

**UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA**

**Faculté des Sciences de l'Ingénieur**

Département de Chimie Industrielle

## **MEMOIRE DE MAGISTER**

En Chimie Industrielle

Spécialité : Génie des procédés

### CONTRIBUTION À L'ETUDE CHIMIQUE DES EXTRAITS LIPIDIQUES ET FRACTIONS VOLATILES DE L'ALGUE BRUNE *CYSTOSEIRA SEDOIDES*

Par

**ALICHE Zahia**

Devant le jury composé de :

H. KHALAF	Professeur, USTSD, Blida	Président
Z. HOUMANI	Professeur, USTSD, Blida	Examineur
S. BOUDAH	Professeur, USTHB, Alger	Examineur
M. EL HATTAB	Maître de Conférences, USTSD, Blida	Rapporteur
Y. DAGHBOUCHE	Maître de Conférences, USTSD, Blida	Co-Rapporteur

Blida, Juin 2008

## RESUME

Le présent travail porte sur l'étude chimique des extraits lipidiques et des fractions volatiles de l'algue brune *Cystoseira sedoides*. La première partie consiste à doser quantitativement les stérols de la fraction lipidique par deux techniques en l'occurrence la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) et la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).

Dans ce travail, la CLHP est utilisée pour la détermination de la teneur des stérols libres dans l'extrait brut de l'algue brune en utilisant l'étalonnage interne. Les résultats obtenus donnent une teneur en stérols libres de 1.62%. La spectrométrie IRTF est utilisée pour doser les stérols totaux et libres après avoir traité préalablement l'extrait brut de l'algue brune. Les stérols totaux sont obtenus après saponification de l'extrait brut de l'algue brune et préconcentration dans des cartouches de type DSC18, alors que les stérols libres sont obtenus après traitement par solvants organiques et passage à travers une phase solide de silice. Dans ce dosage par spectrométrie IRTF, la bande spécifique considérée est à  $1049\text{ cm}^{-1}$ , corrigée avec une ligne de base entre  $1000\text{-}1079\text{ cm}^{-1}$ . Le standard utilisé est le cholestérol à la place du fucostérol, ce dernier est le stérol majoritaire des algues brunes et ce, en considérant une approximation théorique relative à la comparaison des coefficients d'absorption molaires des deux standards. Le taux de stérols obtenu par cette méthode est de 3.04 % pour les stérols totaux et de 1.97 % pour les stérols libres.

La deuxième partie est consacrée à l'étude de l'huile essentielle (HE) de *Cystoseira sedoides* obtenue par entraînement à la vapeur d'eau, avec un rendement de 0.1%. L'identification des composés de l'huile essentielle est réalisée par le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (CG-SM), en se basant sur les banques de données spectrales de l'appareil. Des tests antimicrobiens et anticancéreux sont mis en point. L'huile essentielle présente une activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa* à une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 0.25 mg/ml. L'huile essentielle étudiée a montré aussi une activité antitumorale modérée.

## ملخص

هذا العمل مخصص للدراسة الكيميائية للمستخلصات الدهنية و الكسور الطيارة للطحلب البني سيستوزيرا سيدويداز.

الجزء الاول يخص معايرة لكمية الستيرولات الموجودة في المستخلص الدهني، و هذا باستعمال تقنيتين لمقارنة و هما: الكروماتوغرافية السائلة تحت ضغط قوي و المطيافية ما تحت الحمراء بتحول فوريي. ادت الكروماتوغرافية السائلة تحت ضغط قوي في المرحلة النظامية باستعمال معيار داخلي للحصول على نسبة 1.62% من الستيرولات الحرة (كمية الستيرولات في 100 غ من المستخلص الزيتي). من جهة اخرى استعملت المطيافية تحت الحمراء لمعايرة الستيرولات الحرة و الكلية في المستخلص الزيتي الخام، و هذا بعد اخضاع المستخلص لمعالجة اولية .

تم الحصول على الستيرولات الكلية بعد إخضاع المستخلص لمفاعلة تصبن و تركيزه في خراطيش من نوع DSC-18 بينما الستيرولات الحرة تم الحصول عليها بعد إخضاع المستخلص لمعالجة بواسطة مجموعة من المذيبات العضوية، و تمريره عبر مادة السيليس.

باستعمال هذه التقنية، تم اخذ طول الموجة الخاصة عند 1049 سم<sup>1</sup> مع قاعدة مصححة بين 1000 و 1079 سم<sup>1</sup>، و هذا باتخاذ الكليسترون كمقياس. هذا الاخير استعمل في مكان النيكوستيرول الذي يعتبر الستيرول الغالب في الطحالب البنية، و قد تم ذلك باعتبار تقريب نظري نسبة الى مقارنة معاملي الامتصاص الموليين للمعيارين.

نسبة الستيرولات المتحصل عليها بواسطة هذه التقنية هي 3.04 % ستيرولات كلية و 1.97 % ستيرولات حرة.

في الجزء الثاني تمت دراسة الزيت المستخلصة من الطحلب البني سيستوزيرا سيدويداز. تم الحصول على هذه الاخيرة عن طرق التقطير البخاري بالماء بمردود 0.1 % (كتلة الزيت بالنسبة الى 100 غ من كتلة طحلب جاف).

لمعرفة مكونات الزيت المستخلصة، تم استعمال الكروماتوغرافية الغازية المزوجة مع مطيافية الكتلة، و هذا باستعمال بتوك المغلومات الموجودة تي الجهاز.

الزيت المستخلصة اطهرت نشاط مضاد لبكتريا بسودوموتاز ايري جينوزا بتركيز 2.25 مغ/مل، و اطهرت كذلك نشاط مضاد سرطاني مقبول.

## ABSTRACT

The present work is devoted to the chemical study of the lipidic extracts and volatiles fractions of the brown alga *Cystoseira sedoides*. The first part consists in the determination of the amount of sterols in the lipidic extract by the use of two comparative techniques that are high-performance liquid chromatography (HPLC) and Fourier transform infrared spectrometry (FTIR). The high-performance liquid chromatography (HPLC) with internal standard gives a percentage of 1.62 % of the free sterols in the extract (weight of sterol in 100 g of crude extract).

The Fourier transform infrared spectrometry (FTIR) is used to determine the amount of free and total sterols in the lipidic extract, after treatment of the crude extract. Total sterols are obtained from the extract after saponification and preconcentration on DSC18 solid phase cartridges (SPE), while the free sterols are obtained after treatment of the extract with organic solvents and passage through a silica phase. The FTIR spectrometry is employed for selective detection at  $1049\text{ cm}^{-1}$  with a baseline established between  $1000$  and  $1079\text{ cm}^{-1}$ . The cholesterol is used as standard in the place of fucosterol which is the major sterol in the brown algae. This is based on a theoretical approximation related to the comparison between the molar absorption coefficients of the two standards. The amount of total sterols obtained with this method is 3.04%, and 1.97% for total and free sterols respectively.

The second part is devoted to the study of the essential oil of *Cystoseira sedoides* obtained by steam hydrodistillation. The yield of volatile oil is 0.1% (amount of essential oil in 100 g of dried algae). The essential oil is analysed by GCMS coupling by using spectral data of the apparatus in order to identify the different components. The antimicrobial activity is studied on five microbial strains. The essential oil shows good bacterial activity against Gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa* with minimum inhibitory concentration MIC of 0.25 mg/ml. The antitumoral tests show moderate activity of this oil.

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier monsieur le président ainsi qu'à Messieurs et mes dames les membres de jury,

Monsieur H. KHALAF, Professeur à l'Université Saad Dahleb de Blida

Madame Z. HOUMANI Professeur à l'Université Saad Dahleb de Blida

Monsieur S. BOUDAH Professeur à l'Université des sciences et de la technologie  
Houari Boumediene (Alger)

Monsieur M. EL HATTAB Maître de Conférences à l'Université Saad Dahleb de  
Blida

Madame Y. DAGHBOUCHE Maître de Conférences à l'Université Saad Dahleb de  
Blida

Qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

Ce projet de magister m'a permis de vivre une des étapes les plus enrichissantes de ma vie. Je tiens à en remercier mon rapporteur, monsieur El Hattab, de m'avoir accordé toute sa confiance. Il a toujours su être disponible et je suis très reconnaissante de tout ce qu'il m'a apporté tant du point de vue scientifique que du point de vue personnel. J'aimerais remercier de la même façon madame Daghbouche, pour sa présence, son aide et ses judicieux conseils qui ont contribué à la réussite de ce travail, merci profondément pour le temps consacré.

J'adresse un remerciement tout particulier à madame El Hattab. Je tiens à lui exprimer ici ma reconnaissance pour sa contribution, ses conseils et son soutien moral tout au long de ce travail.

Je tiens à adresser mes plus profonds remerciements à Monsieur Ouzzane, Monsieur Boutoumi et Monsieur Hadj Allah.

Je remercie tous les membres du laboratoire de chimie physique moléculaire et macromoléculaire ainsi que tous le personnel du département de chimie.

Je remercie également monsieur Belkassem et Mademoiselle Nafissa du laboratoire d'analyse chimique. Je tiens à remercier de la même façon Monsieur Mourad (Oumert), Monsieur Mourad (Hayen), Monsieur Zoubir, Monsieur

Boumaama, Monsieur Mouloud, Mademoiselle Zahia ainsi que tous le personnel du département de chimie industrielle.

Un merci très spécial à Monsieur Mohamed et ces collègues : Monsieur Merzak, Monsieur Yousef, Monsieur Mourad de l'imprimerie (pavillon 1), pour leur aide précieuse.

De la même façon je remercie Monsieur Mohamed, Monsieur Amine et Monsieur Moussa du centre de calcul (pavillon 18), pour leurs encouragements.

Je remercie tous les membres du centre de recherche et de développement (CRD) du groupe SAIDAL pour leur collaboration. Un vif remerciement à Madame Rachem, Hiba, Sonia et Afrah du laboratoire de microbiologie, sans oublier de remercier Monsieur Zahouani et Monsieur Darouiche du laboratoire de pharmacotoxicologie.

Je tiens à remercier les membres du laboratoire MFS de l'université de Toulon et du Var pour leur aide. Je profite à remercier Monsieur Piovetti, Monsieur Culioli, Monsieur Viano, Monsieur Mocrini....etc.

Je tiens à remercier également les membres du laboratoire de pharmacologie marine de Nantes pour leur contribution.

Toute ma gratitude va enfin à ma famille pour leur soutien tout au long de ses études et durant ce travail.

Toutes les personnes, qui ont contribué à ce que je mène à bien ce travail.

A vous tous, merci d'avoir été là.

## LISTES DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Composition des algues (pour 100 grammes d'algues sèche)	16
Figure 1.2	Illustration de la méthode diffusion en milieu gélosé	20
Figure 1.3	Schéma représentatif de la CCM	24
Figure 2.1	Phéromones identifiés dans les algues brunes	34
Figure 3.1	<i>Cystoseira sedoides</i>	42
Figure 3.2	Protocole général de l'extraction	44
Figure 3.3	Plaque CCM des extraits bruts	46
Figure 3.4	Plaque CCM des fractions 10 à 18 récupérées des la colonne ouverte de silice	48
Figure 3.5	Chromatogramme CLHP de la fraction stérolique à purifier	51
Figure 3.6	Chromatogramme CLHP du cholestérol	52
Figure 3.7	Chromatogramme CLHP de la fraction stérolique purifiée	52
Figure 3.8	Chromatogramme CLHP de l'étalon interne	53
Figure 3.9	Chromatogramme CLHP de l'étalon interne avec le standard	54
Figure 3.10	Droite d'étalonnage des solutions étalon interne/standard	54
Figure 3.11	Chromatogramme CLHP de l'étalon interne avec l'extrait brut de <i>Cystoseira sedoides</i>	55
Figure 3.12	Montage d'un flux utilisé pour la détermination des stérols dans l'algue	58
Figure 3.13	Spectre IRTF de l'extrait brut de l'algue brune <i>Cystoseira sedoides</i> sans traitement préalable	60
Figure 3.14	Protocole général de la saponification-extraction en phase solide (EPS)	61

Figure 3.15	Protocole général de traitement par solvants organiques	63
Figure 3.16	Spectres d'absorbance du cholestérol préparé dans CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> stabilisé avec l'amylène	64
Figure 3.17	Spectres infrarouge de l'extrait de l'algue brune <i>Cystoseira sedoides</i> saponifié et extrait à travers une cartouche type DSC18	67
Figure 3.18	Spectres d'absorbance du cholestérol avec solvant organique et passage à travers la silice	68
Figure 3.19	Spectre infrarouge de l'extrait de l'algue brune <i>Cystoseira sedoides</i> après traitement avec solvant organiques et passage à travers la silice	69
Figure 4.1	Entraînement à la vapeur d'eau	72
Tableau 1.1	Classification des algues	14
Tableau 1.2	Les principaux composés avec leurs activités biologiques	18
Tableau 1.3	Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition pour des disques imprégnés de 10 µl d'huiles essentielles	21
Tableau 2.1	Travaux antérieurs sur les stérols dans les algues brunes	33
Tableau 3.1	Étude systématique de l'algue brune <i>Cystoseira sedoides</i>	42
Tableau 3.2	Rendements d'extraction pour différents solvants organiques	44
Tableau 3.3	Stérols majoritaires des algues	58
Tableau 3.4	Caractéristiques analytiques du cholestérol préparé directement dans CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /amylène	64
Tableau 3.5	Caractéristiques analytiques du mélange de cholestérol et d'acétate de cholestéryle dans une proportion 9 :1 (1/1) obtenues après saponification et extraction à travers DSC <sub>18</sub>	65
Tableau 3.6	Teneur en stérols totaux dans l'algue brune <i>Cystoseira sedoides</i> après traitement saponification	66
Tableau 3.7	Caractéristiques analytiques du cholestérol obtenues après traitement avec solvants organiques et passage à travers la silice	67



Tableau 3.8	Teneur en stérols libres dans l'algue brune <i>Cystoseira sedoides</i> par spectrométrie IRTF et par CLHP	69
Tableau 4.1	Produits identifiés dans l'huile essentielle de <i>Cystoseira sedoides</i>	74
Tableau 4.2	Différentes souches microbiennes utilisées	78
Tableau 4.3	Évaluation de l'activité anticancéreuse	82

## TABLE DES MATIERES

RESUME .....	
REMERCIEMENTS .....	
TABLE DES MATIERES .....	
LISTES DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX .....	
INTRODUCTION GENERALE.....	12
1. PARTIE THEORIQUE	14
1.1 Généralités sur les algues .....	14
1.2 Activité antimicrobienne des huiles essentielles .....	18
1.3 Chimiotaxonomie et métabolites secondaires des algues .....	21
1.4 Les procédés d'extraction .....	21
1.5 Les méthodes de séparation et d'analyse .....	23
2. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	29
2.1 Introduction .....	29
2.2 Terpènes d'algues brunes .....	30
2.3 Stérois d'algues brunes .....	30
2.4 Produits volatils d'algues marines .....	32
2.5 Activité biologique des produits marins .....	36

2.6	Chimiotaxonomie et métabolites secondaires des algues.....	39
3.	ETUDE DE LA FRACTION LIPIDIQUE DE <i>CYTOSEIRA SEDOIDES</i> (EXTRACTION ET DOSAGE DES STEROLS)	41
3.1	Introduction .....	41
3.2	Étude systématique de l'algue brune <i>Cystoseira sedoides</i> .....	41
3.3	Protocole d'extraction .....	43
3.4	Chromatographie sur couche mince (CCM) .....	45
3.5	Chromatographie sur colonne (CC) .....	46
3.6	Dosage des stérols dans les algues par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) .....	48
3.7	Dosage des stérols dans les algues par spectrométrie infrarouge à transformé de Fourier (IRTF).....	56
3.8	Conclusion .....	70
4.	ETUDE DE LA FRACTION VOLATILE DE <i>CYTOSEIRA SEDOIDES</i> (EXTRACTION, ANALYSE ET ACTIVITE BIOLOGIQUE)	71
4.1	Introduction .....	71
4.2	Extraction des huiles essentielles .....	71
4.3	Traitement et récupération de l'huile essentielle .....	72
4.4	Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) .....	73
4.5	Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de <i>Cystoseira sedoides</i> .....	77
4.6	Activité anticancéreuse de l'huile essentielle de <i>Cystoseira sedoides</i> .....	80
4.7	Conclusion.....	82
	CONCLUSION GENERALE.....	83

REFERENCES.....	86
APPENDICES .....	
A. Liste des abréviations.....	98
B. Chromatogramme CG-SM de l'huile essentielle.....	99
C. Protocoles utilisés dans les tests antimicrobiens.....	100
D. Glossaire.....	103

## INTRODUCTION GENERALE

L'histoire de la chimie des produits naturels remonte à la plus haute antiquité avec la conception des premiers alambics, il y a de cela plus de 3500 ans. Mais c'est surtout depuis deux siècles que les chercheurs commencent à s'intéresser à l'étude de la composition chimique des extraits naturels suivie de l'apparition des premières publications dans ce domaine. A cette époque, l'étude des produits naturels était focalisée principalement sur les organismes terrestres, le monde marin qui représente 70 % de la planète et renferme 90 % des espèces vivantes était complètement ignoré. Cette biodiversité exceptionnelle du monde marin est le fruit d'une très longue évolution qui a permis aux organismes vivants de tester plusieurs solutions et des modèles moléculaires variés afin de s'adapter aux différents environnements.

Les changements globaux et l'intensification des activités humaines induisent d'importantes perturbations des équilibres naturels qui menacent la richesse de cette biodiversité marine : pour cette raison, il est urgent de mieux décrire cette biodiversité et de développer une utilisation raisonnée des ressources marines.

Dans ce domaine, l'écologie chimique marine est un secteur de recherche interdisciplinaire relativement nouveau qui a pour but de déterminer les fonctions biologiques des produits naturels marins au sein des organismes qui les biosynthétisent. Les substances naturelles marines sont de natures aussi variées que leurs fonctions : en effet, sur les dix dernières années seulement, plus de 7000 molécules nouvelles ont été décrites à partir de micro-et de macro-organismes marins tels que les algues (25%), les éponges (33%), les cnidaires (18%), les tuniciers (10%) et d'autres invertébrés. Dans cet ensemble près de 1% des composés décrits présentent un réel potentiel pharmacologique.

Dans ce contexte, la prospection dans l'environnement marin afin de trouver de nouvelles sources de produits naturels bioactifs présentant des structures chimiques originales, est en pleine expansion. Actuellement seuls trois médicaments commercialisés sont dérivés de produits naturels d'origine marine mais plusieurs candidats sont presque arrivés en phase d'entrée sur le marché.

De ce fait, les compagnies pharmaceutiques soutiennent maintenant les recherches sur les produits naturels.

Aussi du fait des faibles quantités disponibles de telles molécules, la synthèse organique reste le meilleur moyen d'approvisionnement afin de ne pas dégrader l'écosystème et éradiquer de telles ressources.

Dans ce sens, une utilisation rationnelle à long terme des substances naturelles marines nécessite des études sur les mécanismes biosynthétiques menant à ces composés, une évaluation des modes de synthèse les plus efficaces mais également la détermination des facteurs écologiques pouvant influencer sur la production de ces substances par les organismes producteurs.

Notre travail s'intègre à ce large domaine de recherche. Il porte, d'une part, sur l'étude chimique de la fraction de stérols présente dans l'extrait lipidique de l'algue brune *Cystoseira sedoides* et, d'autre part, sur l'étude de la composition chimique et l'activité biologique de la fraction volatile obtenue à partir de la même espèce.

Les objectifs assignés à ce travail sont :

- 1- Séparation de la fraction stérolique de l'extrait lipidique de l'algue brune *Cystoseira sedoides*, cette fraction a été purifiée par CLHP semi-préparative et utilisée ensuite comme standard dans le dosage quantitatif par CLHP en utilisant la méthode de l'étalonnage interne.
- 2- Détermination des stérols totaux et libres par spectrométrie IRTF-EPS.
- 3- Etude de la fraction volatile de l'algue brune *Cystoseira sedoides*. Le but étant, primo, d'effectuer une étude analytique par le couplage chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse de l'huile essentielle obtenue et, secundo, d'étudier l'activité biologique des huiles essentielles par la détermination des tests d'activité antimicrobienne et anticancéreuse sur les huiles essentielles.

## CHAPITRE 1 PARTIE THEORIQUE

### 1.1 Généralités sur les algues

#### 1.1.1 Définition

Les algues ont des formes et des dimensions très variables. Il en est de microscopiques et d'autres qui mesurent plusieurs mètres de longueurs; mais elles ont toutes des caractères communs. Elles sont chlorophylliennes et réalisent la photosynthèse. Elles sont donc autotrophes. Elles sont essentiellement aquatiques ou elles sont adaptées à l'habitat aquatique. Ce sont des thallophytes. Leur appareil végétatif est un thalle, c'est à dire que les cellules se ressemblent entre elles [1].

#### 1.1.2 Classification

La classification taxonomique des algues continue d'évoluer et d'être la source de controverses, particulièrement avec les nouvelles données apportées par les techniques moléculaire [2]. Les algues sont disséminées en onze groupes, un de nature procaryotique (les cyanobactéries) et dix de nature eucaryotique. Ces dix groupes d'algues eucaryotes sont répartis dans six ou sept grandes lignées évolutives [3] (Tableau 1.1).

Tableau 1.1 : Classification des algues [3].

C	S
Algues bleues	Elles sont placées dans le règne des Eubacteria et sont donc considérablement éloignés des autres algues.
Algues vertes	Elles appartiennent à un vaste ensemble, les chlorobionta, qui contient deux infrarègnes : les chlorophyta et les streptophyta.
Algues rouges	Elles forment le taxon frères des

	Chlorobionta.
Glaucophyta	Elles sont de petites flagellées d'eau douce aux plastes colorés en bleu par des pigments surnuméraires, appartenant à la même lignée que les algues rouges et vertes, mais en position basale.
Cryptophyta,	Elles sont unicellulaires flagellés incolores ou aux plastes rouges ou bleus.
Euglenophyceae ou euglènes	Elles sont de petites algues flagellées incolores ou possédant des chloroplastes.
Chlorarachniophyceae	Elles sont des amiboflagellés pourvues de chloroplastes.
Haptophyta	Elles sont dotées de plastes colorés en brun-doré par des caroténoïdes.
Algues brunes	Elles sont placées dans un vaste ensemble contenant aussi une dizaine de lignées d'algues microscopique, soit à plastes brun-doré telles que les diatomées ou les chrysophycées, soit à plastes plus au moins verts telles que les xanthophycées.
Dynophyta	Elles n'ont aucune parenté avec les autres algues mais sont affiliées aux Sporozoa.
Fungi ou eumycota	Elles sont composées de vrais champignons ils sont plus proches de nous même que des autres organismes considérés comme des végétaux.
Myxomycètes	Autrefois, elles sont placées dans les champignons. Elles sont considérées comme apparentés à certaines amibes.

### 1.1.3 Composition

La composition des algues varie suivant le lieu de récolte, la saison, la culture et l'espèce [4]. Elles sont constituées globalement de glucose, de protéines, de minéraux, de lipides et d'eau dans les proportions relatives données par la figure 1.1.



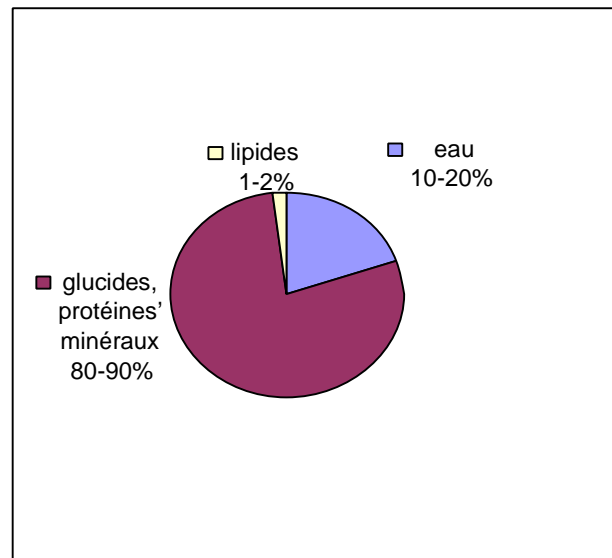


Figure 1.1 : Composition des algues (pour 100 g d'algue sèche) [4].

#### 1.1.3.1 Les composés minéraux

Différents éléments sont souvent accumulés par les algues, il a été défini un « facteur de concentration, Y » qui présente le rapport des concentrations d'un élément donné, dans l'organisme considéré et dans l'eau de mer. Ces facteurs varient dans de très larges proportions au point que certaines algues brunes (*Laminaria*), ont été utilisées comme « minerai » pour la production d'iode [5]. On note la présence de : Ca, Na, Mg, K, Zn, Ga, Co, V, Ni, As, I...etc.

#### 1.1.3.2 Les Polysaccharides

Ce sont des macromolécules glucidiques formées par enchaînement d'un grand nombre de sucres élémentaires. La cellulose, l'hémicellulose et les pectines sont des polysaccharides constitutifs de la paroi des cellules végétales [6].

#### 1.1.3.3 Les Agar-Agars

Ce sont des polymères d'un disaccharide, insoluble dans l'eau froide mais soluble dans l'eau chaude ; en solution aqueuse à 1%, ils forment une gelée ferme entre 32-39°C et qui ne devient fluide qu'à partir de 85°C. L'agar est composé de deux types de molécules : L'agarose et l'agaropectine [6].

#### 1.1.3.4 Les Alginates

Ce sont des sels de l'acide alginique qui est l'un des constituants principaux de la paroi des cellules d'algues brunes [7].

#### 1.1.3.5 Les lipides

Ce sont des substances naturelles peu spécifiques qui interviennent dans la constitution des structures cellulaires et des éléments de revêtement. Ce sont également des substances de réserve et des sources d'énergie cellulaire. Ces molécules sont hydrophobes, parfois amphiphiles, solubles dans les solvants organique apolaires ou peu polaires, non volatiles [8].

##### 1.1.3.5.1 Terpènes

Ce sont tous les composés formés à partir d'unités isopréniques, leur nombre est estimé à environ 23000. Ils sont définis comme produit du métabolisme du diphosphate d'isopentényle, lequel provient de l'acétylcoenzyme - A par voie de l'acide mévalonique. Dans le domaine des produits naturels marins, les terpènes occupent une place privilégiée au regard du nombre de structures originales isolées ainsi qu'aux propriétés bioactives de ces produits [8].

##### 1.1.3.5.2 Stérols

Les stérols représentent un groupe de substances dérivé d'un polycyclique iso pentanoide hydroxylé possédant la structure d'un cyclopentane-1,2 phénanthrène. Le nombre total d'atome de carbones varie de 27 à 30 ( $C_{27}$ - $C_{30}$ ) avec une chaîne latérale attaché au carbone 17 ( $C_{17}$ ) [9].

#### 1.1.3.6. Huiles essentielles et produits volatils

Selon la définition de la norme française NF T 75-006 (AFNOR, 1987), l'huile essentielle est «un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de

l'épicarpe des citrus, soit par distillation à sec. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques » [10, 11].

Ces essences sont chimiquement un mélange complexe de plusieurs composés où parfois une classe de produit est prédominante. Ils sont principalement des produits terpéniques ; des monoterpènes (C-10), des sesquiterpènes (C-15) et des diterpènes (C-20). Il existe aussi une variété d'hydrocarbures aliphatiques (linéaire, ramifiés saturés et insaturés), acides, alcools, aldéhydes, esters acycliques ou lactones et exceptionnellement des composés azotés ou soufrés, coumarins et homologues de phényle propanoïdes [12].

Les huiles essentielles sont utilisées comme antibiotiques ou dans d'autres préparations chimiques pour leurs actions antimicrobiennes, fongicides et virucides. L'activité d'une huile essentielle dépend de sa composition chimique [12].

### 1.2 Activité antimicrobienne des huiles essentielles

La confirmation scientifique de l'activité des huiles essentielles est récente. Elle ne date que du début du siècle dernier avec les travaux du docteur Gattefossé, le père de l'aromathérapie en France. Cette activité est à la base de la médecine alternative. Des produits bioactifs sont utilisés pour conserver les aliments. Cette activité a été utilisée pour conserver le patrimoine bibliographique des musées [13] et utilisée même pour l'assainissement de l'air et des systèmes de ventilation [14].

Tableau 1.2 : Principaux composés avec leurs activités biologiques [15].

Classe chimique	Activités
Les acides	Anti-inflammatoire, Calmants du système nerveux
Les aldéhydes	Anti-inflammatoire, Calmants du système nerveux, Anti-infectieux
Les cétones	Anti-inflammatoire, Anti-infectieux, Anti-coagulantes, Cicatrisantes
Les esters	Anti-spasmodiques, Anti-arythmiques
Les phénols	Anti-microbiennes, Anti-fongiques, Anti-virucides
Les monoterpènes	Stimulants du système immunitaire, Antalgiques, Antiseptiques
Les sesquiterpènes	Anti-inflammatoires, Immunostimulants, Anti-allergiques

On distingue deux sortes d'effets des huiles essentielles sur les microorganismes : une activité létale (bactéricide) et une inhibition de la croissance (bactériostase). L'activité des huiles essentielles est souvent assimilée à une activité bactériostatique. Le tableau 1.2 présente les principales classes chimiques et leurs activités biologiques.

### 1.2.1 Protocoles de détermination de l'activité antimicrobienne

L'examen des données bibliographiques fait apparaître d'emblée la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne des huiles essentielles. Selon la souche microbienne, l'huile essentielle et l'application désirée. Divers milieux de culture peuvent être mis en œuvre [16]. Dans le cadre de ce travail, la méthode des disques semble être la mieux adaptée.

#### 1.2.1.1 Méthode de diffusion en milieu gélosé ou méthode des disques (aromatogramme)

Cette méthode reste la plus utilisée avec une grande efficacité depuis 50 ans [17]. Elle s'applique à un très grand nombre d'espèces bactériennes. Cette technique permet de mettre en évidence la diffusion des composants volatils des huiles essentielles en milieu gélosé à l'agar réalisée dans une boîte de pétri. Le contact se fait par l'intermédiaire de papier sur lequel on dépose une quantité donnée d'huile essentielle (Figure 1.2). La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des produits à tester. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Chaque antibiotique diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration. Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'antibiotique suffisante pour inhiber leur croissance. On observe ainsi autour des disques une zone circulaire indemne de colonies, appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'antibiotique. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante [16, 17].

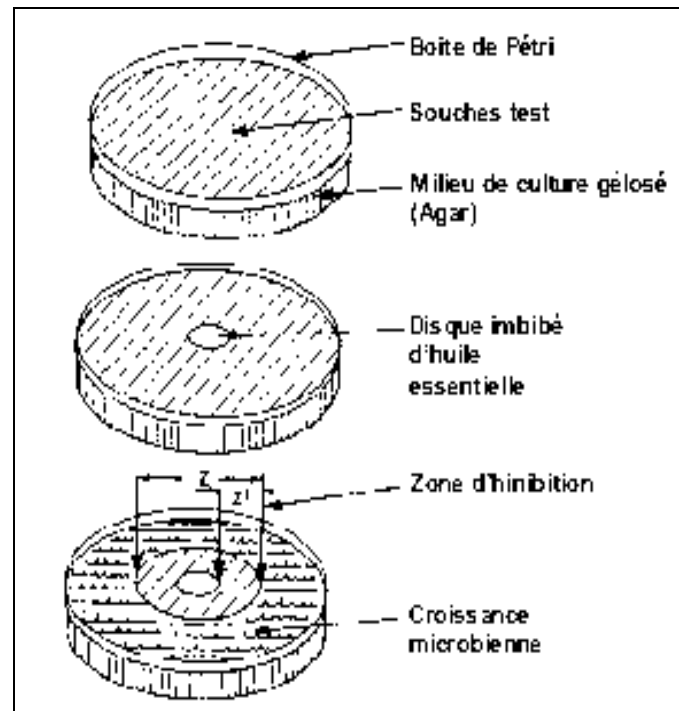


Figure 1.2 : Illustration de la méthode diffusion en milieu gélosé [18].

#### 1.2.1.2 Concentration minimale inhibitrice

En bactériologie médicale (technique antibiogramme ou du disque-diffusion) chaque souche est caractérisée par deux valeurs : le diamètre d'inhibition et la concentration minimale inhibitrice (CMI), établie selon la méthode de référence par dilution en milieu gélosé. La CMI est la plus petite concentration d'antibiotique capable d'inhiber la croissance bactérienne à l'oeil nu [19, 20]. Ces valeurs sont corrélées selon les courbes de concordance établies pour des souches d'une même espèce. La souche est alors classée comme sensible S, intermédiaire I ou résistante R par comparaison avec des valeurs critiques expérimentales diffusée par le comité français de l'antibiogramme de la société française de microbiologie [17].

#### 1.2.1.3 Évaluation des résultats des tests antimicrobiens

Selon la littérature, en bactériologie la souche microbienne est caractérisée par deux valeurs : le diamètre d'inhibition qui est déterminé en observant une zone circulaire indemne de colonies autour des disques et la concentration minimale

inhibitrice (CMI) [16]. Le tableau 1.3 donne la relation entre le diamètre d'inhibition et la sensibilité de la souche. Notons que la valeur du diamètre du disque imbibé est soustraite.

Tableau 1.3 : Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition pour des disques imprégnés de 10 µl d'huiles essentielles [21]

Diamètre d'inhibition (cm)	Transcription	Sensibilité
0	0	Résistant
0.5	±	Peu sensible
1	+	Sensible
2 à 3	++	Assez sensible
>3	+++	Très sensible

### 1.3 Chimiotaxonomie et métabolites secondaires des algues

La chimiotaxonomie est la science qui s'intéresse au classement des espèces en fonction des critères chimiques spécifiques. Cette science est basée sur l'étude des composés très spécifiques qui sont les métabolites secondaires. La recherche en chimie marine est une source importante de données sur la structure et les activités biologiques des métabolites secondaires. La production de molécules fonctionnant comme messagers chimiques entre les organismes est reconnue depuis de nombreuses années. Il s'agit d'une fonction essentielle du métabolisme secondaire des végétaux et explique certainement sa grande biodiversité. Ces composés sont largement employés par les plantes pour leur défense et leur pollinisation [22]. Ils sont aussi des messagers chimiques, soit des phéromones intra-spécifique, ou des molécules allélochimiques inter-spécifiques.

### 1.4 Procédés d'extraction

#### 1.4.1. Extraction par solvant

Les huiles essentielles, tous comme la fraction lipidique, sont solubles dans la plupart des solvants organiques tels que : n-hexane, dichlorométhane, chloroforme, éther diéthylique ...etc. La matière végétale est mise en contact avec le solvant à une température fixe dans des extracteurs spécifiques tels que le

soxhlet. La matière végétale peut être immergée directement dans le solvant organique. Les produits ayant une affinité au solvant seront passés dans le solvant. Après distillation de ce dernier, on obtient un produit pâteux appelé « concrète », cette dernière, subit généralement un traitement pour éliminer les produits lourds comme les cires et les colorants. Le solvant est choisi sur la base de certains critères tel que : toxicité, point d'ébullition, inertie,...etc [11]. Cette technique est très utilisée dans la préparation des extraits d'algues [23, 24, 25].

#### 1.4.2 Entraînement à la vapeur d'eau

Dans la distillation à la vapeur saturée, le végétal n'est pas en contact avec l'eau : la vapeur d'eau passe à travers la masse végétale et se charge de principes actifs qui sont entraînés par la vapeur d'eau à cause de leur point d'ébullition relativement bas [11]. Les huiles étant plus légères que l'eau, il suffit de les récupérer en surface, tandis que l'eau qui se trouve en dessous sera utilisée pour créer des eaux florales et des hydrolats. Cette technique peut être conduite en continue, dans des installations automatisées. Les premières expériences réalisées par les algues furent effectuées par Katayama en 1958 [26]. L'hydrodistillation consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou broyé) dans un alambic rempli d'eau portée à l'ébullition.

L'hydrodiffusion consiste à pulser de la vapeur d'eau à des faibles pressions (0.02-0.15 bars) à travers la masse végétale, du haut vers le bas [11].

Dans ces conditions, les cellules végétales sont soumises à une action « osmotique » du flux de vapeur d'eau. L'extrait associé à l'eau condensée s'écoule vers un collecteur [11].

#### 1.4.3 Extraction par les fluides à l'état supercritique

La technologie d'extraction par les fluides à l'état supercritique est très prometteuse dans le domaine des produits naturels. Le fluide à l'état supercritique a un pouvoir solvant très élevé, cette technique utilise généralement le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), pour des raisons chimiques, économiques et environnementales [27, 28, 11].

Le fluide supercritique a une densité voisine de celle des liquides, une viscosité proche de celle des gaz et une diffusivité très grande par rapport à celle des liquides. Le pouvoir solvant du fluide est modulable par variation de la température et particulièrement de la pression [29]. Cette technique connaît actuellement une large utilisation dans le domaine des produits naturels allant de l'extraction [30] au fractionnement des extraits [31].

#### 1.4.4 Extraction assistée aux micro-ondes

Contrairement à l'extraction au soxhlet qui est une technique assez lente d'où le risque de la dégradation des produits thermosensibles se trouvant dans l'extrait, l'extraction par micro ondes s'avère une technique alternative très efficace pour résoudre ce problème. Elle est rapide et nécessite une faible quantité de solvant [32]. Les micro-ondes sont des radiations non ionisantes s'étalant dans le spectre électromagnétique de 0.32 à 300 GHz correspondant à une longueur d'onde de 1 mm à 1 m et provoquant à l'échelle élémentaire des rotations moléculaires. Cette technique a été partiellement utilisée dans la préparation des huiles essentielles [33], mais elle connaît une ascension fulgurante dans le domaine de la synthèse organique [34].

### 1.5 Méthodes de séparation et d'analyse

#### 1.5.1 Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince repose principalement sur des phénomènes d'adsorption. La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvant qui se progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. En outre, chaque composé de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant [35, 36]. Dans le cas de substances colorées, on visualise plusieurs taches traduisant une séparation : dans le cas de substances non colorées, il faut les rendre visible :



trois solutions s'offrent à nous : Placer la plaque sous lampe UV, utiliser de la vapeur d'iode pour colorer les taches ou utiliser un révélateur chimique.

Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale  $R_f$  (figure 1.3).

$R_f$  = hauteur de la tache/hauteur du front du solvant

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

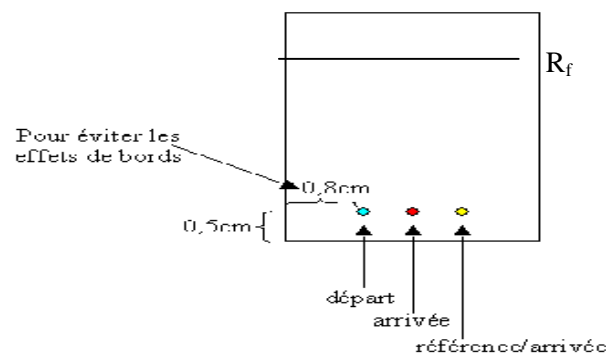


Figure 1.3 : Schéma représentatif de la CCM.

### 1.5.2 Chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne peut être une méthode préparative, elle permet en effet la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement, à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre plusieurs grammes. C'est le procédé chromatographique le plus utile pour séparer des quantités importantes des fractions et des composés purs [35].

C'est une technique basée sur des phénomènes d'adsorption sur la phase solide, le plus souvent l'alumine ou la silice, remplie dans une colonne de longueur et de section variables. L'échantillon, en solution concentrée, est déposé en haut de la colonne, il coule par gravité ou sous l'effet d'une faible pression. On peut utiliser comme éluant un solvant unique ou bien accroître progressivement la polarité de l'éluant de façon à accélérer le déplacement des composés polaires. Les molécules sont entraînées vers le bas à des vitesses variables selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité dans l'éluant. Le chromatogramme se développe

en formant une succession de zones cylindriques qui se séparent en migrant vers le bas. A mesure que chaque zone s'écoule de la colonne, on la recueille.

Les fractions issues de la colonne peuvent subir des préconcentrations. Dans ce cadre, beaucoup de techniques ont été proposées pour isoler et concentrer les extraits. Parmi elles, on cite l'extraction en phase solide (EPS) qui est une technique d'extraction permettant de remplacer l'extraction liquide-liquide ou le passage sur une colonne classique de chromatographie. Deux types de supports existent actuellement, les cartouches et les disques [37]. Les phases solides mettent en jeu des interactions polaires (phase normale) apolaire (phase inverses) ou des interactions par échange d'ion.

### 1.5.3 La chromatographie liquide à haute performance

La chromatographie liquide haute performance, (CLHP) constitue une technique analytique très générale d'emploi [38]. Actuellement la CLHP, rend aisée la chromatographie de partage sur colonne grâce aux progrès de la technologie tant dans le domaine de la préparation des phases stationnaires que dans celui de l'écoulement de la phase mobile [39]. Dans toute installation de CLHP on retrouve, un liquide appelé phase mobile qui parcourt un tube appelé colonne, remplie, d'une phase stationnaire. Si la phase stationnaire est polaire (silice), on utilisera une phase mobile peu polaire, la chromatographie est dite à polarité de phases normale, si la phase stationnaire est très peu polaire (silice greffée) on choisira une phase mobile polaire, le plus souvent un mélange Méthanol /Eau, la chromatographie est dite à polarité de phase inversée.

Deux détecteurs sont classiquement utilisés :

Le détecteur UV –Visible, il mesure l'absorption de lumière par le produit à la sortie de la colonne.

Le réfractomètre : il mesure la variation de l'indice de réfraction du liquide à la sortie de la colonne. Les données sont collectées par l'intermédiaire soit d'un intégrateur ou d'une station d'acquisition.

Dans des conditions chromatographiques données, le temps de rétention (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté), caractérise qualitativement une substance. L'amplitude de ces pics et la prolongation de la

ligne de base permettent de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté.

Le dosage quantitatif nécessite l'application de techniques bien adaptées. Les méthodes les plus utilisées sont :

-Dosage par étalonnage externe : Le processus est basé sur la comparaison de deux chromatogrammes, à savoir ceux de l'étalon et de la solution échantillon. On prépare dans un solvant, une solution de référence (concentration  $C_{réf}$ ) du composé à analyser. On injecte un volume  $V$  de cette solution et on repère sur le chromatogramme l'aire  $A_{réf}$  du pic correspondant. Ensuite, sans changer les conditions d'analyse, on injecte un même volume  $V$  de l'échantillon en solution, contenant le composé à doser (concentration  $C_{éch}$ ). Soit  $A_{éch}$  l'aire du pic d'éluion correspondant. Puisque les volumes injectés sont égaux, il y a une proportionnalité entre les aires, qui dépendent des masses injectées, et les concentrations correspondantes ( $m_i = C_i \cdot V$ ). On écrit :

$$C_{réf} = K \cdot A_{réf} \quad \text{et} \quad C_{éch} = K \cdot A_{éch}$$

$$\text{Soit :} \quad C_{éch} = C_{réf} \cdot A_{éch} / A_{réf}$$

-Dosage par étalonnage interne : cette méthode consiste en la réalisation de deux chromatogrammes, l'un pour le calcul des coefficients de réponse relatifs et l'autre pour l'analyse proprement dite. Les aires des pics des produits à quantifier sont donc comparées avec celle du composé de référence, appelé étalon interne, introduit à une concentration connue dans l'échantillon à analyser.

On suppose que l'échantillon contient deux composés à doser 1 et 2, l'étalon interne étant désigné par E.

Dans une première étape, on commence par injecter une solution de concentration  $C_1$  en 1,  $C_2$  en 2 et  $C_E$  en E. appelons les aires des pics qui correspondent à ces concentrations  $A_1$ ,  $A_2$  et  $A_E$ .

$$\text{On écrit } K_{1/E} = C_1 \cdot A_E / C_E \cdot A_1 \quad \text{et} \quad K_{2/E} = C_2 \cdot A_E / C_E \cdot A_2$$

La seconde étape de l'analyse consiste à chromatographier un volume quelconque d'une solution faite avec l'échantillon à étudier et dans laquelle a été ajoutée une quantité connue de composé E. soient  $A'_1$ ,  $A'_2$  et  $A'_E$  les aires du nouveau chromatogramme que l'on obtient.

A partir des coefficients relatifs calculés dans la première étape ainsi que de la concentration de l'étalon interne dans l'échantillon,  $C'_E$ , connue, on accède ainsi à :

$$C'_1 = C'_E \cdot K_{1/E} \cdot A'_1 / A'_E \quad \text{et} \quad C'_2 = C'_E \cdot K_{2/E} \cdot A'_2 / A'_E$$

En généralisant à n constituants, on peut calculer la concentration massique du soluté i par cette équation :  $C'_i = C'_E K_{i/E} A'_i / A'_E$

#### 1.5.4 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

L'infrarouge analytique regroupe plusieurs méthodes d'identification et de dosage non destructif basé sur l'étude de l'absorption (ou la réflexion), par l'échantillon, des radiations électromagnétiques comprises entre 1 et 100 $\mu\text{m}$ . cette bande spectrale est elle même divisée en proche I.R (1 à 2.5 $\mu\text{m}$ ), en moyen I.R (2.5 à 25 $\mu\text{m}$ ) et en lointain I.R au delà. La partie la plus riche en information est celle du moyen I.R [40, 41]. Tous les spectromètres I.R conduisent à un document de base, appelé spectre I.R qui représente, pour chaque longueur d'onde, le rapport, des intensités transmises, avec ou sans échantillon. Ce rapport, appelé transmittance T, peut être remplacé par son pourcentage (%T) ou par l'absorbance,  $A = \log(1/T)$ . Il est fréquent d'exprimer les longueurs d'onde sous forme de nombre d'ondes ( $\text{cm}^{-1}$ ) sachant que  $\lambda = 1/\nu$ .

Il existe beaucoup d'instruments commerciaux qui diffèrent dans leurs conceptions. Dans les appareils séquentiels, les absorptions lumineuses sont mesurées les unes après les autres, en balayant la région spectrale dans un ordre séquentiel (spectre à filtre optique, à monochromateur). Dans les spectromètres multiplexés, le capteur photosensible reçoit simultanément l'information correspondant à plusieurs longueurs d'onde. Les signaux sont donc acquit à l'aide d'un capteur unique. Un système de codage permet d'obtenir les spectres à partir des signaux ainsi obtenus. Les instruments à transformée de Fourier sont des exemples de systèmes multiplexés. Les spectromètres multicanaux ont plusieurs capteurs photosensibles qui peuvent enregistrer indépendamment l'absorption de la lumière à des longueurs d'ondes spécifiques. Les systèmes à barrette de diodes et les caméras appartiennent à ce type [42].

L'infrarouge à transformée de Fourier correspond à un montage simple faisceau, qui diffère de celui des appareil séquentiels. Le monochromateur étant remplacé par un interféromètre –souvent de type Michelson- placé entre la source et l'échantillon. Le spectre est produit suite à une opération mathématique appelée « transformée de Fourier ». Cette méthode a bouleversé les méthodes traditionnelles car elle présente plusieurs avantages.

- il n'y a pas de lumière parasite, car le détecteur reçoit plus d'énergie [102,104],
- le rapport signal/bruit de fond est bien supérieur à celui de la méthode séquentielle,
- Les longueurs d'onde sont calculées avec une grande précision,
- la résolution est constante sur tout le domaine étudié.

Bien que la spectrométrie IRTF est devenue l'une des méthodes d'analyse quantitative utilisée dans le plus grand nombre de disciplines scientifiques, elle présente des limitations relatives particulièrement à la faible sensibilité de cette technique, ce problème est particulièrement important dans le cas des analyses des échantillons aqueux. Afin d'offrir des solutions et des alternatives aux différentes déterminations quantitatives par spectrométrie IRTF, le couplage entre l'extraction en phase solide (EPS) et la spectrométrie IRTF peut être considéré et ce, par la preconcentration de l'analyte d'un côté et le changement du solvant d'un autre.

#### 1.5.5 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible [43]. Elle permet de recueillir des informations sur la nature, la composition et la structure des espèces présentes dans l'échantillon [44]. Le spectromètre de masse est souvent couplé avec un système de chromatographie en phase gazeuse [34,38], cette association, d'une méthode séparative et d'une méthode d'identification, permet d'étudier des mélanges complexes à l'état de traces. Un composé organique introduit dans le spectromètre de masse est ionisé par bombardement électronique à 70 eV. L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé. Il peut y avoir des ruptures de liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, formation ainsi des ions fragments, ces derniers sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/charge par l'application d'un champ magnétique et /ou électrique, puis collectés par un détecteur. L'ensemble de ces ions constitue le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la structure moléculaire. La spectrométrie de masse est utilisée dans l'analyse élémentaire et dans l'analyse isotopique. Cette dernière est très utilisée dans le domaine pharmaceutique, ou dans celui de l'étude de croissance des plantes [38].

## CHAPITRE 2 SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### 2.1 Introduction

Suite aux études effectuées sur les richesses terrestres, les océans et les mers apparaissent très prometteurs pour la découverte de nouvelles substances. Ces substances apportent une véritable originalité structurale permettant aux organismes marins de constituer une importante réserve d'innovation [45].

Qu'elles proviennent de procaryotes ou d'eucaryotes, ces organismes se caractérisent par la présence d'éléments chimiques ou de structures rarement observés, voir inconnus en milieu terrestre, cette observation s'applique autant aux métabolites primaires qu'aux métabolites secondaires [5]. Donc, la recherche en chimie marine est une source importante de données sur la structure et les mécanismes d'action de ces produits, en particulier les métabolites secondaires. Ce champ de recherche s'est développé de manière exponentielle, démarrant dans les années 1970 et se poursuivant jusqu'à nos jours [46], comme peut en témoigner le nombre croissant d'articles, revues ou rapports de congrès publiés annuellement dans ce domaine. A ce jour, les travaux menés sur les organismes marins, ont conduits à la détermination structurale d'une variété de classes de métabolites originaux. Plus particulièrement, les algues brunes sont classées troisièmes après les éponges et les cnidaires avec environ 1488 publications de 1970 à 2004; ce qui a permis d'identifier près de 1260 molécules [5]. Ce progrès rapide réalisé dans ce domaine est directement lié à l'emploi de nouvelles techniques de séparation et de caractérisation.

Par ailleurs, la recherche dans ce domaine ne s'arrête pas à comparer les processus métaboliques des différentes espèces ou détecter l'impact de l'environnement sur ces métabolites, elle s'est orientée vers l'évaluation des applications industrielles de ces espèces. À titre d'exemple, les espèces riches en stéroïde, caroténoïdes, acides gras poly-insaturés constituent une source très intéressante pour les formulations à intérêt thérapeutique [47].

## 2.2 Terpènes d'algues brunes

Divers travaux ont montré la diversité des terpènes dans les organismes marins tel que les algues, les éponges, les mollusques.....etc. Les diterpènes constituent la classe chimique majeure des Phéophycées car ils représentent les deux tiers de l'ensemble des molécules décrites dans ce phylum [8].

Il faut préciser que l'isolement et la purification de la plupart des diterpènes sont réalisés par CLHP à polarité de phase inversée. La caractérisation structurale est effectuée par la combinaison des techniques spectroscopiques, notamment la RMN mono et bidimensionnelle. Cette dernière grâce à la séquence HMBC, permet de vérifier toutes les corrélations longues distance entre proton et carbone. Les algues brunes du genre *Cystoseira* ont fait l'objet de nombreuses études sur la composition chimique de leur extrait lipidique, mettant en évidence la présence de substances terpéniques à coté des stérols. On trouve essentiellement des diterpènes linéaires dérivés du géranylgeraniol. Une grande diversité des méroditerpènes (linéaires, monocyclisés, bicyclisés.....etc.) est également constatée dans ce genre. Nous citons à titre d'exemple, non exhaustif, les meroditerpènes isolés de l'algue brune *Cystoseira crinita* [48] et de *Cystoseira amentacea* Var. *stricta* récoltée sur la côte française [49, 50]. Le nouveau méroditerpène 4'-methoxy-2(E)-bifurcarenone isolé de cette dernière a présenté une activité cytotoxique contre *Paracentrotus lividus* [50].

D'autres travaux ont confirmé la spécificité de cette classe de produits en étudiant la variation de la composition en terpènes dans les espèces appartenant au genre *Bifurcaria* [51-54].

## 2.3 Stérols d'algues brunes

La composition en stérols dans les algues brunes se résume en général au fucostérol qui est toujours majoritaire, lorsqu'il y a d'autres stérols, il s'agit notamment du cholestérol (*padina*, *ralfisia*), du 22-déshydrocholestérol, du 24-méthylène cholestérol, ainsi que du desmostéol [5]. Le fucostérol a été isolé des algues brunes en 1934 par Heilbron [55]. Les travaux de Heilbron ont été poursuivis en permettant l'isoler d'autres stérols et d'autres classes de produits des différentes espèces d'algues [56]. Depuis cette découverte, un grand intérêt a

été porté sur l'étude des lipides des algues brunes, et en particulier des stérols. Dans plusieurs cas, avant de séparer les stérols, l'extrait organique subit une saponification, l'étude est portée sur la fraction insaponifiable. La CG et la CG/SM étaient largement utilisées pour déterminer les stérols et leur composition dans la fraction stérolique [57, 58, 59, 60]. Vu la spécificité de ces composés, fruit du métabolisme secondaire, l'isolement et l'identification de ces derniers exigent l'emploi de techniques plus élaborées et de plus en plus perfectionnées qui se sont développées avec l'évolution de la phytochimie. Parmi ces techniques, la CLHP en phase normale. Elle a permis à Piovetti et al [61] d'étudier la composition des métabolites secondaires des algues brunes appartenant à la famille des Cystoseiraceae. Elle a permis, en particulier de doser les stérols (analysés globalement sous forme de fucostérol), dans trois espèces d'algues brunes. Il s'agissait de *Bifurcaria bifurcata* (côte atlantique, Cap Blanc), *Bifurcaria bifurcata* (côte atlantique, Casablanca) et *Cystoseira stricta* (Méditerranée). Il est à noter, qu'auparavant, cette technique était utilisée uniquement pour purifier et séparer les diterpènes [62, 63]. Une autre étude a permis de comparer la composition en stérols de huit échantillons d'algues brunes appartenant à deux ordres de la classe de phéophycées, à savoir, les Dictyotales et les Fucales [64]. Cette étude qualitative et quantitative a été réalisée en utilisant les techniques CG-SM et CG. Le cholestérol et le fucostérol sont les stérols majoritaires. La quantité des stérols chez les Fucales était 10 fois plus grande que celle chez les Dictyotales. Dans le même travail, trois nouveaux stérols ont été identifiés pour la première fois dans les algues brunes, à savoir, le 5-cholestan-3-ol, ergosta-5,24-dien-3-ol et un stérol en C<sub>30</sub>. Le nombre de nouveaux stérols isolés est toujours en croissance. Dans l'étude de l'algue rouge *Melanothamnus somalensis*, Ahmed et al [65] ont isolé un nouveau stérol en C<sub>26</sub> nommé somalenone (24-norcholest-5-en-3,7-dione). Trois autres stérols déjà connus (cholestérol, 7-oxo-cholestérol et 24-méthylènecholestérol) étaient isolés pour la première fois dans cette algue. D'autres dérivés d'oxydation du fucostérol ont également été isolés dont certains d'entre eux, comme le saringostérol, sont considérés comme des artefacts consécutifs à une oxydation atmosphérique du fucostérol [5]. Cependant une preuve expérimentale de la nature artefactuelle du saringostérol a été établie pour deux espèces différentes de *Cystoseira* de la mer Noire : *Cystoseira barbata* et *Cystoseira crinita* [66]. Après extraction des lipides, purification



chromatographique et analyse par CG, cinq stérols ont été identifiés dans *Cystoseira barbata* et sept dans *Cystoseira crinita*. Pour les deux algues citées précédemment, le stérol majoritaire était le fucostérol. Il représentait presque la quasi-totalité des stérols dans *Cystoseira barbata*, tandis que dans *Cystoseira crinita* il était accompagné du 24-éthyl-choles-5,22-dien-3-ol qui n'est pas usuel chez les phéophycées. En plus, il a été noté que seulement ces deux algues renfermaient le saringastérol [66]. Dans le même contexte, un travail effectué par Giner et al [67] a porté sur l'identification des stérols de l'algue brune *Aureococcus anophagefferens*, après saponification, séparation par CLHP puis analyse par RMN. Cette algue contient le 24-méthylènecholesterol (48% des stérols libres) et le (E)- et le (Z)-24-propylidènecholesterol dans les proportions respectives de 32% et 12%. C'est la première fois que de telle quantité de (Z)-24-propylidènecholesterol est isolée d'une algue. Il est supposé que *Aureococcus anophagefferens* est la source de (Z)-24-propylidènecholesterol, stérol isolé des invertébrés marins variés. Ce produit est proposé d'être un marqueur chimiotaxonomique des pelagophycées, une nouvelle classe des chrysophycées qui comprennent les Sarcinochrysidales. Le tableau 2.1 regroupe quelques travaux sur la fraction stérolique de quelques algues brunes effectués après l'an 2000.

#### 2.4 Produits volatils d'algues marines

Bien que l'étude de la fraction volatile des plantes terrestres ait commencé tôt, ce n'est que ces dernières années que celle des organismes marins a pris son essor et des études analogues ont commencé [74]. Les produits volatils marins contiennent plusieurs types de composés organiques et ils ont une grande importance en chimiotaxonomie et en écologie. Pour les algues brunes ces dérivés volatils sont des hydrocarbures poly-éthyléniques presque toujours à 11 atomes de carbone, souvent cycliques et sans halogènes. Ces produits sont des phéromones, qui sont intraspécifiques (communication entre individus de la même espèce). Ils sont indispensables à la survie de l'espèce, car ils interviennent dans le processus de reproduction de l'algue [5]. Selon leurs structures chimiques, ils sont classés en quatre groupes [75] : dérivés des cyclopropane, dérivés du

cyclopentène, dérivés du cycloheptadiène et les oléfines acycliques. La figure 2.1 donne quelques phéromones identifiées dans les algues brunes.

Tableau 2.1 : Travaux antérieurs sur les stérols dans les algues brunes.

Auteurs	Algues brunes étudiées	Stérols identifiés	Techniques de séparation et d'analyse
STEFANOV K. et al. [68] (2000)	<i>Zanardinia prototypus nardo</i>	Fucostérol 85% Cholestérol 6% 24-méthylène cholestérol 5%	CCM CGL CG-SM
	<i>striaria attemata (gre.)</i>	Cholestérol 22% Fucostérol 16% 24-méthylène cholestérol 18%	
GINER J.L. et al. [69] (2001)	<i>Aureoumbra lagunnensis</i>	(E)-24-propylidene Cholestérol 5.7% Stigmastérol 22.2% Sitostérol 19.2% Cholestérol 14.1%	CLHP RMN H CG-SM
KAMENARSKA Z. et al. [70] (2002)	<i>Cystoseira crinita</i>	Fucostérol 58.5 % 24-méthyl-cholesta-5,24 (28)-dien-3 -ol 18 % Cholestérol 11 %	CCM CG CG-SM
KAMENARSKA Z. et al. [71]. (2003)	<i>Stiphorarhizodes</i>	24-méthylène cholestérol 73.2 % cholestérol 1% Fucostérol 4.6 %	CC CG CCM CG-SM
	<i>Punctaria latifolia grev.</i>	Cholestérol 76% 24-méthylène cholestérol 6.1%	
	<i>Punctaria plantaginea</i>	Cholestérol 45% 24-méthylène cholestérol 28.6%	
SANCHEZ-MACHADO D.O. [72] (2004)	<i>Himanthalia elongata</i>	Fucostérol 83-97 %	CLHP-UV CLHP-SM
	<i>Undaria pinnatifida</i>	Fucostérol 83-97 %	
	<i>Laminaria ochroleuca</i>	Fucostérol 83-97 %	
KAPETANOVIC R. [73] (2005)	<i>Cystoseira adriatica</i>	Cholestérol 40% (24R)-stigmasta-5-en-3 -ol 30% Fucostérol 5%	CCM CC CG
	<i>Fucus virsoides</i>	Fucostérol 92%	

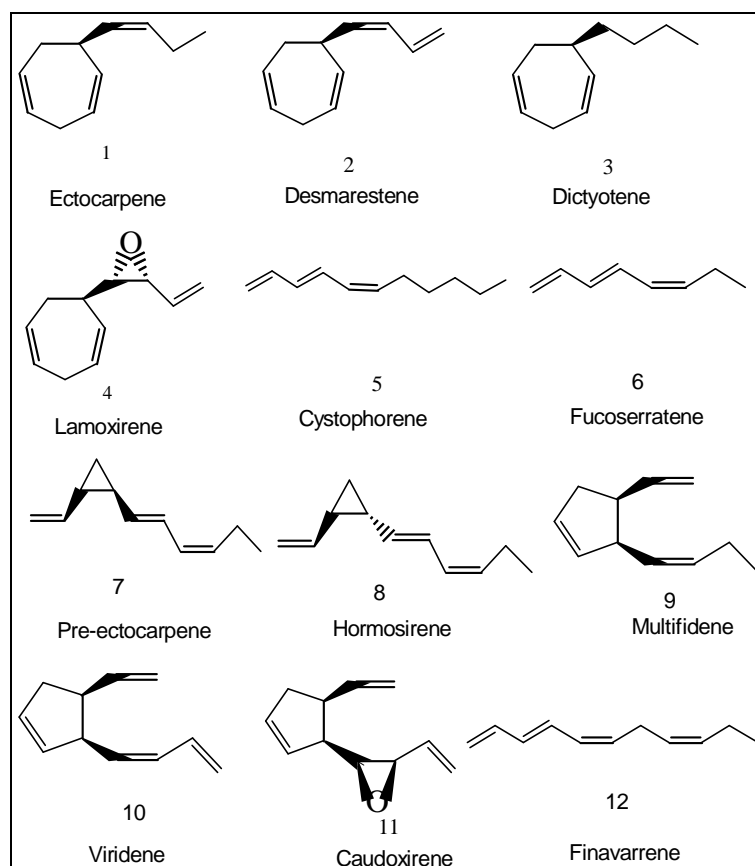


Figure 2.1 : Pheromones identifiés dans les algues brunes [76].

Dans le même domaine, une étude [76] a été réservée aux produits volatils de l'espèce méditerranéenne *Dictyopteris membranacea* et à l'optimisation des techniques d'extraction utilisées. Les fractions volatiles ont été préparées par trois techniques différentes : hydrodistillation à la vapeur d'eau, hydrodistillation assistée au micro-ondes focalisées et extraction par le dioxyde de carbone supercritique. La composition chimique des fractions volatiles obtenues par hydrodistillation à la vapeur d'eau et par extraction au dioxyde de carbone supercritique renferme une série d'hydrocarbures à 11 atomes de carbone, dominée par le dictyoptérène A, une série de produits soufrés et dérivés avec la 3-hexyl-4,5-dithia-cycloheptanone comme constituant majoritaire et une série de produits lipidiques constitués de paraffines, d'acides gras et dérivés. La composition chimique obtenue par hydrodistillation assistée aux micro-ondes est caractérisée par la présence surprenante d'une série de sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés qui est complètement absente dans les deux autres fractions. Il a été montré que l'albicanol est le produit majeur de la fraction

sesquiterpénique, il n'a été jamais rencontré auparavant dans une espèce du genre *Dictyoptéris*. De plus, certains sesquiterpènes hydrocarbonés, bien que connus chez les végétaux terrestres, ont été décrits pour la première fois dans *D. membranacea*, il s'agit notamment du -Bourbonène, de l'azulène et de l'axenol. Également, il y a lieu à noter que les espèces marines produisent des composés halogénés possédant de 1 à 30 atomes de Carbone. Ils sont principalement des terpènes et des polyphénols. La famille Bonnemaisoniaceae, contient des acétogénines halogénés, contenant de 1 à 30 atomes de Carbone sous forme d'hydrocarbure et de leurs dérivés oxygénés (alcool, aldéhydes, acides....etc) [77]. Il a été constaté la présence des terpènes halogénés assez rares [78] et des phénols [79, 80] chez certaines algues vertes, mais aussi des oxylipines [81] et des Polyphénols chez certaines algues brunes [82]. Suite à l'étude menée sur la fraction lipidique de *Cystoseira barbata* et *Cystoseira crinita*, Milkova et al [66] ont montré que la fraction volatile de *Cystoseira barbata* est principalement composée des hydrocarbures halogénés. L'hexachlorobutadiène a été isolé pour la première fois dans la nature. Tandis que *Cystoseira crinita* ne contient que des traces d'un monoterpène (Dihydroactinidiolide) qui a été déjà détecté chez les plantes terrestres et quelques algues vertes [83, 84].

Les produits volatils de l'algue verte des mers douces, *Chara globularis* ont fait l'objet d'une étude analytique [85]. Ils ont été obtenus par hydrodistillation de l'algue fraîche (0.9% de rendement) puis identifiés par analyse CG/SM sur une colonne capillaire HP5-MS. Il a été constaté que la composition chimique de *Chara globularis* contient des produits chlorés relativement rares qui représentent plus de 10% des produits volatils. Ces derniers confèrent à l'algue une odeur très caractéristique. Dans la même algue, deux terpénoïdes ayant une activité antibactérienne ont été identifiés, il s'agit de, dihydroactinidiolide et du hexahydrofarnesylacétone. La présence de ces deux derniers produits chez d'autres algues vertes a été déjà reportée [86, 87, 88].

Dans le même contexte, Kamenarska et al [89], ont effectué une comparaison entre les compositions en produits volatils de sept espèces d'algues brunes de la mer noire. Ces algues sont : *Stilophora rhizodes*, *Punctaria tenuissima*, *Punctaria lattifolia*, *Punctaria plantaginea*, *Colpomenia pergrina*, *Zanardinia prototypus* et *Dilophus fasciola*. Différents groupes de composés ont été identifiés : hydrocarbures, benzènes alkylés, alcools phénols, aldéhydes, cétones, acides,

esters, terpènes et des composés soufrés et chlorés. La fraction volatile est obtenue par distillation-extraction simultannée et l'identification est réalisée par CG/SM. Sur la base des résultats obtenus, des conclusions sur la taxonomie et l'évolution des algues ont été proposées [89]. Les informations taxonomiques apportées par les produits volatils obtenus par distillation-extraction ont été reportées dans le travail de Kamenarska et al [71]. Dans un autre travail [70], une partie de l'extrait chloroformique a été soumise à une distillation dans l'appareil de Lickens-Nickerson. Les produits volatils ont été extraits par l'éther diéthylique (6.3% de rendement) de l'extrait, puis analysés par CG/SM. Dans cette étude, les composés chlorés représentent 27% des composés volatils. Ils sont surtout des éthanes substitués par le chlore et des groupes éthoxy sous forme d'acides chloroacétique et leurs esters éthyliques, qui possèdent des activités antibactériennes et antifongiques. La présence de ces produits empêche la croissance de certaines algues [90]. Les produits extraits de la fraction volatile des algues sont dotés des propriétés très intéressantes surtout en pharmacopée. Ceci a incité les chercheurs à pousser leurs recherches sur cette classe, malgré les faibles rendements rencontrés dans plusieurs cas et la concentration extrêmement faible des composés rares [5].

## 2.5 Activité biologique des produits marins

Les algues comme d'autres organismes vivants produisent des métabolites secondaires. Ces composés jouent un rôle dans : la défense contre la prédation, la compétition pour l'espace, l'antifouling, la reproduction....etc. ils peuvent être la source de nouveaux principes actifs, c'est pour ces raisons que les métabolites secondaires font l'objet d'une attention particulière, notamment dans le monde de la recherche. L'étude de la fraction lipidique et volatile des algues ne concerne pas uniquement la chimiotaxonomie mais aussi pour exploiter ces composés isolés dans diverses industries. Les algues rouges et brunes n'ont aucun équivalent terrestre et les métabolites qu'on y trouve sont presque tous originaux [5].

Dans l'alimentation Beaucoup d'entre eux sont consommés presque tous les jours sous forme de gélifiants ou d'épaississants [5]. Six algues brunes, cinq algues rouges, deux algues vertes et deux microalgues étaient autorisées à la consommation en agroalimentaire [91]. L'utilisation des algues en pharmacologie

remonte à la nuit des temps. Les chinois ont utilisés les algues brunes contre les ulcères d'estomac et pour soigner les goitres [5]. En 1948, Brotzu découvre une nouvelle génération d'antibiotique appelé « céphalosporine » à partir des champignons semi-marins. L'étude systématique de la biodiversité marine à des fins thérapeutiques n'a véritablement commencé que dans la seconde moitié du vingtième siècle et a tout de suite suscité de grand espoirs grâce à la découverte de quelques molécules rares et actives. Les activités biologiques les plus recherchées sont avant tout l'activité anticancéreuse et l'activité antivirale [5]. Certains travaux sur les extraits lipidiques de certaines espèces de Cystoseiracées ont montré la contribution des produits terpéniques dans l'activité antimicrobienne et antifouling de ces algues [92, 93, 94, 95]. Rappelons que les stéroïdes et les terpènes sont cités pour leurs activités dans l'anti-prédation, la compétition pour l'espace et le contrôle de croissances des épiphytes [96, 97]. Dans le travail de Milkova et al [66], des activités antimicrobiennes, antifongiques et cytotoxiques contre les crustacées ont été observées chez *Cystoseira barbata*. Ceci est probablement lié à la présence d'hydrocarbures halogénés dans la fraction volatile de cette algue [66]. Suite à l'étude effectuée sur les stéroïdes, les produits volatils et les lipides de l'algue verte *Chara globularis* [85], le pouvoir antimicrobien de différentes fractions a été étudié in vitro sur deux souches bactériennes *Escherichia coli* WF+ et *Staphylococcus aureus* 209. L'activité antimicrobienne a été définie par la mesure du diamètre d'inhibition sur la couche d'agar colorée après 72 h d'incubation à 37°C par le bleu de méthylène. L'extrait lipidique est modérément antimicrobien vis-à-vis de *S.aureus*. Une autre étude réalisée par Kamenarska et al [89] a porté sur l'étude de l'activité antimicrobienne de sept espèces de phéophycées. L'étude a été effectuée sur deux souches bactériennes *Staphylococcus aureus* 209 et *Escherichia coli* WF+, ainsi que des souches fongiques *Candida albicans* 562, en utilisant la méthode de diffusion en milieu gélosé d'Agar, l'activité cytotoxique a été aussi étudié vis-à-vis des crustacées de *Artemia salina*. Quatre fractions volatiles des ces espèces ont présenté une activité modérée contre le Gram + *Staphylococcus Aureus*. Pour la cytotoxicité, *Zanardinia prototypus* a présenté une activité modérée vis-à-vis de *Artemia salina* (Ld50+25). Souhaili et al [98] ont testé l'activité antibactérienne et antifongique des différents extraits de l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* récoltée sur la côte atlantique Marocaine. Ces extraits ont été examinés pour leurs

activités sur la croissance des champignons et sur la formation des mycotoxines par les champignons. La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée par la méthode des dilutions. Quatre solvants ont été utilisés dans l'extraction ; l'hexane, le méthanol, l'éthanol et l'eau. Une inhibition totale a été obtenue dans le cas de l'extrait éthanolique avec toutes les espèces fongiques à une concentration de 10%. L'extrait aqueux n'a montré aucune activité, exception faite pour quelques souches. Les autres extraits n'ont aucune activité. La formation des mycotoxines dans *Aspergillus flavus* a été inhibée par les extraits éthanoliques à une CMI de 10%. Après isolement du composé responsable de cette activité antifongique, il pourra être incorporé dans des formulations thérapeutiques pour inhiber la croissance fongique ou dans des formulations pour des conservateurs alimentaires. De nouveaux produits à partir des plantes médicinales terrestres et des algues marines ont été reportés dans le travail de Ahmed et al [99], à partir de l'algue verte *Codium decorticatum* un nouveau stérol, decorténol et un alcool acyclique diterpénique, avec une bioactivité intéressante ont été isolés et caractérisés. Ahmed et al [100] ont étudié l'activité anticancéreuse de 35 extraits éthanoliques obtenus de dix-sept algues marines à des saisons différentes. Les algues, *Codium tomentosum* (hiver), *Jaina rubens* (été) et *Padina pavoni* (hiver) ont présenté relativement une grande activité antitumorale. Une étude très approfondie [101] sur quarante-quatre espèces d'algues de la côte espagnole, a porté sur un criblage chimique pour la production des composés antibactériens et antifongiques contre des bactéries à Gram-négatifs et à Gram-positifs, mycobactéries, champignons et fongis. Un total de vingt-huit (28) espèces ont présenté une activité antibactérienne dont six ont présenté aussi une activité antifongique. Dans le travail déjà cité, *Asparagopsis taxiformis* et *Cymopolia barbata* ont été les espèces les plus actives avec un grand spectre d'action (d'organismes cibles). Toutes les espèces qui ont présenté une activité concernent le cas des bactéries à Gram-positif, tandis que seulement deux espèces, (*Asparagopsis taxiformis* et *Osmundea hybrida*), sont actives contre les mycobactéries. Dans ce même travail [101] Del Val et al ont de plus étudié la relation entre la production des métabolites secondaires et l'activité antimicrobienne sous différentes conditions. Plusieurs travaux, concernant l'activité biologique des algues, sont reportés dans la littérature, comme les activités antibiotiques, antivirales, antitumorales et anti-inflammatoires [102]. Une

multitude de fonction semble donc être attribuable aux nombreux métabolites secondaires. Copp [103] a rassemblé dans une étude les différents travaux entre 1990 et 2002 sur des produits naturels liés à des activités antimycobactériennes, avec 248 citations et 352 composés isolés des sources terrestres ou marines. De plus, il existe des variations chimiques de ces métabolites en fonction de la saison et lieu de récolte. Cette variation peut faire l'objet d'une étude chimiotaxonomique.

## 2.6 Chimiotaxonomie et métabolites secondaires des algues

La nature et /ou la présence des métabolites secondaires (molécules très spécifiques) peuvent être utilisées par les biologistes comme des critères de classement dans la détermination de la position systématique d'une espèce (chimiotaxonomie) dans le cas, notamment, de l'existence de variations morphologiques, saisonnières ou géographiques [8]. La quasi-totalité des publications concernant les terpènes d'algues brunes font référence aux ordres des Dictyocales et des Fucales où l'on a identifié de très nombreux diterpènes et quelques sesquiterpènes, un unique tri-nor-triterpène linéaire, ainsi qu'un triterpène linéaire, mais encore aucun monoterpène. En ajoutant à cela le fait qu'à de très rares exceptions, près les terpènes d'algues brunes ne contiennent pas d'halogènes, on doit donc distinguer très nettement les terpènes des Phéophycées de ceux des Chlorophycées et des Rhodophycées [5]. Grâce à cette science mettant en collaboration plusieurs disciplines, plusieurs classifications ont été proposés. Dans ce cadre, Amico [104] a donné une classification aux algues brunes appartenant à la famille des *Cystoseiracées* en se basant sur la classe chimique des terpènes. Dans le même genre, il a été démontré que les espèces ayant des métabolites complexes étaient les plus intéressantes à étudier. Par exemple, *Cystoseira amentacea var. stricta* qui élaborait des méroditerpènes les plus complexes était plus représentative que *Cystoseira sauvageauana* qui était pour sa part plus représentative que *Cystoseira brachicarpa*. La taxonomie du genre *Cystoseiracée* a été toujours sujette à discussion. Dans le même contexte, Valls et Piovetti [83] ont étudié cette famille d'algue sur le plan de la chimie. Ils ont montré l'intérêt des métabolites secondaires (diterpènes) dans la chimiotaxonomie algale. Ce travail a complété celui de Piatteli [3] sur l'étude chimique de la famille des *Cystoseiracées*. Selon ces travaux, la classification était basée sur les



groupes des terpènes existants, par exemple ; le groupe I ne contient pas des terpènes, le groupe II contient particulièrement les diterpènes linéaires, le groupe III est constitué de méroditerpènes.....etc. Dans un autre travail de Al Easa et al [84], trente algues microscopiques appartenant au trois (03) grandes divisions : Chlorophycées, Rhodophycées et Phéophycées de la côte Qatarienne ont été étudiées par leur composition en stérols par CG/SM à des fins taxonomiques. Concernant les stérols des algues, la composition en ces produits, montrait des différences pour les trois divisions. Le cholestérol était prédominant dans les Rhodophycées et la distribution en stérols dans l'algue rouge variait beaucoup entre les différentes espèces. Le fucostérol était prédominant dans la plupart des espèces de phéophycées. Le cholestérol était aussi présent mais la proportion des deux stérols était variable durant le cycle de vie de l'algue. La composition en stérols des Chlorophycées différait des autres, et le stérol majoritaire variait dans l'ordre ou pour le même ordre à l'intérieur de la même famille. Ce travail a confirmé des résultats déjà obtenus. Notons enfin, que la chimiotaxonomie peut être très utile pour tous ceux qui travaillent sur des séries chimiques et qui souhaitent trouver des modèles originaux à l'intérieur de celle-ci [2].

### CHAPITRE 3

## ETUDE DE LA FRACTION LIPIDIQUE DE *CYTOSEIRA SEDOIDES* (EXTRACTION ET DOSAGE DES STEROLS)

### 3.1 Introduction

Ce chapitre est consacré au dosage quantitatif des stérols de l'algue brune *Cystoseira sedoides*, contenu dans la fraction lipidique extraite par solvant à partir de l'algue sèche. Dans une première étude et dans un but comparatif, le dosage des stérols libres est effectuée par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) et par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF). Il faut noter que, dans ce domaine, la CLHP est la technique maîtrisée et généralement utilisée pour le dosage quantitatif des stérols des algues [61, 72] alors que, la spectrométrie IRTF a été utilisée que pour des analyses qualitatives. Dans une deuxième étude, l'objectif visé est la détermination des stérols totaux de l'algue brune *Cystoseira sedoides* par spectrométrie IRTF et ceci, constitue une suite du travail de recherche mené par l'équipe et qui a permis le développement d'une nouvelle méthode fiable pour la détermination des stérols totaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata* par spectrométrie IRTF couplée à l'extraction en phase solide (EPS) [107, 108].

### 3.2 Étude systématique de l'algue brune *Cystoseira sedoides*

Les côtes Algériennes présentent une richesse importante en espèces algales, particulièrement les espèces du genre *Cystoseira*, parmi ces espèces, on note la présence de l'algue brune endémique *Cystoseira sedoides* (Figure 3.1). Il faut préciser noter tous d'abord que les algues brunes occupent une place importante dans la population du milieu marin (flore) méditerranéen. Elles sont souvent de grande taille, se trouvant en général entre la surface et une profondeur de 15 à 20 mètres dans les eaux agitées. La couleur brune de ces algues résulte de la dominance des pigments xanthophylles, la fucoxantine masque les autres pigments chlorophylles a et c, le  $\beta$ -carothène et les autres [5]. L'ordre des Fucales

regroupe toutes les espèces qui se reproduisent sans alternance de génération, ces algues ne présentent qu'un seul stade diploïde avec des gamètes haploïdes ; il n'y a pas de gamétophytes et les Fucales constituent la classe des Cyclospores [5].



Figure 3.1 : *Cystoseira sedoides*

L'algue ayant fait l'objet de ce travail a été récoltée au niveau du complexe touristique la Corne d'Or de la ville de Tipaza, en Septembre 2002. L'identification de l'espèce a été réalisée au niveau du laboratoire de biologie marine de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB). La systématique de cette algue est décrite dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Position systématique de l'algue brune *Cystoseira sedoides*.

Embranchement	Chromophycées
Classe	Phéophycées
Ordre	Fucales
Famille	Cystoseiracées
Genre	<i>Cystoseira</i>
Espèce	<i>sedoides</i>

### 3.3 Protocole d'extraction

Les procédés d'extraction varient selon la fraction ou la gamme de produits à extraire et dépendent largement de la nature de l'échantillon [9]. Généralement, dans le cas des stérols et de leurs dérivés, l'extraction est réalisée par le mélange de solvant chloroforme/méthanol [9, 109], l'hexane [9, 110], le dichlorométhane [9, 111] ou par de l'acétone [9, 112]. Cette extraction est suivie par une saponification et des purifications chromatographiques pour isoler les stérols totaux [9]. Avant l'extraction, le matériel végétal est trié manuellement pour éviter toutes sources de contamination. Souvent, les macroalgues sont le lieu privilégié où s'accrochent plusieurs épiphytes qui sont en fait d'autres types d'algues. Les algues triées sont ensuite lavées, séchées puis broyées. L'extraction est réalisée trois à quatre fois par un solvant de choix. Dans ce cadre, nous avons déterminé le rendement d'extraction de trois types de solvants, le dichlorométhane, l'acétone et le mélange chloroforme/méthanol (1/1), à température ambiante dans la proportion d'environ 1 litre pour 200 g d'algue. Le contact solvant-algue peut durer d'une journée à une semaine, un temps suffisamment long permet un épuisement maximal de l'algue. La solution solvant-extrait est filtrée sur un buchner à verre fritté afin d'éliminer toute suspension provenant de la dégradation de la matière végétale. La solution ainsi filtrée est distillée légèrement sous vide à une température de 42°C. Le protocole général d'extraction utilisé est indiqué par la figure 3.2.

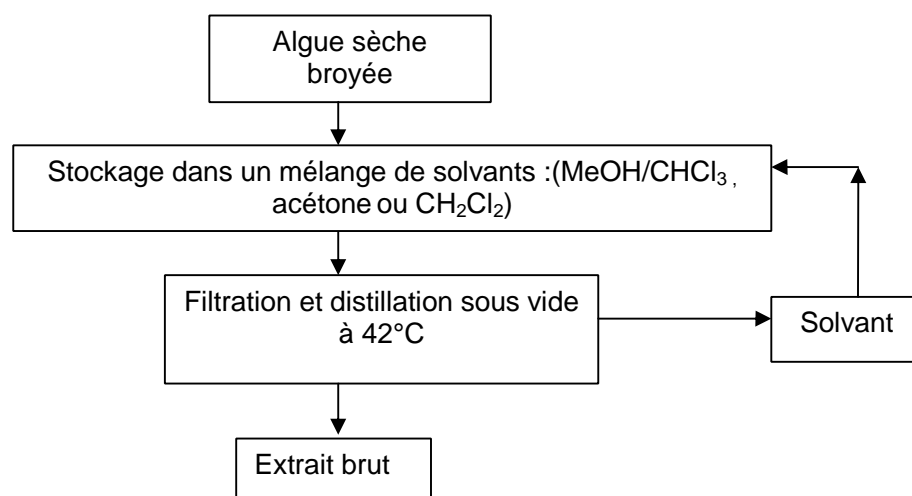


Figure 3.2 : Protocole général de l'extraction.

Tableau 3.2 : Rendements d'extraction pour différents solvants organiques.

Solvants d'extraction	Rendements (%)
Méthanol/Chloroforme (1 :1) volumique	0.52
Dichlorométhane	0.16
Acétone	0.22

D'après le tableau 3.2, on remarque que le meilleur rendement moyen d'extraction a été obtenu avec le mélange Méthanol/Chloroforme. Ce résultat est tout à fait objectif, dans la mesure où l'utilisation d'un mélange de solvants permet de disposer d'un large domaine de solubilité. Le chloroforme est un solvant apolaire à faiblement polaire (polarité relative = 0.40), le méthanol est un solvant polaire (polarité relative = 0.95). Nous constatons donc que le mélange équivolume des deux solvants permet de balayer l'intervalle global de polarité et tous les produits polaires et apolaires de la fraction lipidique pourraient à priori être extraits, donc ce mélange solvant est très faiblement sélectif, l'extrait ainsi obtenu contient toute la gamme de produits polaires et apolaires. Cependant, l'utilisation du dichlorométhane (polarité relative = 0.42) ou de l'acétone (polarité relative = 0.65) seul permet de réaliser une extraction sélective d'une gamme de produits donc la polarité est proche de celle du solvant.

Afin de fractionner l'extrait obtenu, nous avons utilisé la chromatographie sur colonne ouverte de silice (CC). Cette technique, très simple permet des séparations grossières de mélanges complexes et quelque fois, elle permet d'obtenir des fractions contenant des produits presque purs [9, 113]. Pour vérifier la nature des produits obtenus, nous avons fait appel à la chromatographie sur couche mince (CCM), une technique très simple mais qui fournit souvent des informations très précieuses [9, 113]. Nous l'avons utilisé d'un premier lieu à l'extrait brut pour détecter la présence de la fraction stérolique, objet de notre étude.

### 3.4 Chromatographie sur couche mince de l'extrait brut

L'objectif de cette analyse comme nous l'avons déjà précisé est de vérifier la présence des stérols dans les extraits bruts, mais également pour les repérer par la suite dans les différentes fractions.

#### 3.4.1 Matériels et produits utilisés

La CCM est effectuée sur des feuilles d'aluminium recouvertes de gel de silice si 60 (Merck). L'élution est réalisée avec un mélange binaire acétate d'éthyle: isooctane (AcOEt/TMP) à une proportion 50 : 50 v/v. la révélation est réalisée avec une solution 18 N d'acide sulfurique suivi d'un passage à l'étuve à 110°C. La plaque CCM est préparée en déposant les spots des extraits bruts déjà obtenus (03 extraits), avec le cholestérol pris comme étalon. Celle-ci est placée verticalement dans une cuve contenant la phase mobile constituée par le mélange AcOEt/TMP (50 :50 v/v).

#### 3.4.2 Confirmation de la présence des stérols par chromatographie sur couche mince

Après pulvérisation de la plaque CCM à l'acide, nous avons observé l'apparition de taches roses pour les trois extraits au même niveau que le cholestérol (même  $R_f$ ) (Figure 3.3). Les taches roses sont caractéristiques des stérols. Les stérols et leurs dérivés (acides et esters) se colorent en rose suite à l'action de l'acide sulfurique suivi d'un chauffage [9]. Cette analyse nous a permis de montrer la présence des stérols dans les trois extraits à un  $R_f=0.66$ .

Puisque la présence des stérols est confirmée et du fait que l'extrait brut renferme plusieurs produits de polarités différentes, un fractionnement de ce dernier est effectué pour récupérer cette classe de produits.

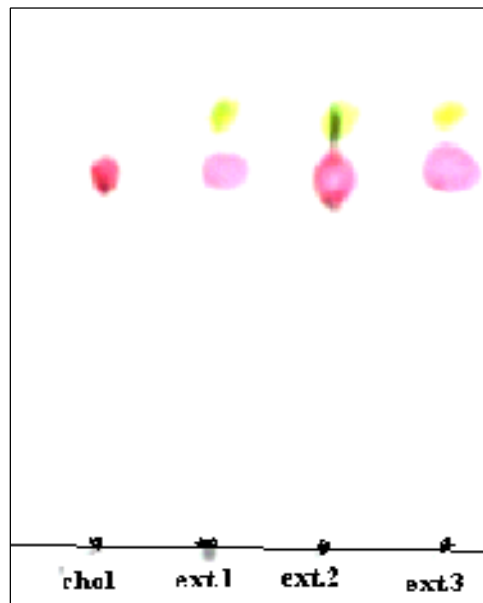


Figure 3.3 : Plaque CCM des extraits bruts (chol., cholesterol; ext.1 :MeOH/CHCl<sub>3</sub>; ext.2 :CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; extr.3:acétone)

### 3.5 Chromatographie sur colonne

Le point de départ de la séparation chromatographique doit être la connaissance ou la prédiction des composants du mélange. De plus, les manipulations antérieures donnent souvent des renseignements sur la nature des composants. Donc, le choix du solvant d'élution et de fixation sera fonction des substances à séparer [36]. Dans le cas des produits naturels, la matrice végétale est très complexe à une grande échelle de polarité. Le seul moyen pour assurer un bon fractionnement de l'extrait brut est l'utilisation d'un gradient d'élution ascendant.

#### 3.5.1 Protocole de la méthode

La chromatographie sur colonne est effectuée sur une colonne remplie de gel de silice 60 (0.25 mm), en respectant le rapport 1 g d'échantillon pour 40g d'adsorbant. L'extrait brut dissout dans un minimum de solvant est introduit au sommet de la colonne. L'extrait est élué à l'aide d'un mélange binaire acétate d'éthyle/hexane dont la composition évolue de 100% d'hexane à 100% d'acétate d'éthyle puis enfin, on procède à un lavage de la colonne avec du méthanol pur (100%). Nous avons procédé à un fractionnement en tenant compte de la couleur de la fraction, c'est ainsi que des fractions ayant un volume oscillant entre 100 à

150 ml ont été récupérées au fur et à mesure de l'élution. Les fractions obtenues sont ensuite évaporées à sec et pesées.

Le fractionnement effectué nous a permis de récupérer 114 fractions de polarité croissante (allant des produits apolaires jusqu'aux produits polaires). Chaque gamme de produit est concentrée dans une ou plusieurs fractions successives. Pour pouvoir séparer ces différentes fractions en fonction de leurs classes chimiques et afin de regrouper certaines d'entre elles, une analyse par CCM a été effectuée.

### 3.5.2 Situation de la fraction stérolique par chromatographie sur couche mince

Pour visualiser les stérols et repérer la fraction stérolique à purifier, nous avons effectué une CCM en utilisant le même protocole et dans les mêmes conditions que précédemment (§.3.4.2). Nous avons limité (choix basé sur des critères objectifs) la recherche de stérols dans les fractions allant de 4 à 55. Les fractions 1 à 3 contiennent le  $\beta$ -carotène (pigment jaune assez caractéristique), la chlorophylle, des acides gras à bas poids moléculaire et des produits volatiles [76]. Les fractions au delà de 55, sont des fractions polaires où nous avons vérifié par CCM l'absence de stérols. La confirmation de l'existence des stérols est réalisée grâce au cholestérol comme témoin. Après révélation à l'acide sulfurique, l'analyse de ces plaques montre l'existence des stérols dans les fractions allant de 10 à 18 (apparition des taches roses) (Figure 3.4). Ces fractions ont été éluées avec le mélange solvant à 60/40 hexane/acétate d'éthyle. En regroupant toutes ces fractions, on obtient une fraction concentrée en stérols que nous avons appelé la fraction stérolique non purifiée qui fera l'objet d'une purification ultérieure, par CLHP.



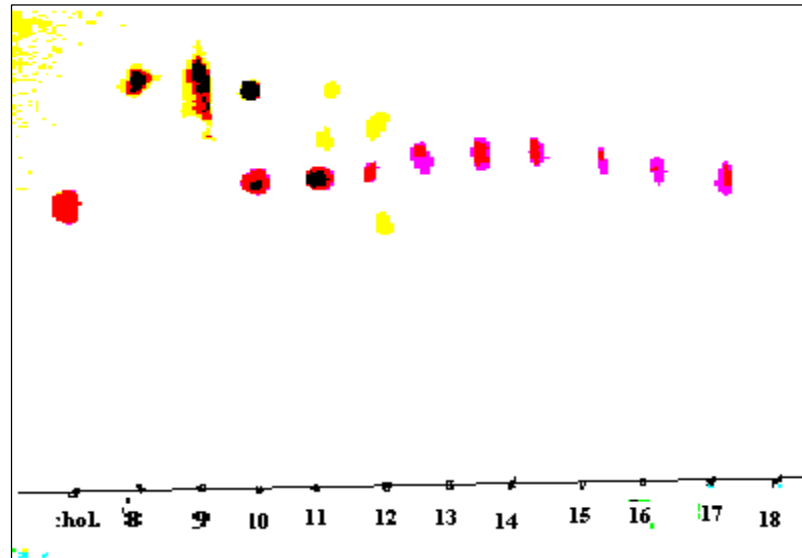


Figure 3.4 : Plaque CCM des fractions 8 à 18 récupérées de la colonne ouverte de silice

### 3.6 Dosage des stérols libres dans l'algue brune *Cystoseira sedoides* par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

L'objectif de cette partie étant de doser les stérols libres dans l'extrait obtenus par solvant à partir de l'algue sèche. Nous avons utilisé la chromatographie liquide haute performance en phase normale en adoptant la technique de l'étalonnage interne. Il y a lieu de noter dans ce cadre que cette technique très fiable est très couramment utilisée dans le dosage des différents métabolites secondaires [114] des algues ou autres organismes. Nous avons enregistré l'utilisation de cette technique dans divers travaux sur le dosage de certains métabolites en fonction des variations saisonnières et géographiques [48, 49, 52, 115, 116, 117, 118].

Afin de réaliser le dosage par étalonnage interne, nous avons besoin d'un standard (sous forme de produit pur) à doser dans la matrice végétale ainsi que de l'étalon interne.

Dans cette partie de l'étude, la chromatographie liquide CLHP en phase normale et en mode isocratique est utilisée pour deux objectifs :

- Repurification des stérols de la fraction récoltée de la colonne ouverte de silice par la CLHP semi-préparative,

- Détermination de la teneur en stérols libres dans l'extrait brut, en utilisant la fraction de stérols repurifiée comme standard par CLHP analytique.

### 3.6.1 Choix du standard

Il est important de noter que dans notre cas, il ne s'agit pas d'un produit pur mais d'une fraction de produits appelés stérols (en fait une fraction stérolique). Cette fraction est dominée par le cholestérol (plus de 90%) dans les algues rouges et par le fucostérol (plus de 95%) dans les algues brunes. C'est la raison pour laquelle, certains travaux sur le dosage des stérols dans les algues ont utilisé le cholestérol pour doser les stérols dans l'extrait lipidique de l'algue rouge *Asparagopsis armata* [107] et le fucostérol pour doser la fraction stérolique dans l'extrait lipidique de certaines espèces d'algues brunes [61].

Dans notre travail, nous avons privilégié l'utilisation comme standard, la fraction stérolique elle-même que nous avons purifiée à partir des fractions collectées par chromatographie sur colonne ouverte de silice (fraction de 10 à 18 regroupées).

### 3.6.2 Choix de l'étalon interne

Le choix de l'étalon interne est d'une importance primordiale, c'est un composé qui ne doit pas interférer avec les différents types de composés du chromatogramme, généralement, il faut tester une série de produits dans des expériences préliminaires pour aboutir au choix de l'étalon interne. Dans le présent travail, la 4-méthoxy acétophénone a été utilisée comme étalon interne. Une série d'expérience préliminaire sur différents produits nous a permis de vérifier que la 4-méthoxy acétophénone, remplit les critères d'un bon étalon interne. Ce même produit a été déjà utilisé lors de l'étalonnage des stérols de l'algue rouge *Asparagopsis armata* [107, 108].

### 3.6.3 Instrumentation

Une chaîne de chromatographie liquide haute performance, équipée d'une pompe ConstaMetric 3000 (LDC analytical), est utilisée soit en mode analytique soit en mode semi préparatif. Pour l'analyse ainsi que pour les purifications des produits, la détection est assurée par un réfractomètre différentiel Waters 40I et d'un intégrateur Varian 4400. Deux colonnes ont été utilisées : une colonne analytique purosfer<sup>®</sup> STAR Si (5µm), 250 mm x 4.6 mm et une colonne semi-préparative lichrospher<sup>®</sup> Si 60 (5µm), 250 mm x 10.5 mm.

La phase mobile utilisée est un mélange binaire d'acétate d'éthyle et d'isooctane, en mode isocratique.

### 3.6.4 Purification de la fraction stérolique par CLHP

Comme nous l'avons déjà expliqué, la CCM des fractions 10 à 18 montrent qu'elles contiennent majoritairement des stérols (Figure 3.4). Nous les avons regroupé en une seule fraction que nous avons appelé fraction stérolique non purifiée. Une analyse plus poussée par CLHP (Figure 3.5) de la fraction stérolique non purifiée confirme la présence des stérols (bien qu'ils s'agit d'un mélange, les stérols donnent un seul pic en CLHP en phase normale) en proportion relativement importante ( $t_r=9.7$  mn). Cette fraction stérolique non purifiée, contient également une fraction de produits apolaires composés de pigments (chlorophylles responsables de la couleur verte de la fraction), des acides gras et leurs dérivés. L'objectif étant donc de séparer la fraction stérolique élue à  $t_r=9.7$  mn. La purification de cette fraction a été effectuée sur une colonne semi-préparative en utilisant un éluant constitué d'un mélange AcOEt/TMP (15/85, v/v) à un débit de 3 ml/mn. Cette fraction stérolique purifiée contient le fucostérol en majorité (sa teneur est supérieure à 95% dans les algues brunes) mais également du cholestérol et d'autres types de stérols. Pour vérifier la nature de cette phase stérolique, nous avons injecté le cholestérol (à défaut de fucostérol qui est un produit très cher) dans les mêmes conditions de purification (Figure 3.6). Le chromatogramme obtenu montre un pic élué à  $t_r=9.24$ mn soit approximativement le même temps de rétention que celui de la fraction stérolique.

La purification par CLHP de la fraction stérolique totale issue de la colonne (fraction 10 à 18) a permis d'isoler une masse de 85,84 mg de stérols libres relativement purs (fraction très légèrement colorée contenant encore des traces de pigments). Nous avons vérifié la pureté de la fraction stérolique purifiée par CLHP où nous avons constaté l'apparition d'un seul pic (Figure 3.7). Cette fraction stérolique purifiée est utilisée comme standard dans le dosage quantitatif.

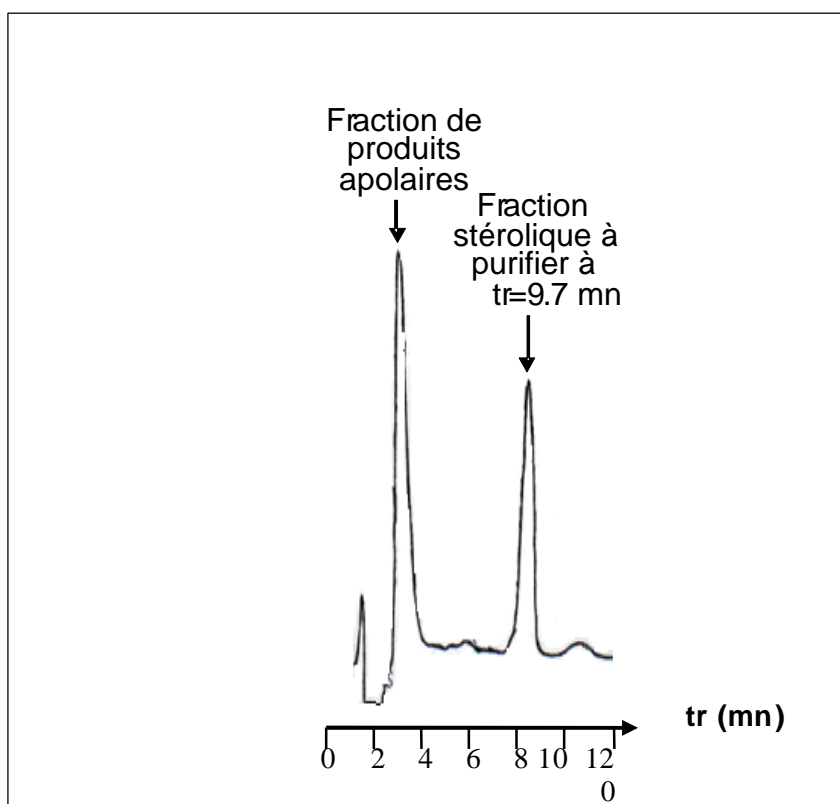


Figure 3.5 : Chromatogramme CLHP de la fraction stérolique à purifier. Colonne : semi-préparative, élution : AcOEt/TMP (15/85, v/v), débit 3 ml/mn.

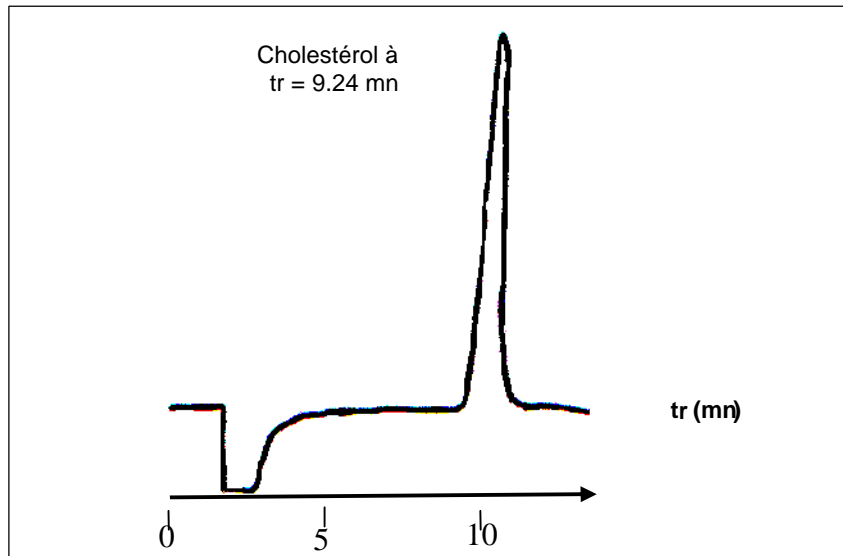


Figure 3.6 : Chromatogramme CLHP du cholestérol.  
Colonne : semi-préparative, élution : AcOEt/TMP (15/85, v/v), débit 3 ml/mn

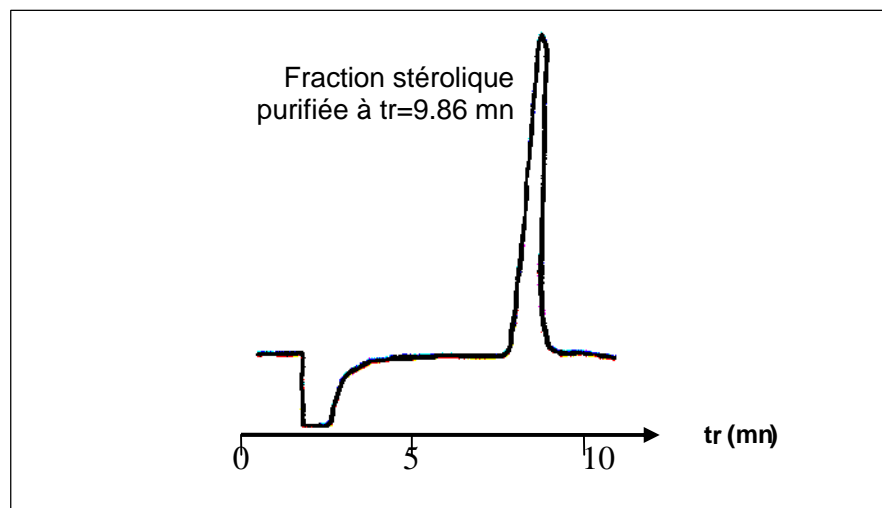


Figure 3.7 : Chromatogramme CLHP de la fraction stérolique purifiée par CLHP.  
Colonne : semi-préparative, élution : AcOEt/TMP (15/85, v/v), débit 3 ml/mn

### 3.6.5 Droite de calibration

Comme nous l'avons déjà précisé, l'étalon interne utilisé dans le dosage est la 4-méthoxy acétophénone (Figure 3.8).

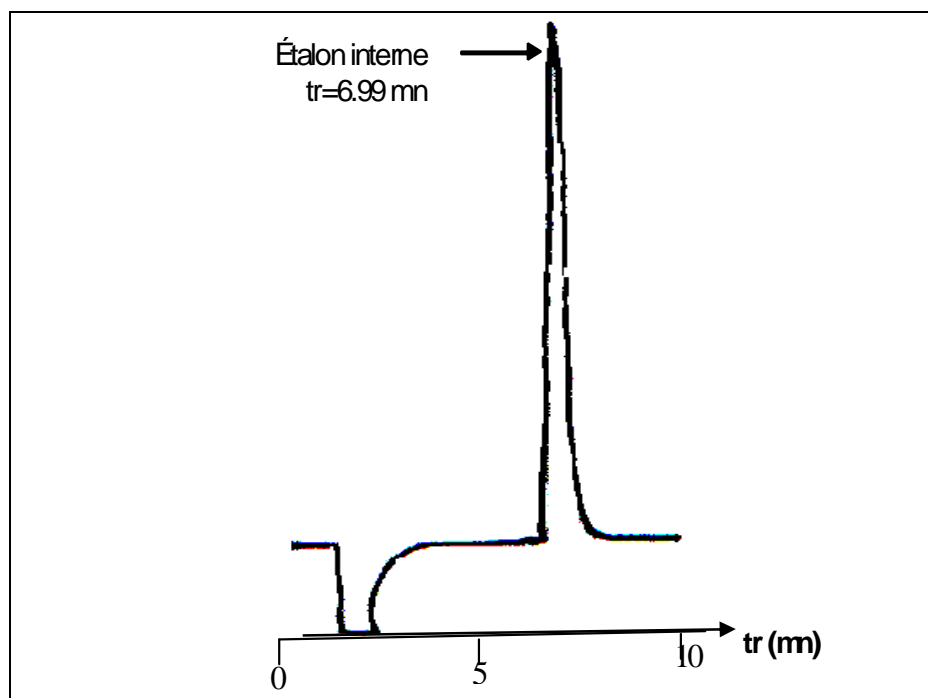


Figure 3.8 : Chromatogramme CLHP de l'étalon interne.  
Colonne : analytique, élution : AcOEt/TMP (15/85, v/v), débit 1 ml/mn.

La courbe d'étalonnage (calibration) a été déterminée en injectant des solutions de concentrations différentes d'étalon interne et du standard (stérols purifiés). Pour cela, nous avons préparé une solution d'étalon interne dans l'AcOEt à 2 mg /ml, et une solution de standard dans l'AcOEt à une concentration de 17 mg / ml. A partir de ces deux solutions, nous avons pris un volume de la solution d'étalon interne auquel nous rajoutons un volume croissant de la solution de standard. Les résultats obtenus sont représentés sous forme du rapport de concentration  $C_{EI}/ C_{St}$  en fonction du rapport d'aires  $A_{EI}/ A_{St}$  (Figure 3.9 et Figure 3.10).

Cette courbe d'étalonnage a été réalisée par CLHP analytique en phase normale en utilisant un mélange éluant d'AcOEt/TMP (15/85, v/v). Le débit a été fixé à 1 ml/mn et le volume injecté de 20  $\mu$ l (boucle de 20  $\mu$ l). La corrélation entre ces deux variables est donnée par la droite d'étalonnage de la forme :  $C = a A + b$ .

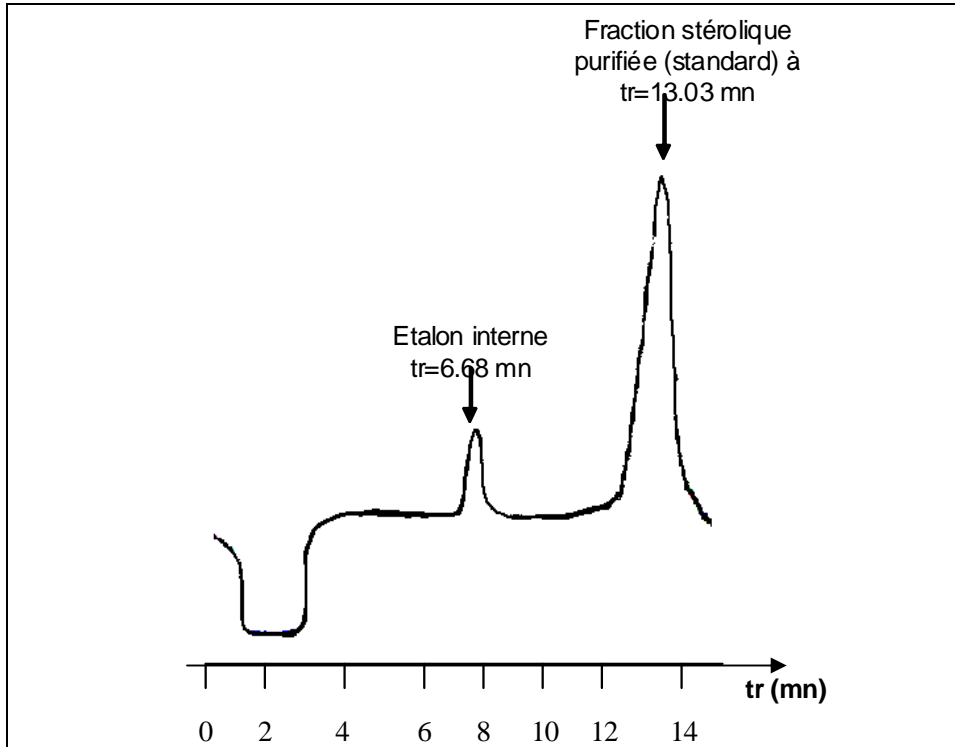


Figure 3.9 : chromatogramme CLHP de l'étalon interne et la fraction stérolique purifiée. Colonne : analytique, élution : AcOEt/TMP (15/85, v/v), débit 1 ml/mn.

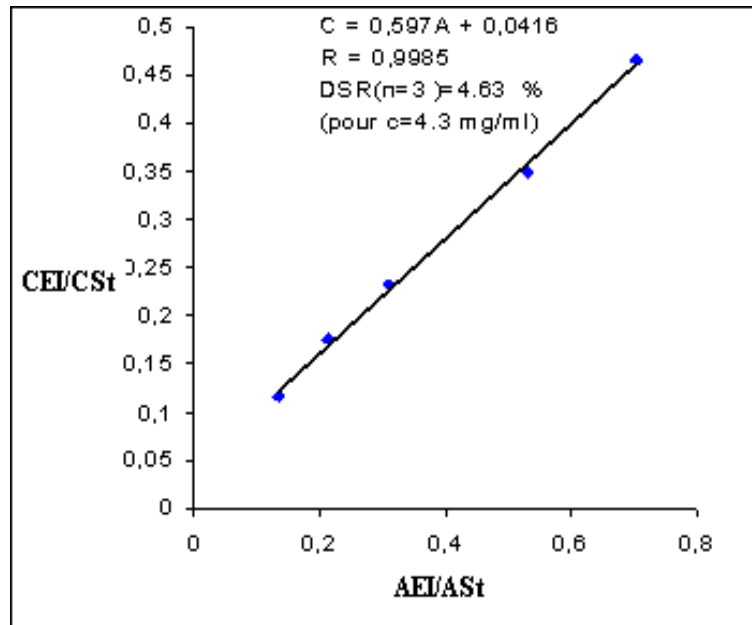


Figure 3.10 : Droite d'étalonnage des solutions étalon interne/standard.

### 3.6.6 Analyse quantitative des stérols libres dans l'extrait brut de *Cystoseira sedoides*

Un volume de la solution d'extrait brut dissout dans l'acétate d'éthyle à une concentration de 83 mg/ml est mélangé à un volume de l'étalon interne (4-methoxy acétophénone) de concentration 2 mg/ml (dissout dans le même solvant), le mélange est injecté dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées dans l'établissement de la droite d'étalonnage. Chaque point de la droite d'étalonnage représente la moyenne de trois (03) valeurs. Dans le cas où les valeurs sont très différentes quatre (04) à cinq (05) expériences ont été effectuées pour le même point. Le chromatogramme obtenu est donné par la figure 3.11.

Afin de déterminer la teneur en stérols dans l'algue étudiée, les rapports des aires des stérols et de l'étalon interne sont reportés dans la droite de calibration, ce qui permet de déduire la concentration des stérols connaissant la concentration de l'étalon interne.

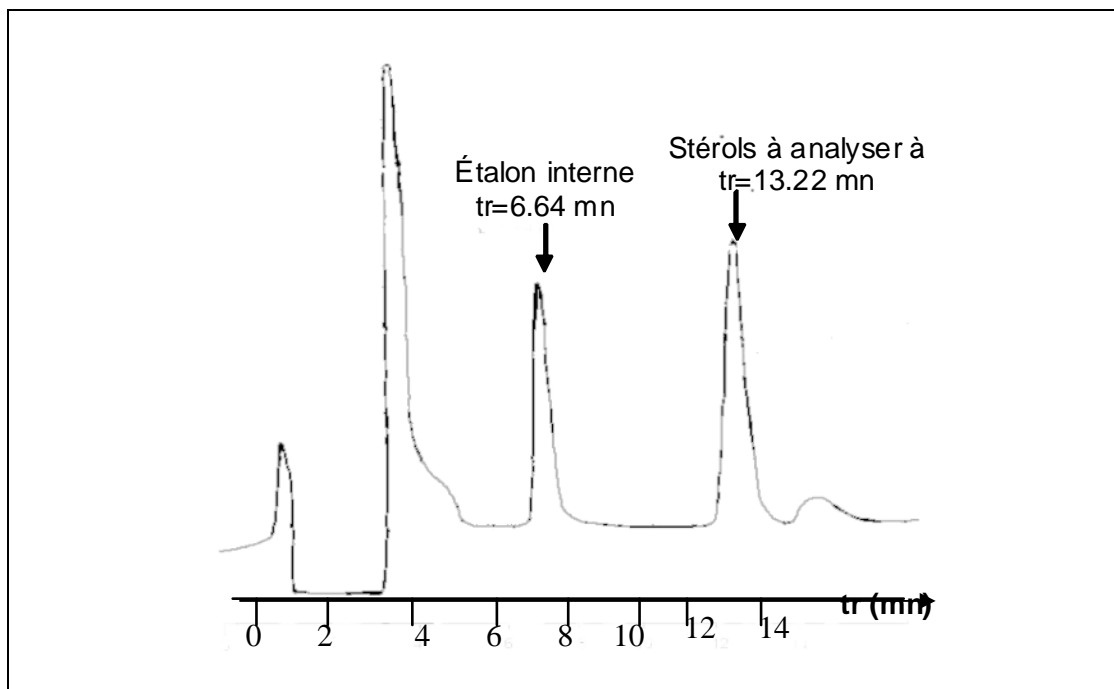


Figure 3.11 : Chromatogramme CLHP de l'étalon interne avec l'extrait brut de *C.sedoides*. Colonne : analytique, élution : AcOEt/TMP (15/85, v/v), débit 1 ml/mn.



### 3.6.7 Discussion des résultats

Le dosage par CLHP en se basant sur la méthode de l'étalonnage interne nous a permis d'évaluer la teneur massique des stérols dans l'extrait brut de l'algue brune *Cystoseira sedoides*. La teneur massique moyenne résultat de trois injections est de  $(1.62 \pm 0.2) \%$  (par rapport à 100 g d'extrait brut) soit 0.0083% (par rapport à 100 g d'algue sèche). Cette teneur représente une valeur moyenne se trouvant dans l'intervalle des teneurs de stérols analysés dans les algues brunes [9, 120]. D'autres travaux ont mentionnés des teneurs plus importantes [117, 121]. La teneur en stérols peut varier en fonction de la saison et le lieu de récolte [9, 117]. Il faut préciser que les stérols analysés sont ceux se trouvant à l'état libre. D'autres stérols se trouvent à l'état lié sous forme d'esters (acétates) [122] ou des stérols glycosidiques [123], ces derniers sont dotés d'une activité biologique très intéressante [124].

Le dosage des stérols liés fait intervenir une réaction de saponification qui permet de libérer le groupement acétate ou la structure glycosidique liée au stérol. Les stérols libres ajoutés au stérols liés constituent ce qu'on appelle les stérols totaux. La proportion de stérols liés dépend de l'espèce, elle peut être importante comme elle peut être négligeable.

### 3.7 Dosage des stérols dans l'algue brune *Cystoseira sedoides* par spectrométrie infrarouge à transformé de Fourier (IRTF)

Plusieurs méthodes ont été proposées pour la quantification des stérols de différentes algues [72, 120]. Un des domaines de recherche auquel s'est engagé notre laboratoire est lié à l'utilisation de la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) et ce, dont l'objectif, est le développement de nouvelles méthodes pour la quantification des métabolites secondaires des algues après saponification et préconcentration dans des cartouches de phases solides de type DSC18. A cet effet, un travail important réalisé, au cours d'une thèse de magister, a permis de développer une nouvelle méthode analytique pour la détermination des stérols totaux (analysés globalement sous forme de cholestérol), par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) couplé à l'extraction en phase solide (EPS) de l'algue rouge « *Asparagopsis armata* », et ce, en

considérant les valeurs d'absorbance de la bande spécifique du groupement C-OH des stérols à  $1049\text{ cm}^{-1}$ , corrigées, avec une ligne de base stabilisée entre  $1000\text{-}1079\text{ cm}^{-1}$  [107, 108]. Sur la base de cette étude, l'objectif principal fixé dans ce travail est double, le premier concerne le dosage des stérols totaux et le deuxième est consacré à celui des stérols libres des algues brunes, par spectrométrie IRTF.

Lors de cette étude, une approximation théorique nous permettra l'utilisation du cholestérol comme standard à la place du fucostérol. Bien que, ce dernier, est le stérol majoritaire des algues brunes, on a évité son emploi car il est onéreux d'un côté et non disponible d'un autre côté, l'idée va être appliquée sur l'extrait lipidique de l'algue brune *Cystoseira sedoides*.

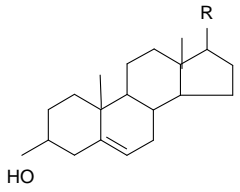
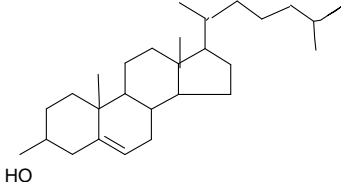
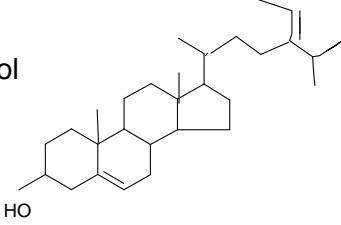
### 3.7.1 Principe de l'approximation théorique

Le caractère unique d'un spectre infrarouge permet un degré de spécificité important, toutefois, il convient de ne pas oublier que la fréquence exacte à laquelle absorbe un groupe donné peut varier en fonction de l'environnement existant à l'intérieur de la molécule.

De ce fait, l'analyse des structures des molécules des deux stérols des algues rouges et brunes (Tableau 3.3) montre que le radical R change d'un stérol à un autre mais l'environnement de la fonction C-OH libre, spécifique des stérols majoritaires des algues, est identique. D'où l'approximation de considérer les coefficients d'absorption molaire, des deux standards le cholestérol et le fucostérol, sont les mêmes à  $1049\text{ cm}^{-1}$  et ce, évidemment dans les mêmes conditions expérimentales et spectrales. Cette approximation théorique constitue une étape préliminaire à une étude plus profonde et plus détaillée dont le but est le développement d'une méthode générale pour le dosage des stérols libres ou totaux, par spectrométrie IRTF indépendamment du stérol majoritaire de l'algue choisie.

Il y a lieu à noter que, si l'expérience montre que le coefficient d'absorption molaire est différent d'un standard à un autre, un facteur de correction représentant le rapport entre les pentes des lignes de calibration des différents standards considérés peut être établi.

Tableau 3.3 : Stérol majoritaire des algues

Algue	Stérols majoritaires 
Algue rouge	Cholestérol 
Algue brune	Fucostérol 

### 3.7.2 Instrumentation et réactifs

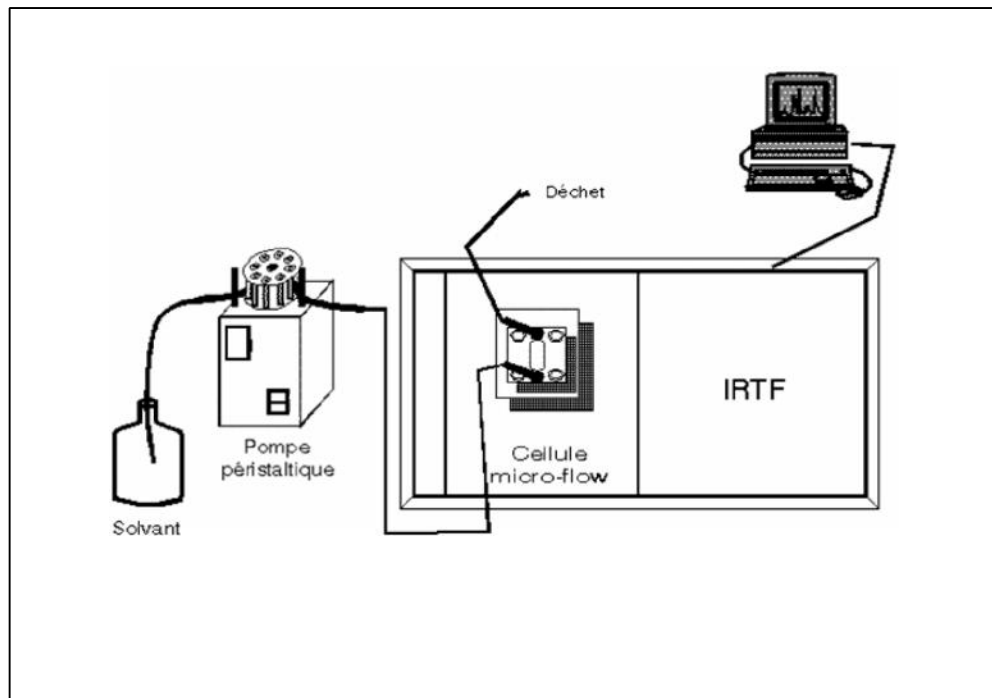


Figure 3.12 Montage d'un flux utilisé pour la détermination des stérols dans l'algue.

Les spectres sont enregistrés sur un spectrophotomètre à transformée de Fourier IRTF de marque Shimadzu type FITR-8900, équipé d'un détecteur sulfate triglicine deutéré (DTGS) à température stabilisée, d'une séparatrice de radiation en KBr, d'une fente type global et d'un système de processus digital (DSP) et ce, dans l'infrarouge moyen entre 4000 et 400  $\text{cm}^{-1}$ . Les fenêtres utilisées sont de fluorure de calcium ( $\text{CaF}_2$ ), et une entretoise en téflon de 0.5 mm. L'acquisition des spectres a été effectuée avec une résolution de 4  $\text{cm}^{-1}$  et un nombre de balayage égal à 40 spectres.

L'introduction des solutions se fait par écoulement bloqué « stop flow ». Pour cela une cellule conventionnelle a été modifiée au niveau de notre laboratoire en une cellule de flux. L'avantage d'une telle cellule est d'éviter les inconvénients relatifs au nettoyage et au remplissage des cellules conventionnelles, de minimiser la consommation des solvants organiques et de réduire le temps d'analyse (15 à 20 s). L'échantillon est introduit dans la cellule à l'aide d'une pompe péristaltique de marque DESACA (Heidelberg, Allemagne). Des tubes de chlorure de polyvinyle de diamètre intérieur 2.79 mm et de PTFE de diamètre intérieur 0.8 mm, sont utilisés pour faire passer l'échantillon dans la cellule, comme le montre le montage de la figure 3.12. Le flux est stoppé momentanément, une fois la cellule est remplie. À ce moment un spectre correspondant à l'échantillon est enregistré entre 1000 et 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

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

Tous les réactifs utilisés dans cette étude sont de grade analytique, le cholestérol, l'acétate de cholestéryle et l'hydroxyde de potassium sont fournis par Merck, les solvants sont fournis par Panreac ou par Prolabo.

### 3.7.3. Procédure générale

#### 3.7.3.1 Spectre IRTF de l'algue brune *Cystoseira sedoides*

L'analyse du spectre de la figure 3.13 montre que la détermination directe des stérols à partir de l'extrait brut de *Cystoseira sedoides*, en utilisant la bande d'absorption à 1049  $\text{cm}^{-1}$  est impossible. L'extrait brut renferme plusieurs produits de natures différentes, ces derniers peuvent masquer la bande spécifique

sélectionnée, d'où un traitement préalable de l'extrait brut est indispensable pour permettre la détermination des stérols libres et totaux.

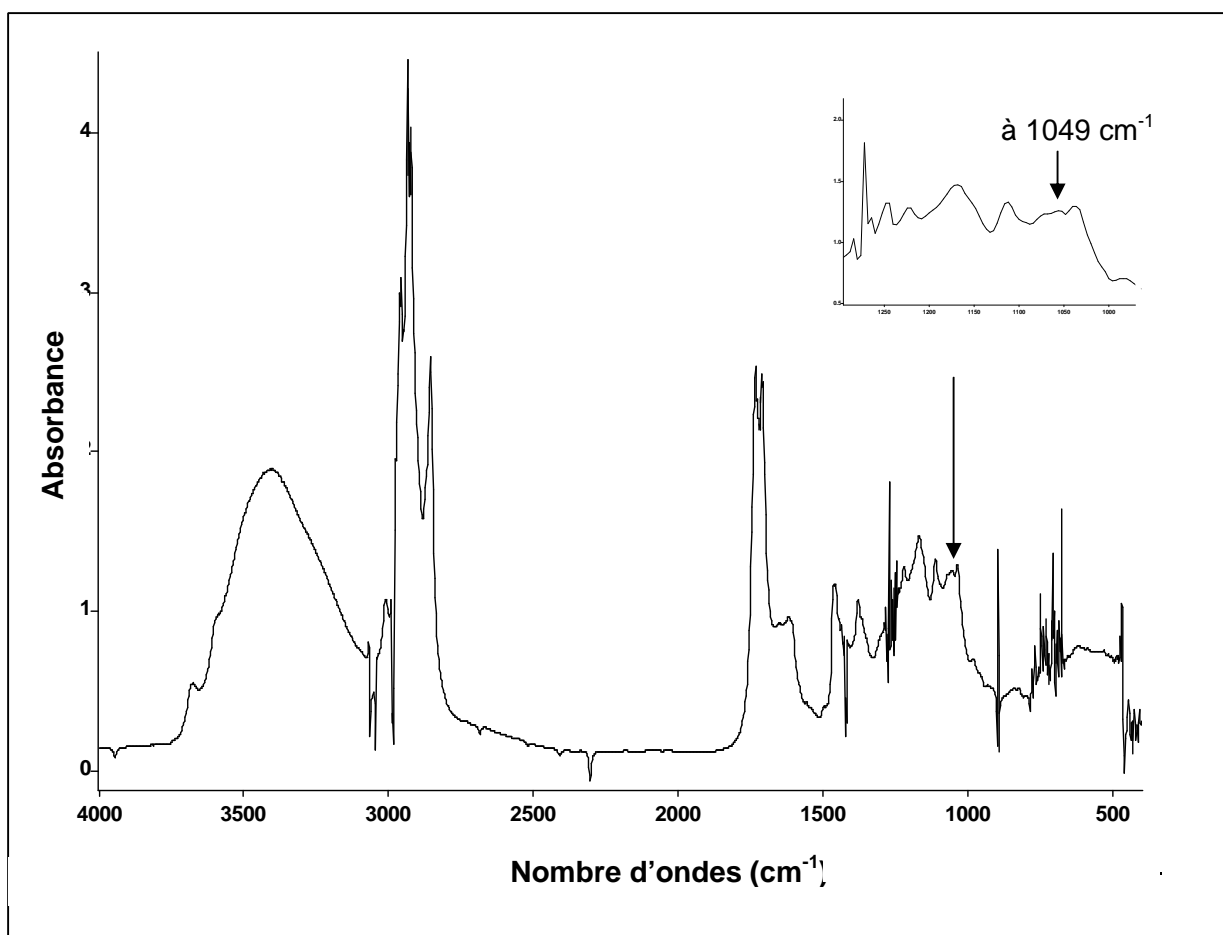
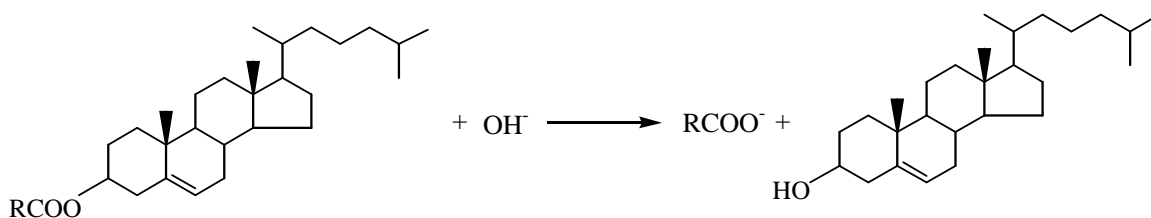


Figure 3.13 : Spectre IRTF de l'extrait brut de l'algue brune *Cystoseira sedoides* sans traitement préalable.

### 3.7.3.2. Traitement préalable au dosage des stérols totaux

Afin de libérer les stérols liés et d'analyser les stérols totaux, le traitement préalable des échantillons consiste à saponifier l'extrait brut suivi d'une préconcentration en phase solide.

La réaction de saponification est la décomposition d'un ester par l'action d'une base, généralement l'hydroxyde de sodium ou l'hydroxyde de potassium, pour donner un alcool et un sel d'acide carboxylique.



Une quantité d'échantillon d'extrait brut est mélangé avec 40 ml de solution éthanolique de KOH (1M) à 90 °C à reflux pendant une heure. Après refroidissement, 40 ml d'eau distillée est ajoutée. Le mélange réactionnel ainsi obtenu est passé à travers une cartouche de DSC18 conditionnée au préalable avec 2 ml de méthanol et 1 ml d'eau distillée. Pour récupérer les stérols, l'élution est réalisée avec quatre fractions de 1 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/amylène. La figure 3.14 montre les différentes étapes de ce traitement.

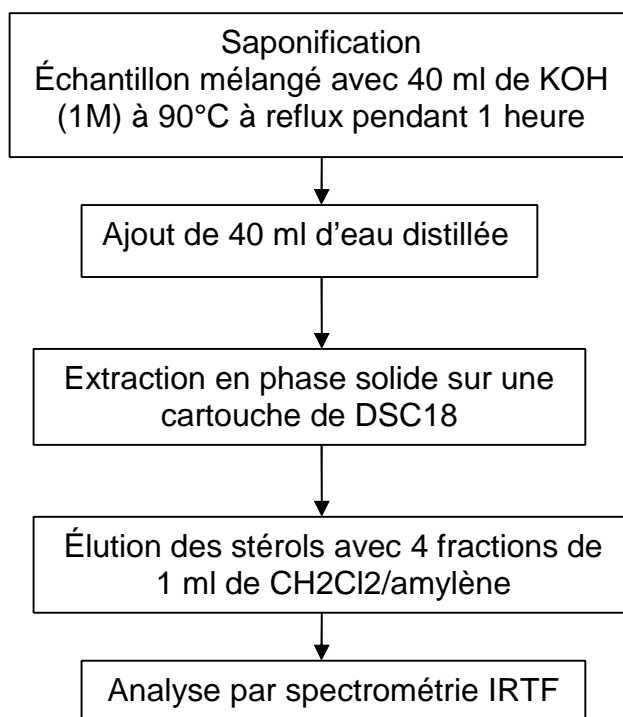


Figure 3.14 : Protocole général de la saponification-extraction en phase solide (EPS).

Il faut noter que, cette partie est basée sur le travail antérieur [107]. Le protocole de préconcentration et les paramètres spectraux sont déjà optimisés après plusieurs expériences visant à choisir celles qui donnent une meilleure récupération.

La bande spécifique du cholestérol à  $1049\text{ cm}^{-1}$ , en utilisant une ligne de base stabilisée entre  $1000$  et  $1079\text{ cm}^{-1}$  et un background stabilisé avec le solvant ont été considérés.

Concernant le protocole de préconcentration, le dichlorométhane stabilisé avec l'amylène a été sélectionné car les meilleures caractéristiques analytiques d'un mélange de cholestérol et de l'acétate de cholestéryle étaient obtenues avec ce solvant.

La phase solide de type DSC18 (Supelco) a été choisie comme adsorbant car, seulement cette phase a pu retenir quantitativement le cholestérol et le mélange cholestérol/acétate cholestéryle, après avoir testé la C18 (Merck) et la Bond Elut C18 (Varian).

### 3.7.3.3 Traitement des extraits avec solvant organique et passage à travers la silice

Pour doser les stérols libres des algues, un traitement du cholestérol avec les solvants organiques a été réalisé. Un prétraitement selon le protocole de « Bly and Dyer » a été effectué au préalable, par un mélange  $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ . Il a permis d'éliminer les produits très polaires et les impuretés (phase  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ ). La partie moyennement polaire (phase  $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ ) a été passée à travers une phase de silice en utilisant la même proportion de mélange de solvants qui a permis d'éluer les stérols de la colonne ouverte de silice, à savoir hexane/acétate d'éthyle (60/40). Les stérols sont préconcentrés dans cette phase. La figure 3.15 montre les différentes étapes de ce traitement.

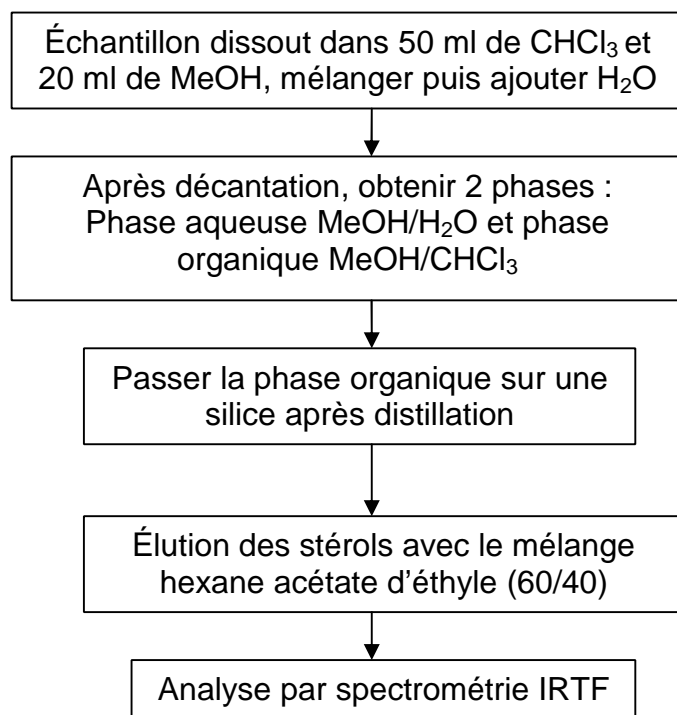


Figure 3.15 : Protocole général de traitement par solvants organiques.

Notons qu'avant l'analyse, un *background* du blanc analytique (une solution qui a subi toute la procédure développée et qui contient le solvant et tout les réactifs utilisés lors de l'analyse , à l'exception de l'analyte lui même) est établi.

### 3.7.4 Résultats et discussions

#### 3.7.4.1 Dosage des stérols totaux par spectrométrie IRTF

##### 3.7.4.1.a Caractéristiques analytiques du cholestérol obtenues directement dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ amylène

Les caractéristiques analytiques du cholestérol préparé directement dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sont présentées dans le tableau 3.4 et les spectres du cholestérol à des concentrations allant de 0.7 à 10 mg.ml<sup>-1</sup> sont représentés dans la figure 3.16. Ces résultats coïncident bien avec ceux trouvés dans les travaux précédents [107] ; montrant une très bonne linéarité, une limite de détection de 7.4 µg.ml<sup>-1</sup> et une déviation standard de 0.25%.



Tableau 3.4 : Caractéristiques analytiques du cholestérol préparé directement dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /amylène.

Droite de calibration	$0.019839C+0.00047$
Coefficient de corrélation	0.999945
Limite de détection (L.D en $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ )	7.4
Déviatoin standard relative (D.S.R en % pour $n=10$ )	0.25
Domaine de concentration (D.C ( $\text{mg}.\text{ml}^{-1}$ ))	0.7-10

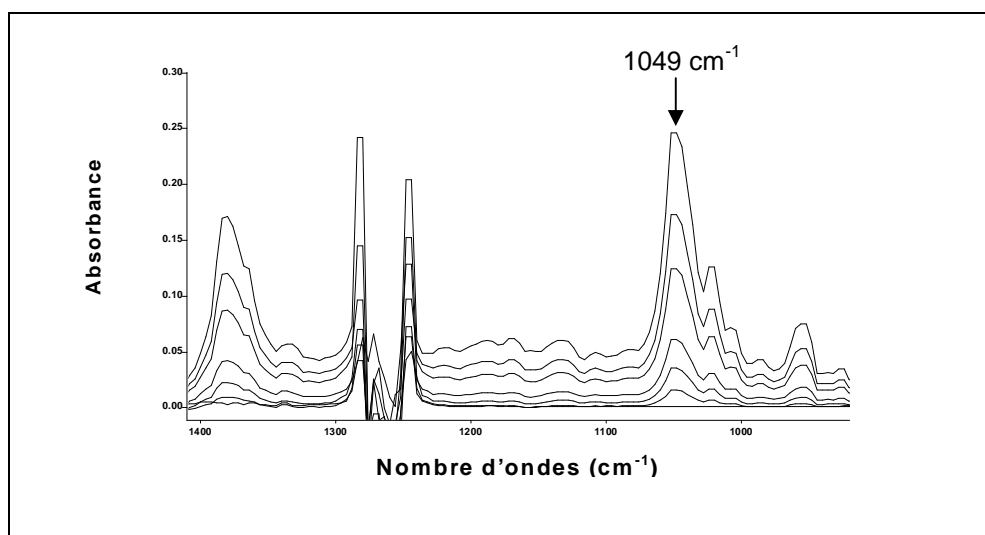


Figure 3.16 : Spectres d'absorbance du cholestérol préparé dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  stabilisé avec l'amylène, pour un domaine de concentration compris entre  $0.7-10 \text{ mg}.\text{ml}^{-1}$ . Conditions expérimentales : Chemin optique  $0.5 \text{ cm}^{-1}$ , Résolution nominale  $4 \text{ cm}^{-1}$ , Nombre de balayage 40, Background de la cellule remplie de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  /amylène.

#### 3.7.4.1.b Caractéristiques analytiques du cholestérol après saponification et extraction en phase solide

Les caractéristiques analytiques du cholestérol après saponification et extraction à travers un support solide de phase  $\text{DSC}_{18}$  sont établies et résumées dans le tableau 3.5.

Tableau 3.5 : Caractéristiques analytiques du mélange de cholestérol et d'acétate de cholestéryle dans une proportion 9 :1 (1/1) obtenues après saponification et extraction à travers DSC<sub>18</sub>.

Droite de calibration	0.01501C+0.00197
Coefficient de corrélation	0.9995
Limite de détection (L.D en $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	12.8
Déviatoin standard relative (D.S.R en % pour n=10)	0.28
Domaine de concentration (D.C ( $\text{mg. ml}^{-1}$ ))	0.7-10
Récupération d'extraction (%)	76

Le rendement d'extraction est calculé à partir des rapports entre les pentes des droites de calibration obtenues pour des étalons après traitement et des étalons préparés directement dans le solvant.

Il a été reporté dans la littérature des différences importantes dans la composition des stérols des algues, ce qui peut être lié aux variations saisonnières ou géographiques [125].

Pour ce travail, une proportion cholestérol/acétate cholestéryle de 9 :1 (p/p) a été considérée, car c'est la proportion rencontrée généralement entre les stérols libres et les stérols liés dans les algues [126].

#### 3.7.4.1.c Analyse des stérols totaux de l'algue brune *Cystoseira sedoides* par spectrométrie IRTF

Vers 100 mg d'extrait d'algue brune *Cystoseira sedoides* préalablement saponifié et preconcentré selon le protocole décrit dans la partie expérimentale est analysé par spectrométrie IRTF. Le spectre est montré sur la figure 3.17.

Le contenu des stérols de l'algue brune est obtenu en extrapolant les valeurs d'absorbance dans la droite de calibration établie pour des étalons de cholestérol et d'acétates de cholestéryle, mélangés dans une proportion 9 :1 traité de la même façon que les échantillons réels. Les résultats sont résumés dans le tableau 3.6 et montrant un contenu de stérols totaux de  $3.04 \pm 0.45$  %.

Tableau 3.6 : Teneur en stérols totaux dans l'extrait brut de l'algue brune *Cystoseira sedoides* après traitement par saponification.

Quantité de l'extrait (mg)	Concentration (mg/ml)	Taux de stérols (%)
111	3.72	3.36
111	3.02	2.72

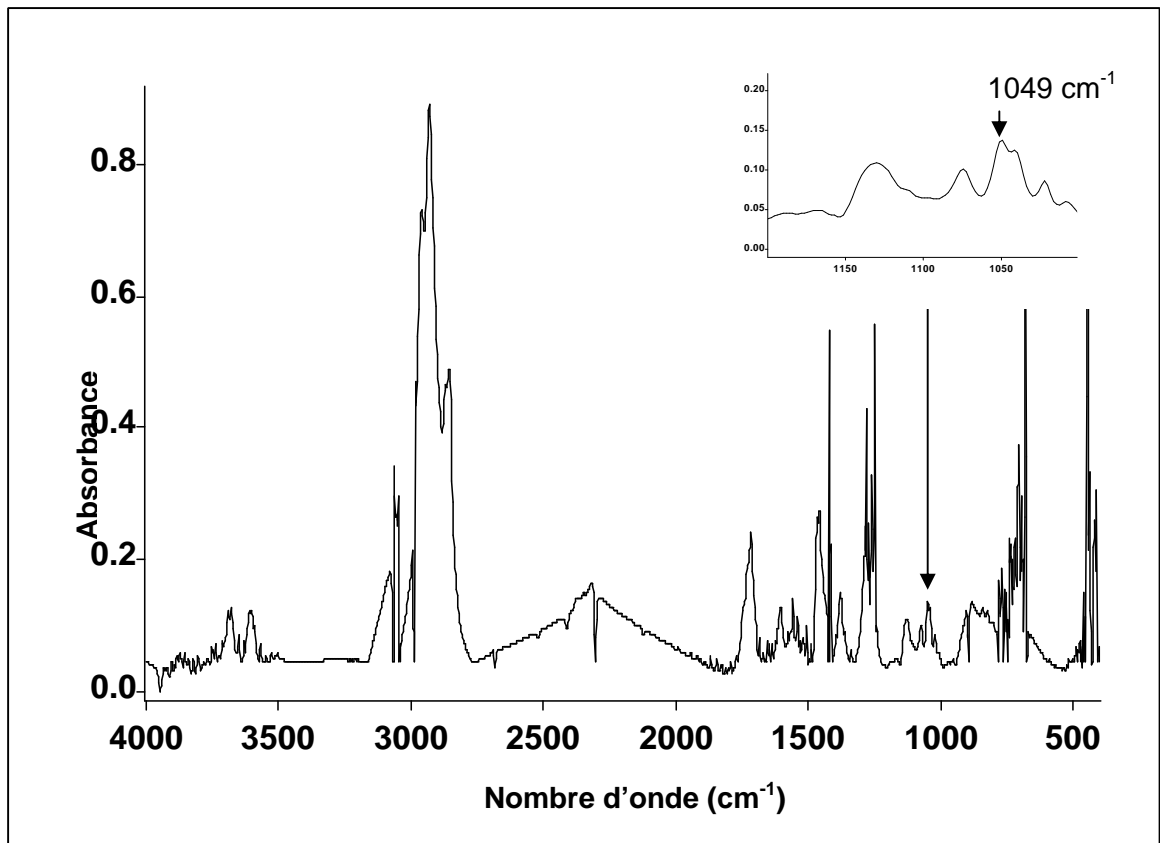


Figure 3.17 : Spectres infrarouge de l'extrait de l'algue brune *Cystoseira sedoides* saponifié et extrait à travers une cartouche de type DSC18.

### 3.7.4.2 Dosage des stérols libres par spectrométrie IRTF

#### 3.7.4.2.a Caractéristiques analytiques du cholestérol obtenues après traitement avec solvants organique et passage à travers la silice

Le tableau 3.7 illustre les caractéristiques analytiques du cholestérol établies après traitement avec solvants organiques et passage à travers la silice. Comme l'illustre le tableau 3.7, le pourcentage de récupération moyen, du processus global, est de 88% dans un domaine de concentration de 0.5-6.3 mg.ml<sup>-1</sup> dans la phase organique finale. Au regard de cela, la méthode développée est rapide, simple et fiable permettant la détermination des stérols libres dans les algues.

Tableau 3.7 : Caractéristiques analytiques du cholestérol obtenues après traitement avec solvants organiques et passage à travers la silice

Droite de calibration	0.017493C+0.000095
Coefficient de corrélation	0.9995
Limite de détection (L.D en µg.ml <sup>-1</sup> )	16.5
Déviatoin standard relative (D.S.R en % pour n=10)	4.6
Domaine de concentration (D.C en mg. ml <sup>-1</sup> )	0.5-6.3
Récupération (%)	88

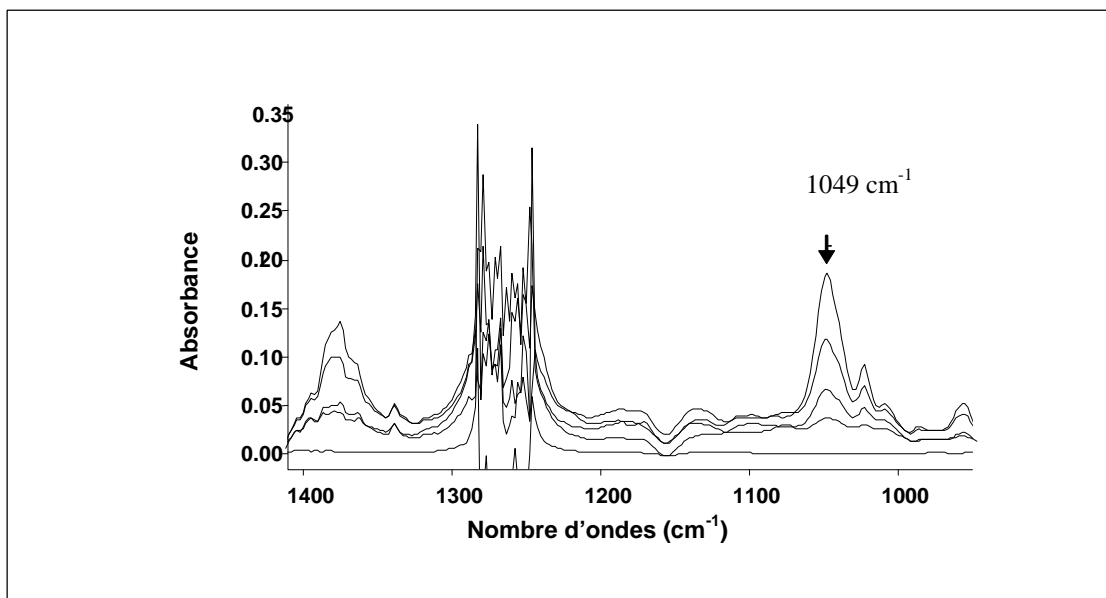


Figure 3.18 : Spectres d'absorbance du cholestérol traité avec solvant organique et passage à travers la silice.

Conditions expérimentales: Chemin optique  $0.5 \text{ cm}^{-1}$ , Résolution nominale  $4 \text{ cm}^{-1}$ , Nombre de balayage 40, Background de la cellule remplie avec le blanc analytique

#### 3.7.4.2.b Analyse des stérols libres de l'algue brune *Cystoseira sedoides* par spectrométrie IRTF

L'extrait de l'algue brune *Cystoseira sedoides* est préalablement traité par solvants organiques selon les étapes décrites précédemment,

En observant le spectre de l'extrait brut, on constate qu'il y a une interférence au voisinage de la bande spécifique,  $1049 \text{ cm}^{-1}$ . Ce phénomène est remarqué dans ce cas de traitement avec solvants organiques car d'un côté plusieurs étapes de préconcentration ont été réalisées et d'un autre, différents solvants ont été employés. Les traces de ces derniers peuvent interférer avec l'analyte en masquant des groupements fonctionnels ou comme dans notre cas, des bandes spécifiques.

Pour vérifier nos résultats, on a fait appel à deux méthodes de calibration :

-La calibration par addition standard qui consiste à ajouter des quantités connues d'une solution étalon à des prélèvements identiques d'échantillon. Chaque solution est ensuite diluée jusqu'à un volume donné avant de mesurer son absorbance.

-La calibration externe qui consiste à préparer plusieurs étalons de standard de concentrations différentes qui subiront le même traitement que les échantillons réels, puis tracer une droite de la variation de l'absorbance en fonction de la concentration. La concentration en stérols des échantillons réels est obtenue après extrapolation directe sur cette droite.

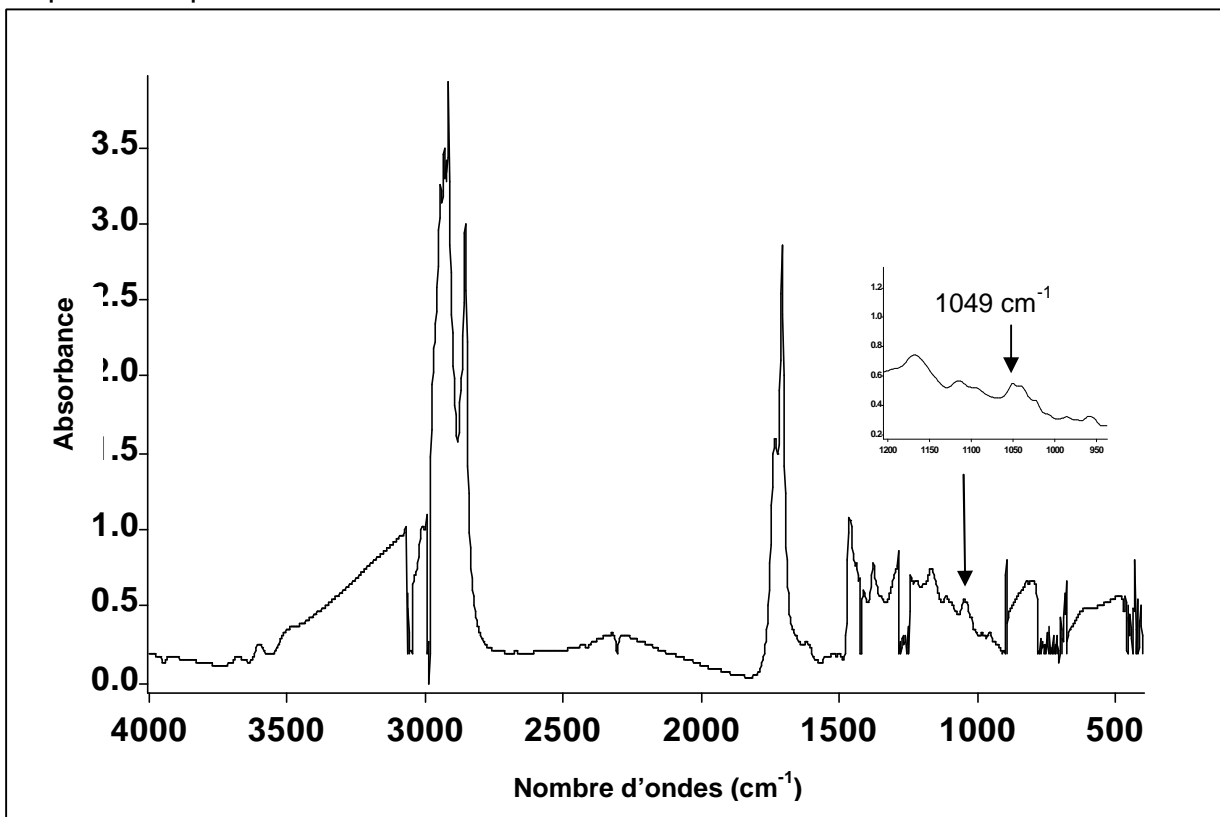


Figure 3.19 : Spectre infrarouge de l'extrait de l'algue brune *Cystoseira sedoides* traité par solvants organique et extrait à travers une cartouche de silice. Le tableau 3.8 donne les résultats obtenus pour l'algue étudiée, en utilisant la spectrométrie IRTF et la CLHP.

Tableau 3.8 : Teneur en stérols libres dans l'extrait brut de l'algue brune *Cystoseira sedoides* par spectrométrie IRTF et par CLHP.

	Détermination par spectrométrie IRTF	Détermination par CLHP
Taux de stérols (%)	1.97±0.08	1.62±0.2

Pour la spectrométrie IRTF : valeur moyenne ± déviation standard relative de deux mesures indépendantes.

Pour la CLHP : valeur moyenne ± déviation standard relative de trois injections.

### 3.8 Conclusion

Deux objectifs sont atteints lors de cette étude quantitative; le premier représente une contribution dans la détermination des stérols totaux des algues par spectrométrie IRTF, ce qui constitue une continuation des travaux de recherches auxquels s'est déjà engagée l'équipe. Le second est lié au développement d'une nouvelle méthode pour le dosage des stérols libres des algues brunes par spectrométrie IRTF et ce, après traitement avec solvants organiques et passage à travers un support solide de silice. L'analyse a été basée sur l'utilisation de la bande spécifique à  $1049\text{ cm}^{-1}$ , corrigée avec une ligne de base entre  $1000$  et  $1079\text{ cm}^{-1}$ .

Les stérols libres de l'algue brune *Cystoseira sedoides* sont analysés par CLHP, technique maîtrisée et généralement utilisée pour le dosage des stérols des algues, en utilisant la fraction stérolique purifiée comme standard et en appliquant la méthodologie de l'étalonnage interne, l'étalon interne utilisé est la 4-méthoxy acétophénone.

Les résultats obtenus par les deux méthodes pour le dosage des stérols libres sont en concordance, ce qui confirme la fiabilité de la méthode de dosage par spectrométrie IRTF.

Suite à ce travail, nous envisageons d'exploiter cette méthode pour effectuer un dosage saisonnier des extraits de l'algue étudiée afin d'élucider l'évolution de la teneur des stérols en fonction du temps (saison). L'étude chimique saisonnière des stérols associés à celle d'autres métabolites secondaires de la même espèce permettrait de décrypter le processus biosynthétique intervenant au sein de l'espèce [127].

## **CHAPITRE 4**

### **ETUDE DE LA FRACTION VOLATILE DE *CYTOSEIRA SEDOIDES*** **(EXTRACTION, ANALYSE ET ACTIVITE BIOLOGIQUE)**

#### 4.1 Introduction

Ce chapitre est consacré à l'étude analytique de l'huile essentielle de l'algue brune « *Cystoseira sedoides* ». Elle comprend trois parties :

- 1- préparation de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur.
- 2- analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et identification des différents constituants de l'huile essentielle.
- 3- Étude de quelques activités biologiques de l'huile essentielle. Il s'agit précisément de l'activité antibactérienne, antifongique et anticancéreuse.

#### 4.2 Extraction des huiles essentielle

L'extraction de huile essentielle est réalisée par entraînement à la vapeur d'eau dans un montage à l'échelle laboratoire, comprenant un ballon (1), remplie au deux tiers (2/3) d'eau surmonté d'une colonne (2) contenant l'algue soumise à la vapeur d'eau. la colonne est reliée à un réfrigérant (3) permettant de condenser les vapeurs issues de la colonne. L'hétéro-azéotrope eau-huile condensé est récupéré dans une ampoule à décanter (4). La durée de l'extraction est fixée à 1 h.30 mn pour une masse d'algue de 50 g.





Figure 4.1 : Entraînement à la vapeur d'eau

#### 4.3 Traitement et récupération de l'huile essentielle

Le mélange eau-huile essentielle est soumis à une extraction liquide – liquide avec de l'éther diéthylique. Le mélange se sépare en une phase organique contenant l'huile essentielle dans l'éther et une phase aqueuse, cette dernière est soumise de nouveau à une extraction liquide-liquide avec de l'éther afin d'épuiser au maximum l'huile essentielle soluble dans l'eau. Cette opération d'extraction liquide-liquide est effectuée trois fois, les phases organiques obtenues sont mélangées en une seule. La phase organique totale est filtrée sur du  $MgSO_4$  ou du  $Na_2SO_4$  afin d'éliminer toute trace d'eau. La phase organique filtrée est ensuite distillée à la pression atmosphérique pour éliminer l'éther. Le rendement moyen de l'huile essentielle est de 0.1%. Cette valeur de rendement est toute a fait acceptable au regard des résultats obtenues dans l'extraction des huiles essentielles a partir d'autres algues brunes [53], particulièrement les espèces appartenant au genre *Cystoseira*. Ces dernières sont caractérisées par des rendements assez faibles, que ce soit en huile essentielle ou en extrait lipidique. Ce rendement peut être légèrement modifié en fonction d'autres paramètres tels que le lieu et la période de récolte.

#### 4.4 Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM)

Cette partie consiste en une étude analytique qualitative. Il s'agit de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse suivie de l'identification des différents produits de l'huile essentielle.

##### 4.4.1 Conditions opératoires

L'analyse est effectuée sur un chromatographe HP-6890 couplé à un spectromètre de masse HP 5972, dans les conditions suivantes :

- Une colonne capillaire de type HP1 (polydiméthylesiloxane 100%), de longueur 30m d'un diamètre de 0.25 mm et une épaisseur du film de 0.25 µm.
- Un potentiel d'ionisation du spectromètre de masse égale à 70 eV.
- Le programme de température du four est : 90(10') à 210 (10') à raison de 3 °/mn
- Gaz vecteur He,
- Injection en mode Split : 1/90.

Les échantillons de l'huile essentielle sont dilués dans l'AcOEt à 1%.

##### 4.4.2 Identification des produits de l'huile essentielle de *Cystoseira sedoides*

L'identification est effectuée en se basant sur les banques de données spectrales de l'appareil (NBS 75k.I, Wiley 7n.I et Mass Finder 3) ainsi que sur les données de la littérature concernant les produits purs isolés [128, 129].

L'identification pour une base spectrale consiste à comparer le spectre de masse du produit avec celui du même produit de cette base, cette comparaison est donnée à un certain taux de similitude. Dans notre cas tous les produits ont été identifiés à un taux de similitude de plus de 90%.

Nous tenons à rappeler que NBS 75k est une banque comprenant les spectres de masse de 75000 molécules, celle de Wiley 7n comprend 250000 molécules et la banque Mass Finder est spécialisée dans les terpènes et comprennent environ 3000 molécules. Le tableau 3.1 illustre les composés identifiés par analyse CG-SM. (Voir Appendice B pour le chromatogramme CG-MS).

Tableau 4.1 : Produits identifiés dans l'huile essentielle de *Cystoseira sedoides*.

Ordre d'éluion	Temps de Réention (mn)	produits	Formule chimique	Identification
1	3.5	Benzaldehyde	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O	NBS 75k, Wiley 7n
2	4.032	Acide hexanoique	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	NBS 75k, Wiley 7n
3	4.44	2(5H)-Furanone	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	NBS 75k, Wiley 7n
4	4.8	benzenacetaldehyde	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O	NBS 75k, Wiley 7n
5	6.05	Acide heptanoique	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	NBS 75k, Wiley 7n
6	7.09	2,6,6-trimethyl-2-cyclohexene-1,4-dione	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	NBS 75k, Wiley 7n
7	8.87	Acide octanoique	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	NBS 75k, Wiley 7n
8	9.89	1H pyrrole-2,5-dione	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	NBS 75k, Wiley 7n
9	11.24	2,6,6-triméthyl -1-cyclohexen-1-acetaldehyde	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> O	NBS 75k, Wiley 7n
10	11.24	2,7-diméthyl-1-cyclohepten-1-carbaldehyde	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	NBS 75k, Wiley 7n
11	11.64	décanal	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	NBS 75k, Wiley 7n
12	12.35	Acide nonanoique	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	NBS 75k, Wiley 7n
13	13.53	5-pentyle-2(5H)furanone	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	NBS 75k, Wiley 7n
14	15.18	-cububène	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	[128,129]
15	16.65	-bisabolène	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	[128,129]
16	17.13	tetradecane	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	[128,129]
17	17.52	-ionone	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O	[128,129]
18	18.12	Germacrène-D	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	[128,129]
19	18.42	6,10-diméthyl-5,9-undecadien-2-one	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O	[128,129]
20	19.92	albicanol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	[128,129]
21	20.42	1(+)-Epi-bicyclosesquiphellandrene	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	[128,129]
22	20.64	11-pentadécène	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub>	NBS 75k, Wiley 7n
23	20.83	4,4,7a-triméthyl-5,6,7,7a-tetrahydro2(4H)-benzofuranone	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	NBS 75k, Wiley 7n
24	21	pentadécane	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub>	[128,129]
25	21.56	-cadinène	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	[128,129]
26	21.96	-calacorène	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub>	[128,129]
27	23.062	Acide dodécanoique	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	[128,129]
28	23.75	4-méthoxybenzyl-2,2-diméthyl-propanoate	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	NBS 75k, Wiley 7n
29	24.28	1-hexadécène	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub>	NBS 75k, Wiley 7n
30	24.65	hexadécane	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	NBS 75k, Wiley 7n
31	25.25	cubénol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	[128,129]
32	25.91	-copaène	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	[128,129]
33	26.15	-cadinol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	[128,129]
34	26.9	Acide tridécanoique	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	NBS 75k, Wiley 7n

35	27.73	8-heptadécène	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub>	NBS 75k, Wiley 7n
36	28.13	14-hexadécenal	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O	NBS 75k, Wiley 7n
37	28.36	14-norcadin-5-en-one	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	NBS 75k, Wiley 7n
38	30.28	Acide tétradécanoïque	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	NBS 75k, Wiley 7n
39	31.65	tétradécanal	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O	NBS 75k, Wiley 7n
40	32.73	6,10,14-triméthyl-2-pentadécanone	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O	NBS 75k, Wiley 7n
41	33.8	Acide pentadécanoïque	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	NBS 75k, Wiley 7n
42	33.96	1-hexadécène	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub>	NBS 75k, Wiley 7n
43	36.53	Acide hexadec-9-énoïque	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	NBS 75k, Wiley 7n
44	38.56	Acide hexanoïque	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	NBS 75k, Wiley 7n
45	38.23	octadécanal	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O	NBS 75k, Wiley 7n
46	38.79	eicosa-5,8,11,14-tetraénoate de méthyle	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	NBS 75k, Wiley 7n
47	38.91	eicosa-5,8,11,14-tetraénoate d'éthyle	C <sub>22</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	NBS 75k, Wiley 7n
48	39.92	Acide heptadécanoïque	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	NBS 75k, Wiley 7n
49	40.1	Acide hexadec-11-énoïque	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	NBS 75k, Wiley 7n
50	41.16	phytol	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	[128,129]
51	42.34	Acide octadéc-9-énoïque	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	NBS 75k, Wiley 7n
52	42.88	Acide octadécanoïque	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	NBS 75k, Wiley 7n
53	43.85	docosane	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>	NBS 75k, Wiley 7n
54	46.24	eicosa-5,8,11,14,17-pentaénoate de méthyle	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	NBS 75k, Wiley 7n
55	49.18	tétracosane	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub>	NBS 75k, Wiley 7n

#### 4.4.3 Discussion des résultats

L'examen du tableau 4.1 montre que la composition chimique de l'huile essentielle est dominée par les acides gras saturés et leurs dérivés. On constate la présence de la série des acides gras allant de l'acide hexanoïque à l'acide octadécanoïque et la présence de certains dérivés d'acides gras sous forme d'esters. On note également la présence d'alcane lourds sous forme d'hydrocarbures et d'hydrocarbures oxygénés tels que les aldéhydes et les cétones. La présence de ces produits est couramment rencontrée dans les huiles essentielles de plantes terrestres [90] et d'algues marines [31, 57, 130, 131, 132]. On ne connaît pas avec précision leurs rôles au sein de l'espèce végétale sauf le fait qu'il peuvent mener selon un processus biosynthétique aux acides gras insaturés [133]. Le précurseur biosynthétique des acides gras est l'acétyl CoA. Ce dernier réagit avec le dioxyde de carbone sous forme de bicarbonate en présence de l'adénosine triphosphate (ATP) pour donner le malonyl CoA [134], c'est le

précurseur unique, c'est ce qui explique le fait que la grande majorité des acides gras saturés présents aux sein des végétaux ont un nombre d'atomes de carbone pairs, il existe toutefois des exceptions à cette règle.

Cependant, la présence des acides gras insaturés sous forme d'esters, à savoir, l'eicosa-5,8,11,14-tetraénoate de méthyle, l'eicosa-5,8,11,14-tetraénoate d'éthyle (tous deux dérivés de l'acide arachidonique) et l'eicosa-5,8,11,14-17 pentaénoate de méthyle (dérivé de l'acide eicosapentaénoïque) est tout à fait habituel dans les huiles essentielles d'algues marines. Les deux acides gras insaturés à savoir, l'acide arachidonique et l'acide eicosapentaénoïque sont les précurseurs biologiques d'une série d'hydrocarbures à 11 atomes de carbone (polyènes). A cet effet, citons les exemples de l'ectocarpene, pre-ectocarpene et l'hormosirene [135], également du dictyopterene A, dictyotène, dictyoprolenol et du neodictyoprolenol [136].

Ces hydrocarbures en C-11 et leurs homologues oxygénés jouent le rôle de médiateurs chimiques (phéromones) dans le processus de défense et autres fois de reproduction de l'espèce [43]. Il faut noter que ces produits sont connus chez toutes les espèces de phéophycées et ne sont pas spécifiques d'un ordre ou d'une famille. Toute fois et bien que les précurseurs biologiques des hydrocarbures en C-11 à savoir l'acide arachidonique et eicosapentaénoïque soient présents dans la composition chimique de l'huile essentielle, nous avons noté l'absence très surprenante des hydrocarbures en C-11, cette absence est probablement due à la période de récolte de l'algue. Une étude saisonnière de l'huile essentielle de l'algue permettrait d'élucider la cinétique du mécanisme de biosynthèse.

La composition chimique de l'huile essentielle (tableau 4.2) révèle également la présence de sesquiterpènes hydrocarbonés, tels que le -cububène, -cadinène, -calacorène et des sesquiterpènes oxygénés tels que l' albicanol, cubénol...etc. Ces sesquiterpènes sont couramment rencontrés dans les huiles essentielles des plantes terrestres [137]. Toute fois, certaines études [138-142] effectuées sur des espèces du genre *Dictyopteris* ont montré la présence dans la fraction volatile de sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés cités précédemment. Les sesquiterpènes ont été isolés dans certaines espèces telles que *Dictyopteris divaricata* et *Dictyopteris undulata* récoltées sur les côtes Japonaises.

Une autre étude plus récente [76] a montré que la présence des sesquiterpènes dans l'algue brune *Dictyopteris membranaceae* est liée au procédés d'extraction, c'est ainsi que, l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation assistée aux micro-ondes focalisées contient des sesquiterpènes tandis que celle obtenue par extraction au dioxyde de carbone supercritique et par hydrodistillation classique ne contenait pas de sesquiterpènes. Il serait peut être judicieux de consacrer une étude plus poussée sur le lien biosynthétique entre les hydrocarbures en C-11 et les sesquiterpènes, et le rôle de ces derniers au sein de l'espèce.

#### 4.5 Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cystoseira sedoides*

L'examen des références bibliographiques révèle que la majorité des huiles essentielles sont dotées d'une activité antimicrobienne [143]. Cette partie décrit le protocole choisi pour mettre en évidence l'activité des huiles essentielles par diffusion dans le milieu de culture. Les résultats qualitatifs permettent de sélectionner les souches les plus sensibles à cette huile pour la détermination de la CMI.

##### 4.5.1 Étude qualitative de l'effet antimicrobien de l'huile essentielle par la méthode de diffusion sur milieu solide

Cette méthode est la technique choisie pour déterminer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle. Elle repose sur le pouvoir migratoire de l'huile essentielle à l'intérieur d'une boîte de pétri, dans un milieu nutritif solide

###### 4.5.1.1 Matériels et méthodes

- a) Les Disques utilisés sont d'origine Schleicher/schuell 26 68/2, (Antibiotica-test Blattcher, réf.321—261 D.3354 Dassel, W. Allemagne). Leur diamètre est de 9 mm.
- b) L'huile essentielle est conservée dans des flacons à froid et à l'abri de la lumière.
- c) Les souches sont choisies pour leur résistance naturelle à divers types d'agents antimicrobiens. Nous avons examinée les procédés d'évaluation des désinfectants décrits par les normes françaises (AFNOR). Les souches bactériennes qui ont été

retenues pour ce travail sont celles proposées par Hammer K.A. [144]. Il s'agit de deux Gram négatifs et deux Gram positifs, et une levure, provenant de la collection du laboratoire de microbiologie du CRD-SAIDAL. Elles sont conservées dans des tubes de GN (gélose nutritive) inclinées et repiquées mensuellement à une température de +4°C.

La liste des souches utilisées est regroupée dans le tableau suivant :

Tableau 4.2 : Différentes souches microbiennes utilisées

Nom de la souche	N° ATCC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15442
<i>Escherichia coli</i>	4157
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538
<i>Bacillus subtilis</i>	9372
<i>Candida albicans</i> (levure)	24433

d) La concentration bactérienne des différentes solutions et inoculums est évaluée par la méthode des dilutions et est exprimée par la mesure de la densité optique (D.O à 620 nm) sur un spectrophotomètre UV Visible (UV mini 1240 Shimadzu).

#### 4.5.1.2 Protocole

Le milieu de culture gélosé en surfusion est coulé dans des boîtes de pétri. Des disques absorbants stériles sont imprégnés d'une quantité d'huile essentielle et sont déposés sur gélose inoculée avec les souches testées (10 ml). La concentration de la suspension bactérienne est ajustée à  $10^7$ - $10^8$  germes /ml. Les boîtes de pétri sont incubées à l'étuve (24 heures à 37°C pour les bactéries et 48 heures à 25°C pour les levures). L'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque, dont le diamètre est mesuré et exprimé soit en cm soit en mm.

La boîte de contrôle, est une boîte dont le disque déposé au centre de la gélose n'est pas imbibé d'huile essentielle.

Le témoin est une boîte de pétri préparée dans les conditions de l'expérience, sans disques. (Voir Appendice C pour le protocole détaillé).

#### 4.5.1.3 Discussion

Un effet inhibiteur de l'huile essentielle sur le développement du Gram négatif « *Pseudomonas aeruginosa* » a été constaté, alors que la croissance a eu lieu normalement dans les boîtes gélosées contenant les autres souches.

Nous avons noté l'apparition d'une zone d'inhibition (halo) autour des deux disques absorbants dans le cas de cette bactérie.

Le diamètre d'inhibition moyen est de  $(28.75 \pm 0.35)$  mm (ce qui représente une surface bactéricide de  $0.065 \text{ cm}^2$ ).

On peut attribuer le caractère « assez sensible » à cette souche vis à vis l'huile essentielle étudiée, du moment où le diamètre d'inhibition est compris entre 2 et 3 cm [67]. Nous avons remarqué l'absence d'une zone appelée « couronne de résistance » qui se développe généralement autour du disque dans le cas où les colonies continuent à se multiplier. Donc on peut conclure que l'huile semble exercer une activité « bactéricide ». En admettant que le diamètre d'aire d'inhibition est un bon indicateur de l'activité bactéricide et par souci de continuité du travail, nous avons déterminé par la suite la CMI, en adoptant la méthode des dilutions en milieu gélosé.

#### 4.5.2 Étude quantitative de l'effet antimicrobien de l'huile essentielle par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Après avoir testé l'activité de l'huile essentielle vis-à-vis d'une gamme de microorganismes, et pour évaluer l'activité antibactérienne, il est intéressant de calculer la CMI dans le cas où l'huile essentielle présente une activité antimicrobienne. La CMI est la plus basse concentration d'un agent antimicrobien qui peut inhiber visiblement la croissance d'un micro-organisme après 24 heures d'incubation pour les bactéries et 48 heures pour les levures.

##### 4.5.2.1 Protocole

La méthode consiste à préparer une série de dilutions allant de 10% jusqu'à 0.065% d'une solution mère contenant le milieu MH inoculé avec l'huile essentielle. Après avoir déposé les mélanges dans les boîtes, ensemercer par spotage à l'aide d'une microseringue à raison de 1-2  $\mu\text{l}$  des suspensions



microbiennes de  $10^4$  germes/ml. Le témoin est une boîte contenant le milieu MH, ensemencé dans les conditions de l'expérience, sans huile essentielle. La CMI correspond à la concentration où il n'y a pas de culture visible. (Voir l'Appendice C).

#### 4.5.2.2 Résultats

Après avoir tester une gamme de concentration allant de 10% à 0.065%, nous avons trouvé que la croissance bactérienne est inhibée à une concentration de 0.25 mg/ml.

#### 4.5.2.3 Discussion des résultats

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie très puissante et très résistante à toute sortes d'agents antimicrobiens et antibiotiques en général. Elle colonise le milieu en formant des biofilms visqueux très résistants. Il a été démontré que le traitement de telles bactéries nécessite des concentrations considérables d'agents antimicrobiens [145].

Les résultats de l'analyse par CG-SM, montre que l'huile essentielle de *Cystoseira Sedoides* est riche en acides gras et leurs dérivés, les aldéhydes, les cétones, les alcools, les sesquiterpènes hydrocarbonés...etc. Ces molécules sont réputées actives, de plus grande efficacité et à plus large spectre [146]. Ces derniers agissent en dénaturant les protéines et les acides nucléiques formants les biofilms bactériens. La membrane externe de *pseudomonas* qui est responsable de cette résistance intrinsèque peut être franchie plus facilement en présence de composés polycationiques qui augmentent sa perméabilité [41, 147].

Il est à noter que l'huile essentielle étudiée est spécifique, car elle n'est active qu'avec *pseudomonas* qui est réputée très résistante devant les autres souches qui sont moins résistantes.

#### 4.6 Activité anticancéreuse de l'huile essentielle

Pour évaluer l'activité anticancéreuse de l'huile essentielle de *Cystoseira sedoides*, une quantité de cette dernière est mise en contact avec des cellules de la lignée L16. Ce test permet de montrer l'action des produits toxiques existant

dans l'huile sur la croissance cellulaire et de déterminer la  $CI_{50}$  (concentration inhibitrice de 50% des cellules). Les résultats de ces tests sont illustrés dans le tableau 3.3.

#### 4.6.1 Discussion

A la lumière de ce tableau, on constate la présence d'une légère activité de l'huile essentielle vis-à-vis cette lignée. Pour évaluer correctement cette activité anticancéreuse, il faut procéder au fractionnement de l'huile, les sous fractions caractérisées par la présence de famille de composés peuvent avoir une activité plus importante que le mélange global. L'activité modérée peut être liée à la saison de récolte de l'algue, l'activité de l'huile essentielle est reliée à sa composition chimique, cette dernière est tributaire de la saison de récolte.

Tableau 4.3 : Évaluation de l'activité anticancéreuse.

Concentration (µg/ml)	DO moy	Erreur	Croissance (%)	Activité
10	1.0305	0.032	97.51	Actif $CI_{50} > 90 \mu\text{g/ml}$
30	0.9475	0.022	85.94	
90	0.692	0.000	48.49	
10	1.05	0.002	100.34	Inactif
30	1.055	0.004	101.06	
90	1.038	0.045	98.60	
10	0.7435	0.007	55.95	Actif $CI_{50} = 18.5 \mu\text{g/ml} \pm 1.6$
30	0.693	0.015	48.64	
90	0.4435	0.022	12.50	
10	0.771	0.016	59.93	Actif $CI_{50} > 90 \mu\text{g/ml} \pm 30.7$
30	0.728	0.022	53.71	
90	0.7655	0.003	59.14	
10	0.941	0.003	84.55	Inactif
30	0.925	0.029	82.24	
90	0.9575	0.038	86.94	
10	0.689	0.002	48.06	Actif $CI_{50} > 90 \mu\text{g/ml} \pm 8.2$
30	0.6885	0.009	47.98	
90	0.7325	0.01	54.36	

#### 4.7 Conclusion

L'analyse par le couplage CG-SM permet d'affiner nos connaissances sur la composition chimique de l'huile essentielle de *Cystoseira sedoides*. Elle est constituée principalement d'acides gras, d'aldéhydes, d'esters, de sesquiterpènes...etc.

Les tests antimicrobiens effectués démontrent l'efficacité de l'huile essentielle vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa*. Ce pouvoir antibactérien contre cette bactérie, permet de considérer cette huile essentielle comme spécifique.

Les tests anticancéreux effectués montrent la légère activité de cette huile essentielle contre les cellules considérées.

Ces résultats sont encourageants pour une recherche visant à utiliser les huiles essentielles des algues dans des formulations thérapeutiques.

## CONCLUSION GENERALE

Notre mémoire a été consacré à l'étude chimique de l'espèce d'algue brune *Cystoseira sedoides*, (algues méditerranéennes récoltées sur les côtes algériennes).

Il comprend quatre parties distinctes qui ont été développées de la façon suivante :

(1) – partie théorique comprenant des généralités sur les algues, les procédés d'extraction et les différentes méthodes et techniques employés dans ce travail,

(2) - synthèse bibliographique portant sur des travaux antérieurs,

(3) - dosage quantitatif des stérols libres par CLHP et des stérols libres et totaux par spectrométrie IRTF. Pour la CLHP, la fraction stérolique purifiée a été utilisée comme standard, alors que pour la spectrométrie IRTF le cholestérol a été employé, comme standard.

(4) - étude analytique de l'huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau, suivie de tests d'activités biologiques.

Nos travaux personnels sont montrés dans les parties 3 et 4.

La partie 3 regroupe les résultats de la séparation de la fraction stérolique et du dosage des stérols dans l'extrait lipidique par CLHP et par FTIR.

Nous avons tout d'abord préparé un extrait par solvant à partir de l'algue sèche. Cet extrait a subi un fractionnement grossier sur colonne ouverte de silice où 114 fractions ont été récupérées. Une analyse préliminaire par chromatographie sur couche mince nous a permis de localiser les fractions contenant la fraction stérolique en quantité importante en s'aidant du cholestérol comme témoin. Il s'est avéré sur la base de cette analyse que les fractions 10 à 18 contiennent presque que des stérols, elles ont été donc mélangées en une seule fraction appelée fraction stérolique non purifiée. Cette dernière a été purifiée par CLHP semi-préparative en phase normale, ce qui a permis de récupérer une masse de 84,85 mg de fraction stérolique purifiée (contenant un taux important du fucostérol), cette dernière a été utilisée en tant que standard dans le dosage par CLHP des stérols libres dans l'extrait lipidique de l'algue. Le dosage par CLHP est réalisé par étalonnage interne en utilisant la 4-méthoxyphénone comme étalon interne. Nous avons tout d'abord effectué les expériences ayant permis de tracer la droite d'étalonnage en utilisant l'étalon interne

et le standard (fraction stérolique purifiée), suivie de l'utilisation de cette droite de calibration dans la détermination de la teneur en stérols libres dans l'extrait lipidique. La teneur de stérols obtenu est  $1.62 \pm 0.2$  %.

La spectrométrie IRTF a été utilisée, primo, pour la détermination des stérols totaux, de l'algue brune *Cystoseira sedoides* et ce, après saponification et préconcentration en phase solide de l'extrait brut et, secundo, pour la détermination des stérols libres de l'extrait de l'algue brune préalablement traité avec un solvant organique et passage à travers la silice. Lors de cette étude, le cholestérol a été utilisé comme standard à la place du fucostérol (stérol majoritaire des algues brunes) et ce, en considérant les coefficients d'absorption molaire des deux standard les mêmes à  $1049 \text{ cm}^{-1}$ . La quantification des stérols est obtenue en mesurant les valeurs d'absorbance des stérols à la bande spécifique  $1049 \text{ cm}^{-1}$ , corrigées avec une ligne de base stabilisée entre  $1000 - 1079 \text{ cm}^{-1}$ . La teneur de stérols déterminée avec cette méthode est de  $3.04 \pm 0.45$  % pour les stérols totaux et de  $1.97 \pm 0.08$  % pour les stérols libres. Ce dernier est comparé à celui trouvé par CLHP et nous constatons que les teneurs déterminées par les deux méthodes sont proches. Au regard de cela, la nouvelle méthode développée par spectrométrie IRTF est simple, rapide, peu coûteuse et fiable, pouvant fournir avec précision le taux de stérols libres dans les algues.

La quatrième partie est consacrée à l'étude analytique de la fraction volatile obtenue par entraînement à la vapeur. Nous avons préparé une huile essentielle par entraînement à la vapeur dont le rendement est de l'ordre de 0,1 %. Cette huile essentielle a été analysée par le couplage chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse. Cette analyse permet d'obtenir la séparation chromatographique (chromatogramme) et l'identification des produits correspondant aux différents pics du chromatogramme. L'identification est réalisée grâce aux banques de données spectrales NBS 75k.l (75000 molécules), mass Finder (3000) et Wiley 7n.l (250000 molécules), mais également en utilisant les références bibliographiques de certains produits purs isolés à partir des algues. Cinquante et un (51) produits ont été identifiés, il s'agit notamment d'acides gras (de l'acide hexanoïque à l'acide octadécanoïque) et de leur dérivés (esters,..). Nous avons enregistré sans surprise la présence de sesquiterpènes hydrocarbonés (cububène, germacrène,..) et des sesquiterpènes oxygénés tels que l'albicanol et autres. Toute fois, nous avons constaté l'absence des hydrocarbures en C-11 (dictyoptérène A,

B,...) qui sont souvent présents dans les essences d'algues, ce sont des produits qui jouent le rôle de médiateurs chimiques. Leur absence peut être due à la période de récolte de l'algue. Nous avons terminé cette partie par effectuer des tests d'activité biologique sur les huiles essentielles obtenues, notamment les tests antimicrobiens. L'huile essentielle a présenté une activité très spécifique contre la bactérie Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa* et une activité anticancéreuse modérée. Cette partie est très importante au regard des propriétés biologiques souvent décelées chez les huiles essentielles.

## APPENDICE A

### LISTE DES ABREVIATIONS

AcOEt : acétate d'éthyle

AFNOR : Association Française de Normalisation

ATCC: American Type Culture Collection

CC : chromatographie sur colonne

CCM : chromatographie sur couche mince

CG : chromatographie en phase gazeuse

CG-SM : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

CHCl<sub>3</sub> : chloroforme

CMI : concentration minimale inhibitrice

CLHP : chromatographie liquide à haute performance

CLHP-UV : chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie Ultra-Violet.

CLHP-SM : chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse

D.O : densité optique

EPS : extraction en phase solide

HMBC : heteronuclear multiple bond connectivity

IRTF : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

MeOH : méthanol

RMN : résonance magnétique nucléaire

TMP : triméthyl pentane

UV : Spectrophotométrie d'absorption moléculaire dans le domaine ultra-violet/visible

A : absorbance

A<sub>st</sub>: aire de pic du standard(échantillon, étalon)

A<sub>éch</sub>: aire de pic de l'échantillon

C : concentration

K : coefficient de proportionnalité

T : transmittance

R<sub>f</sub> : rapport frontal

m : masse

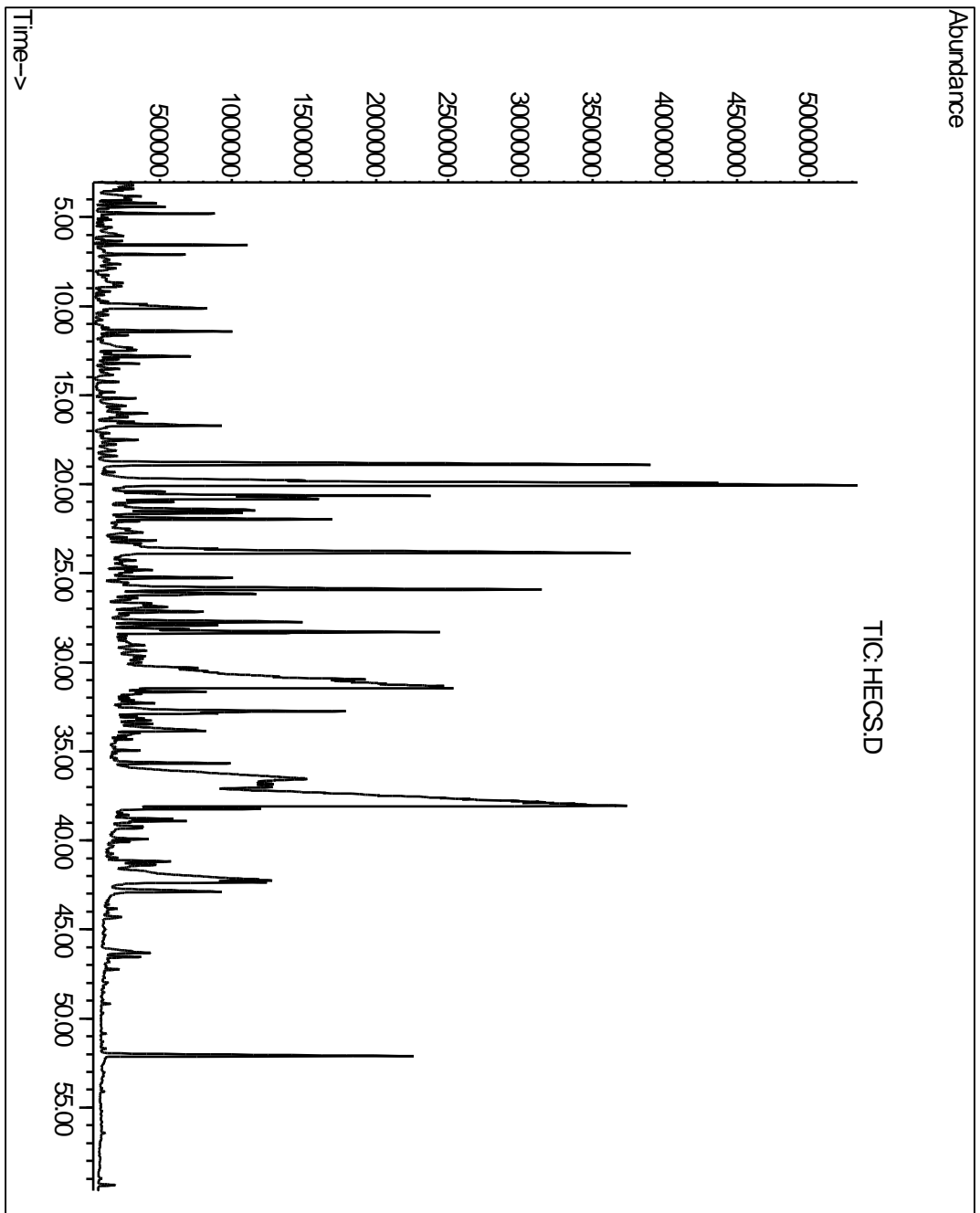
t<sub>r</sub> : temps de rétention

λ : longueur d'onde

n : nombre d'ondes

ε : coefficient d'absorption molaire

APPENDICE B  
Chromatogramme CG-SM de l'huile essentielle





## **APPENDICE C**

### **PROTOCOLES UTILISES DANS LES TESTS ANTIMICROBIENS**

#### Protocole expérimental de la méthode de diffusion sur milieu solide

##### Préparation de la première couche

Faire fondre le milieu MH dans un bain-marie à 95 °C.

Verser le milieu dans des boîtes de pétri à raison de 15 ml par boîte.

Laisser refroidir et solidifier.

##### Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture jeune de 18 à 24 heures pour les bactéries et 48 heures pour les levures, l'inoculum est obtenu à partir d'un premier ou d'un second repiquage des souches.

Prélever 3 à 5 colonies et les émulsionner dans un tube contenant 5 à 6 ml d'eau physiologique.

Après agitation, vérifier la densité optique. Celle-ci doit être environ 0.22 à 0.32 pour les bactéries et entre 2 à 3 pour les levures à une longueur d'onde de 620 nm. Les valeurs comprises dans les intervalles cités ci-dessus correspondent à une concentration optimale de  $10^7$ - $10^8$  germes/ml.

##### Préparation de la deuxième couche (tapis bactérien)

Faire fondre une autre fois le milieu MH.

Laisser refroidir jusqu'à 45 °C.

Inoculer 50 ml du milieu MH avec 200 µl de chaque suspension.

Après agitation, déposer rapidement 6 ml de chaque milieu inoculé sur la surface de la première couche de gélose solidifiée.

Faire pivoter la boîte sur elle-même pour avoir une nappe uniforme, puis laisser se refroidir.

### Application des disques

Les disques absorbant sont imbibés avec l'huile essentielle (à raison de 10 µl de l'huile essentielle)

Déposer délicatement les disques sur la gélose. (Dans notre cas deux disques sont déposés dans chaque boîte.

Laisser diffuser pendant 30 mn.

Incubation

Incuber à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et 25 °C pendant 48 h pour les levures.

### Résultats

Présence d'activité inhibitrice : existence de zone claire autour du disque.

Absence d'activité inhibitrice : absence de zone claire autour du disque la lecture de la zone translucide d'inhibition et relativement circulaire s'effectue aisément avec un pied à coulisse.

Cette zone est appelée « halo d'inhibition ».

### Protocole expérimental pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice(CMI)

#### Protocole de préparation de la suspension bactérienne $10^4$ germes/ml

Préparer d'abord une suspension de  $10^7$ - $10^8$  germes/ml, en repiquant 3 à 4 colonies du milieu de culture, et en diluant 4-5 ml d'eau physiologique.

La D.O à 620 nm doit être comprise entre 0.22 et 0.32.

De cette solution de  $10^7$ - $10^8$  germes/ml, préparer des dilutions de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$  % de la manière suivante :

-Prélever 1 ml de la suspension mère, qu'on verse dans 9 ml d'eau distillée stérile, ceci nous donne la dilution  $10^{-1}$ .

-Faire la même chose pour les cinq tubes qui restent pour obtenir les dilutions suivantes :

( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ).

Le dernier tube ( $10^{-6}$ ) correspond à la concentration  $10^4$  germes/ml.

### Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

On prépare une série de dilution du milieu nutritif MH inoculé avec l'huile essentielle allant de 0.065% jusqu'à 10%.

La réalisation des dilutions se fait comme suit :

1 ml d'huile essentielle est dilué dans 50 ml du milieu, ce qui donne une dilution de 2%.

Verser la moitié du premier flacon dans un deuxième flacon et ajuster avec 25 ml du milieu pour obtenir la dilution de 1%.

Procéder de la même manière pour obtenir les dilutions suivantes :

0.065, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 2.5, 5, 10 %.

Verser chaque dilution dans une boîte de pétri.

Faire sécher.

Avec une micro seringue, ensemercer les boîtes par spotage à raison de 1-2 µl de la suspension  $10^4$  germes/ml (deux spots par boîtes).

Après une (1) heure, incuber à 37°C pendant 24 heures.

### Résultat

Lire la CMI pour laquelle il n'y a pas de culture visible.

## APPENDICE D GLOSSAIRE

Acide alginique, découvert par E.C.C. Stanford en 1880, est un polysaccharide formé de chaîne linéaire, de longueur variable, d'acide D-mannuronique (M) et/ou d'acide L-guluronique(G).

AFNOR : Association Française de Normalisation, Tour Europe, Cedex 7-92080 Paris.

Agar : est un polysaccharide extrait d'algue et capable d'absorber jusqu'à 500 fois son volume d'eau.

Agaropectine, il confère à l'agar des propriétés gélifiantes.

Agarose, est un polymère d'un disaccharide, l'agarabiose, formé par l'union d'un résidu galactose et d'un dérivé anhydre de se sucre.

Amibes, des êtres vivants unicellulaires eucaryotes, vivant en eaux douces ou salées, capables de se déplacer par de multiples déformations du cytosquelette eucaryotiques.

Amiboflagellés, Amibe, cellule capable de se mouvoir au moyen de pseudopodes (permet aux cellules de se déplacer), pourvue d'un ou plusieurs flagelles

Autorophique, (autotrophe) : organisme qui capable d'élaborer ses propres substances organiques à partir d'éléments minéraux.

Bacillus subtilis, est une bactérie catalase-positive que l'on trouve habituellement dans le sol. Elle n'est pas considérée comme pathogène pour l'Homme, mais elle peut contaminer des aliments et peut exceptionnellement provoquer une intoxication alimentaire.

Candida albicans, est un organisme vivant à l'état naturel dans la bouche et le tube digestif. Elle provoque des infections fongiques essentiellement au niveau des muqueuses digestive et gynécologique.

Caroténoïdes, On regroupe sous le terme de caroténoïde les carotènes et les xanthophylles.

Carotènes, des pigments orange et jaunes répandus chez de très nombreux organismes vivants, liposolubles, et elles suivent des voies métaboliques similaires à celles des lipides.

Cellulose, est un glucide, polymère du glucose et principal constituant des végétaux et en particulier de la paroi de leurs cellules.

Champignons, désigne divers organismes biologiques sans chlorophylle, pas ou peu mobiles. Ils font partie des Eucaryotes.

Chlorobionta, organisme vert.

Chlorophyta, incluent les algues vertes marines et une grande partie des algues d'eau douce et aériennes.

Chloroplaste, plaste coloré en vert des chlorobiontes qui leur donne leur couleur verte. (Synonyme, chromatophore ou plaste).

*Escherichia coli*, est une bactérie intestinale des mammifères très commune chez l'être humain. Découverte en 1885 par Théodore Escherich. Certaines souches d'*E. coli* peuvent être pathogènes entraînant alors des gastro-entérites, infections urinaires, méningites, ou septicémies.

Epicarpe : pellicule, peau qui recouvre un fruit, partie externe du péricarpe (Larousse).

Eucaryote, se dit d'un organisme dont les cellules possèdent un vrai noyau.

Fouling : processus de colonisation d'une surface solide (vivante ou non).

Le flagelle, est un organite assurant la mobilité d'une cellule. Commun aux eucaryotes et aux procaryotes, c'est un prolongement cytoplasmique.

Les flagellés, (du latin flagellum = fouet) sont des organismes eucaryotes unicellulaires, qui sont dotés de flagelles dont ils se servent pour leur propulsion.

Lignée, ensemble d'êtres vivants (ou de gènes) descendant d'un ancêtre commun.

Plaste, organite cellulaire qui peut se charger de pigments (chloroplaste, chromoplaste) ou de diverses substances nutritives.

Procaryote, se dit d'un organisme qui ne possède pas un vrai noyau, s'oppose à eucaryote, synonyme bactérie.

*Pseudomonas aeruginosa*, (ou bacille pyocyanique), est une bactérie gram-négative du genre *Pseudomonas*. Les bacilles sont fins, droits et très mobiles grâce à un flagelle polaire: ciliature monotriche, dépourvus de spores et de capsules. Ils apparaissent la plupart du temps isolés ou en diplobacilles. Elle est pathogène et fréquemment rencontrée dans les infections nosocomiales.

*Staphylococcus aureus*, Gram positif et catalase positif. Elle est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées.

Streptophyta, incluent les algues d'eau douce ou aériennes mais aussi les Embryophyta (algues vertes adaptées à la vie terrestres).

Taxon, groupe d'être vivant constituant une unité systématique d'un niveau hiérarchique donné (espèce, genre, famille, classe, embranchement, etc.).

Taxonomie,

Thalle : appareil végétatif des végétaux inférieurs, caractérisé par l'absence de tige, feuilles et racines.

Xanthophylle, pigment tèrenoïde, jaune, orangé ou rouge de structure voisine de celles des carotènes mais comportant des atomes d'oxygènes en plus de la chaîne hydrocarbonée.

## REFERENCES

1. Gayral. P « les algues morphologie, cytologie, reproduction, écologie ». Édition Doin, Paris, France, 1975.
2. Hoek.V., Mann D.G. and Jahns H.M., « Algae, an introduction to phytochemistry », Edition Cambridge University Press, England, 1995.
3. De Reviere B., « Biologie et phylogénie des algues », Tome 1, Édition Belin, Paris, France, 2002.
4. Keij. I.B. and Kanji.H, « Seaweed: chemical composition and potential food uses”, Food Reviews International, 5(1), 1989, 101-104.
5. Kornprobst J.M « substances naturelles d’origine marines ». Édition Tec & Doc, Paris, France, 2005.
6. Gayral P. et Cosson J., « Connaître et reconnaître les algues marines ». Édition Ouest France, 1986.
7. Jacques Ribier et Jean-Claude Godineau « les algues », Édition Flammarion, Paris, France, 1984.
8. Culioli G. « Isolement et détermination structurales de nouveaux diterpènes de l’algue brune *Bifurcaria bifurcata* (Velly) Ross-chimiotaxonomie du genre *Bifurcaria* Stackhouse » thèse de doctorat, université de Toulon et du Var, 1999.
9. Abidi S.L. « Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils », Journal of chromatography A, 935, 2001, 173-201.
10. AFNOR, « Huiles essentielles », Recueil de normes Françaises, 3<sup>ème</sup> édition, AFNOR, Paris, 1989.
11. Bruneton J. « Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales », 2<sup>ème</sup> édition Tec & Doc, Paris, France, 1999.
12. Dorman H.J.D & Deans S.G., “Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils”, journal of applied microbiology, 88, 2000, 308-316.
13. De Billerbeck G., « Activité fongique de l’huile essentielle de *Cymbopogon nardus* sur l’*Aspergillus niger*. Évaluation d’un bioréacteur pour l’étude de l’effet inhibiteur des substances volatiles en phase vapeur », thèse de doctorat, institut national polytechnique de Toulouse, France, 2000, 236.

14. Pibiri M.C, Seigniez et al, « Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles et leurs effets sur le bien être des occupants », Lausanne, LESO, EPFL, CISBAT, 2001.
15. Willem J.P. « Les huiles essentielles, médecine d'avenir », Édition la source d'or, Paris, France, 2004, 318.
16. Pibiri M.C. « Assainissement microbiologique de l'air et de système de ventilation au moyen d'huile essentielles » thèse de doctorat, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Suisse, 2006.
17. Fauchère J.L. et Avril J.L, « Bactériologie générale et médicale », édition Ellips, Paris, 2002, 365.
18. Zaika, L. L., "Spices and Herbs - Their Antimicrobial Activity and Its Determination" Journal of Food Safety, 9(2), 1988, 97-118.
19. Liassine N., « Problème des pathogènes Gram négatif résistants aux antibiotiques en milieu hospitalier », Schweiz. Med.Wochensch., 130, 2000, 1930-1936.
20. Speciale A., R. Musumeci, G. Blandino, I. Milazzo, F. Caccamo, G. Nicoletti, "Minimal inhibitory concentrations and time-kill determination of moxifloxacin against aerobic and anaerobic isolates », International Journal of Antimicrobial Agents, 19(2), 2002, 111-118.
21. Belaiche P. « L'aromatogramme », Traité de phytothérapie et d'aromathérapie, Édition M.S.A., Paris, tome 1, 1979, 204.
22. Waridel P., « Investigation phytochimique des plantes aquatiques *Potamogeton pectinatus* L., *P. lucens* L., *P. perfoliatus* L. et *P. crispus* L. (Potamogetonaceae) », thèse de doctorat, Université de Lausanne, Suisse, 2003.
23. Iatrides M.C., Artaud J., Derbesy M. and Estienne J. « Identification de constituants lipidiques dans des algues brunes sources d'alginate », Ann. Fals.Exp.Chim., 71(768), 1978, 337-338.
24. Mori K., Ooi T., Hiraoka M., Oka N., Hamada H., Tamura M., Kusumi T. "Fucoxanthin and its metabolites in edible brown algae cultivated in deep seawater", Marine Drugs, 2, 2004, 63-72.
25. Punin Crespo M.O. and Lage Yusty M.A. "Determination of aliphatic hydrocarbons in the alga *Himantalia elongate*", Ecotoxicology and Environmental Safety, 57, 2004, 226-230.
26. Katayama T., "Chemical studies on volatile constituents of seaweeds XIII. On volatile constituents of *Laminaria sp*". Bull. Jap. soc. se. fish, 24(c), 1958, 346-354.



27. Turner C., Eskilsson C.S., Bjorklund E., "Collection in analytical-scale supercritical fluid extraction", *Journal of Chromatography A*, 947, 2002, 1-22.
28. Rout P.K., Naik S.N, Rao Y.R, Jadeja, G. Maheshwari R.C,"Extraction and composition of volatiles from *Zanthoxylum rhesta*: Comparison of subcritical CO<sub>2</sub> and traditional processes" *J. of Supercritical Fluids*, 42, 2007, 334–341.
29. Modey, W.K., Mulholland D.A., Raynor M.W., "Analytical supercritical fluid extraction of natural products", *Phytochem. Anal.* , 7, 1996, 1-15.
30. Baysal T. and Starmans D.A.J. "Supercritical carbon dioxide extraction of carvone and limonene from caraway seed", *Journal of Supercritical Fluids*, 14 1999, 225-234.
31. Simandi B., Oszagyan M., Lemberkovics E., kéry A., kaszacs j., Thyron F. and Matyas T.," Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of oregan oleoresin", *Food research International*, 31,1998, 723-728.
32. Dagnac T., Padro A. and Rauret G.,"Optimization of the extraction of arsenic species from mussels with low power focused microwaves by applying a Doehlert design", *Analytica Chimica Acta*, 364, 1985, 343-347.
33. Tomaniova M., Hajlmagelova J., Pavelka Jr.J., kocourek V., Holadova k. and klimova I., "Microwave-assisted solvent extraction- a new method for isolation of polynuclear aromatic hydrocarbons from plants", *Journal of Chromatography A.*, 827, 1998, 21-29.
34. Wathey B., Tierney j., lidstrom P. and westman J., "The impact of microwave-assisted organic chemistry on drug discovery", *Drug Discovery Today*, 7, 2002, 373-380.
35. Robbitt J.M., Schwarting A., Gritter R.j., «Introduction à la chromatographie», Édition GAUTHIER-VillARS , Paris, 1972.
36. Burgot G. et Burgot J.L., « Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications : Méthodes chromatographiques, électrophorèses et méthodes spectrales », Édition Tec & Doc, Paris, France, 2002.
37. Guegan P., Ebeler S.E., « SPE methodology for the separation of lipids», *Inform.*, 7(10), 1996, 1094-1103.
38. Rouessac F., Rouessac A., « Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes », MASSON 3<sup>ème</sup> Édition, Paris, Milan, Barcelone, 1997.
39. Mahuzier G. et Hamon M., « Abrégé de chimie analytique : Méthodes de séparation », MASSON 2<sup>ème</sup> édition, Paris, New York, Barcelone, Milan, Mexico, Sao Paulo, 1986.

40. Silverstein R.M., Basler G.C., Morill T.C., « Identification spectrométrique de composés organiques ». Édition De Boeck & Larcier, 1998.
41. Browing D.R., « Méthodes spectroscopiques », Édition MASSON et C<sup>ie</sup>, Paris, France, 1974.
42. Bertrand D., « La spectroscopie proche infrarouge et ses applications dans les industries de l'alimentation animale », INRA Prod. Anim., 15(3), 2002, 209-219.
43. Creswel C.J., Runquist O.A. and Campbell M.M., « Spectral analysis of organic compounds », Burgess Publishing Company, 2ème Édition, 1972.
44. Rouessac F., Rouessac A., « Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes », Édition MASSON, Paris, Milan, Barcelone, Bonn, 1992.
45. Ravily S., « Mise au point du fractionnement d'extraits bruts d'origine naturelle par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en gradient, en vue d'une automatisation du procédé ».Thèse de doctorat, Université de Nantes, 2005.
46. Piatteli M., « chemistry of marine algae, overview and current status », Oebalia, 17, 1991, 357-379.
47. Pollesello P., Toffanin R., Murano E., Paoletti S., Rizzo R. and Kvam B.J. "Lipid extracts from different algal species.<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopic studies as new tool to screen differences in the composition of fatty acids, sterols and carotenoids", Journal of applied phycology, 4, 1992, 315-322.
48. Praud A., Valls R., Piovetti L., Banaigs B. and Benaim J.-Y., "Meroditerpenes from the brown alga *Cystoseira crinita* of the French Mediterranean coast" Phytochemistry, 40 (2), 1995, 495-500.
49. Valls R., Mesguiche V., Piovetti L., Prost M. Peiffer G. "Meroditerpenes from the brown alga *Cystoseira amentacea* Var.*Stricta* collected of the French Mediterranean coast" Phytochemistry, 41(5), 1996, 1367-1371.
50. Mesguiche V., Valls R., Piovetti L. and Banaigs B."Meroditerpenes from *Cystoseira amentacea* Var.*Stricta* collected of the Mediterranean coast", Phytochemistry, 45(7), 1996, 1489-1494.
51. Culioli G., Mesguiche V., Piovetti L. and Valls R. «Geranylgeraniol and geraniolgeraniol-derived diterpenes from the brown alga *Bifurcaria bifurcata* (Cystoseiraceae)" Biochem. Syst. Ecol., 27(6), 1999a, 665-668.
52. Culioli G., Di Guardia S., Valls R.and Piovetti L. «Geraniolgeraniol-derived diterpenes from the brown alga *Bifurcaria bifurcate*; comparaison with other *Cystoseiraceae* species",Biochem.Syst.Ecol. 28(2), 2000, 185-187.

53. Sun H.H., Ferrara N.M., McConnell O.J. and Fenical W., "Bifurcarenone, an inhibition of mitotic cell division from the brown alga *Bifurcaria galapagensis*", *Tetrahedron Lett.*, 21(33), 1980, 3123-3126.
54. Mori K., Uno T., "Synthesis and structure revision of bifurcarenone, a unique monocyclic diterpene in combination with a hydroquinone C<sub>7</sub> unit as inhibitor of mitotic cell division", *Tetrahedron Lett.*, 45, 1989, 1945-1958.
55. Heilbron I, M, Phipers R.F. and Wright, "The chemistry of the algæ. Part I. The algal sterol fucosterol", *J. Chem. Soc.*, 1934, 1572-1576.
56. Heilbron I, Phipers R.F., « The algae, the lipochromes of focus vesiculosus", *Biochem. J.* 29, 1935, 1376-1381.
57. Akin M., Miralles J. and et. Kornprobst J.M. "Sterol and fatty acid distribution in red algae from the Senegalese coast", *Comp. Biochem. physio.* 96B(3), 1990. 559-563.
58. Cranwell P.A., Jaworski G.H.M. "Hydrocarbons, sterols, esters and fatty acids in six freshwater chlorophytes", *Phytochemistry*, 29(1), 1990, 145-151.
59. Combaut G., Codomier L. and Teste J., « Seasonal chemical evolution of the alga *Cystoseira elegans*", *Phytochemistry*, 20(8), 1981, 2036-2037.
60. Artaud J., Iatrides M.C., Tisse C., Zahra J.P. and Estienne J., «Études chromatographiques et spectroscopiques de stérols : Application aux stérols d'algues », *Analisis*, 8, 1980, 277-286.
61. Piovetti L., Deffo P., « Determination of sterols and diterpenoids from brown algae (*Cystoseiraceae*) », *Journal of Chromatography*, 588, 1991, 99-105.
62. Caumbaut G. and Piovetti L., "A novel acyclic diterpenes from the brown alga *bifurcaria bifurcate*", *Phytochemistry*, 22(8), 1983, 1787-1789.
63. Valls R., Banaigs B., Francisco C., Codomier L. and Cave, "An acyclic diterpenes from the brown alga *Bifurcaria bifurcate*", *Phytochemistry*, 25(3), 1986, 751-752.
64. Fleury B.G, Pereira M.V.G., Da Silva J.R.P, Kaisan M., Teixeira V.L. and Kelecom A. "Stérols from brazilian marine brown algae ", *Phytochemistry*, 37(5), 1994, 1447-1449.
65. Ahmed V. U., Memon A. H., "Somalenone, a C<sub>26</sub> sterol from the marine red alga *Melanothamnus somalensis*", *Pytochemistry*, 42, 1996, 1141-1143.
66. Milkova T., Talev G., Christov R., Dimitrova-Konakleiva S. and Popov S., "Sterol and volatiles in *cystoseira Barbata* and *Cystoseira crinita* from the black sea", *Phytochemistry*, 45(1), 1997, 93-95.
67. Giner J.L. and Boyer G.I., « Sterol of the brown tide alga *Aureococcus*

*anophaefferens*», *Phytochemistry*, 48(3), 1998, 475-477.

68. Stefanov K., Dimitrova-Konaklieva St., Frette X., Christova D., Nikolova Ch., Popov S., « Sterols and acylglycerols in the brown algae *Zanardinia prototypes nardo* and *Striaria attenuate*(Grev.) Grev.from the black sea », *Botanica Marina*, 43, 2000, 141-145.
69. Giner J.L., Li X, Boyer G.I., « Sterol composition of *Aureoumbra lagunensis*, the texas brown tide alga », *Phytochemistry*, 57, 2001, 787-789.
70. Kamennarska Z., Yalcin F.N., Ersoz T., Calis I., Stefanov K., Popov S., Z., « Chemical composition of *Cystoseira crinita* bory from the Eastern Mediterranean », *Natutforsch.* 57C, 2002, 584-590.
71. Kamennarska Z., Dimitrova-Konaklieva St., Stefanov K., Popov S., « A comparative study on the sterol composition of some brown algae from the Black Sea » *J.Serb.Chem.Soc.*, 68(4-5), 2003, 269-275.
72. Sanchez-Machado D.I., Lopez-Hernandez J., Paseiro-Losada P., Lopez-Cervantes J. « An HPLC method for the quantification of sterols in edible seaweeds », *J., Biomed. Chromatogr.*, 18, 2004, 183-190.
73. Kapetanovic R., Sladic D., Popov S., Zlatovic M., Kljajic Z., Gasic M.J., « Sterol composition of the Adriatic Sea algae *Ulva lactuca*, *Codium dichotomum*, *Cystoseira adriatica* and *Fucus virsoides* », *J.Serb.Chem.Soc.*, 68(12), 2005, 1395-1400.
74. Roussis V., Vayias C, Caberi H, Harvala C. and Fenical W. "English International Symposium on Marine Natural Products", canary Island, Espagne, 1995, 51.
75. Maier I., Muller D.G., « Sexual pheromones in algae », *Biol. Bull.* vol. 170, 1986, 145-175.
76. El Hattab M., « Contribution à l'étude chimique des extraits lipidiques et huiles essentielles d'algues méditerranéennes et de l'océan atlantique : isolement, détermination structurale de nouveaux métabolites et modélisation mathématique des procédés d'extraction. », Thèse de doctorat d'état, Université de Blida, 2005.
77. Barrow K.D., "In Marine Natural Product", vol.5, Edition P.J.Scheuer.Academic Press, New York, 1983, 51.
78. Paul V.J., Cronan J.M and Cardelina J.H.I., "Isolation of new brominated sesquiterpene feeding deterrents from tropical green alga *Neomeris annulata* (Dasycladaceae: Chlorophyta)", *J. Chem. Ecol.*, 1993, 19(9), 1847-1859.
79. Carte B., Troupe N, Chan J A, Westley.J.W and Faulkner D.J., "Rawsonal, an inhibitory of HMG-CoA reductase from the tropical green algae *Avrainvillea rawsoni*", *Phytochemistry*, 28, 1989, 2917-2919.

80. Park, M., Fenical W. and Hay M.E., "Debromoisocym obarbatol, a new chromonal feeding deterrent from the marine alga *Cympolia barbata*", *Phytochemistry*, 31, 1992, 4115-4118.
81. Todd J.S., Proteau P.J. and Gerwick W.H., "Egrediachlorides A-C: new chlorinated oxylipins from the marine brown alga *Egredia menziesii*", *Tetrahedron Letters*, 34, 1993, 7689-7692.
82. Green D, Kashman Y. and Miroz A, "Colpol, a new cytotoxic C<sub>6</sub>-C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> metabolite from the alga *Colpomenia sinuosa*", *Journal, of Natural Product*, 56(7), 1993, 1201-1202.
83. Sakagami H, Iseda J, Fujimori T, Hara Y and Chihara M, "Volatile constituents in marine green algae", *Bull. Jap.Soc.Fish.*, 57(3), 1991, 527-533.
84. Elenkov I., Georgieva T, Hadjieva P, Dimitrova-Konaklieva, St and Popov. S., « Terpenoids and sterols in *Cladophora vagabunda*», *Phytochemistry*, 38, 1995, 457.
85. Bankova V., Stefanov K., Dimitrova-Konaklieva St., Keremedchieva G., Frette X., Nikolova C., Kujumgiev A. and Popov Simeon., "Secondary metabolites and lipids in *Chara globularis* Thuill", *Hydrobiologia*, 457, 2001, 199-203.
86. Sakagami H., Iseda J., Fujimori T., Hara Y. and Chihara M., « Volatiles constituents in marine algae », *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 1991, 527-533.
87. Elenkov I., Georgieva, T., Hadjieva P., Dimitrova-Konaklieva St and Popov S., "Terpenoids and sterols in *Cladophora vagabunda*", *Phytochemistry*, 38, 1995, 475-459.
88. Markham K.R., "Distribution of flavonoids in the lower plants evolutionary significance. In Harborne, J.B. (Ed), *The flavonoids: Advances in Research since 1980*. Chapman and Hall, London; New York:, 1988, 428.
89. Kamenarska Z., Dimitrova-Konaklieva S., Stefanov K., Najdenski H., Tzvetkova I. and Popov S, "Comparative study of the volatile compounds from some Black sea brown algae", *Botanica Marina*, 45, 2002, 502-509.
90. Oshihiro T., Nakano S., Takahashi Y., Suzuki M. and Izumi Y., « Occurrence of bromoperoxidase in the marine macro-alga, *Ulva lens*, and emission of volatile brominated methane by the enzyme », *phytochemistry*, 52, 1999, 1211-1215.
91. Burtin P. « Nutritional value of seaweeds », *Electron.J. Environ. Agric. Food Chem.* 2(4), 2003, 498-503.
92. Hellio C., Bremer G., Pons A.M., Le Gal Y., Bourgonnon N., « Inhibition of the developement of microorganisms (bacteria and fungi) by extract of marine algae from Brittany (France) », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54, 2000, 543-549.

93. Hellio C., De La Broise D., Duffossé L., Le Gal Y., Bourgonnon N., « Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae : potential use for environmentally friendly antifouling paints », *MAR. Environ.Res.*, 52, 2001a, 231-247.
94. Hellio C., Thomas-Gayon H., Culioli G., Piovetti L., Bourgonnon N., Le Gal Y., "Marine anti-foulants from *Bifurcaria bifurcata* (Phaeophyceae Cystoseiraceae) and other brown macroalgae", *Biofouling*, 17, 2001b, 189-201.
95. Hellio C., Bergé J.P., Biopoil C., Le Gal Y., Bourgonnon N., "Screening of marine algal extracts for anti-settlement activities against microalgae and macroalgae", *Biofouling*, 18, 2002, 205-215.
96. Tsoukatou M., Hellio C., Vagias C., Harvala C. and Roussis V."Chemical defence and Antifouling activity of three Mediterranean sponges of genus *Ircinia*", *Z.Naturforsch.*, 57c, 2002, 161-171.
97. Takur N. and Anil A.,"Antibacterial activity of the sponge *Ircinia ramosa*: importance of its surface associated bacteria", *J. Chem. Ecol.*, 26, 2000, 57-71.
98. Souhaili Z., Lagzouli M., Faid M., Fellat-Zerrouck K., « Inhibition of growth and mycotoxins formation in moulds by marine algae *Cystoseira tamariscifolia* », *African Journal of Biotechnology*, 3(1), 2004, 71-75.
99. Ahmed V.U., Ahmed W.U., Aliya R., Baqai F.T, Ghazala, Iqbal S., Khatoon, Mohammad F.V., Noorwala M., Perveen S., Pervez A., Saba N., Shan M.G. and Siddiqui S., « New natural products from terrestrial medicinal plants and marine algae», *Pure and Appl. Chem.* 66(10/11), 1994, 2311-2314.
100. Ahmed M.M.I., Mostafa H.M., El-Masry M.H., El-Naggar M.M.A., « Active biological materials inhibiting tumor initiation extracted from marine algae», *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 31(1), 2005, 146-155.
101. Del Val A.G., Platas G., Basilo A., Cabello A., Gorrochategui J., Suay I., Vicente F., Portillo E., Jimenez del Rio M., Reina G. G., Pelaez F.,"Screening of antimicrobial activities in red , green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Island, Spain)", *Int. Microbiol.*, 4, 2001, 35-40.
102. Scheuer P.J., "Some marine ecological phenomena: chemical basis and biomedical potential", *Science*, 248, 1990, 173-177.
103. Copp B.R., "Antimycobacterial natural product", *Nat. Prod. Rep.*, 20, 2003, 535-557.
104. Amico V., « Marine algae of family Cystoseiraceae: chemistry and chemotaxonomy", *Phytochemistry*, 39(6), 1995, 1257-1279.
105. Valls R. and Piovetti L.,"The chemistry of the Cystoseiraceae (Fucales:Pheophyceae): chemotaxonomic relationships", *Phytochemistry*,

23(7/8), 1995, 723-745.

106. Al Easa H.S., Kornprobst J.M. and Rizk A.M., "Major sterol composition of some algae from Qatar", *Phytochemistry*, 39(2), 1995, 373-374.
107. El Hattab N., « Détermination des stérols de l'algue rouge *Asparagopsis armata* par spectrométrie infra rouge à transformée de Fourier en employant l'extraction en phase solide : étude comparative avec la chromatographie liquide à haute performance », thèse de Magister, Université de Blida, 2003.
108. El Hattab N., Daghbouche Y., El Hattab M., Piovetti L., Garrigues S., De la Gardia M., « FTIR-determination of sterols from the red alga *Asparagopsis armata*: Comparative studies with HPLC », *Talanta*, 68, 2006, 1230-1235.
109. Evershed R.P., Male V.L., Goad L.J., "Strategy for the analysis of sterol esters from plant and animal tissues" *J. Chromatogr.A*, 400, 1987, 187-205.
110. Abidi S.L., List G.R., Rennick K.A., "Effect of genetic modification on the distribution of minor constituents in canola oil", *J. Am. Oil Chem.Soc.*, 76(4), 1999, 463.
111. Akihisa T., Kinura Y., Roy K., Ghosh P., Thakur S., Tamura T., "Triterpene alcohols and 3-oxo steroids of nine Leguminosae seeds", *Phytochemistry*, 35, 1994, 1309-1313.
112. Claasen F.W., Van de Haar C., Van Beek T.A., Dorado J., Martinez Inigo M.J., Sierra-Alvarez R., « Rapid Analysis of Apolar Low Molecular Weight Constituents in Wood Using High Pressure Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection », *Phytochem.Anal.*, 11, 2000, 251-256.
113. Paquot C. and Hautfenne A. (Eds), "Standard Methods for the Analysis of oils, Fats and Derivatives", International Union of Pure and Applied Chemistry , 7ème édition, Oxford, Angleterre, 1987.
114. Deffo P., « Contribution à l'étude chimique de l'algue brune *Cystoseira amentacea* variété *stricta* : isolement, caractérisation structurale et analyse de nouveaux mérodiéters », Thèse de doctorat, Université de Toulon et du Var, 1995.
115. Valls R., "Séparation, identification, étude spectroscopique de métabolites secondaires d'algues brunes (Cystoseiraceés). Dosages. Variations. Chimiotaxonomie", thèse de doctorat, université d'Aix-Marseille III, 1993.
116. Daoudi M., Bekkas S., Culioli G., Orthalo-Magné A., Piovetti L. and Guiry M.D., « Acyclic diterpenes and sterols from the genera *Bifurcaria* and *Bifurcariopsis* (Cystoseiraceae, Phaeophyceae)" *Biochem. Syst. Ecol.*, 29, 2001, 973-978.
117. Culioli G., Orthalo-Magné A., Richou M., Valls R. and Piovetti L. « Seasonal variations in the chemical composition of *Bifurcaria bifurcata* (Cystoseiraceae)" *Biochem. Syst. Ecol.*, 30, 2002, 61-64.

118. Maréchal J.P., Culioli G., Hellio C., Thomas Guyon H., Callow M.E., Clare A.S. and Orthalo-Magné A, «Seasonal variation in antifouling activity of crude extracts of the brown alga *Bifurcaria bifurcata* (Cystoseiraceae) against cyprids of *Balanus amphitrite* and the marine bacteria *Cobetia marina* and *Pseudoalteromonas haloplanktis*», J. Exp. Biol. Eco., 313, 2004, 47-62.
119. Caumbaut G., Yacoudou A., Piovetti L. and Kornpropst J.M., "Sterols of the Senegalese brown algae *Padina vickersiae*", Phytochemistry, 24(3), 1985, 618-619.
120. Govindan M., Hodge J.D., Brown K.A. and Nunez-Smith M., "Distribution of cholesterol in Caribbean marine algae", Steroids, 58, 1993, 178-179.
121. Giner J. L. and Boyer G. L., « Sterol of the brown tide alga *Aureococcus anophagefferens* », Phytochemistry, 48(3), 1998, 475-477.
122. Rezanka T., "Analysis of sterol esters from alga and yeast by high-performance liquid chromatography and capillary gas chromatography-mass spectroscopy with chemical ionization", J. Chromatography, 598, 1992, 219-226.
123. Sugawara T. and Miyazawa T., "Separation and determination of glycolipids from edible plant sources by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detection", Lipids, 34, 1999, 1231-1237.
124. Hashimoto T., Tori M. and Asakawa Y.i, "Piscicidal sterol acylglucosides from *Edgeworthia chrysantha*" Phytochemistry, 30, 1991, 2927-2931.
125. Aknin M., Moellet-Nzour R., Kornprobst J.M., Gaydou E.M. Samb A. and Miralles J., "Sterol composition of twelve chlorophyceae from the senegalese coast and their chemotaxonomic significance", Phytochemistry, 31(12), 1992, 4167-4169.
126. Barbier M., "Introduction à l'écologie chimique". Édition Masson, Paris, 1975.
127. Valls R., Piovetti L. and Praud A., "the use of terpenoids as chemotaxonomic markers in the genus *Cystoseira*", Hydrobiologia, 260/261, 1993, 549-556.
128. Joulain D. and König W.A., « The Atlas of spectral data of sesquiterpenes hydrocarbons », Hamburg: Edition E-B-Verlag, 1998.
129. Adams R. P., « Essential oil components by GC/MS », Academic press, Saint Diego, CA, 1989.
130. Riguira R., Castelo L., Quintela M. and Vilalta R., « Acids, esters and hydrocarbons of algae of Galician coast », Acta Chem. Compostelana, 21, 1984, 13-26.
131. Dimbitsky V.M., Shkrobl. And Dor I., "Separation and identification of hydrocarbons and other volatile compounds from cultured blue-green alga



*Nostoc* sp. by gaz chromatography-mass spectrometry using serially coupled capillary columns with consecutive nonpolar and semipolar stationary phase", J. Chromatog.A, 682, 1999, 221-229.

132. Kamenarska Z., Dimitrova-Konaklieva S., Nikolova Ch., Kujumdjiev A., Stefanov K. and Popov S., "Volatile compounds of the freshwater algae *Spirogira* and *Mougeotia*", Z. Naturforsch., 55c.2000, 495-499.
133. Meyer A., Cirpus P., Ott C., Zahringer U and Heinz E., "Biosynthesis of docosahexaenoic acid in *Euglena Gracilis*: biochemical and molecular evidence for the involvement of -fatty acyl group desaturase", Biochemistry, 42, 2003, 9779-9788.
134. Ohlrogee J.B. and Jaworski J.G., "Regulation of fatty acids and synthesis". Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Biology, 48, 1997, 109-136.
135. Boland W. and Mertes K., "Biosynthesis of algal pheromones. A model study with the composite *Senecioisatidens*", Eur. J. Biochem, 47, 1985, 83-91.
136. Yamamoto Y., Akakabe Y., Matsui K., Shimizu H. and Kajiwara T., "Neodictyoprolenol and Dictyoprolenol, the possible biosynthesis intermediates of Dictyodterenes, in the Japanese algae *Dictyopteris*", Z. Naturforsch., Teil C, 56,2001, 423-429.
137. Pourmortazavi S.M., Hajimirsadeghi S.S., "Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis" Journal of Chromatography A, 116 (1-2), 2007, 2-24.
138. Irie T., Yamamoto K. and Masamunet T., « Sesquiterpenes from *Dictyoptris divaricata*.I", Bull. Chem. Soc.Jpn., 37, 1964, 1053-1055.
139. Kurosawa E., Izawa M., Yamamoto K., Masamune T and Irie T., "Sesquiterpenes from *Dictyopteris divaricata*.II", Bull. Chem. Soc.Jpn., 39, 1966, 2509-2512.
140. Fenical W., Sims J., Wing R. and Radlick P., "Zonarène, a sesquiterene from the brown seaweed *Dictyopteris zonaroides*", Phytochemistry, 11, 1972, 161-1163.
141. Fenical W., Sims J., Squatrito D., Wing R. and Radlick P., "Zonarol and Isozonarol fungitoxic hydroquinones from the brown seaweed *Dictyopteris zonaroides*", J. Org. Chem., 38, 1973, 2383-2386.
142. Fenical W. and McConnell O., "Chromazonarol and Isochromazonarol, new chromanols from the brown seaweed *Dictyopteris undulata*( *zonaroides*)", Experientia, 31, 1975, 1004-1005.
143. Ramirez P., Garcia-Risco M.R., Santoyo S., Senorans F.J., Ibanez E., Reglero G., " Isolation of functional ingredients from rosemary by preparative-supercritical fluid chromatography (Prep-SFC)" Journal of Pharmaceutical and

Biomedical Analysis, 41, 2006, 1606-1613

144. Hammer K. A., Carson C. F., Riley T. V., « Antimicrobial activity of essential oils and other plant extract », Applied microbiology. 86, 1999, 985-990.
145. Fleurette J., Freney J. and Reverdy Me., « Antiseptie et désinfection ». Édition Eska, France, 1995.
146. Rae J.M.,” Review of the methods used for isolating harmaceutical lead compounds from traditional medicinal plants”, Environnementaliste, 27, 2007, 165-174.
147. Longaray Delmare A.P., Moshen-Pistollo I.T., Artico L., Atti-Seraini L., Echeverrigaray S.,”Antibacterial activity o the essential oils o Salvia officinalis L. and Salvia triloba L. cultivated in South Brazil”, Food Chemistry, 100, 2007, 603-608.