave lyophilisé) : **B.jl** > **B.C**.

La diminution du diamètre au cours du processus du séchage est avec une perte de masse de 90-98%.

Le taux d'humidité obtenu est de l'ordre de $11,85 \pm 0,6$ %. Il varie un peu avec la composition des billes.

III.3. Caractérisation par spectrométrie infrarouge

L'analyse des alginates par spectroscopie infrarouge (FTIR - ATR) nous a permis de déterminer les groupes fonctionnels caractéristiques présents des billes d'alginates et du jus de betterave lyophilisé. Les résultats obtenus sont présentés dans les figures (III.17, III.18, III.19, III.20). Les principales bandes caractéristiques des billes et du jus sont fournis dans un tableau (tableau.III.09).

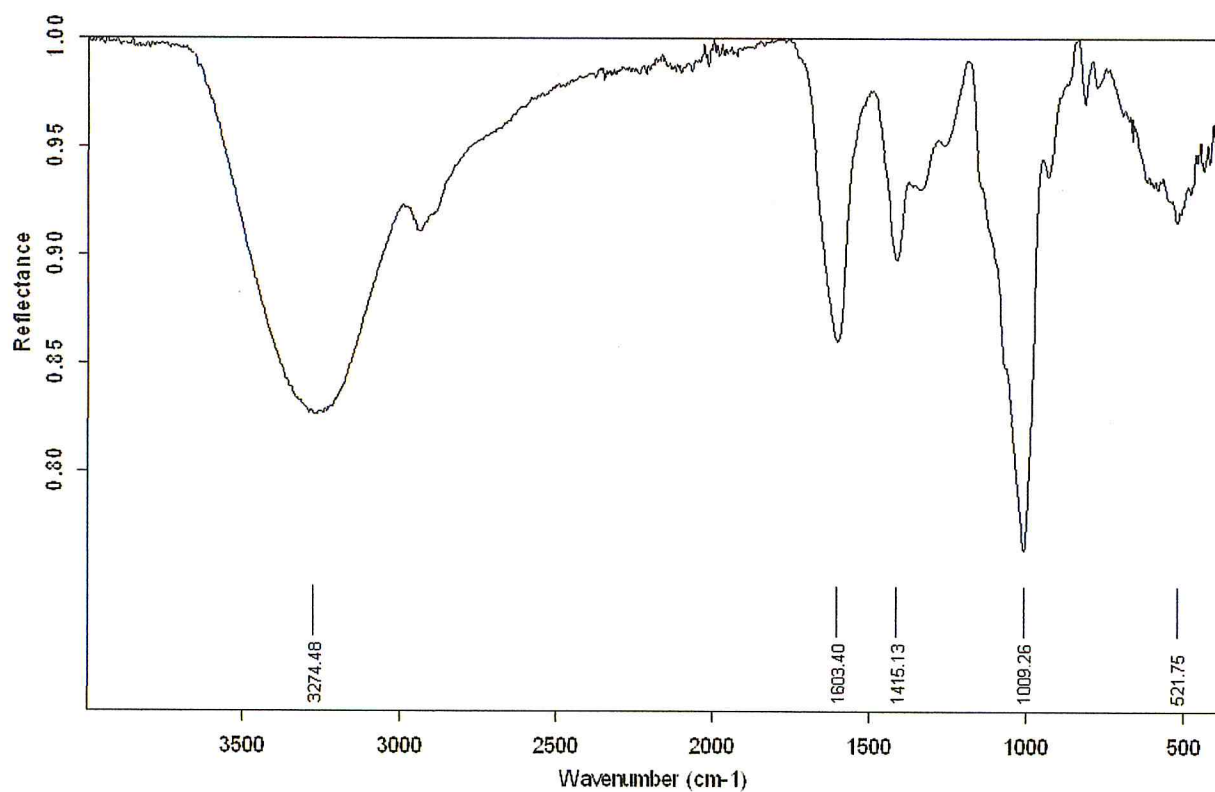


Figure III.17 : Spectre IR des billes l'alginate B.C.

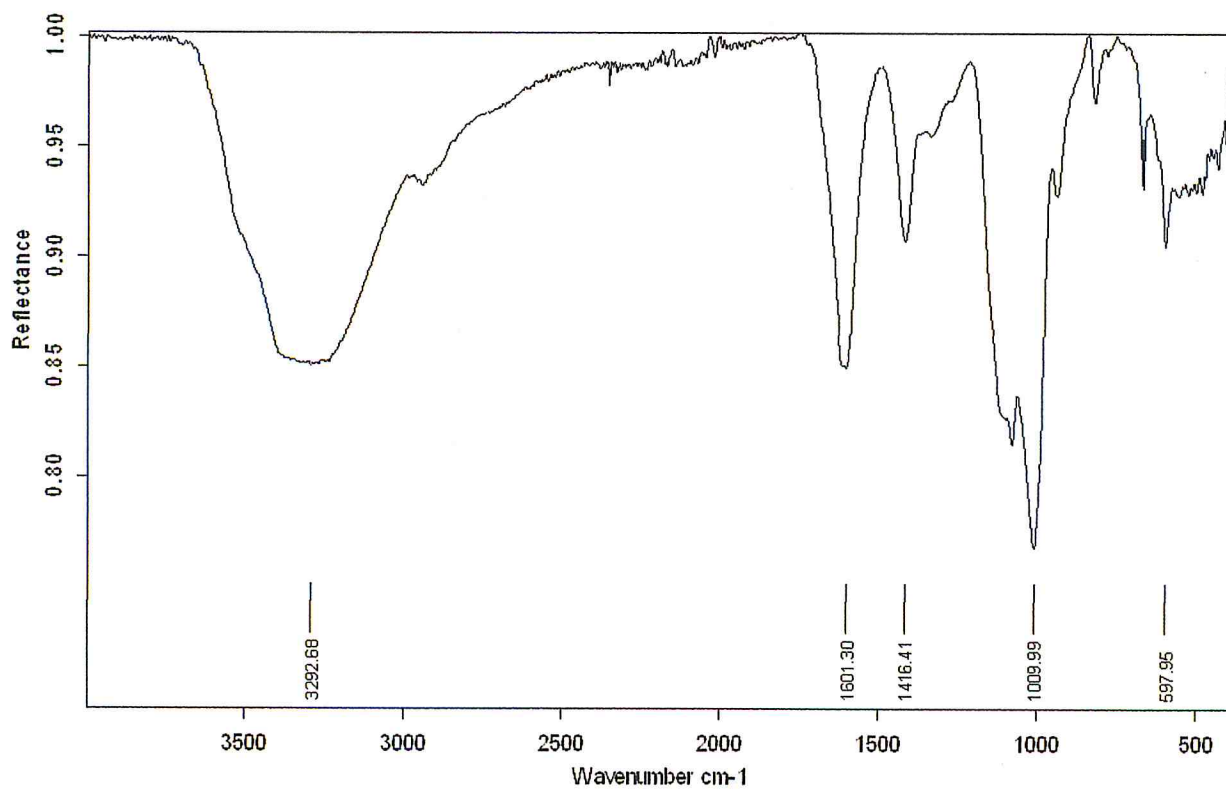


Figure III.18 : Spectre IR des billes l'alginate B.S.

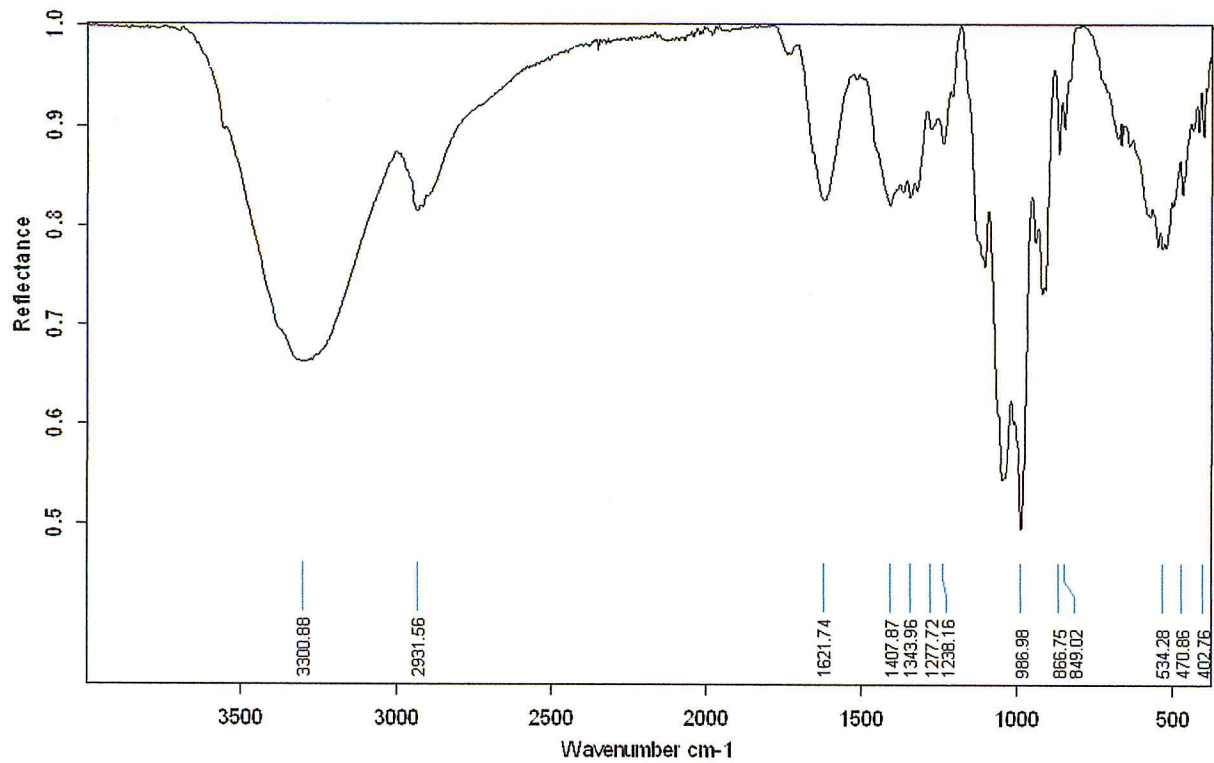


Figure III.19 : Spectre IR du jus de betterave lyophilisé.

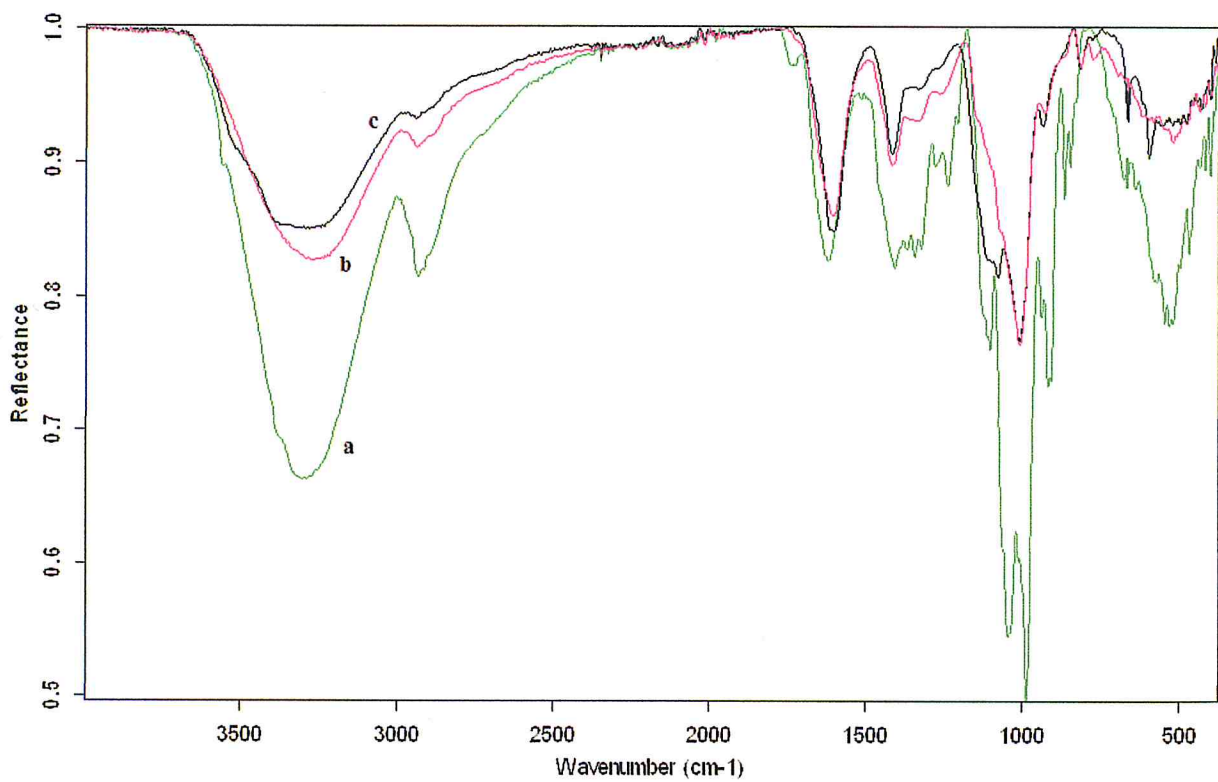


Figure III.20 : Superposition des spectres IR a : jus betterave lyophilisé, b : billes B.C, c : billes B.S.

Tableau III.09 : Les principales bandes des spectres IR des billes et du jus de betterave.

Bandes d'absorption (cm ⁻¹)			Attribution
Jus de betterave lyophilisé	Billes (B.C)	Billes (B.S)	
3300	3274	3292	Vibration d'élongation du groupement —OH et N-H
1621	1603	1601	Vibration de déformation N-H (amines primaires)
1407	1415	1416	Vibration de déformation symétrique C- H
534	521	597	Vibration de déformation C=O

Discussion

Après complexation avec Ca⁺² et séchage, aucun déplacement notable des bandes caractéristiques de l'alginate n'est observé.

Les caractérisations effectuées en spectroscopie infra rouge confirment, la présence conjointe de l'alginate et du jus de betterave. Ainsi sur les spectres enregistrés (figure III.17, III.18, III.19, III.20), il est possible d'observer les bandes caractéristiques de l'alginate décrites précédemment (partie I : extraction et caractérisation des alginate) et parallèlement, les bandes caractéristiques du jus de betterave : vibration d'élongation du groupement —OH et N-H et déformation N-H (amines primaires) vers 3300 et 1620 cm⁻¹ (Molina et al., 2014) respectivement (tableau III.09), confirmant l'encapsulation du jus de betterave.

Il est intéressant de souligner que dans le cas de séchage par lyophilisation toutes les bandes caractéristiques de l'alginate et du jus de betterave sont présentes, ce qui confirme que la température et pression appliquée n'atteint ni la nature de l'alginate ni celle du principe actif.

D'après ces résultats, nous pouvons donc déduire qu'il n'y a pas de réaction entre les deux matériaux, le jus de betterave et l'alginate, qui conservent leurs principaux groupes fonctionnels.

III.4. Caractérisation par diffraction des rayons X

Les spectres de diffractions des rayons X de l'alginate de sodium commercial et des billes d'alginate lyophilisées sont fournis ci-dessous (figure : III.21 et figure : III.22):

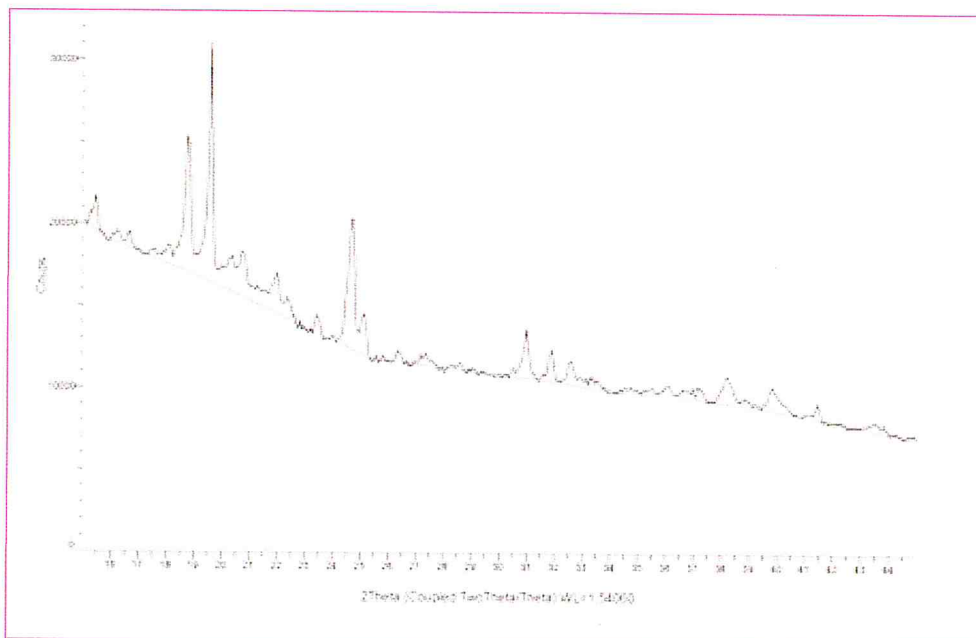


Figure III.21 : Diagramme de diffraction des rayons X de l'alginate de sodium commercial.

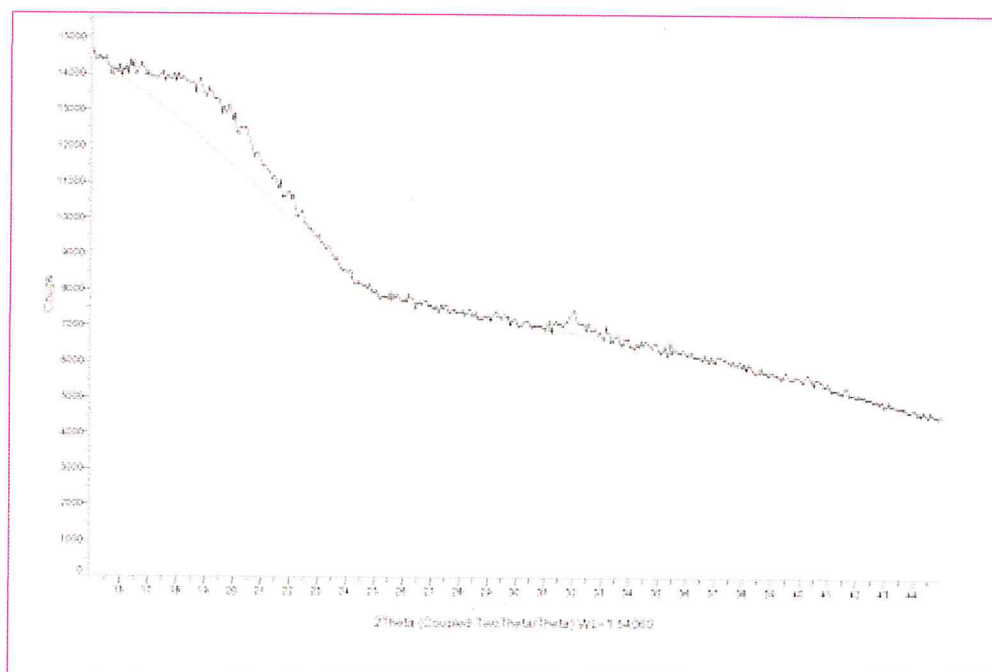


Figure III.22 : Diagramme de diffraction des rayons X des billes d'alginate B.C.

Discussion

Cette analyse a permis de mettre en évidence la différence structurale entre la poudre d'alginate de sodium et la poudre des billes synthétisées. Les diagrammes de diffraction des rayons X de l'alginate commercial et des billes d'alginate sont atypiques.

Le spectre de diffraction des rayons X de l'alginate de sodium montre des pics intenses à environ $2\theta = 18,5^\circ, 19,5^\circ, 24,5^\circ$ (figure III.21).

Le spectre de diffraction des rayons X des billes d'alginate montre un pic large à environ $2\theta = 19^\circ$ (figure III.22).

En comparant les résultats de DRX des billes d'alginate avec l'alginate de sodium pur, il a été observé qu'il y avait un changement significatif dans le diagramme de diffraction. Le diagramme d'alginate montre un certain taux de cristallinité alors que celui des billes montrent une structure quasiment amorphe.

L'élargissement des raies de diffraction ainsi que la diminution des intensités mesurées indiquent une nette diminution de la taille des cristallites. Cela indique que les changements dans l'état cristallin est produit lors de la préparation des billes par la méthode de gélification ionotropique.

L'apparition de large pic dans les billes d'alginate peut être en raison de l'augmentation de l'association des chaînes d'alginate par réticulation ionique qui peuvent déformer les régions cristallines.

III.5. Caractérisation par UV-Visible

III.5.1. Evaluation du taux d'encapsulation

Le spectre de balayage (figure III.23) nous a permis de fixer la longueur d'onde exacte d'absorbance du jus de betterave, la plus grande absorbance a été observée pour une longueur d'onde de $\lambda=535 \text{ nm}$.

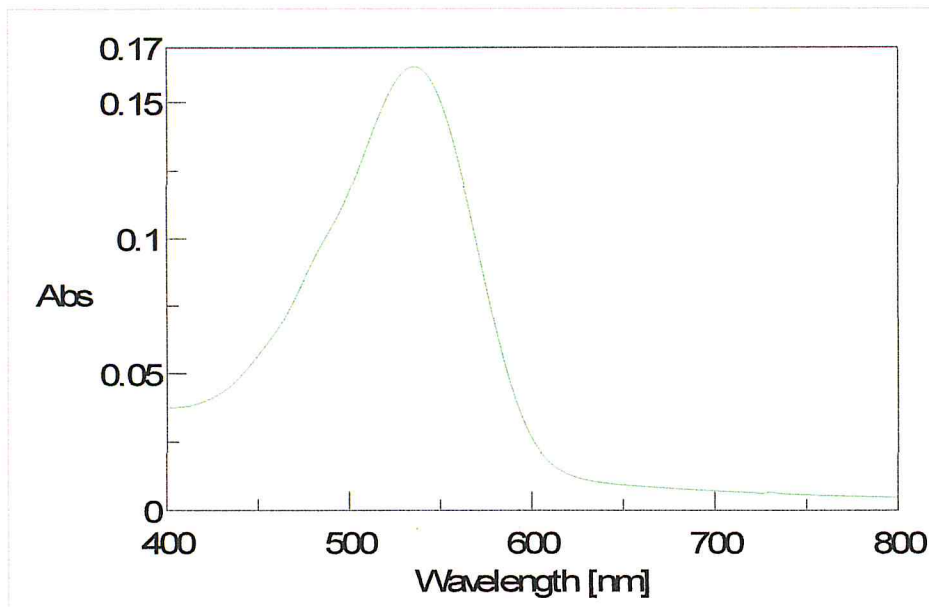


Figure III.23 : Spectre de balayage UV-Visible du jus de betterave fraîche à 1ml/l.

La courbe d'étalonnage de la solution de CaCl_2 (restante après la synthèse des capsules) a été déterminée par UV-Visible à 535 nm (figure III.24) dont l'équation est la suivante:

▪ Solution de CaCl_2 : $Y = 0,0006x + 0,001$ $R^2 = 0,9954$

Le taux d'encapsulation est obtenu à partir du rapport entre la concentration finale encapsulée et la concentration initiale du principe actif mis en solution.

La concentration initiale est connue alors que la concentration finale est déduite de la droite d'étalonnage de la solution de CaCl_2 (figure III.24).

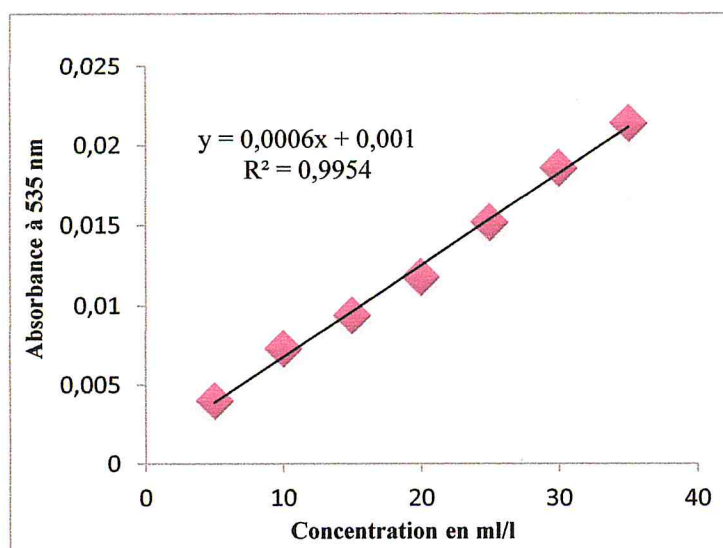


Figure III.24 : Droite d'étalonnage de la solution de CaCl_2 .

En sachant que la concentration initiale est de 400 ml/l et que l'absorbance de la solution de CaCl_2 est de : 0.1351. La concentration de la solution de CaCl_2 sera : 220 ml/l. La concentration finale sera donc : $400 - 220 = 180$ ml/l.

$$\text{Taux d'encapsulation \%} = (180/400) \times 100 = 45.$$

Le taux d'encapsulation est de 45 % il est > 50, ce taux est dans l'intervalle mentionné dans (Richard et Benoît, 2000).

III.5.2. Estimation du pouvoir antiradicalaire par la méthode au DPPH

Les activités antiradicalaires des extraits des billes d'alginate, du jus de betterave lyophilisé et du témoin positif BHT ont été déterminées par la méthode au DPPH. Les résultats obtenus sont représentés sous forme de droites (figures : III.25, III.26, III.27) dont les équations sont les suivantes: (Y= % d'activité antiradicalaire, x = concentration de l'extrait)

- BHT : $Y = 3,4475x + 25,295$ $R^2 = 0,9953$
- Betterave fraîche lyophilisée : $Y = 760,39x + 2,3146$ $R^2 = 0,9957$
- B.C 7 jours : $Y = 161,86x - 0,7813$ $R^2 = 0,9976$
- B.jl 7 jours : $Y = 315,18x + 5,0471$ $R^2 = 0,9957$
- B.jl 30 jours : $Y = 356,36x - 4,4804$ $R^2 = 0,996$
- B.jl 60 jours : $Y = 276,47x + 5,0508$ $R^2 = 0,9922$

L'activité anti radicalaire de nos extraits est exprimée en CI_{50} . Pour chaque extrait la CI_{50} est déduite de la droite d'étalonnage correspondante. L'extrait possédant la valeur CI_{50} la plus basse, exerce l'activité antiradicalaire la plus puissante.

Comme figurant dans le (tableau III.10) l'antioxydant standard BHT a montré une activité antiradicalaire puissante avec une CI_{50} de l'ordre de 7.166 $\mu\text{g/ml}$. Parmi les trois extraits aqueux, l'extrait BFL représente l'extrait le plus actif avec une CI_{50} de l'ordre de 62,71 $\mu\text{g/ml}$, par contre l'extraits B.jl montrent une plus faible activité antiradicalaire avec une CI_{50} de 142,63 enfin l'extrait B.C montre une faible activité avec une CI_{50} de 313,73 $\mu\text{g/ml}$.

Le (tableau III.11) montre que les activités antiradicalaires des extraits ont gardé une bonne activité au cours du temps avec des CI_{50} de l'ordre de 0.142 mg/ml pour B.jl 7 jours, 0,152 mg/ml pour B.jl 30 jours et 0.162 mg/ml pour B.jl 60 jours.

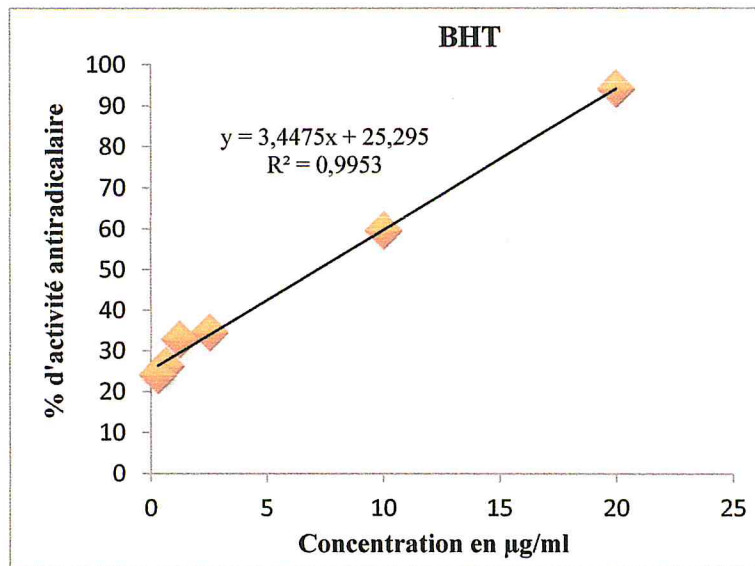


Figure III.25 : Droite d'étalonnage de l'extrait méthanolique du BHT.

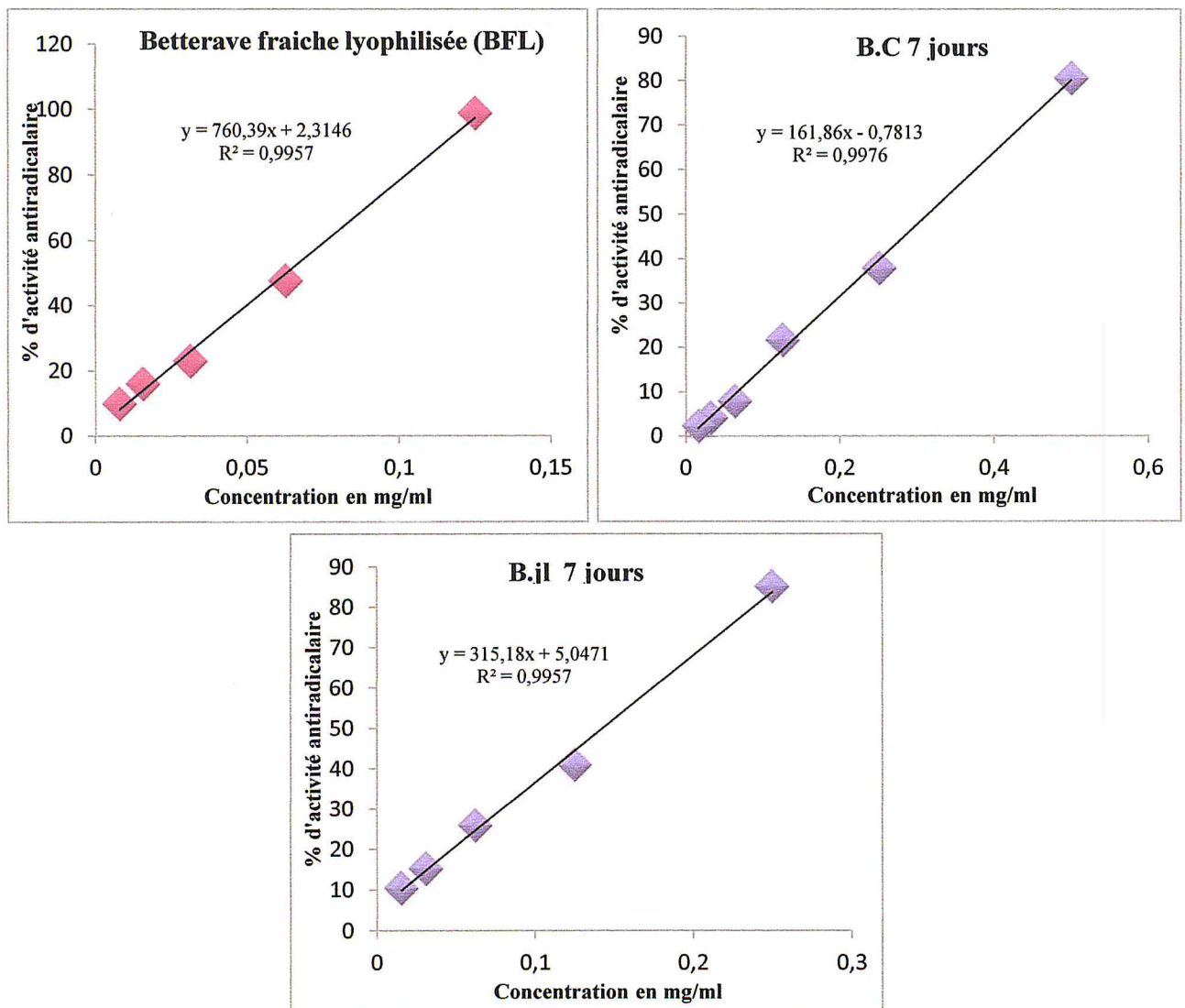


Figure III.26 : Droites d'étalonnage des extraits aqueux.

Tableau III.10 : Valeurs des CI_{50} de l'extrait méthanolique BHT et des extraits aqueux déterminées par le test du DPPH.

Extraits	BHT	BFL	B.jl 7 jours	B.C 7 jours
CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	7,166	62,71	142,6	313,73

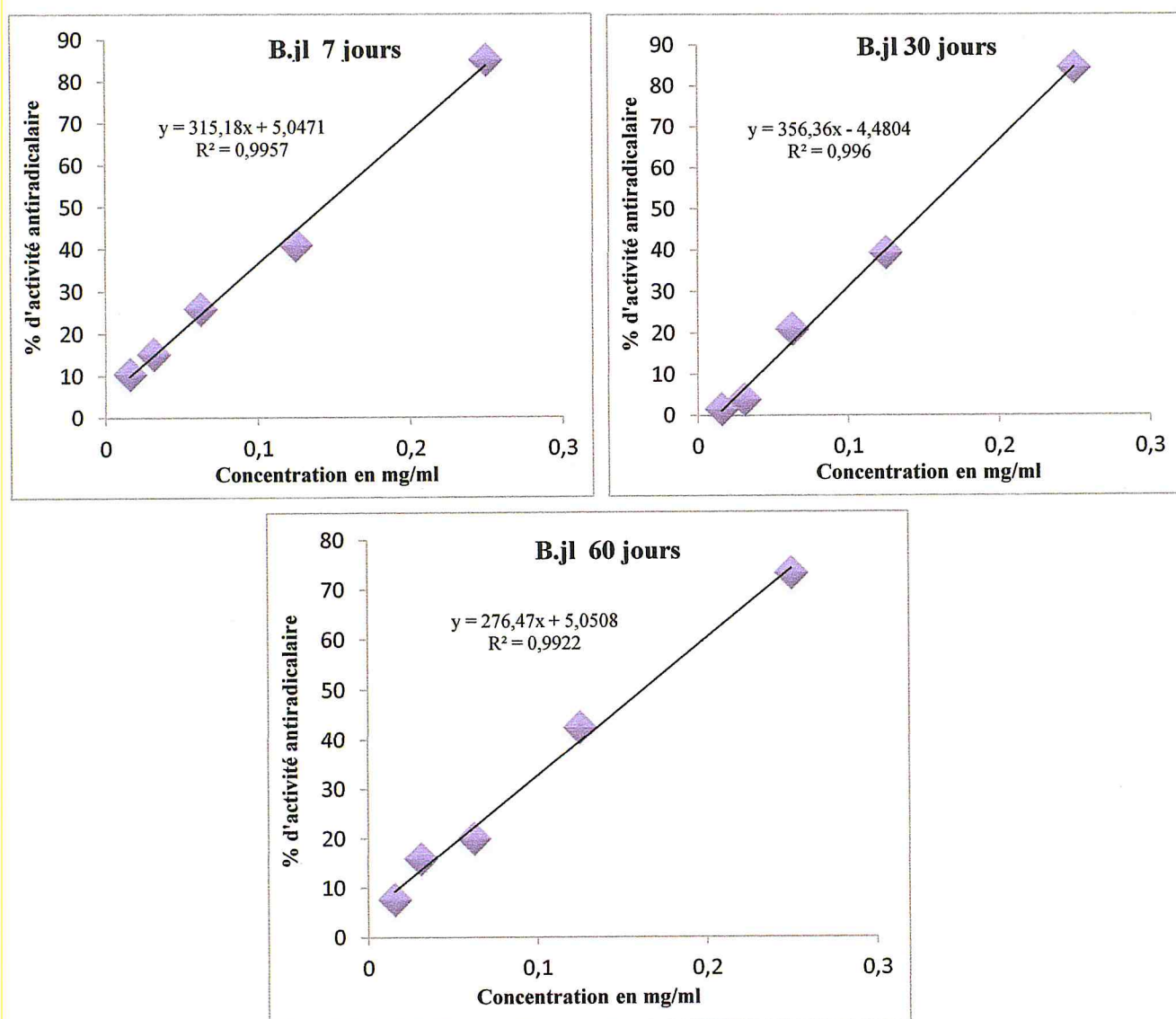


Figure III.27 : Droites d'étalonnage des extraits aqueux des billes B.jl selon la durée de conservation.

Tableau III.11 : Valeurs des CI_{50} des extraits aqueux des billes B.jl par le test au DPPH.

Extraits	B.jl 7 jours	B.jl 30 jours	B.jl 60 jours
CI_{50} (mg/ml)	0,1426	0,1528	0,1625

Discussion

L'activité antiradicalaire de nos extraits a été influencée par deux paramètres : le solvant, la quantité mise pour le test du DPPH.

L'extrait méthanolique du BHT a la capacité antiradicalaire la plus élevée, les autres extraits sont aqueux, le solvant a pu influencer les valeurs des activités antiradicalaires.

Parmi les cinq extraits aqueux : l'extrait du jus de betterave frais représente l'extrait le plus actif avec une CI_{50} de l'ordre de $62.17 \mu\text{g/ml}$, la capacité antiradicalaire des autres extraits est plus faible (tableau III.10), cela peut s'expliquer par la quantité mise pour le test du DPPH.

L'extrait B.jl montre une plus forte activité antiradicalaire avec une CI_{50} de $0,142 \text{ mg/ml}$ que celui de l'extrait B.C qui montre une plus faible activité avec une CI_{50} de $0,313 \text{ mg/ml}$. Cela est influencé par la concentration en principe actif, les billes B.jl sont plus concentrées en principe actif car elles ont été synthétisées avec du jus de betterave lyophilisé, tandis que les billes B.C ont été synthétisées avec du jus de betterave frais.

Les trois extraits B.jl ont gardé une bonne activité au cours du temps avec des CI_{50} de l'ordre de 0.142 mg/ml , $0,152 \text{ mg/ml}$, et 0.162 mg/ml pour B.jl 7 jours, B.jl 30 jours et B.jl 60 jours respectivement. Une contamination microbienne peut diminuer l'activité antiradicalaire, il est donc préférable de les conserver en présence d'un antimicrobien ou de les stériliser.

À la lumière de ces résultats on peut avancer que l'alginate est un biopolymère qui peut servir de support pour la microencapsulation du jus de betterave.

Conclusion générale et perspectives

Notre étude est axée essentiellement sur l'extraction des alginates d'une part, et sur la possibilité d'encapsuler un principe actif bio (le jus de betterave) dans ce biopolymère, d'autre part.

Les travaux d'extractions se sont fait sur quatre Phéophycées locales : *Cystoseira stricta*, *Dictyota dichotoma*, *Dictyopteris membranacea* et *Sargassum vulgare* qui n'ont jusque là pas fait l'objet d'extraction de phycocolloïdes alginiques. Ceci constitue donc, une contribution de notre part qui initie une réflexion sur la possibilité de valorisation des algues marines locales.

Des rendements en alginates moyens de l'ordre de 6.02, 4.68, 5.13 et 8.42% ont été obtenu respectivement pour Cys, DA, DS et S. L'analyse des alginates par spectroscopie infrarouge, moyennant un spectromètre FTIR-ATR, montre que les spectres d'alginates extraits présentent une forte similarité avec l'alginate commercial testé et avec les données de la littérature scientifique.

L'analyse effectuée par DRX a permis de mettre en évidence la différence structurale entre la poudre d'alginate de sodium commercial et les poudres des alginates extraits. On a constaté la présence de pics intenses à différentes positions pour l'alginate commercial et pour les quatre alginates extraits, ce qui montre que toutes les poudres présentent un certain taux de cristallinité.

La mesure de viscosité sur les différents extraits montre que les espèces DA et S pourrait être considérées comme des alginophyte candidates à l'exploitation industrielle présentant des viscosités intéressantes appartenant aux gammes -15 à 300 mPa.s- comme il est indiqué par les standards commerciaux.

En dernier lieu, nous suggérons à ce que cette étude préliminaire devrait être approfondie et complétée afin d'apporter des réponses à l'influence de différents facteurs comme :

- Le facteur « pollution » : une même espèce devrait être étudiée dans deux sites différents afin de déterminer l'impact probable de divers polluants sur son rendement en alginate.
- Le facteur dessiccation : le taux d'alginate de ces deux espèces, doit être évalué en fonction du temps d'immersion, pour évaluer l'impact de la dessiccation sur leur rendement en alginates.
- Les variations selon les saisons : il serait intéressant d'étaler les essais d'extraction sur plusieurs saisons pour avoir un rendement plus représentatif.

- Les variations selon les différentes parties de l'appareil végétatif doivent être étudiées afin de cibler la portion du thalle la plus riche en alginate, c'est en quelque sorte, une optimisation du rendement de l'algue.

Enfin, une étude technico-économique s'impose et une orientation vers l'algoculture pourrait s'avérer nécessaire en vue de la préservation des ressources et de leur durabilité. Les enjeux économiques, s'ils s'avèrent importants, ne doivent pas nuire pour autant à l'écosystème marin.

Il est bien connu que l'utilisation de ressources naturelles renouvelables, de faible coût et disponibles en grandes quantités, permet de développer un produit ayant un impact réduit sur l'environnement. En effet, dans cette étude nous avons envisagé l'encapsulation du jus de betterave dans l'alginate préalablement extrait.

On a pu obtenir des billes de surface lisse et sphériques relativement homogènes en taille, de diamètre d'environ 3 mm pour les billes humides et moins de 1 mm pour les billes séchées par lyophilisation.

Avec la microscopie électronique à balayage (MEB) qui permet l'observation directe de la morphologie des capsules, on a pu observer une surface irrégulière et rugueuse avec un système poreux à l'intérieur qui apparaît similaire à celle d'une éponge.

L'analyse par spectroscopie FTIR a confirmé l'absence de réaction entre les deux matériaux à savoir le jus de betterave et l'alginate, confirmant l'encapsulation du jus de betterave et sa conservation dans son état primaire.

Les résultats de DRX des billes d'alginate avec l'alginate de sodium solide, ont montré qu'il y avait un changement significatif. Le diffractogramme d'alginate montre un certain taux de cristallinité alors que celui des billes montrent une structure quasiment amorphe.

L'étude de l'activité antiradicalaire des extraits (B.jl) par la méthode de réduction de radical libre DPPH a montré que ceux-ci gardaient une bonne activité au cours du temps. Ces résultats ont montré que l'alginate peut être un bon support pour l'encapsulation du jus de betterave. Ces capsules pourraient donc constituer une alternative à certaines applications dans divers domaines : alimentaire, medical, ..etc.

Références bibliographiques

- **Agardh C.A. (1817).** *Synopsis algarum Scandinaviae*, adjecta dispositione universali algarum. pp. [i]-xl, [1]-135. Lundae [Lund]: Ex officina Berlingiana.
- **Bashford L.A, Thomas R.S, Woodman F.N. (1950).** Manufacture from brown marine algae. *Journal of the Society of Chemical Industry*, 69, 337-343.
- **Belattmania Z, Zrid R , Reani A, Elatouani S, Sabbar E.M, Mourtadi A , El Moznine R , Cherkaoui O, Bentiss F, Sabour B. (2015).** Caractérisation spectroscopique et rhéologique des alginates de sodium extraits de trois algues marines Phaeophyceae (*Dictyopteris polypodioides*, *Dilophus ligulatus* et *Halopteris scoparia*) de la côte d'El Jadida – Maroc), 6, 1657-1662.
- **Benali M et Karali A. (2006).** Extraction de phycocolloïdes alginiques à base de deux Fucophyceae: *Cystoseira barbata* (Goodenough et Woodward) C. Agardh et *Sargassum vulgare* C. Agardh et étude de la flore algale associée dans la baie de Bou-Ismaïl. Ing. d'Etat, Science de la mer, Option : Aquaculture, I.S.M.A.L .Alger : 62 p
- **Benoît J.P, Briançon S, Fattal E, Fessi H, Legrand P et Passirani C. (2009).** Sphéroïdes et formes vectorisées. 32p.
- **Bertagnolli C, Espindola A.P, Kleinübing S.J, Tasic L, Carlos da Silva M.G. (2014).** *Carbohydr. Polym.* 111, 619.
- **Brand-Williams W, Cuvelier M.E and Berset C. (1995).** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28: 25-30.
- **Canillac N and Mourey A. (2001).** Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excels* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiol.* 18: 261– 268.
- **Chandía N. P., Matsuhira B., Vásquez A. E. (2001).** *Carbohydr. Polym.* 46, 81p.
- **Číž M, Čížová H, Denev P, Kratchanova M, Slavov A, Lojek A. (2010).** Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food Control*, 21: 518–523.
- **Daws C.J. (1997).** *Marine Botany.* 2nd Ed: 578p.
- **Donati I, Holtan S, Morch Y.A, Borgogno M, Dentini M, Skjak-Braek G. (2005).** New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginate gels. *Biomacromolecules*, 6, 1031-1040.
- **Fang D, Liu Y, Jiang S, Nie J, Ma G. (2011).** *Carbohydr. Polym.* 85, 276p.
- **Feldmann J. (1937).** Les algues marines des côtes des Alèbres : Cyanophycées, Chlorophycées et Phéophycées. *Revue algologique.* vol.9, n° 3-4: 331 p.
- **Filippov M. P, Kohn R, Chem. Zvesti. (1974).** 28, 817p.

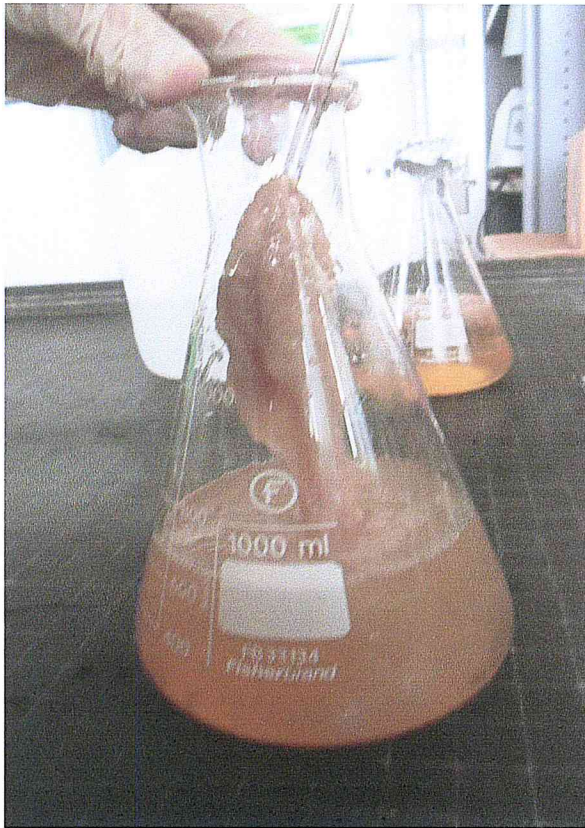
- **Grant G.T, Morris E, Rees D.A, Smith P. J. C. and Thom D. (1973).** Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Lett.* 32(1): 195-198.
- **Grasdalen H. (1983).** *Carbohydr. Res.* 118, 255.
- **Haug A. (1964).** Composition and properties of alginates, Reports of the Norwegian Institute of Seaweed Research, 30p.
- **Haug A. and Larsen B. (1970).** "An extracellular polysaccharide from *Beijerinckia indica*, containing L-guluronic acid residues." *Acta Chem Scand* 24(5): 1855-1856.
- **Hernández-Carmona G, Aguirre-Vilchis M, Rodriguez-Montesinos Y.E. (1992).** Recirculation of residual acid from the pre-extraction stage in the process of obtaining sodium alginate. *Ciencias Marinas.* 18, 125-137.
- **Hernandez R.M, Orive G, Ponce S, Gascon A.R, Igartua M, Pedraz J.L. (2002).** Study of the in vivo antigenic response of microcapsules elaborated with different alginates, Proc. 4th World Meeting ADRITELF/APGI/APV, Florence, pp. 875-876.
- **Jorgensen T.E, Sletmoen M, Draget K.I, Stokke B.T. (2007).** Influence of oligoguluronates on alginate gelation, kinetics, and polymer organization. *Biomacromolecules* 8(8): 2388-2397.
- **Kapadia G., Tokuda H., Konoshima T., Nishino H. 1996.** Chemoprevention of lung and skin cancer by *Beta vulgaris* (beet) root extract. *Cancer Letters*, 100: 211–214.
- **Kornprobst J.M. (2005).** Substances naturelle d'origine marine. *Chimio diversité /pharmaco diversité/biotechnologie*, T.1, 281-286.
- **Krajka-Kuzniak V, Szaefer H, Ignatowicz E, Adamska T, Baer-Dubowska W. (2012).** Beetroot juice protects against N-nitrosodiethylamine-induced liver injury in rats, *Food Chem. Toxicol.* 50, 2027–2033.
- **Kumar R and G. (2000).** Chitin and chitosan applications. *M.N.V. React. Function. Polym.*, 46,1-27.
- **Larpent J.P, Larpent-Gourdaud M. (1990).** *Mémento Tech de microbiologie.* Ed. Lavoisier, Paris: 417 p.
- **McHugh D.J. (2003).** A guide to the seaweed industry. *FAO Fisheries Technical - T441*, FAO Fisheries Department & FAO Regional Fisheries Officers, Rome, Italy, 2003, pp 118.
- **Miller I.J. (1996).** *Phytochem.* 41, 1315.

- **Mjahed H. (2009).** Caractérisation physico-chimique des films multicouches de polyélectrolytes à base de polysaccharides en vue d'applications dans le domaine des biomatériaux, thèse de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg, 22-29.
- **Molina G.A, Hernández-Martínez A , Cortez-Valadez M , García-Hernández F and Estevez M. (2014).** Effects of Tetraethyl Orthosilicate (TEOS) on the Light and Temperature Stability of a Pigment from *Beta vulgaris* and Its Potential Food Industry Applications, *Molecules* 19, 17993.
- **Myklestad S. (1968).** Ion-exchange properties of brown algae. I. Determination of rate mechanism for calcium-hydrogen ion exchange for particles from *Laminaria hyperborea* and *Laminaria digitata*. *Journal of Applied Chemistry*, 18, 30-36.
- **Noailles M.C. (2003).** "Fucus vesiculosus : Individu entier et détail d'un rameau fertile qui porte des réceptacles." Retrieved December 1st, 2008, from [http://www.sb-roscoff.fr/INVENTAIRES/Inv_Algues/index.algues.php?action=illustration&nom=F vesic dessin modif.jpg&id algae=104](http://www.sb-roscoff.fr/INVENTAIRES/Inv_Algues/index.algues.php?action=illustration&nom=F_vesic_dessin_modif.jpg&id_algue=104).
- **Papageorgiou S.K, Kouvelos E.P, Favvas E.P, Sapalidis A.A, Romanos G. E, Katsaros F.K. (2010).** *Carbohydr. Res.* 345, 469.
- **Penman A, Sanderson G.R. (1972).** *Carbohydr. Res.* 25, 273.
- **Pérez R. (1997).** Ces algues qui nous entourent : Conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisations, culture. IFREMER. 272p.
- **Pérez R, Kaas R, Campello F, Arbault S, Barbaroux O. (1992).** La culture des algues marine dans le monde. Editions IFREMER.
- **Pelligrini M, Pelligrini L. (1971).** Contribution à l'étude biochimique des Cystoseiraceae méditerranéennes. *Botanica Marina*, Vol. 14 : 6-16
- **Radmer R.J, Parker B.C. (1994).** - Commercial application of algae: opportunities and constraints. *J. Phycol.*, 6, 93-98.
- **Reddy K.M, Ruby L, Lindo A, Nair G.M. (2005).** Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes and human tumor cell proliferation by natural food colors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 9268–9273.
- **Richard J et Benoit J.P. (2000).** Microencapsulation. In : *Techniques de l'ingénieur. J.* 2210, 1-20. Paris, Techniques de l'ingénieur.
- **Rioux L.E. (2005).** Caractérisation rhéologique des alginates polysaccharides extraits des algues brunes. Thèse de Doctorat, Université Laval.

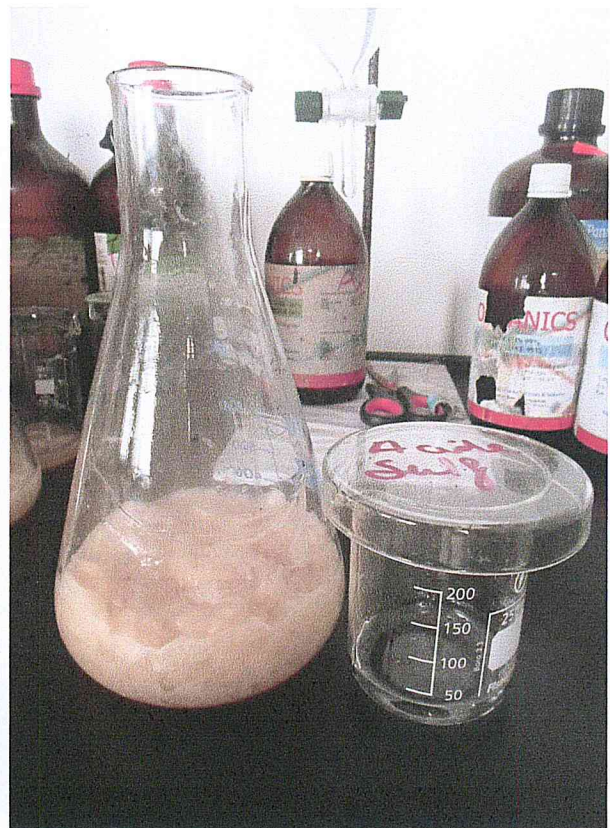
- **Sanchez-Moreno C. (2002).** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Int. J. of Foods Sci. Tech.* 8: 121-137.
- **Schwartz S.J, Von Elbe J.H, Pariza M.W, Goldsworthy T, Pilot H.C. (1983).** Inability of red beet betalain pigments to initiate or promote hepatocarcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*, 21: 531–535.
- **Secconi M.G. (1967).** Procédé de fabrication d'alginate pariant des cystoseires ou algues similaires, et produit industriel obtenu. Brevet de la République Française 1.464.840.
- **Seely G.R. and Hart R.L. (1974).** The binding of alkaline earth metal ions to alginate. *Macromolecules* 7(5): 706-710.
- **Smidsrod O. Smidsrod R.M, Glover S.G. (1973).** Whittington, The relative extension of alginates having different chemical composition. *Carbohydr. Res.* 27: 107-118.
- **Stequert A. (2009).** Transfert de matière dans les gels d'alginate, thèse de diplôme d'Etat de docteur en pharmacie, Nancy, pp. 21-30.
- **Stokke B.T, Smidsrod O, Bruheim P, Skjak-Braek G. (1991).** *Macromolecules.* 24, 4637.
- **Storz H, Zimmermann U, Zimmermann H, Kulicke W.M. (2010).** Viscoelastic properties of ultra-high viscosity alginates. *Rheological Acta*, 49(2), 155-167.
- **Strack D, Vogt T, Schliemann W. (2003).** Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 62: 247–269.
- **Twidwell E.K, Wagner J.J, Thiex Nancy J. (2002).** Use a Microwave Oven to Determine Moisture Content of Forages. 77-88.
- **Vauchel P. (2007).** Optimisation de procédés innovants pour l'obtention des Phycocolloïdes, thèse de doctorat de l'université de Nantes, centre IFREMER, Nantes. 32p.
- **Vandamme E.J, De Baets S, Steinbüchel A. (2002).** *Biopolymers, Volume 6, Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes*, Wiley-Vch.
- **Vandamme T, Poncelet D, Subra-Paternault P. (2007).** *Micro-encapsulation - Des sciences aux technologies*, Tec et Doc, Paris, Chap.12, pp. 175-188.
- **Vincent E. (2010).** Les alginates et leurs applications en pharmacie et en ingénierie : Application a la construction d'un biomatériau, 135p.
- **Wang L, Shelton R.M, Cooper P.R, Lawson M, Triffitt J.T, Barralet J.E. (2003).** Evaluation of sodium alginate for bone cell tissue engineering. *Biomaterials* 24(20): 3475-3481.

Annexes

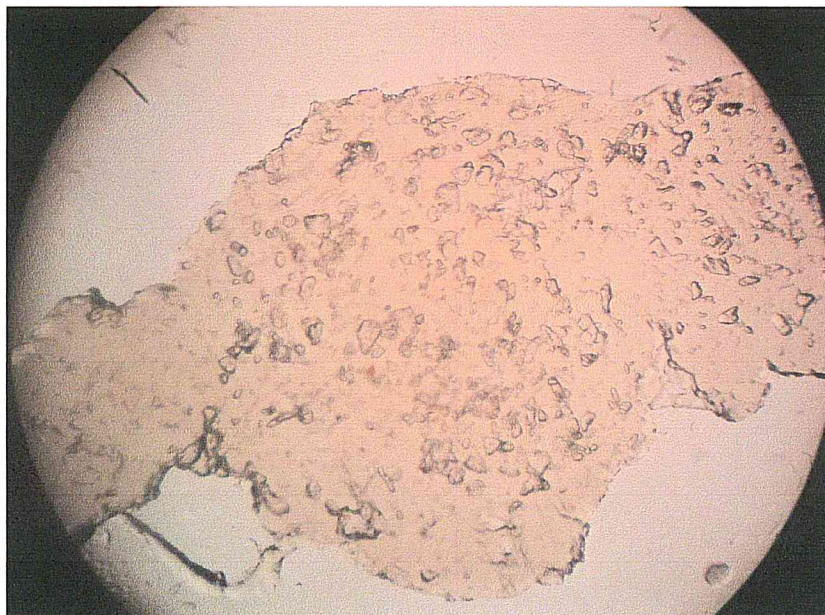
Annexe 01 : Etape de l'extraction des alginates



Formation de l'alginate (semi purifié)



Formation de l'acide alginique

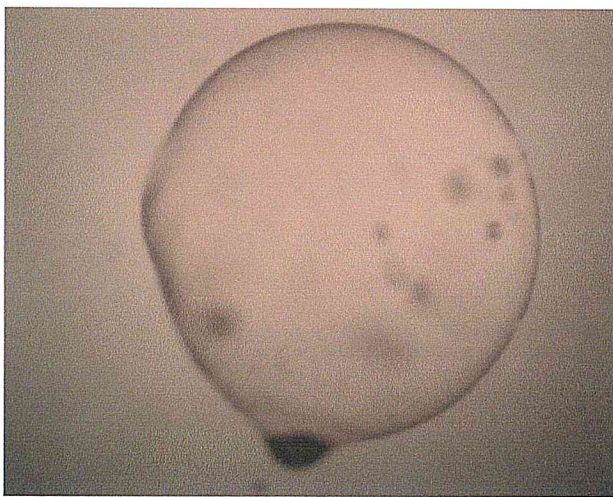


Fil d'alginate (S) humide observée au microscope optique

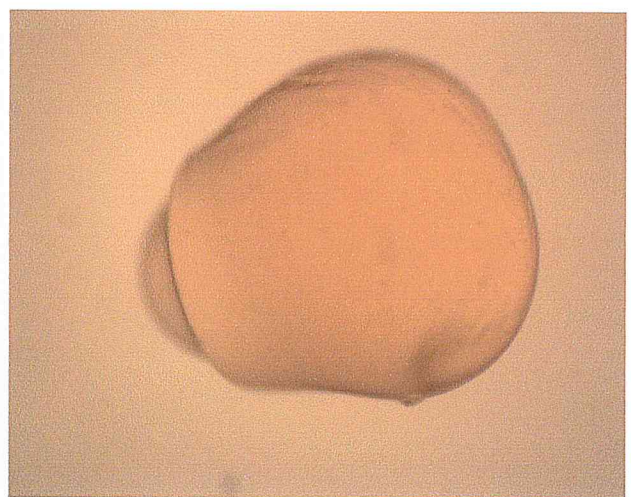
Annexe 02 : Taux d'humidité des alginates

Espèces	Cys	DA	DS	S	Alg.C
TH(%)	20,72	10,15	8,93	7,47	9,68

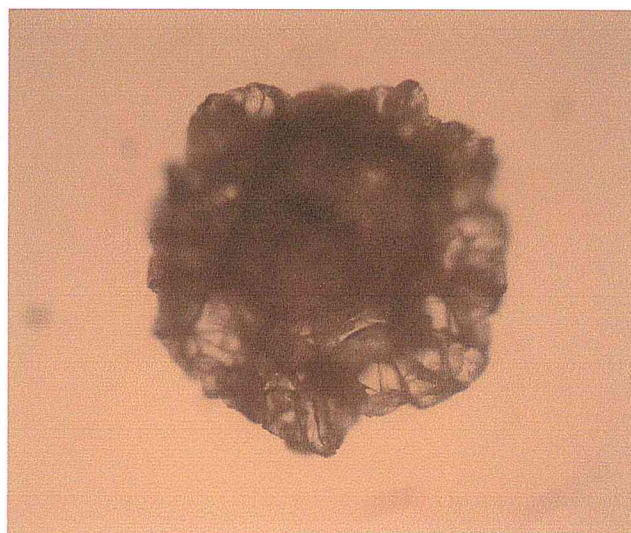
Annexe 03 : Capsules vides observées au microscope optique



Capsule humide d'alginate commercial



Capsule humide d'alginate S



Capsule lyophilisée d'alginate commercial

