



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB DE BLIDA



Faculté des Sciences

Département de Chimie

Mémoire Présenté par

BOUDALI Meriem

**En vue d'obtenir le diplôme de Master**

Domaine	Science de la matière
Filière	Chimie
Option	Chimie des substances naturelles

Titre

**Dosage des dérivés de phloroglucinol de l'extrait de l'algue brune  
*Cystoseira tamariscifolia* par spectrométrie IRTF. Etude chimique  
de l'huile essentielle d'algue par CG-SM.**

Encadré par : Dr. N. BOUZIDI



## Remerciements

*Avant tout je remercie ALLAH tout puissant de m'avoir accordé la force, le courage et les moyens pour accomplir ce travail.*

*Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. M. ELHATTAB de m'avoir accueillie. Merci de m'avoir offert la possibilité de travailler dans un domaine qui me passionne.*

*Je désire aussi remercier Mme S. KASMI pour toute sa disponibilité et son aide.*

*Je remercie spécialement Mme. Y. Daghbouche., Professeur à l'université Saad Dahleb de Blida, pour sa gentillesse, son aide, ses conseils précieux et sa patience qui ont donné vis à ce travail et je suis très reconnaissante de tout ce qu'elle m'a apporté tant du point de vue scientifique que du point de vue personnel.*

*Un très grand merci au Dr. N. BOUZIDI pour son encadrement, son suivi, les idées scientifiques, sa très grande disponibilité et les précieux conseils apportés tout au long de ce stage.*

*Je tiens à remercier vivement tous les membres de jurys pour avoir accepté de juger ce travail.*

*Merci à tous ceux que je n'ai pas cités.*

## Dédicace

*Aujourd'hui, ici rassemblés auprès des jurys,  
Nous prions dieu que cette soutenance  
Fera signe de persévérance  
Et que nous serions enchantés  
Par notre travail honoré*



*Je dédie ce mémoire à . . . *

*A ma très chère mère FATMA ZOHRRA*

*Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le  
symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et  
l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et  
de prier pour moi.*

*Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond  
amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et  
t'accorder santé, longue vie et bonheur.*

*A mon Père DJAMEL*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le  
respect que j'ai toujours eu pour vous.  
Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation  
et ma formation.*

*A mon frère et mes sœurs Mohamed, Sarah et Racha  
A mes chères ami(e) Naima, Selma, Amina, Karima, Zineb et Soumia.  
Et a tous ceux qui me sont chers.*

## الملخص:

تخص هذه الدراسة تطوير أسلوب تحليلي لتحديد الفينولات في مستخلص الطحلب البحري البني سيستوزيرا تماريسيفوليا باستخدام المطيافية ما تحت الحمراء بتحول فورييه مع استعمال الاستخلاص سائل-سائل. اعتبر الفلوروغليسينول كمعيار قياسي لهذه الدراسة.

استخدام المزيج كلوروفورم / ميثانول (ح/ح) مكن من توفير مردود 3% من مستخلص الطحلب. قدرت الفينولات المحتواة في مستخلص الطحلب البني و المعالج مسبقا ب 17 % و ذلك باستخدام طول الموجة الخاصة عند 1610 سم<sup>-1</sup> مصححة مع قاعدة مناسبة.

هذه الدراسة تعني بالتركيب الكيميائي للزيت الأساسي لسيستوزيرا تماريسيفوليا، تم الحصول على الزيت الأساسي عن طريق التقطير ببخار الماء بمردود قدره 0,02% وتم تحليله بواسطة الكروماتوغرافيا في طور الغازي مقرونة بمطيافية الكتلة. تم تحديد 43 مركب يمثلون 66% من إجمالي التركيب الكيميائي على أساس البيانات الطيفية و الأطياف الكتلية. المكونات الأساسية هي الأحماض الدهنية (47%) نلاحظ أيضا وجود المركبات العطرية (9%)، ستيرويدات (5%)، و الهيدروكربونات (3%)، تربينات (2%)، ومركبات مجهولة الهوية (43%) مثلث بمطيافية الكتلة.

مستخلص سيستوزيرا تماريسيفوليا يمتلك القدرة على تفخيخ الجذر الحر DPPH بجرعات صغيرة بالمقارنة مع المركب المرجعي لفيتامين C.

الكلمات المفتاحية: سيستوزيرا تماريسيفوليا، ما تحت الحمراء بتحول فورييه، الفينولات، الفلوروغليسينول، النشاط المضاد للأكسدة.



## RESUME

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

L'utilisation d'un mélange de solvant chloroforme/méthanol (V/V) pour l'extraction de l'algue fournit un rendement de 3%.

La teneur des phénols obtenue par spectrométrie IRTF dans l'extrait de *Cystoseira tamariscifolia*, préalablement traité, a été évaluée, à 17% en utilisant la bande d'absorbance à  $1610\text{ cm}^{-1}$  corrigée avec une ligne de base adéquate.

L'huile essentielle a été obtenue par entraînement à la vapeur d'eau avec un rendement moyen de 0,02% et analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM). Quarante-trois composés qui représentent 66% de la composition chimique totale ont été identifiés en se basant sur la banque de données spectrales ainsi que sur les spectres de masse fournis par la littérature. Les principaux composants sont des acides gras (47%). A noter également la présence des aromatiques (9%), des stéroïdes (5%), d'hydrocarbures (3%), des terpènes (2%) et des composés non identifiés (34%) qui sont représentés par leur spectres de masse.

L'extrait de *Cystoseira tamariscifolia* possède la capacité de piéger le radical libre DPPH, car il agit à faible dose en comparaison avec la vitamine C.

**Mots clés :** *Cystoseira tamariscifolia*, spectrométrie IRTF, phlorotannins, phloroglucinol, préconcentration, composition chimique, activité antioxydante.

## Abstract

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

The use of a solvent mixture of chloroform/methanol (V/V) for extracting the algae provides a yield of 3%.

The content of phenols obtained by FTIR in current *Cystoseira tamariscifolia*, previously treated, was assessed at 17% using the absorbance band at 1610 cm<sup>-1</sup> corrected with a suitable baseline.

The essential oil was obtained by steam distillation of water with an average of 0.02% and analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Forty-three compounds representing 66% of the total chemical composition were identified based on spectral database as well as the mass spectra provided by the literature. The main components are fatty acids (47%). Also note the presence of aromatic (9%), steroids (5%), of hydrocarbon (3%), terpenes (2%) and unidentified compounds (34%) are represented by their mass spectra.

Extract *Cystoseira tamariscifolia* has the ability to scavenge free radical DPPH, as it is at a low dose as compared with vitamin C.

**Keywords:** *Cystoseira tamariscifolia*, FTIR, phlorotannins, phloroglucinol, preconcentration, chemical composition, antioxidant activity.

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>Abréviation</b>	<b>signification</b>
A	Absorbance
CG-MS	Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CH <sub>2</sub> CL <sub>2</sub>	Dichlorométhane
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance
IR	Spectroscopie Infrarouge
IRTF	Spectroscopie Infrarouge à Transformé de Fourier
UV	Ultra-Violet
Tr	Temps de rétention
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SM	Spectrométrie de Masse
°C	Degré Celsius
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1	Propriétés organoleptiques de l'extrait de <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	24
Tableau 2.2	Comparaison des droites de calibration de phloroglucinol préparé directement dans CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /EtOH (80/20 : v/v) et après traitement et dilution dans le même solvant	30
Tableau 2.3	taux des dérivés de phloroglucinol dans l'extrait de <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	32
Tableau 3.1	Les moyens des rendements d'une série d'extraction	42
Tableau 3.2	Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	42
Tableau 3.3	R% = f (t)	43
Tableau 3.4	Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	44
Tableau 3.5	Composition chimique de l'huile essentielle de l'algue brune <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	44
Tableau 3.6	Valeurs IC50 de l'extrait de <i>Cystoseira tamariscifolia</i> et l'antioxydant standard	53



## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Comparaison de la morphologie d'une algue et d'une plante à fleur	04
Figure 1.2	Unité isoprénique	08
Figure 1.3	Géranylgéraniol	08
Figure 1.4	Squelettes type pour les molécules extraites des algues du genre <i>Cystoseira</i>	09
Figure 1.5	squelette de base des stéroïdes	09
Figure 1.6	Fucostérol	10
Figure 1.7	Phloroglucinol	11
Figure 1.8	Exemples de fucols	12
Figure 1.9	Exemples de phloréthols	12
Figure 1.10	Exemple de fucophloréthols	12
Figure 1.11	Exemple de fuhalols	13
Figure 1.12	structures des dérivés phénoliques	13
Figure 1.13	formule du Colpol	13
Figure 1.14	<i>cystoseira tamariscifolia</i>	14
Figure 1.15	Quelques molécules isolées de l'algue brune « <i>Cystoseira tamariscifolia</i> ».	15
Figure 1.16	Schéma d'un spectromètre à transformée de Fourier	18
Figure 2.1	Montage de flux utilisé pour la détermination des dérivés de phloroglucinol dans l'extrait de l'algue brune <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	22
Figure 2.2	Préparation de l'extrait à partir de la matière végétale sèche	23
Figure 2.3	Procédé de préconcentration des dérivés de phloroglucinol	25
Figure 2.4	Identification du phloroglucinol par CCM	26

Figure 2.5	Spectre IRTF de phloroglucinol préparé directement dans $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 80/20 : V/V (3,5 mg.mL <sup>-1</sup> )	27
Figure 2.6	Spectres d'absorbance de la série d'étalonnage de phloroglucinol préparée directement dans $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ (80/20 : V/V)	28
Figure 2.7	Spectres d'absorbance de la série d'étalonnage de phloroglucinol traitée et diluée dans $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ (80/20 : V/V)	29
Figure 2.8	Spectres IRTF de 100 mg extrait brut de <i>Cystoseira tamariscifolia</i> (violet), et le phloroglucinol (3,5 mg.mL <sup>-1</sup> ) (bleu) dilués dans 1 ml de mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ (80/20 :V/V)	30
Figure 2.9	Spectres IRTF de 100 mg extrait de <i>Cystoseira tamariscifolia</i> , après traitement et dilution dans $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ (80/20 : v/v) ( <u>phase MeOH</u> (violet)) et le phloroglucinol (bleu)	31
Figure 3.1	Montage d'entraînement à la vapeur d'eau	36
Figure 3.2	extraction liquide/liquide de l'huile essentielle de <i>Cystoseira tamariscifolia</i> et séchage sur du sulfate de magnésium	36
Figure 3.3	Pycnomètre	37
Figure 3.4	Différentes étapes de la détermination de l'indice d'acide	38
Figure 3.5	Différentes étapes de la détermination de l'indice d'ester	39
Figure 3.6	Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectroscopie de masse	40
Figure 3.7	évolution de rendement en huile essentielle en fonction du temps	44
Figure 3.8	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>cystoseira tamariscifolia</i>	50
Figure 3.9	profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle de <i>cystoseira tamariscifolia</i>	50

Figure 3.10	Forme libre et réduite du DPPH	51
Figure 3.11	Variation du taux de piégeage du DPPH par l'extrait de <i>Cystoseira tamariscifolia</i> en fonction des différentes concentrations	52
Figure 3.12	Variation du taux de piégeage du DPPH par l'acide ascorbique en fonction des différentes concentrations	52
Figure 3.13	Comparaison des valeurs IC50 de notre extrait et l'antioxydant standard (La vitamine C)	54

## TABLE DES MATIERES

RESUME		
REMERCIEMENTS		
DEDICACES		
TABLE DES MATIERES		
LISTE DES ABREVIATIONS		
LISTE DES FIGURES		
LISTE DES TABLEAUX		
INTRODUCTION GENERALE		01
<b>Chapitre I</b>	<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
I	Généralités	04
I.1	Notions générales sur les algues	04
I.2	Notions générales sur les algues brunes	05
I.2.1	Introduction	05
I.2.2	Chimiotaxonomie des algues brunes	06
I.2.3	Présentation de la famille des <i>cystoseiraceae</i>	06
I.2.4	Le genre <i>cystoseira</i>	07
I.2.4.1	Terpènes	07
I.2.4.2	Mérotérpènes	08
I.2.4.3	Hydroquinones et quinones prénylées	09
I.2.4.4	Stéroïls	09



I.2.4.5	Les composés phénoliques et les phlorotannins	10
I.2.5	Etude de l'algue <i>cystoseira tamariscifolia</i>	14
I.2.5.1	Position systématique	14
I.2.5.2	Description	14
I.2.5.3	composition de <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	14
I.3	Techniques d'analyses	15
I.3.1	Chromatographie sur couche mince (CCM)	15
I.3.2	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM)	16
I.3.3	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	17
I.4	Activités biologiques des huiles essentielles et des extraits de <i>cystoseira tamariscifolia</i>	19
<b>Chapitre II</b>	<b>Dosage de dérivés de phloroglucinol dans l'extrait lipidique de <i>Cystoseira tamariscifolia</i> par spectrométrie infrarouge a transformée de Fourier IRTF.</b>	
II.1	Introduction	21
II.2	Partie expérimentale	21
II.2.1	Appareillage et réactifs	21
II.2.1.1	Chromatographie sur couche mince	21
II.2.1.2	Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	22
II.2.1.3	Réactifs	23
II.3	Procédure générale	23

II.3.1	Traitement des échantillons	23
II.3.1.1	Préparation de l'extrait	23
II.3.1.2	Préconcentration du phloroglucinol	24
II.3.2	Détermination du phloroglucinol par spectrométrie IRTF	26
II.4	Résultats et discussions	26
II.4.1	Identification de phloroglucinol par CCM dans l'extrait d'algue	26
II.4.2	Spectre IRTF de phloroglucinol	27
II.4.3	Comparaison des caractéristiques analytiques obtenues pour la détermination de phloroglucinol préparé directement dans CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /EtOH (80/20 : V/V) et après précocentration	28
II.4.4	Détermination du taux de phloroglucinol dans l'extrait de <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	31
<b>Chapitre III</b>	<b>Etude analytique de l'huile essentielle de <i>Cystoseira tamariscifolia</i> par CG-SM, et détermination de l'activité antioxydante de l'extrait.</b>	
III.1	Matériels et méthodes	35
III.1.1	Introduction	35
III.1.2	Lieu et date de récolte de l'espèce étudiée	35
III.1.3	Protocole expérimental d'extraction de l'huile essentielle	35
III.1.3.1	Description du dispositif d'extraction	35
III.1.3.2	Extraction liquide-liquide de l'huile essentielle	36
III.1.3.3	Rendement en huile essentielle	37
III.1.3.4	préparation de l'extrait de <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	37

III.1.3.5	Cinétique d'extraction	37
III.1.4	Analyses physico-chimiques de l'huile essentielle de <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	37
III.1.4.1	Mesure des indices physiques	37
III.1.4.1.1	Détermination de la densité	37
III.1.4.2	Mesure des indices chimiques de l'huile essentielle	38
III.1.4.2.1	Détermination de l'indice d'acide (AFNOR NF T 75-103:1999) [82]	38
III.1.4.2.2	Détermination de l'indice d'ester (AFNOR NF T 75-104:1994) [82]	39
III.1.5	Analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	40
III.1.5.1	Description de l'appareil	40
III.1.5.2	Conditions opératoires	40
III.1.6	Estimation du pouvoir antioxydant de l'extrait lipidique de <i>Cystoseira tamariscifolia</i> par la méthode de piégeage du radical libre DPPH	41
III.1.6.1	Introduction	41
III.1.6.2	Appareillage et réactif	41
III.1.6.3	procédure générale	42
III.2	Résultats et Discussions	43
III.2.1	Rendement en huile essentielle de <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	43
III.2.2	Cinétique d'extraction	44
III.2.3	Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	45

III.2.4	Etude analytique de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	45
III.2.5	Evaluation de l'activité antioxydante	51
	Conclusion	55
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	58



Introduction

générale

## Introduction générale

Le milieu naturel est une source importante pour la recherche de molécules à visée thérapeutique. La majeure partie des médicaments mis sur le marché provient de substances d'origine naturelle.

A ce jour, 10% des plantes ont été examinées phytochimiquement, les organismes marins quant à eux, ont très peu été analysés, de plus il reste encore beaucoup d'espèces à découvrir dans les fonds océaniques. On peut ainsi, mieux comprendre l'espoir de trouver de nouvelles molécules qui puissent contribuer au progrès de la médecine, sachant que 30% de tous les médicaments utilisés sont actuellement dérivés de la nature [1]. Les océans et les mers présentent près des trois quarts de la surface du globe. La vie sur terre est apparue dans le milieu marin il y a environ 3,8 milliards d'années alors que les premières espèces terrestres remontent, quant à elles, à 400 millions d'années. Cette différence se traduit aujourd'hui par une plus grande diversité des phyla et des genres dans le milieu marin. Par exemple, parmi les principaux phyla qui composent le règne animal, une grande majorité comporte des espèces marines et nombre d'entre eux sont exclusivement marins. De la même manière, on peut constater que le règne végétal terrestre se limite au seul monde «vert », alors que le milieu marin en comporte trois : les mondes « vert », « rouge » et « brun » [2].

La mariculture est la culture de la mer, comportant la culture à grande échelle des organismes commercialement utiles, y compris les algues [3].

La chimie marine de produits naturels a connu une croissance explosive pendant les 40 dernières années. A titre d'exemple, entre 1973 et 1987 plus de 3000 nouvelles molécules ont été bien isolés dans les organismes marins. Les sources les plus riches sont les algues rouges (598 nouveaux composés dans la période 1973-1987) et brunes (409 nouveaux composés dans la même période) [4].

L'étude des métabolites secondaires biologiquement actifs est toujours d'actualité pour subvenir aux besoins croissants des différents secteurs à savoir : parfumerie, pharmacie et cosmétiques.

L'essor rapide qu'a connu la chimie des produits naturels marins est du, pour une bonne part, au développement des techniques de séparation et d'analyse. Le développement de nouvelles méthodes d'analyse appropriées est indispensable et toujours nécessaire pour les chercheurs travaillant dans ce domaine. Les études se poursuivent dans la recherche ou la synthèse de nouvelles substances d'intérêt biologiques, notamment les chimiomarqueurs. Ces métabolites peuvent être quantifiés par diverses techniques et méthodes analytiques.

Notre étude s'inscrit dans ce cadre de recherche qui vient contribuer au développement des applications analytiques quantitatives de la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) et offre un outil complémentaire surtout disponible facile à manipuler et rapide aux utilisateurs travaillant dans différentes disciplines.

Le compte rendu de l'ensemble des travaux est chapeauté par une synthèse bibliographique qui fait l'objet de la première partie de ce mémoire. Cette partie assemble plusieurs données sur les algues marines. Aussi, elle rassemble les études antérieures sur la chimie et les potentialités pharmacologiques des organismes marins et particulièrement des algues du genre *Cystoseira* (*Cystoseira tamariscifolia*). Les différentes techniques d'analyse utilisées pour séparer, purifier, ou quantifier les métabolites secondaires sont représentées.

La deuxième partie de ce mémoire a pour objet l'étude le développement d'une nouvelle méthode de dosage des phénols dans l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* par spectrométrie IRTF, la préconcentration des phénols est réalisée par extraction liquide-liquide. Le couplage Extraction liquide-liquide\_ IRTF a pour but d'alléger l'extrait d'une part et d'exploiter la spécificité du spectre IR.

La troisième partie est consacrée à l'étude analytique de la fraction volatile (huile essentielle) de l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* par couplage chromatographie en phase gazeuse- spectrométrie de masse. L'évaluation du pouvoir antioxydant a été effectuée sur l'extrait lipidique de l'algue étudiée.

# Chapitre I

## Synthèse

### Bibliographique



## I. Généralités

### I.1 Notions générales sur les algues

Les algues sont des cryptogames, c'est-à-dire des végétaux dont l'appareil reproducteur est caché (comme les mousses, fougères, lichens...). Ce sont des plantes sans feuilles, tiges ou racines, elles sont simplement constituées d'un thalle (Figure 1.1). Elles peuvent être unicellulaires (algues microscopiques) ou pluricellulaires (algues supérieures ou macroscopiques), l'eau est indispensable pour leur reproduction. Toutes les algues possèdent de la chlorophylle permettant la photosynthèse, leur accès à la lumière est donc indispensable. On peut rencontrer les algues partout, dans l'eau (douce et salée) et sur terre, mais à deux conditions : qu'il y ait de la lumière (pour la photosynthèse) et de l'eau (pour la reproduction) [5].

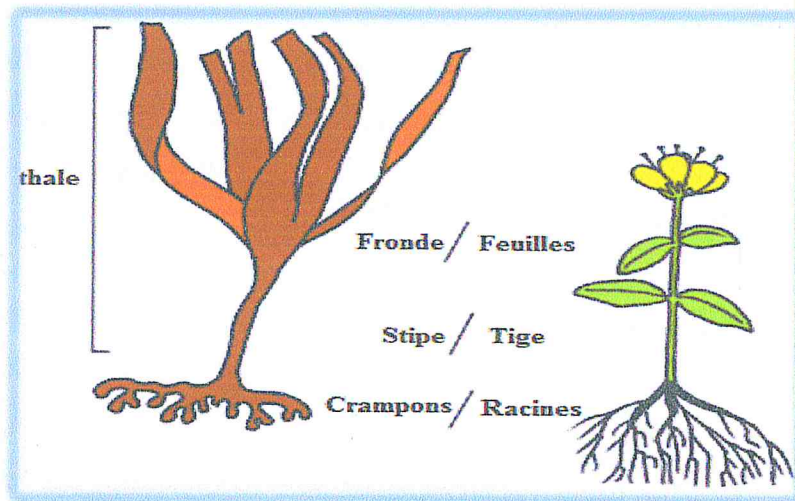


Figure 1.1 : Comparaison de la morphologie d'une algue et d'une plante à fleur

Les algues peuvent être classées selon :

a) Les méthodes de reproduction :

- **Cryptogames:** organes de reproduction non visibles: les algues sont des végétaux inférieurs.

b) Existence ou non d'organes :

-**Thallophytes:** organisation cellulaire continue: les algues possèdent des crampons et non des racines; pas de tiges ni de feuilles mais une lame ou un cylindre.

c) Existence ou non de vaisseaux conduisant la sève :

-**Végétaux non vasculaires:** les algues ne possèdent pas de vaisseaux pour conduire la sève.

## **I.2.2 Chimiotaxonomie des algues brunes**

La taxonomie est la science des lois de la classification des formes vivantes. Les multiples concepts qui ont animé les polémiques entre naturalistes, biologistes et même philosophes résultent du choix et de la caractérisation de l'unité de base qui a été soit l'espèce, soit l'individu [7].

La classification des algues brunes est entièrement basée sur des critères de reproduction. Comme elles peuvent se reproduire avec ou sans alternance de générations, deux sous ensembles peuvent être immédiatement distingués. 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. Toutes les autres espèces se reproduisent avec alternance de générations ou selon que celles-ci sont morphologiquement identiques ou différentes [8].

## **I.2.3 Présentation de la famille des *Cystoseiraceae***

Les *Cystoseiraceae* sont des algues brunes. La famille *Cystoseiraceae* (ordre : Fucales) faisant partie de la classe des phéophycées. Elle a été établie par Kützing en 1843 et comprenait alors plusieurs genres: *Cystoseira*, *Halerica*, *Halidrys*, *Hormophysa*, *Phyllacantha*, *Pycnophycus* (*Bifurcaria*) et *Treptacantha*. Les trois genres *Halerica*, *Phyllacantha* et *Treptacantha* sont actuellement rattachés au genre *Cystoseira* (sauf pour de rares espèces). Les phycologues n'ont pas toujours admis l'existence de cette famille. Ainsi DeToni la considérait comme une entité en 1891 mais la fusionnait aux *Sargassacées* en 1895. En 1962, Nizamuddin a regroupé le plus grand nombre de genres de la famille *Cystoseiraceae*, d'où il a déterminé 21 genres, chacun contient un nombre variable d'espèces. A la fin du 20ème siècle R. Valls et V. Amico ont apporté de nouveaux éclaircissements grâce à leurs études sur les dosages, les variations et les chimiotaxonomies des *Cystoseiracées* [9, 10].

La famille des *Cystoseiracées* se compose de plusieurs genres dont certains sont des distributions très limitées (*Acystis*, *Bifurcariopsis*, *Stolonophora* ...) ou sont présentes seulement sur le continent australien par exemple (*Acrocarpia*, *Carpoglossum*, *Caulocystis*...) par contre d'autres sont largement répandus (*Bifurcaria*, *Cystoseira*, *Halidrys*...). Parmi ces derniers, la famille *Cystoseiracée* a fait l'objet de plusieurs études chimiques qui ont débuté vers les années 76. Ces études ont abouti à la découverte de plusieurs nouvelles molécules [11].



#### **I.2.4 Le genre *cystoseira***

*Cystoseira*, est un genre d'algue brune marine appartenant à la famille des *Cystoseiraceae*. Il comprend environ 56 espèces dans le monde dont 47 taxa en méditerranée [12]. Ces algues sont buissonnantes, arborescentes, très ramifiées, très touffues, souvent de grande taille (30 cm à 1 m ou 2 m) d'un aspect particulier et facilement reconnaissable, mais l'attribution de l'espèce est particulièrement difficile, Certains *Cystoseira* sont remarquables par leur aspect iridescent c'est à dire la belle coloration verdâtre ou bleuâtre qui teinte les rameaux immergés [13].

Les *Cystoseira* sont plutôt répandues dans les eaux de surface, où elles forment des populations très importantes le long des côtes rocheuses les plus exposées à l'action des vagues et les milieux éclairées. Selon les espèces, la coloration varie du noir presque uni au brun, au jaune ou au doré, en passant par le vert olive. Elles sont présentes toute l'année mais perdent leurs rameaux en automne [14].

Plus de 130 composés (métabolites) ont été isolés à partir des algues de cette famille et leurs structures ont été déterminées essentiellement par des méthodes physiques [10].

Les métabolites sont des molécules issues du métabolisme : métabolites primaires et métabolites secondaires.

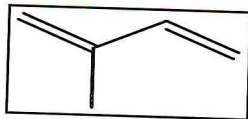
Les métabolites primaires sont caractérisés par leur caractère nécessaire et vital à la survie de la cellule, de l'organisme, tels que les glucides, lipides et les aminoacides.

Les métabolites secondaires ne sont pas nécessaires, vitales pour la cellule de l'organisme. Ces molécules sont en très grand nombre, d'une variété structurale extraordinaire. Elles ont de nombreuses applications pharmaceutiques. Ces métabolites appartiennent à diverses familles de molécules telles que les composés aromatiques, stéroïdes, alcaloïdes et terpénoïdes [15,16].

##### **I.2.4.1 Terpènes**

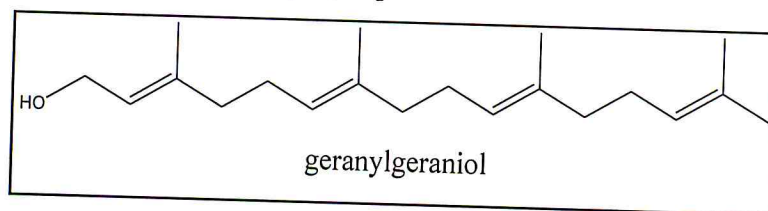
Les terpènes sont des hydrocarbures végétaux, la plupart d'entre eux constituent le principe odoriférant des végétaux. Cette odeur est due à la libération des molécules très volatiles contenant 10, 15, et 20 atomes de carbones, ces molécules sont employées comme condiment ou comme parfum, beaucoup de molécules terpéniques possèdent de propriétés antiseptiques [17].

Tous les composés terpéniques se présentent structurellement comme des polymères de l'isoprène ( $C_5H_8$ ) (Figure 1.2), mais seulement en structure car la nature ne se sert pas de l'isoprène pour biosynthétiser les terpènes. Certains ont une structure acyclique, d'autres comportent un ou plusieurs cycles et une ou plusieurs doubles liaisons [18].



**Figure 1.2:** Unité isoprénique

Les structures des diterpènes actuellement connues sont quasiment toutes linéaires et dérivent du géranylgeraniol (figure 1.3). Les modifications rencontrées sont essentiellement dues à des oxydations (alcools, aldéhydes, cétones, époxydes) pouvant aller jusqu'à des dégradations de la chaîne carbonée. Au total, une cinquantaine de dérivés linéaires à 20 et à 18 carbones ont été caractérisés dans deux familles principales dans les fuciales : les *Cystoseiraceae* et les *Sargassaceae* [19, 20].



**Figure 1.3 :** géranylgeraniol

#### I.2.4.2 Méroterpènes

Les méroterpènes sont très communs parmi les algues brunes, et surtout dans l'ordre des Fucales. La partie non terpénique est toujours aromatique et il s'agit très souvent de quinones (hydroquinone, toluquinone, *p*-quinone). La partie terpénique est variable, des hémiterpènes ( $C_5$ ) aux diterpènes ( $C_{20}$ ), et peut être linéaire ou cyclique (figure 1.4). La source la plus importante de méroterpènes est le genre *Cystoseira* qui reste le plus étudié pour l'ensemble des algues brunes [21]. L'ordre des Fucales n'est pas le seul à produire des méroterpènes et parmi les Dictyotales, les genres *Dictyopteris* et *Taonia*, ont permis d'isoler plusieurs structures originales [2].

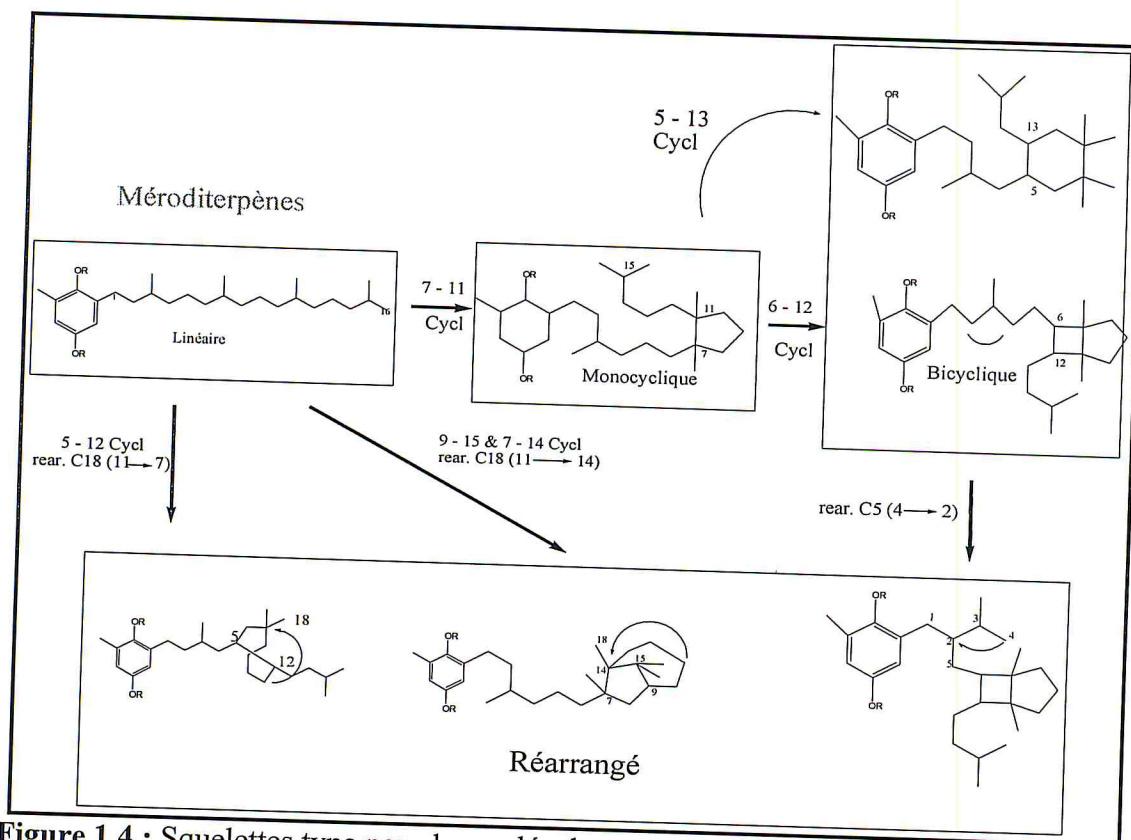


Figure 1.4 : Squelettes type pour les molécules extraites des algues du genre *Cystoseira* [7].

### I.2.4.3 Hydroquinones et quinones prénylées

De nombreux exemples de couplages entre l'hydroquinone, ou la para-quinone, et une chaîne terpénique linéaire, ont été observés dans des Dictyotales et dans des Fucales. La plupart des prénylquinones et hydroquinones prénylées possèdent une chaîne diterpénique et un méthyle sur le cycle aromatique [19, 20].

### I.2.4.4 Stéroïls

Les stéroïls sont des molécules lipidiques possédant une structure tétracyclique, un groupement hydroxyle sur le troisième carbone et une chaîne aliphatique sur le 17<sup>ème</sup> carbone (Figure 1.5).

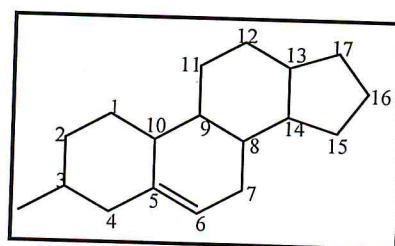


Figure 1.5 : squelette de base des stéroïdes



Les études antérieures sur les stérols des algues ont montré que tous les lots d'algues brunes de la famille des *cystoseiracées* étudiés présentent qualitativement les mêmes stérols, à savoir, le cholestérol, le fucostérol (figure 1.6), le  $\Delta^5$ -avénastérol, le  $\beta$ -sitostérol, le 24 méthylènecholestérol et le brassicastérol [22].

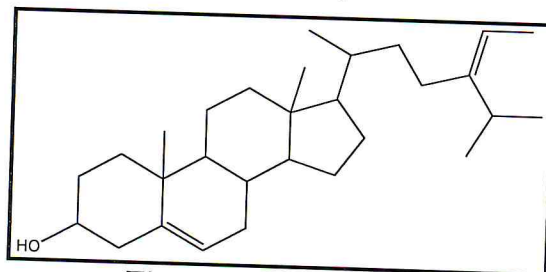


Figure 1.6 : Fucostérol

#### I.2.4.5 Les composés phénoliques et les phlorotannins

Ce sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires et chez les algues. Ils comprennent un cycle aromatique porteur d'un ou plusieurs groupements hydroxyles. Les composés phénoliques algaux sont pour l'essentiel des polymères du phloroglucinol, dont les teneurs sont significativement plus importantes chez les algues brunes (Phéophycées) que chez les algues rouges ou vertes. L'étude qualitative des extraits phénoliques se fait par des étapes de fractionnement par chromatographie moyenne pression et CLHP, puis par une caractérisation des fractions partiellement purifiées grâce à la RMN [23].

L'élucidation structurale est réalisée grâce aux techniques spectrométriques classiques (SM, RMN, FTIR et UV-Visible) [24]. Une seule fois l'élucidation structurale d'un phlorotannin a été réalisée par rayons X [25].

La présence de très nombreux dérivés phénoliques, oligophénols et polyphénols, est la principale caractéristique des algues brunes. La plupart de ces composés se rencontrent dans les espèces appartenant aux ordres des Fucales et des laminariales, mais on en trouve également dans d'autres ordres comme les Dictyosiphonales [26, 27]. Fin 2002, un peu plus de 150 phlorotannins ont été isolés d'une vingtaine d'espèces d'algues brunes. Les polyphénols présents dans les algues en quantités importantes pouvant aller jusqu'à 20% du poids sec du thalle, ils sont tous très peu stables et ne sont en générale, étudiés qu'après acétylation complète. Les procédés d'extraction de ces polyphénols sont complexes et différentes méthodes pour les quantifier sont utilisées [28, 29].

Si l'on rajoute les méroterpènes, on peut donc dire que les dérivés phénoliques sont omniprésents chez les algues brunes. Leurs rôles dans les phénomènes de « fouling » sont plus délicats à interpréter [30]. Des travaux récents ont montré que ces dérivés manifestent plusieurs effets thérapeutiques [31, 32]. De même, ces molécules interviennent surtout avec leur pouvoir antimicrobien et antiappétant vis-à-vis des herbivores [26, 27].

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

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

a- les dérivés du phénol.

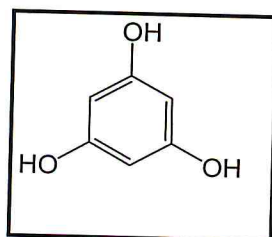
b- les dérivés du résorcinol.

c- les dérivés du phloroglucinol.

**-Les dérivés polyphénoliques (phlorotannins) :**

Les phlorotannins sont issus de couplages radicalaires, carbone-carbone ou carbone-oxygène à partir du phloroglucinol.

Phloroglucinol :



**Figure 1.7 :** phloroglucinol

Phloroglucinol (1, 3, 5-trihydroxybenzene) (figure 1.7) est l'unité monomérique des phlorotannins, composés phénoliques connus seulement chez les algues brunes (*phaeophyceae*). La forme libre est trouvée dans *Cystoseira discors* et *Cystoseira tamariscifolia* à des concentrations plus de 0,5% de matière sèche (MS) (*Sargassaceae*), et dans *Himantalia elongata* (*Himantaliaceae*) à 0,016% MS [33]. Il est également présent dans *Eclonia cava* (*Laminariaceae*) [34], il est utilisé comme engrais dans la culture des artichauts et des oignons en Bretagne, Une fois le phloroglucinol polymérisé sous forme de phlorotannins dans les Fucales, la concentration est fréquemment environ 10% et peut atteindre pas moins de 20% MS. Les études de la dégradation des phlorotannins en milieu alcalin, montre que le phloroglucinol peut être libéré avec un rendement faible [33].

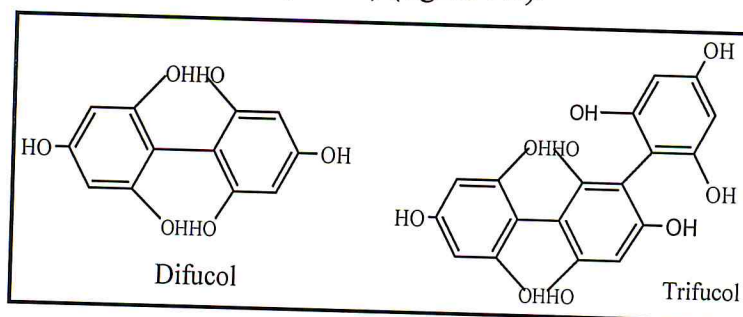
Le phloroglucinol et ses polymères présentent des activités antioxydantes importantes [34-39].

Le phloroglucinol et ses dérivés montrent diverses activités, telle que : la cytotoxicité, l'effet anti-inflammatoire, les activités de la boucle-scission d'ADN et de l'inhibition d'enzymes [36], des activités antithrombotiques et profibrinolytique [37].

Il présente également des effets anticancéreux, antidépresseur, antimicrobien, antiprotozoaire, antispasmodique et antiviral [38].

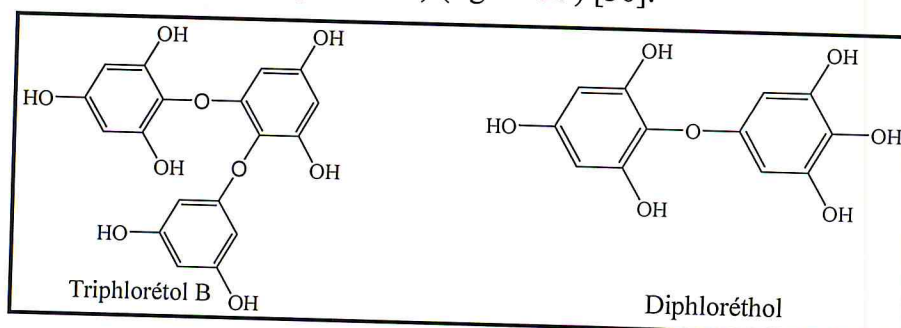
Les phlorotannins peuvent être classés en cinq groupes :

- a. Les fucols : ce sont des oligomères simples du phloroglucinol comme le Difucol (*Fucus vesiculosus*) et le Trifucol (*Fucus spiralis*) (figure 1.8).



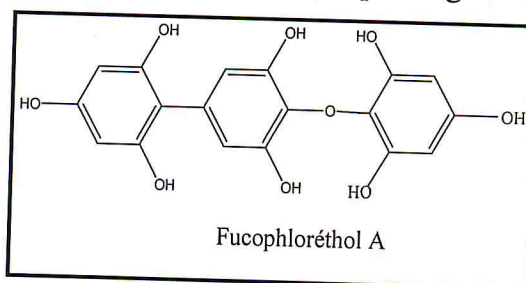
**Figure 1.8:** Exemples de fucols

- b. Les phloréthols : ce terme, qui vient de la contraction entre phloroglucinol et éther comme Diphloréthol (*Bifurcaria bifurcata*), TriphlorétholA (*Cystophora congesta*), et Triphloréthol B (*Cystophora granuhita*) (figure 1.9) [36].



**Figure 1.9 :** Exemples de phloréthols

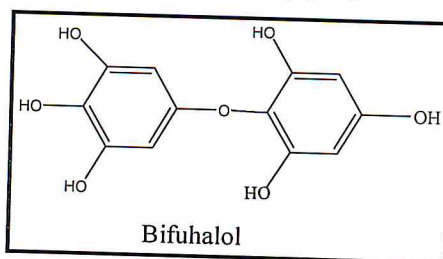
- c. Les Fucophloréthols : cette classe de produits est une forme mixte entre les fucols et les phloréthols, les fucophloréthols sont obtenus par couplages C-C et C-O. Le fucophloréthol le plus simple contient trois unités de phloroglucinol (figure 1.10) [33].



**Figure1.10:** Exemple de fucophloréthols



d. Les fuhalols : cette classe de produits fait référence à des phloréthols possédant un ou plusieurs groupes hydroxyles supplémentaires sur les unités du phloroglucinol. Le composé le plus simple est le bifuhalol (figure 1.11) [40].

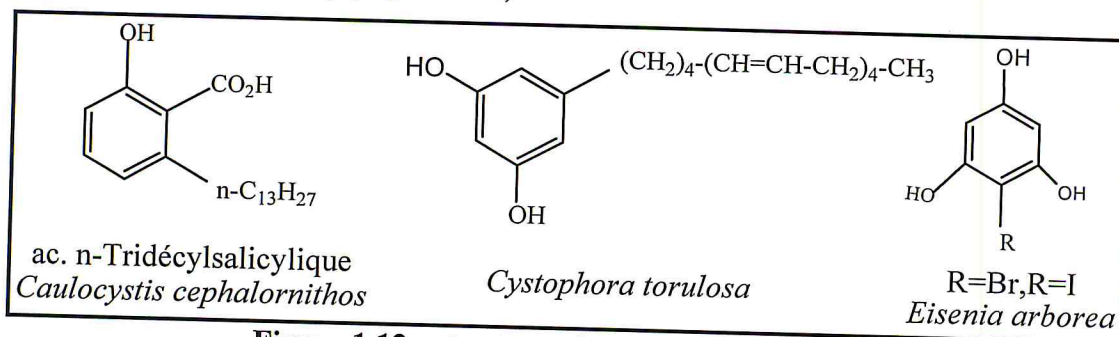


**Figure 1.11 :** Exemple de fuhalols

e. Les eckols : ce sont des dehydrooligomères d'au moins trois unités de phloroglucinol, deux genres de Laminariales, *Ecklonia* et *Eisenia*, contiennent des phloréthols particuliers dans lesquels des cyclisations intramoléculaires ont formé des dibenzo-[1,4]dioxines et des fucanes [28, 29].

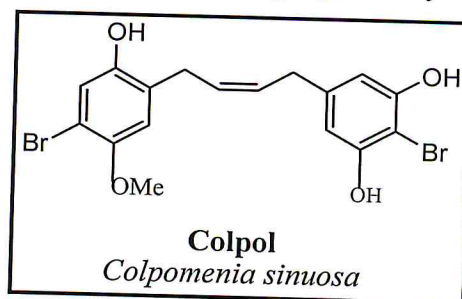
f. Autres dérivés phénoliques [2] :

Les oligophénols dérivent du phénol, du résorcinol (méta-diphénol) et du phloroglucinol (1, 3, 5-trihydroxybenzène) (Figure 1.12).



**Figure 1.12 :** structures des dérivés phénoliques

Le colpol est un dérivé phénolique atypique, isolé de la Dictyosiphonale *Colpomenia sinuosa* récoltée en mer rouge, et possédant des propriétés cytotoxique (Figure 1.13) [2].



**Figure 1.13 :** formule du Colpol

## I.2.5 Etude de l'algue *Cystoseira tamariscifolia*

### I.2.5.1 Position systématique

*Cystoseira tamariscifolia* a pour systématique (figure 1.14) :

Règne : *Eukariota*

Embranchement : *Chromophyta*

Classe : *Phaeophyceae*

Sous classe : *Fucophycidae*

Ordre : *Fucales*

Famille : *Sargassaceae*

Genre : *Cystoseira*

Espèce : *tamariscifolia*

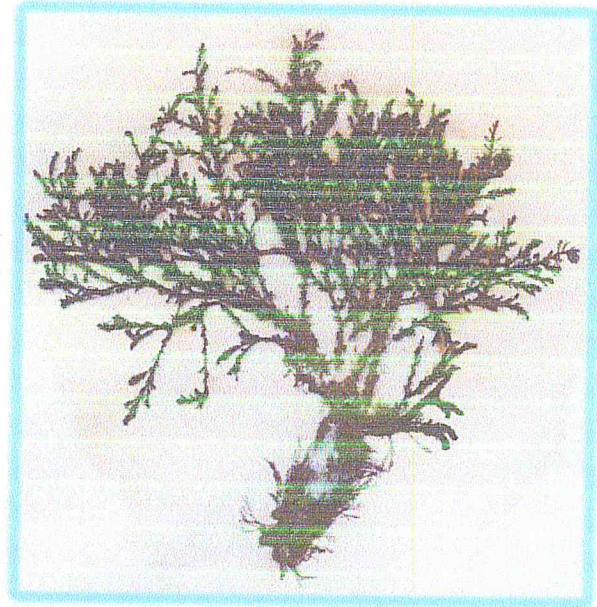


Figure 1.14 : *Cystoseira tamariscifolia*

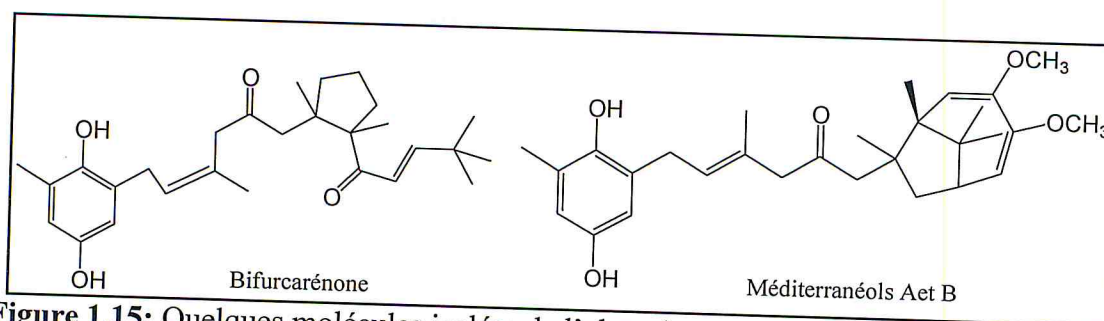
### I.2.5.2 Description :

C'est une algue robuste de 10 à 50 cm, de couleur verte olive, iridescent dans l'eau, produisant une sensation rude au toucher. Le thalle est fixé par un disque très solide et comprend un axe principal dont les ramifications portent de nombreux rameaux secondaires plusieurs fois divisés et recouverts de petits ramules épineux appelés « feuilles ». Elle présente une période de repos l'hiver, elle est alors rude au toucher et réduite. Dès le printemps, elle croît et peut donner des ramules non feuillées et souple, elle est beaucoup moins rude au toucher. Par la suite elle devient très touffue [13].

### I.2.5.3 composition de *Cystoseira tamariscifolia*

Les principaux métabolites secondaires rencontrés dans l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* étant des diterpénoïdes et des méroditerpénoïdes, la figure 1.15 représente quelques uns [41].





**Figure 1.15:** Quelques molécules isolées de l'algue brune « *Cystoseira tamariscifolia* ».

### I.3 Techniques d'analyses

Les analyses des extraits et des huiles peuvent être qualitatives, quantitatives ou structurales. Les techniques d'extraction, de séparation, de purification et d'analyse, respectivement, par chromatographie (colonne ouverte, chromatographie sur couche mince, HPLC), spectrométrie de masse (GC- MS, LC-MS), spectrométrie infrarouge IR, et Résonance magnétique nucléaire unidimensionnelle ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et Séquences DEPT) et bidimensionnelle (COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC) peuvent être utilisées.

#### I.3.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie (CCM) est une méthode d'analyse chimique qualitative permettant la séparation et l'identification des espèces chimiques d'un mélange. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption. La chromatographie d'adsorption est basée sur la différence d'affinité existant entre ses composés. La phase mobile « l'éluant » est un solvant ou un mélange de solvant qui se progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. En outre, chaque composé de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant [42, 43].

Dans le cas de substances colorées, on visualise plusieurs taches traduisant une séparation. Dans le cas de substances non colorées, il faut les rendre visible, trois solutions s'offrent : Placer la plaque sous lampe UV, utiliser de la vapeur d'iode pour colorer les taches ou utiliser un révélateur chimique. Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale  $R_f$  avec :  $R_f = \text{hauteur de la tache} / \text{hauteur du front du solvant}$ . Chaque tache correspond à un constituant et on l'identifie par comparaison du  $R_f$  avec un témoin [44].

### I.3.2 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM)

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible [45]. Elle permet de recueillir des informations sur la nature, la composition et la structure des espèces présentes dans l'échantillon [46].

Le spectromètre de masse est souvent couplé avec un système de chromatographie en phase gazeuse [46,47], 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 [46].

Le couplage chromatographique en phase gazeuse- spectrométrie de masse (CG-SM) est devenu un outil de routine. L'analyse de la composition qualitative d'une huile essentielle, qui, il y a seulement vingt ans, demandait des mois, voire des années, peut s'effectuer en moins d'une heure, grâce à l'informatisation (utilisation de banques de données et traitement des résultats par ordinateur).

Ainsi, la liste des constituants volatils identifiés à l'intérieur d'une huile essentielle ne fait que croître en fonction du temps [48]. L'isolement de la fraction volatile à partir de l'extrait éthéré de l'algue brune *Dictyopteris membranacea* a été réalisé par différentes techniques à savoir l'hydrodistillation et hydrodistillation assistée aux micro-ondes FMAHD et l'extraction par fluide super critique (SFE) avec le CO<sub>2</sub>. L'identification et la détermination de la composition massique des constituants de la fraction volatile ont été effectuées par CG-SM [49].



### **I.3.3 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)**

La spectrophotométrie infrarouge, est l'un des outils les plus puissants dont dispose tout scientifique, qu'il soit chimiste, biologiste, médecin ou autre, dans l'analyse structurale et qualitative. Elle est également utilisée dans l'analyse quantitative [50].

Les applications de la spectrométrie infrarouge se classent en trois grandes catégories basées sur les trois régions spectrales de l'infrarouge (proche IR, moyen IR et lointain IR). La région la plus utilisée est l'infrarouge moyen qui s'étend de  $4000$  à  $400\text{ cm}^{-1}$  (2-25 micro mètre) ou l'on utilise des spectres d'absorption, d'émission ou de réflexion dans le but d'analyse quantitative et qualitative, à cause de la richesse et la multiplicité d'informations fournies par les bandes étroites du spectre [51].

La spectrométrie infrarouge classique est basée sur l'utilisation d'un système dispositif pour séparer les différentes fréquences de la radiation. Les éléments spectraux sont mesurés successivement par l'énergie qui arrive au détecteur par unité de temps, qui est faible, cela se traduit par une faible sensibilité, une mauvaise relation signal/bruit et une vitesse d'acquisition de données faible [52].

Actuellement, la spectrométrie IR connaît un nouvel essor grâce à la disponibilité de spectromètres à transformée de Fourier.

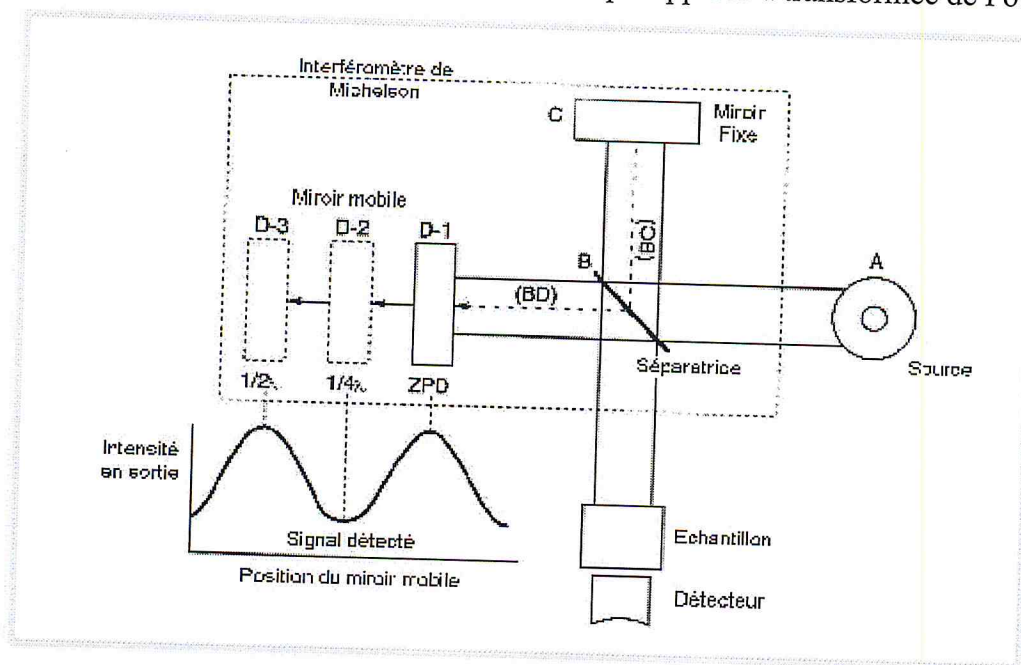
Le grand développement de la technique IRTF est dû à son emploi tant pour l'identification qualitative que pour l'analyse quantitative et pour l'étude des structures chimiques.

L'analyse qualitative se réalise généralement en deux étapes : (1) identification des groupements fonctionnels de la substance [53]. (2) confirmation de la structure moléculaire par comparaison de la totalité du spectre avec celui d'un composé connu [54].

Il existe beaucoup d'instruments commerciaux qui diffèrent dans leurs conceptions. Dans les appareils séquentiels, les absorptions lumineuses sont mesurées les unes après les autres, en balayant la région spectrale dans un ordre séquentiel (spectre à filtre optique, à monochromateur). Dans les spectromètres multiplexés, le capteur photosensible reçoit simultanément l'information correspondante à plusieurs longueurs d'onde. Les signaux sont donc acquis à l'aide d'un capteur unique. Un système de codage permet d'obtenir les spectres à partir des signaux ainsi obtenus. Les instruments à transformée de Fourier sont des exemples de systèmes multiplexés.

Les spectromètres multicanaux ont plusieurs capteurs photosensibles qui peuvent enregistrer indépendamment l'absorption de la lumière à des longueurs d'ondes spécifiques. Les systèmes à barrette diode et les caméras appartiennent à ce type [55].

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



**Figure 1.16:** Schéma d'un spectromètre à transformée de Fourier

Cette méthode a bouleversé les méthodes traditionnelles car elle présente plusieurs avantages : pas de lumière parasite, car le détecteur reçoit plus d'énergie [56].

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 [44].

La spectrométrie infrarouge (IR) a été considérée comme outil fondamental d'analyse dans plusieurs travaux scientifiques [57-60]. Des études quantitatives portées sur les stéroïdes totaux dans l'algue rouge *Asparagopsis armata* et dans une série d'algues brunes ont été menées par notre équipe de recherche [61-63].

#### **I.4 Activités biologiques des huiles essentielles et des extraits de *Cystoseira tamariscifolia***

Les algues brunes marines sont des algues largement répandues à travers le monde, ceci revient à leur faculté d'adaptation via leur reproduction et leur réponse à des conditions écologiques variées. Ceci suppose que les algues brunes sécrètent des substances chimiques de défense, contre les multiples dangers auxquels elles sont exposées (prédateurs mobiles, et micro-organismes envahisseurs) [64]. Ainsi plusieurs équipes de recherche se sont intéressées aux différents aspects de défense de ces algues, surtout dans un but de recherche de substances naturelles à activités antimicrobiennes [65-70] ou encore à pouvoir toxique ou antitumoral [71-74].

Des études effectuées sur *Cystoseira tamariscifolia* ont été réalisées par Bennamara et al [75] portant sur une étude chimique d'un principe actif purifié (un méroditerpène) et son effet antimicrobien sur *Escherichia coli* et *Botrytis cinerea*. Au sein de la même équipe, les activités antifongiques et anti-mycotoxines de cette algue ont été étudiées [76].

L'extrait de *Cystoseira tamariscifolia* a une activité antibactérienne efficace contre *A. tumefaciens* et *Escherichia. Coli*. L'action antifongique in vivo est intéressante dans le domaine des maladies des plantes [77].



## Chapitre II

Dosage des dérivés de phloroglucinol

dans l'extrait lipidique de

*Cystoseira tamariscifolia*

par spectrométrie infrarouge

à transformée de Fourier

IRTF.

## **II.1 Introduction**

Les algues brunes sont connues par leur composition riche en composés phénoliques [15]. Ces derniers sont doués d'activités biologiques remarquables [26, 27] et un grand pouvoir oxydant [78, 79]. Ainsi ces composés peuvent être considérés et classés comme chimiomarqueurs. La détermination de ces composés a été réalisée souvent par spectrophotométrie UV-Visible en utilisant la méthode Folin-Ciocalteu. Des études comparatives ont été menées sur des algues brunes, l'une de ces études a porté sur un dosage quantitative par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  1D et 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  par séquence de corrélation hétéronucléaire sur liaisons multiples (HMBC), des phlorotannins chez cinq cystoseires [80].

Les méthodes chromatographiques ont été également, sollicités dans la séparation et la détermination des phénols. La chromatographie HPLC en phase inverse avec des colonnes C18, une détection UV-Visible avec des barrettes diode et un système de solvant binaire eau acidifié et un solvant organique polaire est la plus utilisée dans le dosage des polyphénols [81].

L'objectif principal de la présente étude est l'élaboration d'une nouvelle méthode pour la détermination du taux de phénol dans l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* par spectrométrie IRTF en utilisant l'extraction liquide-liquide. Le phloroglucinol qui constitue l'unité monomérique des phlorotannins et qui existe chez *Cystoseira tamariscifolia* à l'état libre [34, 80] a été considéré comme étalon pour effectuer cette étude. Néanmoins la CCM a été utilisée pour l'analyse qualitative de la composition chimique de l'extrait de *Cystoseira tamariscifolia*.

## **II.2 Partie expérimentale**

### **II.2.1 Appareillage et réactifs**

#### **II.2.1.1 Chromatographie sur couche mince**

La CCM est effectuée sur des feuilles d'aluminium recouvertes de gel de silice Si 60. L'élution est réalisée avec un mélange binaire acétate d'éthyle/isooctane 2/3 : (v/v). La révélation est faite sous une lampe UV 254 nm, puis au réactif de Gibbs.

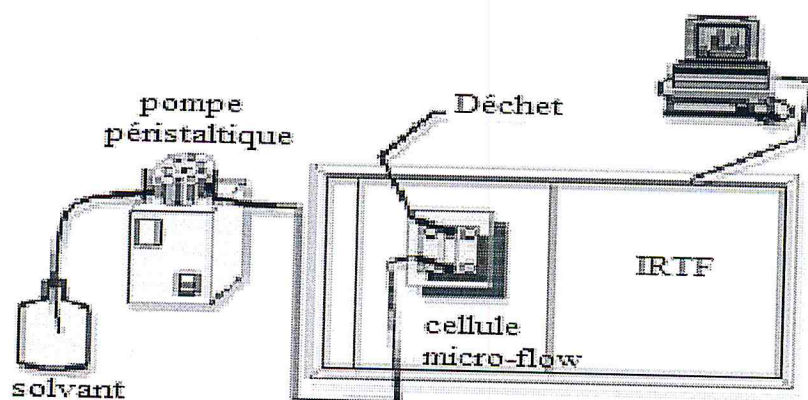
### II.2.1.2 Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Un spectrophotomètre à transformée de Fourier IRTF de marque Jasco type IRTF-8900 (figure 2.1), équipé d'un détecteur sulfate triglicine deutéré (DTGS), d'un rayonnement de laser, d'une séparatrice de radiation en KBr et d'une fente type globar, dont l'infrarouge moyen entre 400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$  a été employé. Les fenêtres utilisées sont en 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 10 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). Le chargement est réalisé en utilisant des tubes de chlorure de polyvinyle de diamètre intérieur de 2.79 mm et des tubes de téflon de diamètre intérieur de 0.8 mm, en fixant un débit de 1.5  $\text{mL mn}^{-1}$ , comme le montre le montage de la figure 2.1. Le flux est stoppé momentanément, une fois la cellule est remplie. À ce moment un spectre correspondant à l'échantillon est enregistré entre 400 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 » développé par Winfirst.



**Figure 2.1:** Montage de flux utilisé pour la détermination des dérivés de phloroglucinol dans l'extrait de l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia*



### II.2.1.3 Réactifs

Tous les réactifs utilisés dans cette étude sont de grade analytique, le dichlorométhane stabilisé avec l'éthanol, le diéthyléther, l'hexane, le chloroforme et l'éthanol.

## II.3 Procédure générale

### II.3.1 Traitement des échantillons

#### II.3.1.1 Préparation de l'extrait

L'algue utilisée dans cette étude a été récoltée en Mai 2012 au niveau du lieu dit « les caroubiers » à l'ouest de la ville de Tipaza en Algérie. L'algue est ensuite triée manuellement pour éliminer toute sorte d'épiphytes, est ensuite séchée à l'ombre dans un endroit sec et aéré.

L'extrait est obtenu par le stockage de 131 grammes d'algue dans un mélange de solvant chloroforme/méthanol (v/v) pendant sept jours à température ambiante. La solution obtenue après élimination du marc a été distillée sous vide à une température de 40°C pour éliminer le solvant. Le protocole général d'extraction utilisé est indiqué sur la figure 2.2.

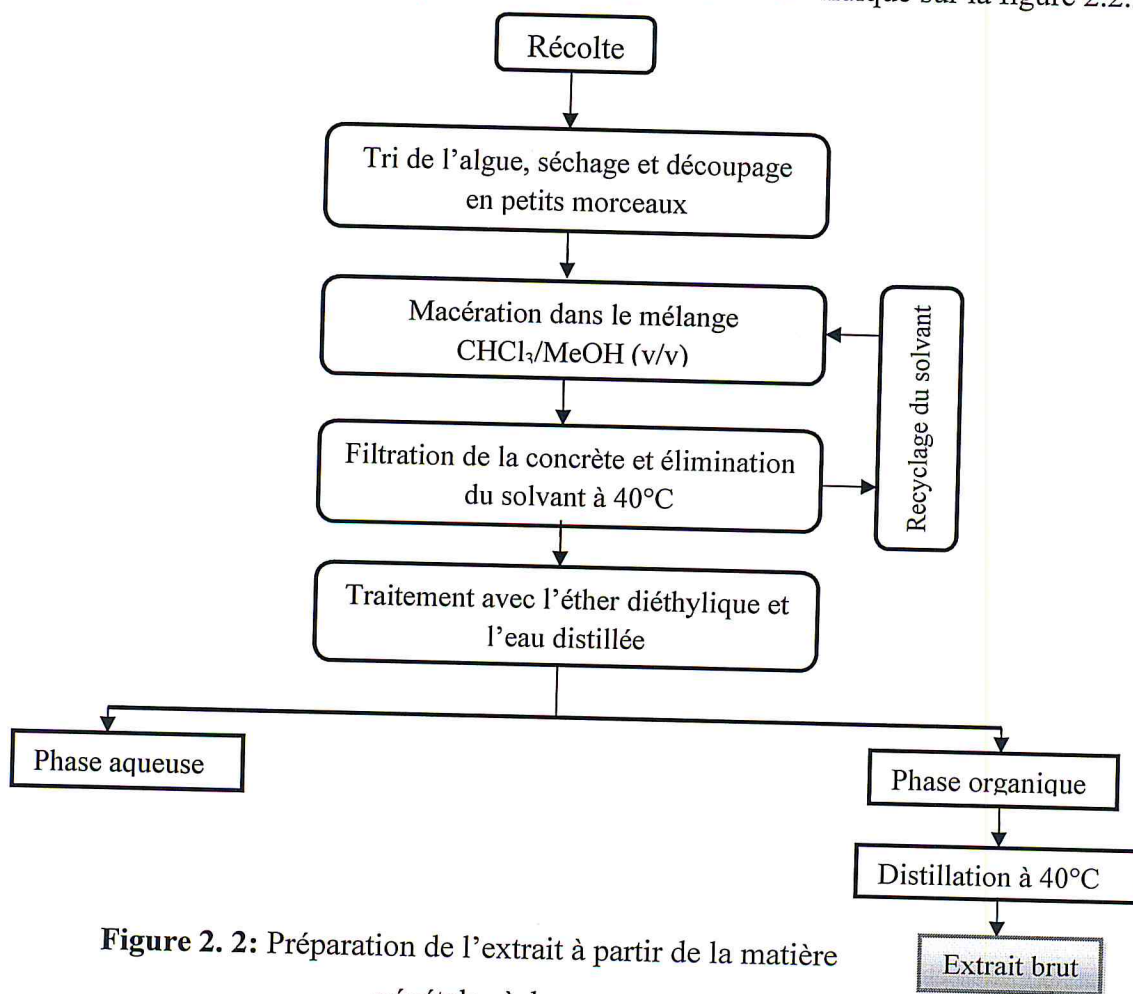


Figure 2. 2: Préparation de l'extrait à partir de la matière végétale sèche

Le rendement d'extraction est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = (M \text{ extrait} / M \text{ mv}) * 100$$

R (%) : Rendement en extrait (%).

M extrait : masse de l'extrait en gramme.

M mv : masse de la matière végétale sèche en gramme.

Le rendement d'extraction de *Cystoseira tamariscifolia* est de 3%. Les caractéristiques organoleptiques de l'extrait obtenu, sont représentées dans le tableau 2.1.

**Tableau 2.1** : Propriétés organoleptiques de l'extrait de *Cystoseira tamariscifolia*

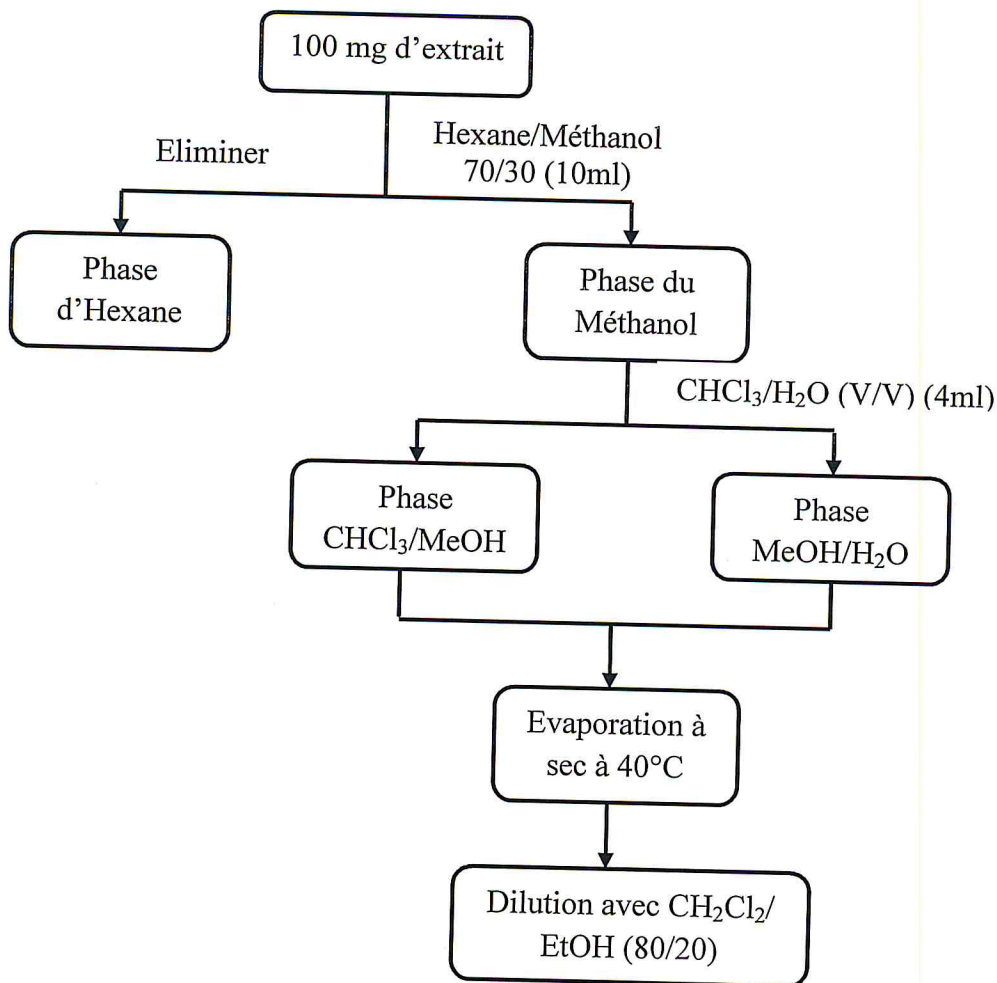
Caractères organoleptiques		
Aspect <b>Pâteux</b>	Couleur <b>verdâtre</b>	odeur <b>caractéristique</b>

### II.3.1.2 Préconcentration du phloroglucinol

La préconcentration du phloroglucinol est effectuée par une double extraction liquide-liquide ; elle consiste à transférer le phloroglucinol d'une phase aqueuse à une phase organique non miscible.

Une quantité de 100 mg d'extrait de *Cystoseira tamariscifolia* a été traitée selon le protocole détaillé dans la figure 2.3





**Figure 2.3 :** Procédé de préconcentration des dérivés de phloroglucinol

L'hexane est utilisé pour sa capacité de solubiliser des composés apolaires et notamment les pigments (chlorophylle a et fucoxantine) les stérols et les diverses formes de lipides. Dans chaque flacon un volume de 10 ml d'un mélange hexane/méthanol (70/30 : V/V) est ajouté à 100 mg d'extrait brut. L'ensemble est homogénéisé et deux phases méthanol/hexane sont individualisées. Un volume de mélange chloroforme/eau (V/V) est ajouté à la phase méthanolique pour dégraisser d'avantage l'extrait, les deux phases obtenues après décantation sont récupérées, les solvants sont entièrement évaporés, et les produits sont solubilisés dans un volume de 1 ml d'un mélange  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  /EtOH (80/20 : V/V).

### II.3.2 Détermination de phloroglucinol par spectrométrie IRTF

Une masse de 100 mg d'extrait organique de *Cystoseira tamariscifolia* a été traitée selon le protocole décrit dans la section 2.3.1.2. Les solutions ainsi obtenues sont soumises à l'analyse par spectrométrie IRTF. Les spectres IRTF sont enregistrés par rapport à un background stabilisé préalablement dans les mêmes conditions instrumentales avec une cellule remplie avec le même solvant de dilution. On mesure les valeurs d'absorbance de l'aire de pic à  $1610\text{ cm}^{-1}$  corrigées avec une ligne de base entre  $1558\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ . Les valeurs d'absorbance corrigées sont extrapolées dans les droites de calibration dans le domaine de concentration entre  $0.5\text{-}3.5\text{ mg.mL}^{-1}$  pour des étalons traités de la même manière que les échantillons réels.

## II.4 Résultats et discussions

### II.4.1 Identification de phloroglucinol par CCM dans l'extrait d'algue

L'objectif de cette manipulation est de vérifier la présence de phloroglucinol dans l'extrait de *Cystoseira tamariscifolia*.

L'analyse de la plaque CCM dans les conditions citées dans le paragraphe II.2.1.1 montre l'apparition de taches bleues pour les extraits, brut et traité de *Cystoseira tamariscifolia* au même niveau que le phloroglucinol, caractérisées par le même Rf (Rf= 0,2) (Figure 2.4).



Figure 2.4 : Identification du phloroglucinol par CCM

## II.4.2 Spectre IRTF de phloroglucinol

La figure 2.5 montre le spectre IRTF de l'étalon de phloroglucinol préparé directement dans le mélange de solvant  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$  (80/20 : V/V). La gamme spectrale étudiée s'étale de 4000 à 900  $\text{cm}^{-1}$ .

Comme on peut le constater, le spectre de phloroglucinol montre des bandes à 3664  $\text{cm}^{-1}$  représentant l'élongation de la liaison OH d'un alcool. Il présente également deux bandes à 1610  $\text{cm}^{-1}$  et 1499  $\text{cm}^{-1}$  caractéristique de l'élongation du groupement C=C aromatique, et une bande à 1158  $\text{cm}^{-1}$  correspond à l'élongation de la liaison C-O d'un phénol.

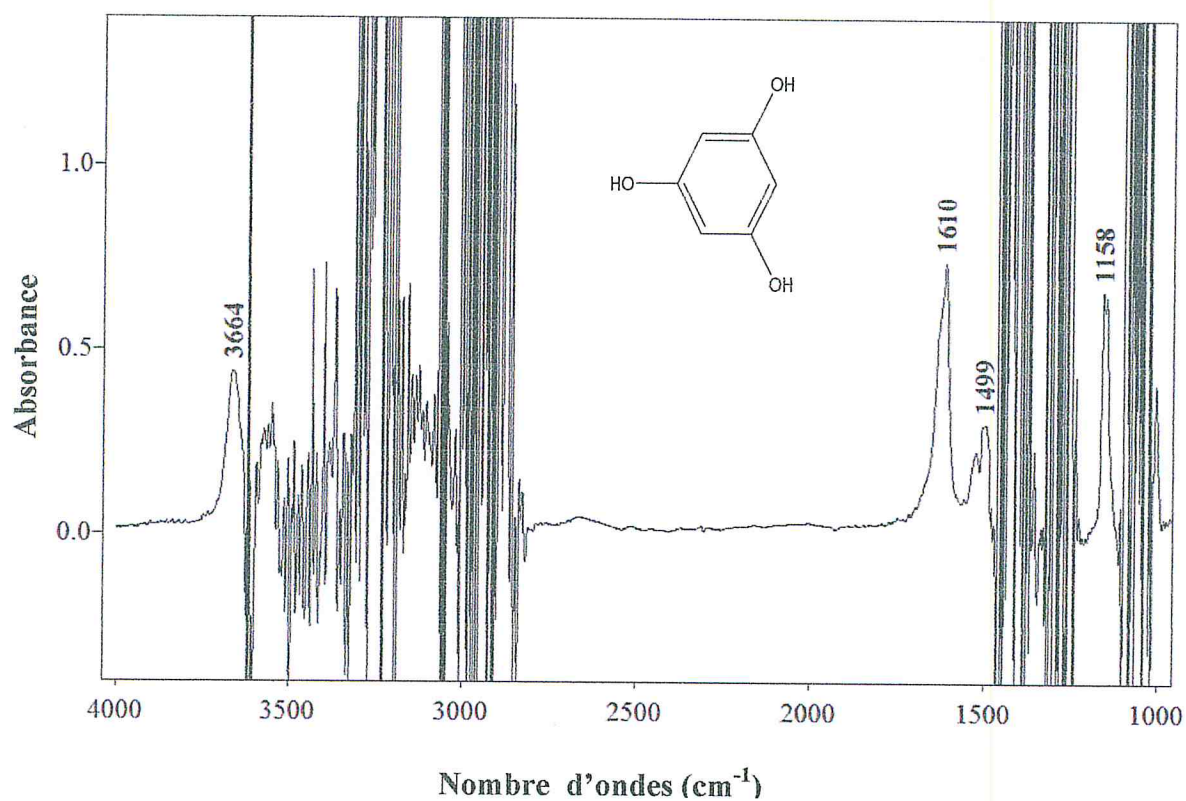


Figure 2.5 : Spectre IRTF de phloroglucinol préparé directement dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$  80/20 : V/V (3,5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )



### II.4.3 Comparaison des caractéristiques analytiques obtenues pour la détermination de phloroglucinol préparé directement dans $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ / EtOH (80/20 : V/V) et après précocentration

La figure 2.6 illustre les spectres d'absorbance d'une série de solutions de phloroglucinol préparée directement dans le mélange  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$  (80/20 : V/V), et ce, dans un domaine de concentration pris entre 0.5 et 3.5  $\text{mg.mL}^{-1}$ .

La bande à  $1610 \text{ cm}^{-1}$  stabilisée avec la ligne de base entre  $1558$  et  $1800 \text{ cm}^{-1}$  a été sélectionnée en considérant l'aire du pic.

Les caractéristiques analytiques des solutions de phloroglucinol préparées directement dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ , sont établies et résumées dans le tableau 2.2. Les caractéristiques analytiques montrent une linéarité assez bonne, une limite de détection de  $0.06 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , et une déviation standard de 2.21 %.

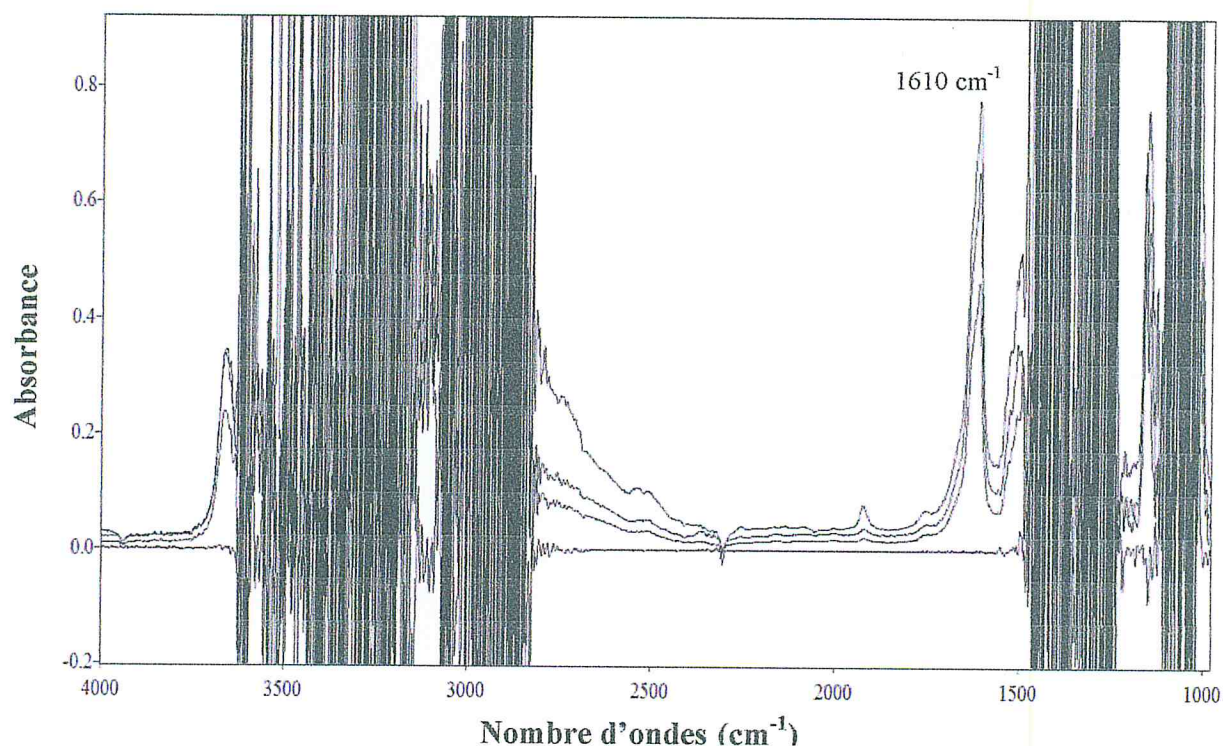
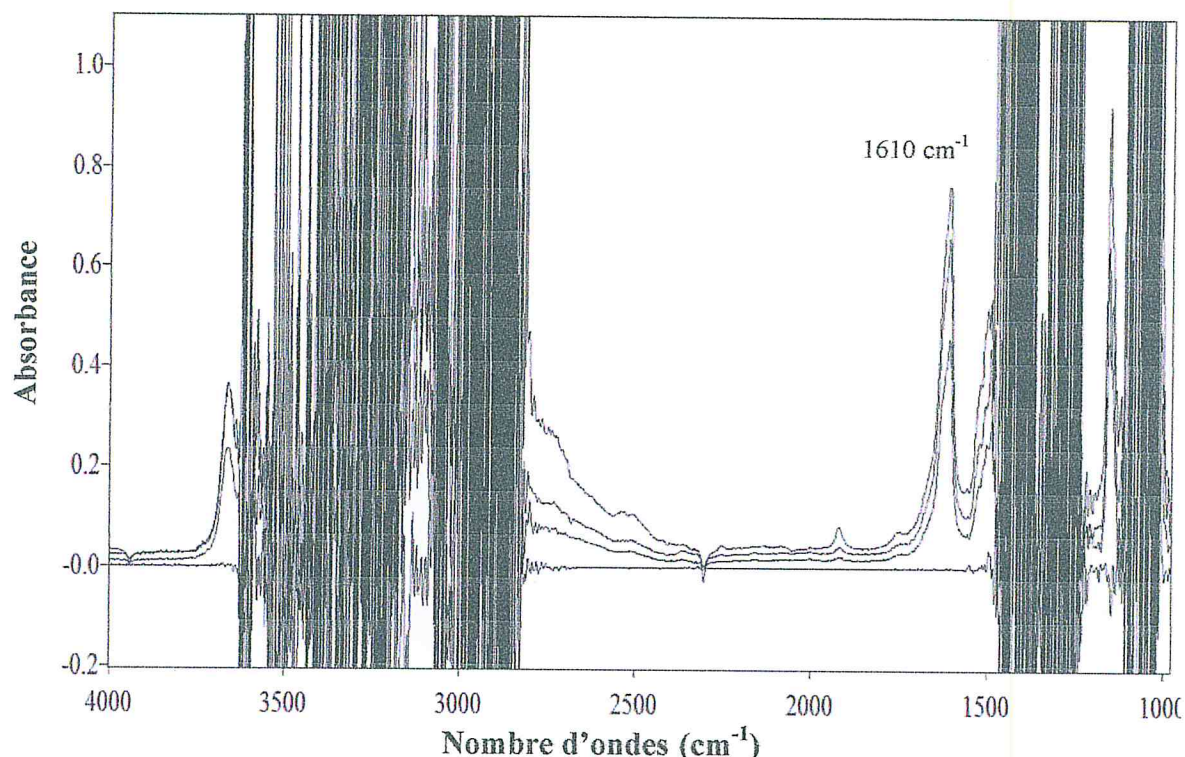


Figure 2.6 : Spectres d'absorbance de la série d'étalonnage de phloroglucinol préparée directement dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$  (80/20 : V/V)



La figure 2.7 illustre les spectres d'absorbance d'une série de solution de phloroglucinol traitée et diluée dans le mélange  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$  (80/20 : V/V), et ce, dans un domaine de concentration pris entre 0.5 et 3.5  $\text{mg.mL}^{-1}$ .

Les caractéristiques analytiques de la série des étalons de phloroglucinol sans et après traitement préparés dans le mélange  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$  (80/20 : V/V) sont établies et résumées dans le tableau 2.2 montrant une linéarité assez bonne, une limite de détection de 0.01  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , et une déviation standard relative de 0.92%.



**Figure 2.7 :** Spectres d'absorbance de la série d'étalonnage de phloroglucinol traitée et diluée dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$  (80/20 : V/V)

Le pourcentage de récupération de phloroglucinol est calculé à partir des rapports des pentes des droites de calibration obtenues pour des étalons de phloroglucinol après traitement, et des étalons préparés directement dans le solvant, voir tableau 2.2.

**Tableau 2.2** : Comparaison des droites de calibration de phloroglucinol préparé directement dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH (80/20 : v/v) et après traitement et dilution dans le même solvant

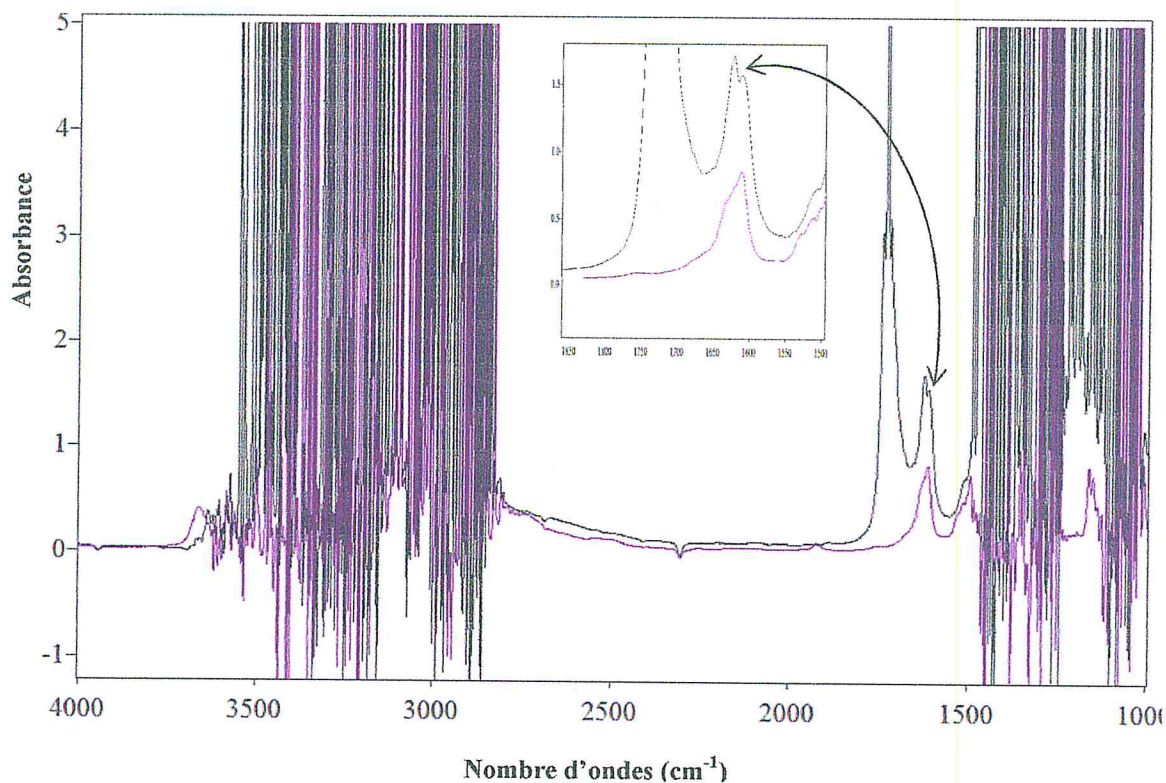
Max : Ligne de base (cm <sup>-1</sup> )	Phloroglucinol préparé directement dans CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /EtOH (80 :20)	Phloroglucinol après traitement dilué dans CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /EtOH (80 :20)	Pourcentage de récupération dans la phase méthanolique (%)
1610 : 1800-1558	A=8.1182C-1.3273 R=0.9956 L.D=0.06µg.mL <sup>-1</sup> R.S.D=2.21% D.C= 0.5-3.5mg.mL <sup>-1</sup>	A=7.8272C+0.3903 R=0.9984 L.D=0.01µg.mL <sup>-1</sup> R.S.D=0.92% D.C= 0.5-3.5mg.mL <sup>-1</sup>	96

**Conditions expérimentales:** A : absorbance, R : coefficient de corrélation, L.D : Limite de Détection en µg.mL<sup>-1</sup> obtenue pour un niveau de confiance de 99.6% (k=3), D.S.R : Déviation Standard Relative (pour C=2 mg.mL<sup>-1</sup>). D.C : domaine de concentration (0.5-3.5 mg.mL<sup>-1</sup>). Résolutions nominales est de 4cm<sup>-1</sup> ; nombre de balayage minimum égale à 10 spectres ; parcours optiques est de 0.5 mm ; background de la cellule remplie avec le solvant de dilution (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH (80/20 : v/v)).

Les résultats montrés dans le tableau 2.2 donnent un rendement de récupération de l'ordre de 96%. Ce résultat confirme que le protocole proposé est adéquat pour le traitement des échantillons réels et permet d'isoler quantitativement les phénols.

En comparant les spectres de 100 mg.mL<sup>-1</sup> de l'extrait brut et de phloroglucinol (étalon 3.5 mg.mL<sup>-1</sup>) on constate que la détermination directe est impossible et qu'un traitement préalable de l'extrait brut est nécessaire (figure 2.8).





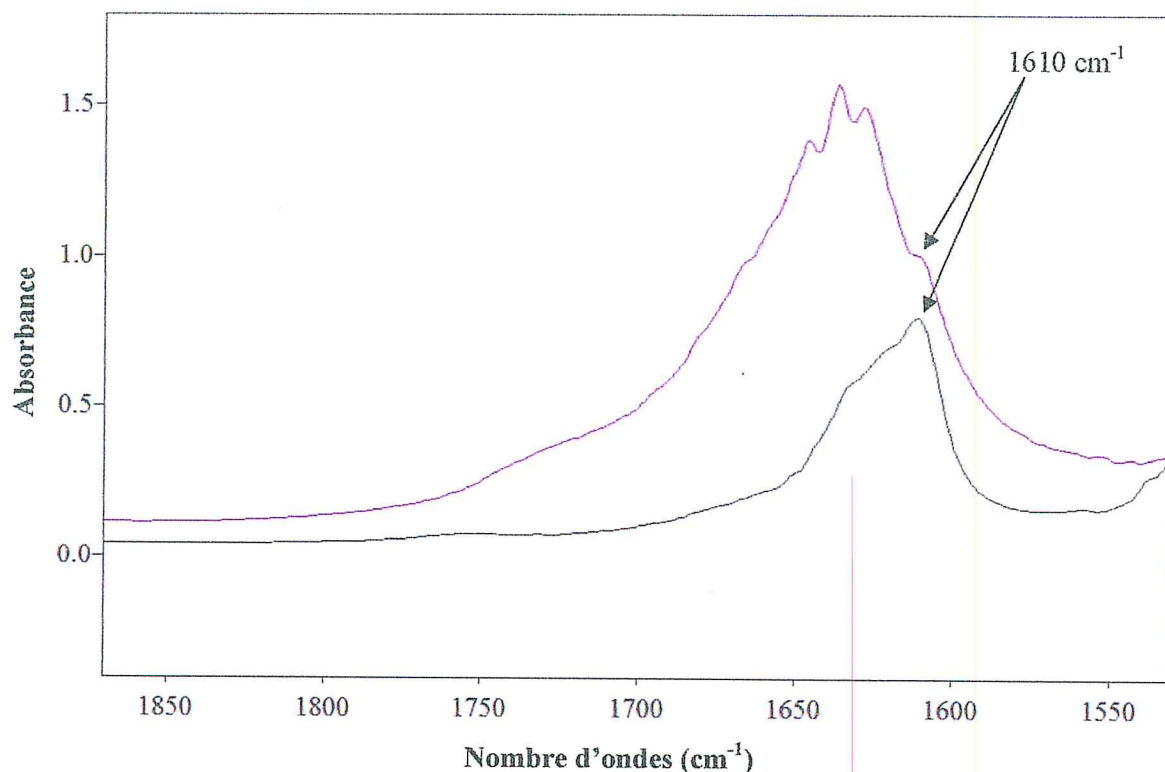
**Figure 2.8 :** Spectres IRTF de 100 mg extrait brut de *Cystoseira tamariscifolia* (violet), et le phloroglucinol ( $3,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) (bleu) dilués dans 1 ml de mélange  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$  (80/20 : V/V)

#### II.4.4 Détermination du taux des dérivés de phloroglucinol dans l'extrait de *Cystoseira tamariscifolia*

Une masse de 100 mg de l'extrait lipidique de *Cystoseira tamariscifolia* préalablement traité selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.3.1.2 a été analysée par spectrométrie IRTF, l'expérience est répétée trois fois. Les spectres obtenus des phases,  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  sont montrés sur les figures 2.9 et 2.10 respectivement.

Le taux est obtenu en extrapolant les valeurs d'absorbance dans les droites de calibration établies pour des solutions étalons traitées de la même manière que les échantillons réels, tous en considérant la moyenne de trois mesures indépendantes.





**Figure 2.9 :** Spectres IRTF de 100 mg extrait de *Cystoseira tamariscifolia*, après traitement et dilution dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH (80/20 : v/v) (phase MeOH (violet)) et le phloroglucinol (bleu)

Il y a de lien à noter que le spectre de la phase méthanolique présente un épaulement à 1610 cm<sup>-1</sup> et non pas un pic résolu, ceci est dû probablement au protocole d'isolement qui n'a pas été le plus adéquat. Une optimisation du protocole de purification et d'isolement de phénols s'impose.

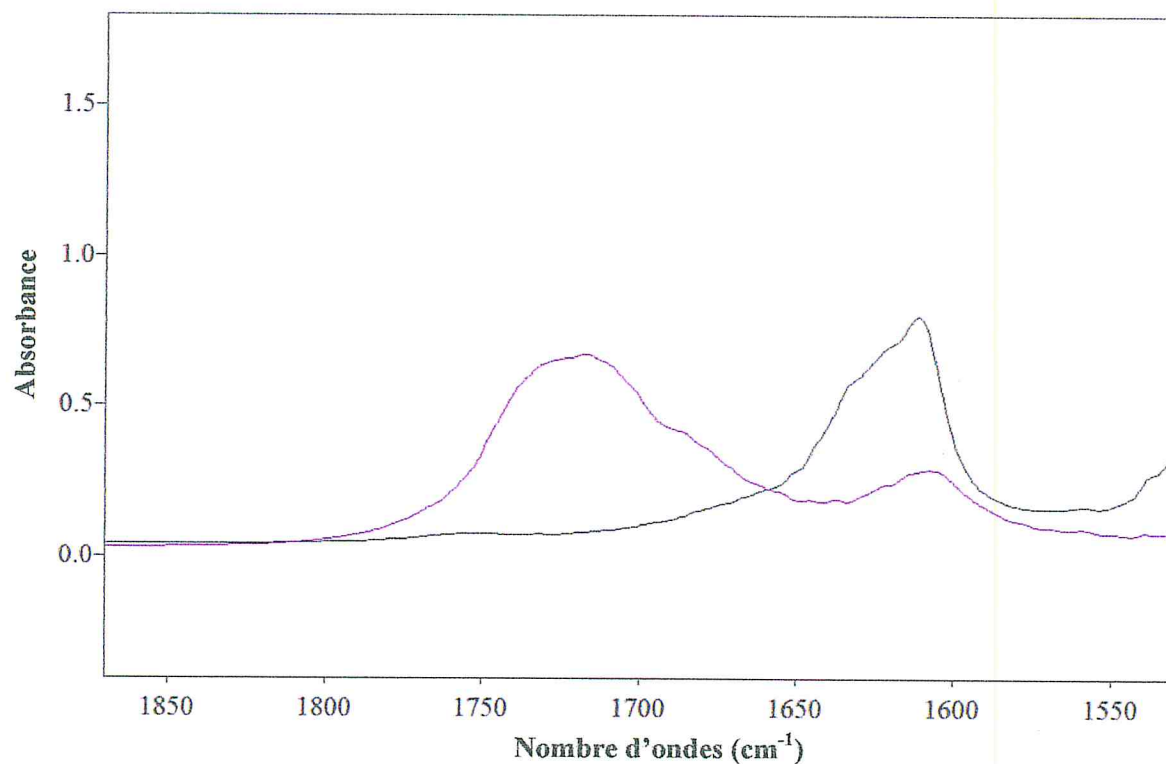
Le tableau 2.3 regroupe les résultats de détermination par spectrométrie IRTF du phloroglucinol dans l'extrait *Cystoseira tamariscifolia*.

**Tableau 2.3 :** taux de dérivés de phloroglucinol dans l'extrait de *Cystoseira tamariscifolia*

Taux	Phase méthanolique
	11±0.48

Le taux de dérivés phénoliques dans la phase méthanolique de l'extrait est de l'ordre de 11%. Ce taux est comparable avec les valeurs données dans la bibliographie [33, 39].

Lors de l'examen des spectres IRTF de l'extrait après traitement, on a constaté que les dérivés phénoliques sont passés aussi dans la phase chloroformique. De ce fait une étude plus approfondie est nécessaire quant à l'optimisation du protocole de purification et d'isolement des dérivés phénoliques.



**Figure 2.10 :** Spectres IRTF de 100 mg extrait de *Cystoseira tamariscifolia*, après traitement et dilution dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH (80/20 : v/v) (phase CHCl<sub>3</sub> (violet)) et l'étalon (bleu)

Chapitre III  
Etude analytique de  
l'huile essentielle  
de *Cystoseira tamariscifolia*  
par CG-SM, et détermination  
de l'activité antioxydante  
de l'extrait.



### **III.1 Matériels et méthodes**

#### **III.1.1 Introduction**

Ce chapitre est consacré à l'étude chimique de l'huile essentielle de *cystoseira tamariscifolia*. Il est reparti en trois parties : l'extraction de l'huile essentielle de *cystoseira tamariscifolia* par entraînement à la vapeur d'eau, l'analyse de sa composition chimique par CG/SM et la détermination des indices physico-chimiques et enfin l'évaluation du pouvoir antioxydant de l'extrait lipidique de cette algue.

L'extraction de l'huile essentielle et la détermination des indices physico-chimiques ont été réalisés au laboratoire de chimie des substances naturelles (département de Chimie de l'Université Saad Dahlab de Blida), alors que l'analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a été effectuée au sein du laboratoire MAPIEM de l'Université du Sud Toulon-Var (France).

#### **III.1.2 Lieu et date de récolte de l'espèce étudiée**

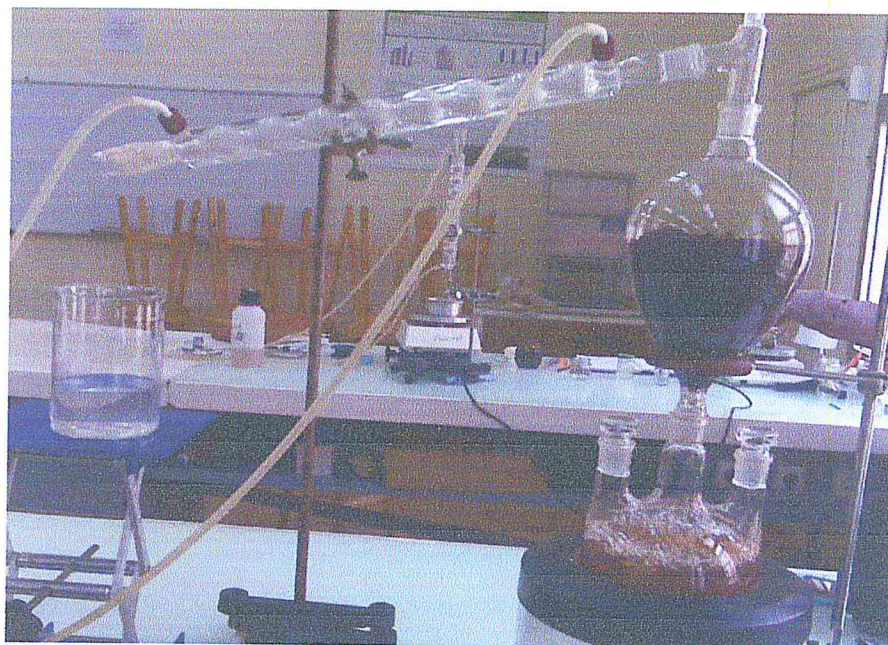
L'algue utilisée dans cette étude a été récoltée en juin 2006 au niveau du lieu dit « les caroubiers » à l'ouest de la ville de Tipaza en Algérie. L'algue est ensuite triée manuellement pour éliminer toute sorte d'épiphytes, est ensuite séchée à l'ombre dans un endroit sec et aéré.

#### **III.1.3 Protocole expérimental d'extraction de l'huile essentielle**

##### **III.1.3.1 Description du dispositif d'extraction**

Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur d'eau. Ces derniers, saturés en composés volatils se condensent au niveau du réfrigérant pour donner un hydrolat (figure 3.1).

L'huile essentielle étant immiscible avec l'eau, le mélange forme un liquide légèrement trouble et sur lequel surnage une fine couche huileuse.



**Figure 3.1 :** Montage d'entraînement à la vapeur d'eau

### III.1.3.2 Extraction liquide-liquide de l'huile essentielle

L'hydrolat recueilli est extrait avec un volume d'éther diéthylique, on obtient alors deux phases : une phase organique contenant l'huile essentielle et une phase aqueuse. Cette opération est répétée deux fois afin d'épuiser complètement l'huile essentielle. Les phases organiques obtenues de chaque extraction sont regroupées et filtrées sur du sulfate de magnésium ( $MgSO_4$ ) afin d'éliminer toute trace d'eau (Figure 3.2). On procède alors à l'évaporation du solvant.

L'huile essentielle ainsi obtenue, est conservée dans des flacons hermétiquement fermés et stockés dans un endroit sombre à 4°C.



**Figure 3.2:** extraction liquide/liquide de l'huile essentielle de *Cystoseira tamariscifolia* et séchage sur du sulfate de magnésium



### III.1.3.3 Rendement en huile essentielle

On définit le rendement par le rapport des masses d'huile essentielle extraite et de la matière végétale. Il est exprimé en pour cent (%) et calculé par la formule suivante :

$$\eta(\%) = \frac{M_{HE}}{M_{MV}} * 100$$

$\eta$  (%): Rendement en huile essentielle (%);

$M_{HE}$ : Masse de l'huile essentielle (g);

$M_{MV}$ : Masse de la matière végétale utilisée (g);

### III.1.3.4 préparation de l'extrait de *Cystoseira tamariscifolia*

L'extrait a été obtenu selon le protocole détaillé dans la section 2.3.1.1.

### III.1.3.5 Cinétique d'extraction

Elle consiste au suivi du rendement d'extraction en fonction du temps. L'objectif de l'étude cinétique est d'optimiser le rendement et le temps d'extraction, mais également comprendre le mécanisme de l'opération d'entraînement à la vapeur d'eau.

Cette étude a été effectuée sur une masse végétale de 124 gramme et un volume d'eau de 3 litre.

## III.1.4 Analyses physico-chimiques de l'huile essentielle de *Cystoseira tamariscifolia*

### III.1.4.1 Mesure des indices physiques

#### III.1.4.1.1 Détermination de la densité

La densité est définie comme étant la masse volumique de l'huile essentielle rapportée à celle de l'eau à une température donnée.

La mesure a été faite à l'aide d'un pycnomètre (figure 3.3), en utilisant la méthode de dilution.



Figure 3.3: Pycnomètre



### III.1.4.2 Mesure des indices chimiques de l'huile essentielle

#### III.1.4.2.1 Détermination de l'indice d'acide (AFNOR NF T 75-103:1999) [82]

C'est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'huile essentielle. Les acides libres sont neutralisés par une solution d'hydroxyde de potassium KOH éthanolique. La figure 3.4 montre les différentes étapes de la détermination de l'indice d'acide.

##### Mode opératoire :

Dans un bécher introduire la prise d'essai, ensuite ajouter l'éthanol 96% et 2 gouttes de phénolphtaléine.

Neutraliser le liquide avec la solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (0.1 mol.L<sup>-1</sup>) contenue dans une burette jusqu'à obtention d'une couleur rose.

L'indice d'acide (IA) est donné par la formule :

$$IA = V \cdot C \cdot \frac{56,11}{m}$$

IA : indice d'acide

V : le volume, en millilitres, de solution de KOH utilisé pour le titrage ;

C : la concentration exacte, en moles par litres, de la solution de KOH ;

m : la masse, en grammes, de l'huile essentielle.

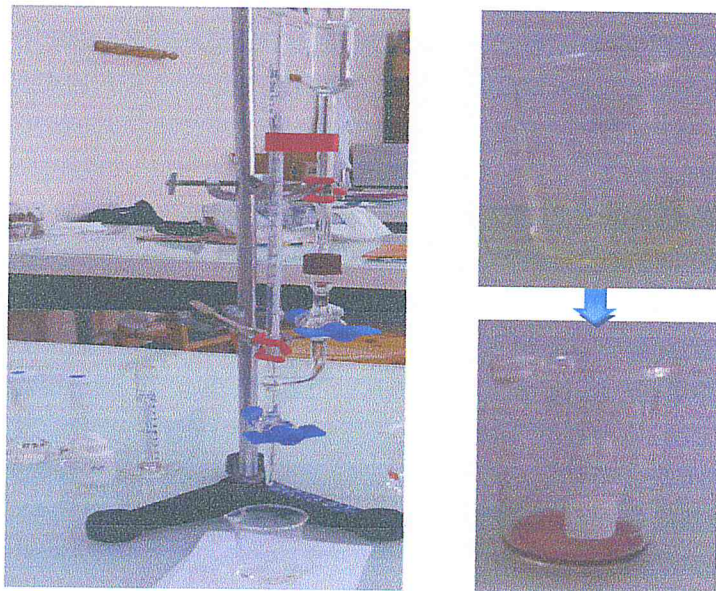


Figure 3.4 : Différentes étapes de la détermination de l'indice d'acide

### III.1.4.2.2 Détermination de l'indice d'ester (AFNOR NF T 75-104:1994) [82]

C'est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1g d'huile essentielle. L'hydrolyse des esters présents dans l'huile essentielle se fait par chauffage, dans des conditions définies, en présence d'une solution d'hydroxyde de potassium éthanolique et dosage en retour de l'excès d'alcali par une solution d'acide chlorhydrique HCl. La figure 3.5 illustre les différentes étapes de la détermination de l'indice d'ester.

#### Mode opératoire :

Dans un ballon, contenant la solution provenant de l'indice d'acide, on ajoute 25ml d'une solution d'hydroxyde de potassium à 0.5mol/l, on adapte le réfrigérant et on laisse chauffer pendant une heure.

Laisser refroidir, puis démonter le réfrigérant et ajouter 20ml d'eau puis 2 gouttes de phénolphtaléine (figure 3.5).

Titrer l'excès d'hydroxyde de potassium avec la solution d'acide chlorhydrique (0.5mol/l).

L'indice d'ester (IE) est donné par la formule suivante :

$$IE = \frac{28,05}{m} (V_0 - V_1) - IA$$

Où :

$V_0$  : le volume, ml, de la solution de HCl utilisé pour l'essai à blanc ;

$V_1$  : le volume, ml, de la solution de HCl utilisé pour la détermination ;

$m$  : la masse, en grammes, de l'huile essentielle ;

$IA$  : la valeur de l'indice d'acide déterminé selon la norme NF T 75-103

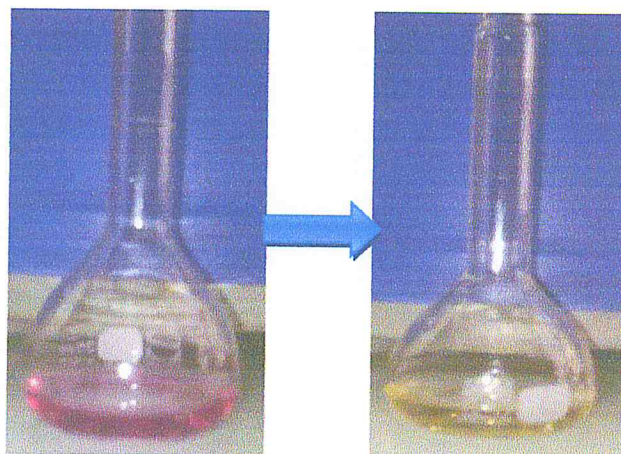


Figure 3.5 : Différentes étapes de la détermination de l'indice d'ester



### III.1.5 Analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

#### III.1.5.1 Description de l'appareil

L'analyse qualitative de la composition chimique de l'huile essentielle extraite par entraînement à la vapeur d'eau a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse « CG-SM » (figure 3.6). L'identification des différents composés est effectuée en se basant sur les banques de données spectrales Wiley 7n et NBS 75k.1. (comprenant, respectivement, des spectres de masse de 250000 et 75000 molécules), avec un taux de similitude supérieure ou égal à 90%.



Figure 3.6 : Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectroscopie de masse

#### III.1.5.2 Conditions opératoires

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

- ✓ Une colonne capillaire de type DB1, de longueur 30m d'un diamètre interne de 0.25 mm et une épaisseur du film de 0.25  $\mu\text{m}$ .
- ✓ un gaz vecteur (hélium) d'un débit de 0.3 ml/mn.
- ✓ Un potentiel d'ionisation du spectromètre de masse égale à 70 eV.
- ✓ La programmation du four est : 80°C (5') - 3°/mn - 280°C (10').
- ✓ Injection d'une quantité de 2  $\mu\text{l}$  en mode Split : 1/9.
- ✓ Les échantillons de l'huile essentielle sont dilués dans l'acétate d'éthyle à 10%.



### **III.1.6 Estimation du pouvoir antioxydant de l'extrait lipidique de *Cystoseira tamariscifolia* par la méthode de piégeage du radical libre DPPH**

#### **III.1.6.1 Introduction**

La notion d'activité anti-oxydante est inévitablement associée aux radicaux libres, c'est-à-dire des molécules instables possédant un électron non apparié.

Ces radicaux libres recherchent un état plus stable. Pour ceci, ils capturent un électron à l'oxygène. Des formes particulièrement actives de l'oxygène sont ainsi produites telles que les radicaux, hydroxyle ou peroxyde, l'oxygène singulet et/ou l'anion superoxyde.

Les algues, comme tout organisme vivant, ont su développer des mécanismes de protection contre les conditions de stress. Elles synthétisent ainsi des molécules pouvant agir à différents niveaux. Les molécules anti-oxydantes chez les algues sont de nature lipophile (caroténoïdes, vitamine E) et de nature hydrophile (polyphénols, phycobiliprotéines, vitamine C, enzymes telle que le superoxyde dismutase) [83].

Le radical libre DPPH permet l'estimation de l'activité antioxydante de l'extrait de *Cystoseira tamariscifolia*. Il possède une coloration violette foncée, lorsqu'il est réduit la coloration devient jaune pâle.

Cette méthode est basée sur l'utilisation d'un radical libre, stable en solution : le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), qui absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm. Utilisé préalablement par Connan (2004) et Le Lann (2006) [84, 85].

En effet, cette partie vise l'étude de pouvoir antioxydant de l'extrait lipidique de *Cystoseira tamariscifolia*.

#### **III.1.6.2 Appareillage et réactif**

L'appareillage utilisé dans l'évaluation de l'activité antioxydante est le suivant

- Un spectromètre UV-Visible de marque Chimadzu type 1605 à double faisceau.
- Une balance sensible.
- Des tubes à essais avec leurs supports.
- une micropipette (pipette de précision).
- Papier Aluminium.
- Une fiole de 100ml, pour préparer la solution de DPPH
- Les produits utilisés sont DPPH, Méthanol, Vitamine C de grade analytique.

### III.1.6.3 procédure générale

Le pouvoir antioxydant de notre extrait a été testé par la méthode au DPPH [86] avec quelques modifications. La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 4 mg de DPPH dans 100 mL de méthanol absolu pour avoir une concentration de 0,04%.

Les échantillons ont été préparés par dissolution de 0.5 mg d'extrait dans 1 mL de méthanol. Cette solution dite solution mère, subit ensuite des dilutions pour en avoir différentes concentrations.

En parallèle, une solution méthanolique de la vitamine C a été préparée par dissolution de 0,2 mg de la vitamine C dans 1 mL de méthanol. L'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon testé.

Dans des tubes secs et stériles, on introduit 1 mL du méthanol et les différentes concentrations de la solution à tester, on ajoute 1 ml de la solution DPPH. Après agitation à l'aide d'un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité, à une température ambiante (25°C) pendant 30 min.

La lecture est effectuée par la mesure d'absorbance à 518 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible, en utilisant des cuves en quartz de 2 ml.

La lecture est mesurée par rapport à un blanc qui constitue 1ml de méthanol et 1ml de la solution de DPPH.

- **Détermination du pouvoir antioxydant**

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

$$\% \text{ Inhibition} = (\text{Abs control} - \text{Abs test}) / \text{Abs control} * 100 \text{ [87]}$$

Soit :

**Abs control:** Absorbance à la longueur d'onde de 518 nm de la solution méthanol + DPPH.

**Abs test:** Absorbance à 518 nm de l'échantillon.

### III.2 Résultats et Discussions

#### III.2.1 Rendement en huile essentielle de *Cystoseira tamariscifolia*

Le rendement moyen de l'huile essentielle est de 0,02%. Cette valeur est faible en comparaison à celles obtenues pour les plantes terrestres et qui est de l'ordre de 0,1% [88]. Dans le but d'obtenir une masse d'huile essentielle suffisante pour effectuer toutes les analyses physico-chimiques, nous avons réalisé une série d'extraction de l'huile essentielle de *Cystoseira tamariscifolia*. Les rendements obtenus exprimés en pourcent, sont regroupés dans le tableau 3.1 :

**Tableau 3.1** : Les moyens des rendements d'une série d'extraction

N° d'expérience	01	02	03
Masse (g)	124	150	137
Masse en huile essentielle (g)	0.02	0.03	0.026
Rendement (%)	<b>0.016</b>	<b>0.02</b>	<b>0.019</b>

Nous avons évalué les caractéristiques organoleptiques à savoir, l'aspect, la couleur et l'odeur, elles sont données par le tableau 3.2 :

**Tableau 3.2**: Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de *Cystoseira tamariscifolia*

Caractères organoleptiques		
Aspect huileux	Couleur jaunâtre	odeur caractéristique

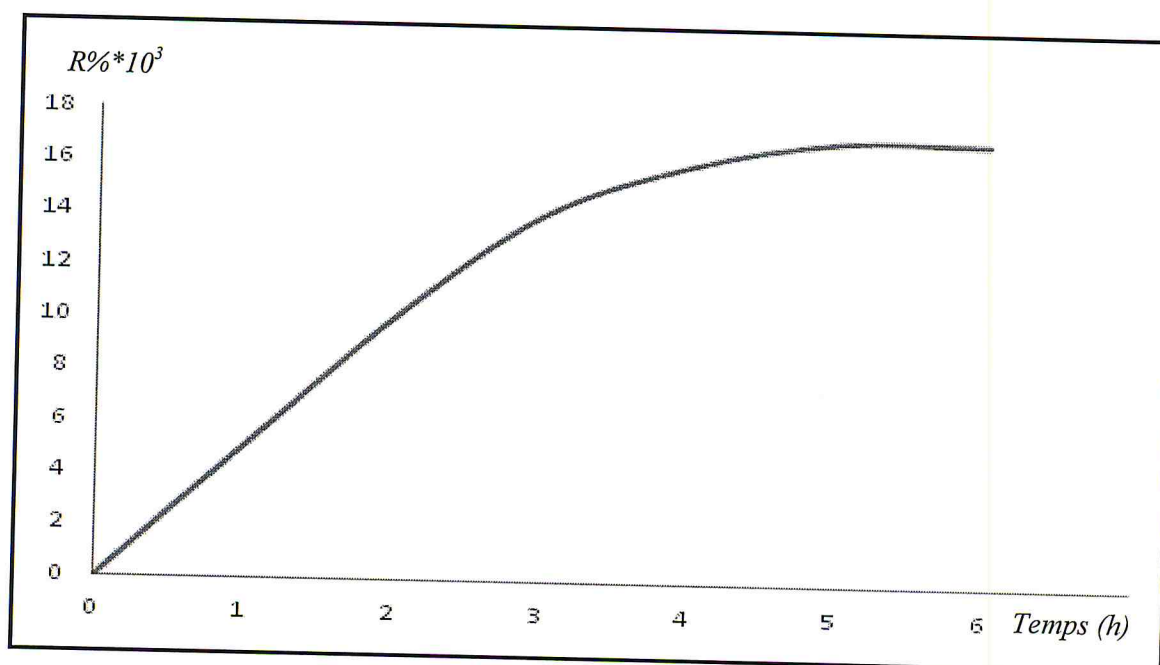


### III.2.2 Cinétique d'extraction

Les valeurs de rendements obtenues en fonction du temps sont regroupées dans le tableau 3.3 et représentées par la figure 3.7

**Tableau 3.3 :**  $R\% = f(t)$

Temps (h)	1	2	3	4	5	6
Rendement (%) $\cdot 10^3$	5	10	14	16	17	17



**Figure 3.7 :** évolution de rendement en huile essentielle en fonction du temps

L'examen de la figure 3.7 montre que la cinétique d'extraction passe par deux étapes, la première dure 3 heures, nous constatons une augmentation presque linéaire du rendement d'extraction. Ceci traduit l'étape où la matière végétale est encore riche en huile essentielle. La seconde étape commence à partir de 3 heures où nous constatons un rendement relativement constant (pallier) qui peut être interprété par l'épuisement de la matière végétale.

Sur la base de cette étude cinétique nous pouvons conclure qu'un temps d'extraction de 3 heures est relativement suffisant pour l'opération d'entraînement à la vapeur.

### III.2.3 Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de *Cystoseira tamariscifolia*

Les résultats des indices physico-chimiques sont donnés dans le tableau 3.4.

**Tableau 3.4:** Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de *Cystoseira tamariscifolia*

<b>Densité</b>	<b>0.98</b>
<b>Indice d'acide</b>	32.06
<b>Indice de saponification</b>	28.04

L'indice d'acide est de 32.06, cette valeur est grande en comparaison à celle des plantes terrestres et qui est de l'ordre de 7. On constate que l'huile essentielle de *Cystoseira tamariscifolia* est riche en acides gras.

La valeur de l'indice de saponification chez cette algue est faible en comparaison a celles des plantes terrestres et qui est de l'ordre de 200.

### III.2.4 Etude analytique de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

L'analyse par CG/SM dans les conditions citées auparavant (III.1.5.2) a permis l'identification des composés regroupés dans le tableau 3.5.

Les différentes classes de composés sont présentées par la figure 3.8 et le profil chromatographique est donné par la figure 3.9.

**Tableau 3.5:** Composition chimique de l'huile essentielle de l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia*

Ordre d'éluion	Temps de rétention (mn)	Nom du composé	Formule moléculaire	% de l'aire
1	5.218	Acide Hexanoïque	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	t
2	8.450	Acide Heptanoïque	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	t
3	12.399	Acide Octanoïque	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	t
4	13.897	3-ethyl-6-methyl-1H-pyrrole-2,5-dione	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	0.197

5	15.474	Acide Benzeneacétique	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	0.096
6	16.000	NI*(1)	/	0.238
7	16.682	NI*(2)	/	0.616
8	16.828	NI*(3)	/	0.315
9	16.939	NI*(4)	/	0.381
10	17.096	NI*(5)	/	0.275
11	17.521	NI*(6)	/	0.857
12	17.745	NI*(7)	/	0.868
13	19.210	2,4-dimethyl-6-allylphenol	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O	0.253
14	20.071	(E), Acide-2-butenedioique diethyl ester	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	0.589
15	20.217	2,6-dimethyl-4-oxa-endo-tricyclo(5.2.1.0**2,6)Decane	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> O	1.342
16	20,675	Acide décanoique	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	0.259
17	20.966	3-methyl-3-phenylbutene	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub>	0.185
18	23.438	5,9-undecadien-2-one-6,10-dimethyl	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O	0.168
19	23.874	NI*(8)	/	0.275
20	24.265	Neo-menthol	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	0.187
21	24.690	β-ionone epoxyde	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	0.162
22	24.825	β-ionone	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O	0.240
23	24.970	NI*(9)	/	0.881
24	25.675	dihydroactinidiolide	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	0.942
25	27.666	NI*(10)	/	0.290
26	28.549	Acide dodecanoique	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	1.933
27	28.873	NI*(11)	/	0.350
28	28.996	NI*(12)	/	0.376
29	29.668	benzophenone	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> O	0.363
30	30.160	3α-methyl-5β-H-6β-isopropyl-9-octalen-2-one	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	0.484
31	30.540	α-copaene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0.176
32	30.730	Trans-methyl dihydrojasmonate	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	0.217
33	31.088	α-cubebene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0.697



34	31.379	t-muurolol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	0.371
35	33.146	NI*(13)	/	5.131
36	33.638	NI*(14)	/	2.206
37	33.817	NI*(15)	/	0.706
38	35.696	Acide tetradecanoïque	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	4.687
39	36.591	n-hexyl salicylate	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	0.385
40	37.284	NI*(16)	/	0.201
41	38.593	tetrahydroionone	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> O	1.008
42	38.805	Acide pentadecanoïque	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	0.740
43	41.456	9-acide hexadecenoïque	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	7.250
44	42.474	Acide hexadécanoïque	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	21.412
45	43.615	NI*(17)	/	0.357
46	44.207	NI*(18)	/	0.507
47	44.409	NI*(19)	/	1.426
48	44.543	Dodecyl acrylate	C <sub>15</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	0.503
49	44.711	Epitiocholanolone	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	1.320
50	44.968	Acide héptanoïque	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	0.278
51	45.248	muscopyridine	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> N	0.365
52	46.388	NI*(20)	/	0.563
53	46.892	Acide linoléique	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	0.887
54	47.350	Acide oléique	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	6.808
55	47.932	Acide octadecanoïque	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	2.168
56	48.514	cyclododecane	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub>	0.324
58	51.377	NI*(21)	/	0.507
59	51.500	2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	0.412
60	54.128	NI*(22)	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	0.353
61	54.464	Octadécane	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub>	0.264
62	55.884	12 β -hydroxy -5α-pregnan-20-one	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	0.352
63	56,723	NI*(23)	/	0.426
64	56.969	Eicosane	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>	0.377

65	59.385	Docosane	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>	0.659
66	60.022	Podocarpan-12 $\alpha$ -ol	C <sub>17</sub> H <sub>30</sub> O	1.506
67	60.481	Lup-1-en-3-one	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O	2.851
68	60.906	NI*(24)	/	1.572
69	61.409	NI*(25)	/	1.535
70	61.711	Nonacosane	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub>	0.837
71	62.326	NI*(26)	/	3.538
72	62.461	NI*(27)	/	1.473
73	63.311	NI*(28)	/	0.293
74	63.959	Hexatriacontane	C <sub>36</sub> H <sub>74</sub>	0.530
75	64.261	Squalene	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>	0.367
76	65.279	NI*(29)	/	2.884
77	65.447	NI*(30)	/	3.856
78	66.118	tetratetracontane	C <sub>44</sub> H <sub>90</sub>	0.465
79	66.476	NI*(31)	/	1.126

t : trace (< 0,1%), NI : Non Identifié.

Les spectres de masse des produits non identifiés sont représentés sous forme de  $m/z$  (abondance %) des principaux fragments.

Exemple : NI\*1 : 41(12), 44(52), 55(47), 57(100), 91(28), 112(13), 131(12), 164(3). Le composé non identifié numéro1 présente les quantités  $m/z$  suivantes : 41, 44, 55, 57, 91, 112, 131, 164. Les abondances : 12, 52, 47, 100, 28, 13, 12, 3 sont obtenues en divisant l'intensité de chaque fragment par celle du pic de base (le pic le plus important).

NI\*(1) : 41(12), 44(52), 55(47), 57(100), 91(28), 112(13), 131(12), 164(3).

NI\*(3) : 43(15), 45(39), 59(100), 73(36), 117(15), 161(4).

NI\*(4) : 41(29), 43(17), 45(42), 59(100), 73(43), 117(15), 161(3).

NI\*(5) : 41(28), 43(17), 45(36), 59(100), 73(34), 117(14), 161(4).

NI\*(6) : 41(17), 43(12), 45(17), 59(100), 73(23), 103(13), 135(0.5).

NI\*(7) : 41(19), 43(13), 45(19), 59(100), 73(21), 103(12), 137(8), 152(6).

NI\*(8) : 43(62), 55(23), 67(12), 81(13), 93(14), 109(14), 121(14), 179(100), 193(2).

NI\*(9) : 43(100), 81(27), 109(30), 137(55), 164(14), 222(17).

NI\*(10) : 41(82), 44(100), 55(73), 69(44), 127(30), 150(27), 178(14), 190(4).

NI\*(11) : 43(55), 55(57), 58(18), 83(28), 86(100), 175(34), 189(7), 204(1).

NI\*(12) : 43(69), 55(37), 81(100), 96(47), 108(30), 121(64), 177(39), 192(6), 222(10).  
NI\*(13) : 43(100), 150(25), 165(20), 179(11), 208(12), 222(24).  
NI\*(14) : 43(91), 81(72), 96(100), 112(37), 133(13), 155(14), 171(17), 189(35), 204(29),  
208(2).  
NI\*(15) : 43(56), 81(37), 96(100), 110(42), 137(22), 152(26), 248(4).  
NI\*(16) : 43(94), 189(100), 220(17).  
NI\*(17) : 43(100), 55(41), 96(64), 135(34), 150(85), 302(2).  
NI\*(18) : 41(100), 55(69), 67(55), 79(68), 91(50), 95(21), 105(22), 256(2).  
NI\*(19) : 43(100), 95(39), 137(16), 232(21), 275(11), 290(8).  
NI\*(20) : 43(100), 69(30), 95(34), 137(47), 150(44), 252(1).  
NI\*(21) : 41(35), 55(31), 77(32), 105(62), 123(100), 182(4).  
NI\*(22) : 43(38), 55(34), 77(31), 97(14), 105(60), 123(100), 196(3).  
NI\*(23) : 43(52), 55(34), 105(53), 123(100), 257(1).  
NI\*(24) : 43(51), 95(35), 137(41), 150(100), 189(19), 230(35), 438(5).  
NI\*(25) : 43(48), 95(35), 137(43), 150(100), 189(18), 230(39), 438(6).  
NI\*(26) : 43(41), 95(31), 137(42), 150(100), 189(17), 230(35), 438(6).  
NI\*(27) : 43(53), 95(35), 137(43), 150(100), 189(17), 230(40), 438(6).  
NI\*(28) : 43(38), 57(27), 71(17), 150(11), 189(100), 230(2).  
NI\*(29) : 43(62), 137(31), 150(100), 191(60), 288(45), 438(5).  
NI\*(30) : 43(58), 137(33), 150(100), 191(61), 288(44), 438(5).  
NI\*(31) : 43(77), 137(37), 150(100), 191(54), 288(37), 438(4).

Nous avons représentés les différentes classes chimiques présentes dans la composition chimique (tableau 3.5) sous forme d'un secteur (figure 3.8).



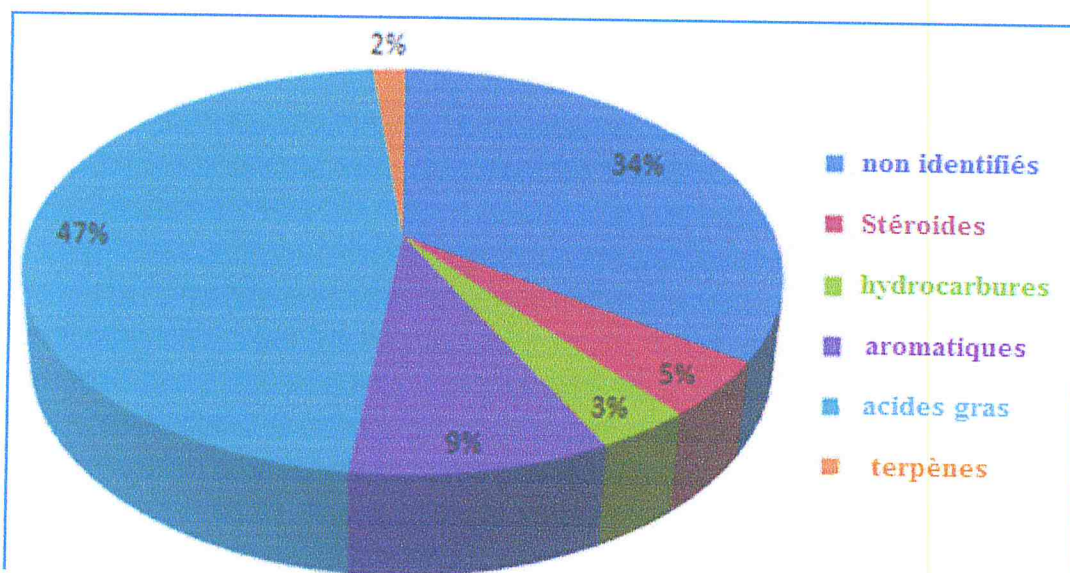


Figure 3.8 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Cystoseira tamariscifolia*

L'examen de la figure 3.8 montre que la composition chimique de l'huile essentielle de *Cystoseira tamariscifolia* est dominée par la présence de 45% d'acides gras : dont les principaux sont l'acide hexadecanoïque (21,412%), le 9-acide hexadecenoïque (7,25%) et l'acide oléique (6,81%).

Nous avons noté la présence des stéroïdes avec une teneur de 5%, les produits identifiés sont Epitiocolanolone (1,32%), 12 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one (0,352%) et Lup-1-en-3-one.

Les terpènes (hydrocarbonés et oxygénés) représentent environ 2% de la composition globale. Les terpènes sont représentés en particulier par les sesquiterpènes  $\alpha$ -copaène (0,176%),  $\alpha$ -cubebene (0,697%), t-muurolol (0,371%) et un triterpène à savoir le squalène (0,376%).

Les hydrocarbures et les composés aromatiques occupent 3% et 9% respectivement de la composition globale, notamment les cétones et les esters.

Nous n'avons pas pu identifier beaucoup de composés (34%) inconnus en se basant uniquement sur le spectre de masse.

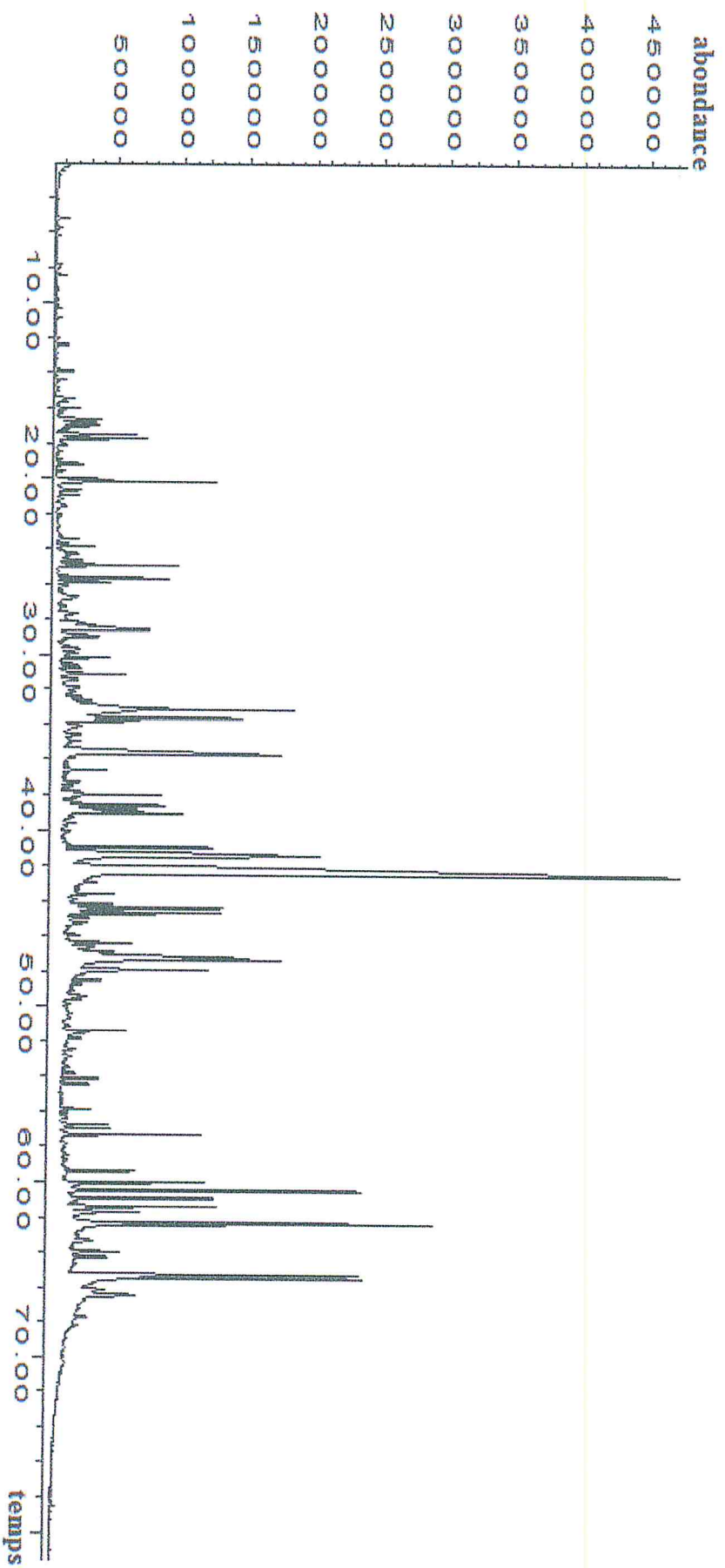
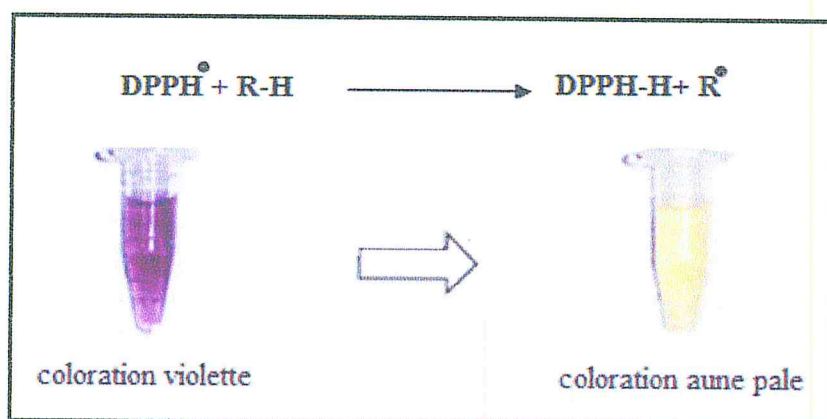


Figure 3.9 : profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle de *Cystoseira tamariscifolia*

### III.2.5 Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante exprime la capacité de réduction des radicaux libres. Pour notre extrait, nous avons employé la méthode au DPPH, ce radical libre synthétique présente une coloration violette sombre, lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes, la forme réduite conférée à la solution une coloration jaune pâle (figure 3.10), le virage vers cette coloration et l'intensité de la couleur jaune reflète la capacité antiradicalaire de la molécule, et dépend de la nature, la concentration et la puissance de cette molécule. L'absorbance mesuré à 518 nm.

La réduction du DPPH peut être représentée comme suit :



*Figure 3.10* : Forme libre et réduite du DPPH

Pour l'évaluation de cette activité, on a préparé une gamme de dilutions allant de 0,002 à 0,018 mg/ml pour l'acide ascorbique et de 0,005 à 0,045 mg/ml pour l'extrait brut.

Les différentes densités optiques ont permis de tracer une courbe d'allure exponentielle, ce qui signifie l'existence d'une relation proportionnelle entre le pourcentage de réduction du radical libre et la concentration de l'extrait dans le milieu réactionnel.



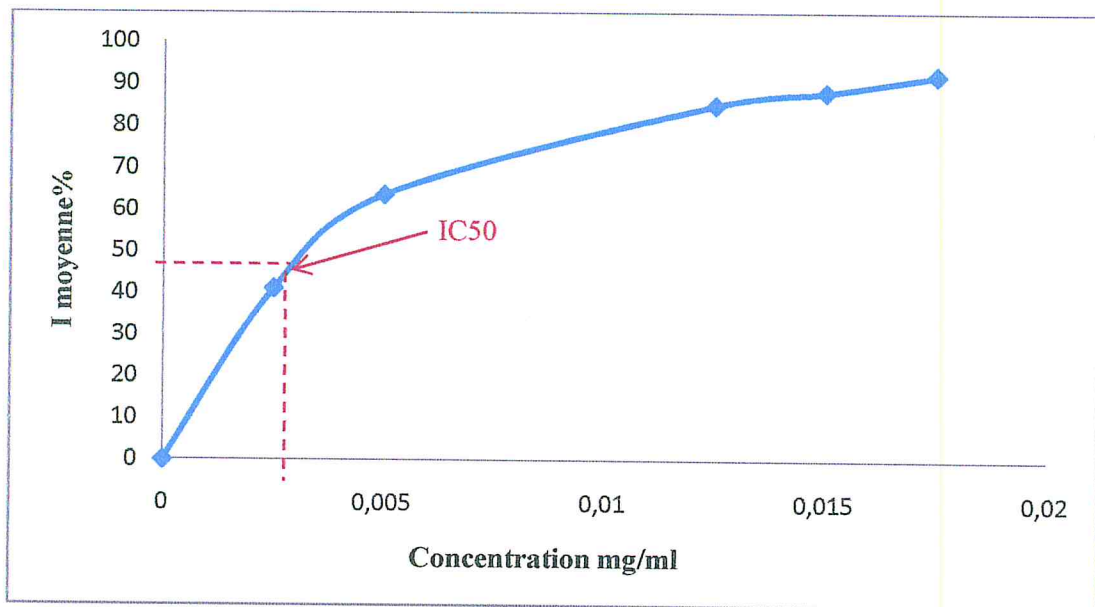


Figure 3.11 : Variation du taux de piégeage du DPPH par l'extract de *Cystoseira tamariscifolia* en fonction des différentes concentrations

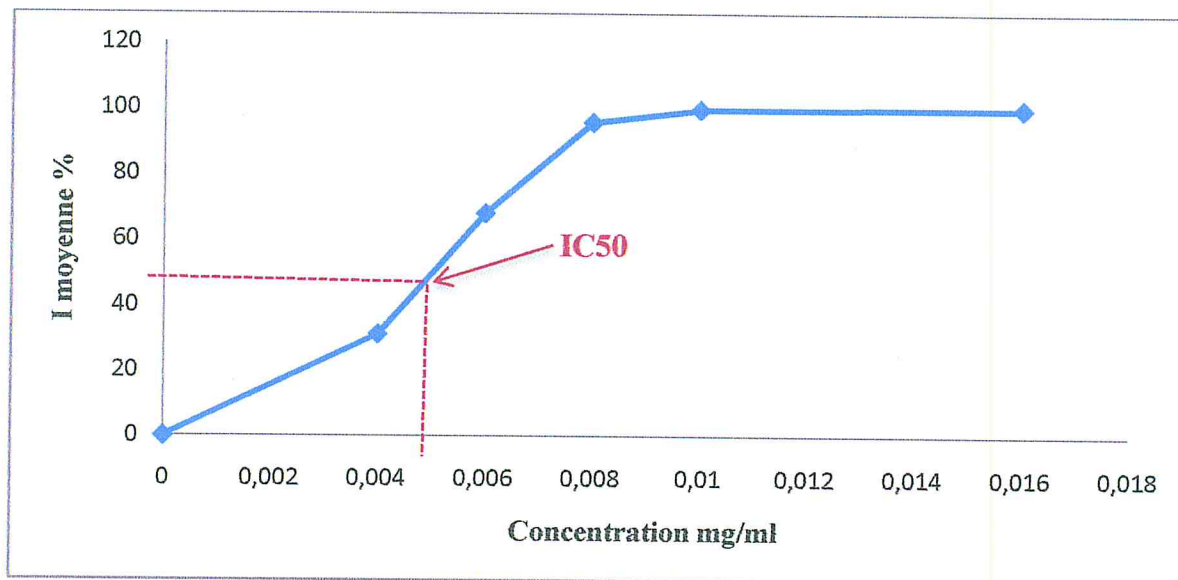


Figure 3.12 : Variation du taux de piégeage du DPPH par l'acide ascorbique en fonction des différentes concentrations

- **Détermination de la valeur IC50**

La IC50 a été apparemment introduite par Brand-williams et ses collaborateurs et elle a été ensuite employée par plusieurs groupes de chercheurs pour représenter leurs résultats. Elle définit la concentration efficace de substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical libre « DPPH » [89]

L'indice IC 50 est calculé. Il correspond à la quantité en mg de composés phénoliques nécessaire pour obtenir environ 50% d'inhibition :

$$IC50 = \frac{\text{concentration} \cdot 50}{\% \text{ d'inhibition}}$$

Rappelons que plus IC 50 est forte, plus l'activité anti-radicalaire est faible [1].

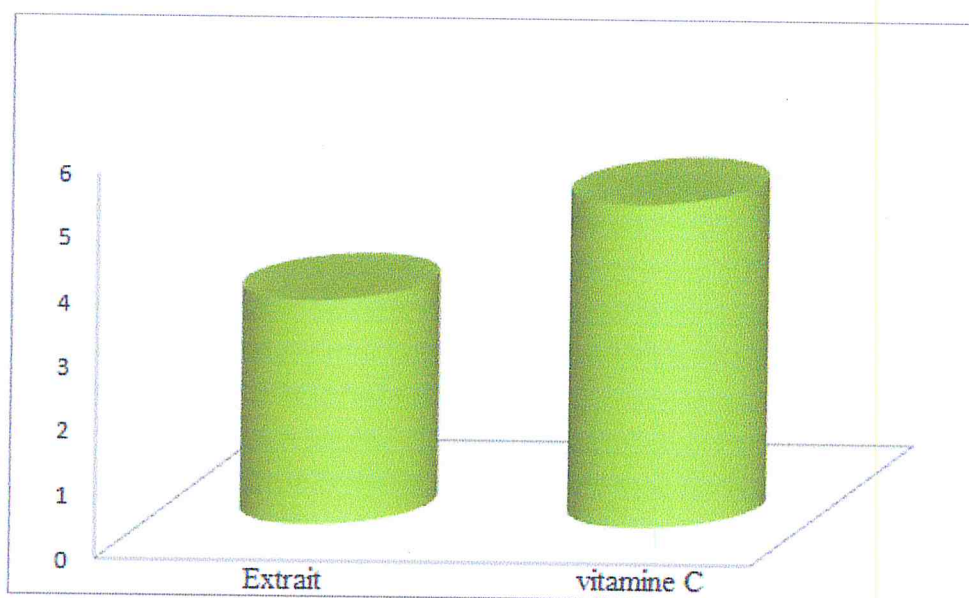
Les IC50 de l'extrait de *Cystoseira tamariscifolia* et l'antioxydant standard sont déterminés graphiquement, dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait et l'ordonné représente l'effet antioxydant en (%). Les résultats déduits sont regroupés dans le tableau 3.6.

**Tableau 3.6:** Valeurs IC50 de l'extrait de *Cystoseira tamariscifolia* et l'antioxydant standard

Composés	IC50 (µg.mL <sup>-1</sup> )
Extrait de <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	3.48
La vitamine C	5,03

D'après les valeurs données par le tableau 3.6 on remarque que l'extrait de l'algue étudiée présente la faible IC50 en comparaison avec la vitamine C.

- **Comparaison entre les IC50**



**Figure 3.13:** Comparaison des valeurs IC50 de notre extrait et l'antioxydant standard (La vitamine C)

Comme c'est illustré par l'histogramme de la figure 3.13, l'extrait de *Cystoseira tamariscifolia* possède des capacités de piégeage du radicale libre DPPH puissantes, puisqu'il agit à faible dose.



CONCLUSION

## Conclusion

En raison du grand nombre de variétés d'animaux et d'algues peuplant nos océans, il paraît judicieux d'adopter des stratégies pour affiner les recherches en vue de découvrir des molécules originales pour l'industrie pharmaceutique.

Une recherche bibliographique importante a été nécessaire pour avoir une appréciation des méthodes décrites dans la littérature quant à l'extraction, la séparation, l'analyse et le dosage des molécules d'origine marine.

Notre étude a porté sur deux parties expérimentales distinctes :

- Dosage des dérivés de phloroglucinol de l'extrait lipidique de l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* par spectrométrie IRTF ;
- Etude de la fraction volatile de l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) et évaluation du pouvoir antioxydant de l'extrait lipidique de l'algue étudiée.

Nous avons préparé un extrait lipidique à partir de *Cystoseira tamariscifolia* par macération de l'algue dans un mélange de solvant (chloroforme/méthanol), le rendement obtenu est de l'ordre de 3%.

L'analyse par la chromatographie sur couche mince de gel de silice (CCM) avec un mélange binaire AcOEt/isooctane : 2/3 (V/V) a montré sous UV, l'apparition de taches bleues dans les extraits brut et traité de *Cystoseira tamariscifolia* au même niveau que le phloroglucinol caractérisées par un rapport frontal de 0,2 ( $R_f = 0,2$ ). Cette analyse a permis de confirmer l'abondance de l'extrait en phénols.

Notre apport dans cette étude concerne l'utilisation de la spectrométrie IRTF dans le développement d'une nouvelle méthode analytique pour le dosage des dérivés de phloroglucinol dans l'extrait de *Cystoseira tamariscifolia*. La méthode ainsi proposée a été mis en œuvre après préconcentration de l'extrait par extraction liquide-liquide.

Le phloroglucinol a été considéré comme étalon pour la détermination des dérivés de phloroglucinols.

La quantification de phénols a été réalisée en mesurant les valeurs d'absorbance en terme de l'aire de pic de toute la série des spectres obtenue lors des mesures. La bande à 1610  $\text{cm}^{-1}$  corrigée avec une ligne de base adéquate a été utilisée. Le taux des dérivés de phloroglucinol ainsi obtenu est de 11%.

L'étude analytique a porté sur la fraction volatile de *Cystoseira tamariscifolia*. L'huile essentielle a été obtenue par entraînement à la vapeur d'eau avec un rendement moyen de 0,02% et analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM). Quarante-trois composés qui représentent 66% de la composition chimique total ont été identifiés. Les principaux composants de l'huile essentielle sont les acides gras (47%). A noter également la présence des aromatiques (9%), des stéroïdes (5%), d'hydrocarbures (3%), des terpènes (2%) et les composés non identifiés (34%) qui sont représentés par leur spectres de masse (m/z).

Les indices d'acide et de saponification de l'huile essentielle de *Cystoseira tamariscifolia* obtenus sont 32 et 28 respectivement.

L'étude du pouvoir antioxydant a confirmé les propriétés puissantes que possède l'extrait de *Cystoseira tamariscifolia* à piéger les radicaux libres.

L'ensemble des résultats obtenus ne constitue qu'une première étape dans la recherche, des essais complémentaires seront nécessaires pour pouvoir confirmer les performances mis en évidence.



Références

Bibliographiques

- [1] P. Bhadury, B.T. Mohammad, et P.C.Wright., «The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents», *Microbial.Biotechnol.*, 33 (2006) 325-337.
- [2] J. M. Kornprobst., «Substances naturelles d'origine marine », édition TEC & DOC, France, 2005.
- [3] <http://WWW.botany.uwc.ac.za/algae/>, 2001.
- [4] M. Piattelli., «Chemistry of marine algae: overview and current status», *Oealia*, 7 (1990) 357-379.
- [5] P.Gayrel, J.Cosson, « connaître et reconnaître les algues marines », Ed. Ouest-France, (1986).
- [6] G. Lecointe, et H. Le Guyader, « Classification phylogénétique du vivants », Ed. Belin Paris, (2001).
- [7] M. Pellegrini, R. Valls, et L. Pellegrini., « Chimiotaxonomie et marqueurs chimiques dans les algues brunes », *Lagascalia* 19(1-2) (1997) 145-164.
- [8] B. De Reviere, F. Rousseau., «Towards a new classification of brown algae», *Prog. phycol. Res.*, 13 (1999) 107-201.
- [9] R. Valls, L. Pioveti., «The chemistry of the cystoseiraceae (Fucales: Pheophyceae): Chemotaxonomic relationships», *Biochemical Systematics and Ecology*, 23 (1995) 723-745.
- [10] V. Amico., «Marine brown algae of family Cystoseiraceae: Chemistry and chemotaxonomy», *Phytochem*, 39(1995) 1257-1279.
- [11] A. Abourriche., «Etude chimique et potentialités pharmacologiques de l'ascidie simple *Cynthia savigni* et de l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* de la cote atlantique Marocaine. Synthèse et valorisation biologique de nouveaux alcaloïdes à base de la 8-hydroxyquinoléine», Thèse d'Etat, Université Hassan II, Casablanca, Maroc (1999).
- [12] Z. Souhaili et al, «Effet létal de l'extrait aqueux de l'algue brune marine (*Cystoseira tamariscifolia*) sur la souris et sur les cellules tumorales du myélome murin», *Afrique Science* 04(3) (2008) 580-590.

- [13] R. Valls. «Séparation, identification, étude spectroscopique de métabolites secondaires d'algues brunes (*Cystoseiracées*). Dosage-Variations-Chimiotaxonomie», Thèse d'Etat, Tome 1, Université d'Aix-Marseille 3, Aix-en-Provence, France. (1993)
- [14] WWW.mediterraneeonline.fr
- [15] W. Fenical., «Natural products chemistry in the marine environment», science, 215 (1982) 923-928.
- [16] R. Valls « Recent advances in the use of terpenes in the chemotaxonomy of algar», Recent Res. Devel. Phytochem.1 (1997) 111-130.
- [17] D. Loomis, et R. Croteau., «Biochemistry of terpénoids: A comprehensive Treatis. In:O.K.Stumpf and E.E.conn (eds) The biochemistry of plants.Lipids: Structure and Function», AcademicPress ,4 (1980) 364-410., San Francisco.
- [18] R.Sylvain, «Notes de cours: chimie organique1». Copyright©1992-2000"URL : <http://crpp0001.uqtr.quebec.ca>.
- [19] O. Isler, M. Montavon, «La chimie des vitamines E et K et des quinones apparentées à chaines isoprénoïde», Bull.soc.chim, (1965) 2403.
- [20] K.M. Fisch, V. Bohm, A.D. Wright, G.M. Konig, « Antioxydative meroterpenoids from the brown alga *Cystoseira crinita*», J. Nat. Prod, 66 (2003) 968-975.
- [21] C. Jegou, G. Culioli, V. Stiger-pouvreau., «méroditerpènes from *Cystoseira modilus* and its taxonomic significance », Biochem. System. And ecol. 44 (2012) 202-204.
- [22] C. Francisco, G. Combaut, J. Teste, B.F. Maume, « Étude des stérols d'algues brunes du genre *Cystoseira*: Identification par chromatographie gaz liquide couplée à la spectrométrie de masse», Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism, 487 (1977) 115-12.
- [23] Y. Oshima, «Graduate school of pharmaceutical sciences», pharmaceutical chemistry-Sendai, Japon, J.L.Nicolas 2001. Japon
- [24] L. Yong, Q. Zhong-Ji, R. Bomi, L. Sang-Hoon, K. Moon Moo ,et K. Se-Kwon, «chemical components and its antioxydant properties in vitro : an edible marine brown alga, *Ecklonia cava* », J. Biorg.& Medicin.chem., 17 (2009), 1963-1973.



- [25] J. J. Daly, R.P. Gregson, «Polyhydroxybiphenyl ethers from the brown alga *Cystoseira congesta*», Aust. J. Chem., 35 (1982) 649-657.
- [26] P. D. Steinberg, « Effect of quantitative and qualitative variation in phenolic compounds on feeding in three species of marine invertebrate herbivores», J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 120 (1988) 221-237.
- [27] P.D. Steinberg, I. Van Altena, « Tolerance of marine invertebrates herbivores to brown algal phlorotannins in temperate Australasia», Ecol. Monogr, 62 (1992) 189-222.
- [28] M.A.Ragan, J.S.Craigie. « Phenolic compounds in brown algae, in: Handbook of phycological Methods-physiological Cambridge» University press, (1978) 157-179.
- [29] K.L.Van Alstyne. «Comparison of three methods for quantifying brown algal polyphenolic compounds», J.Chem.Ecol., 21(1995) 45-58.
- [30] A.M. Ragan, «Physodes and the phenolic compounds of brown algae. Composition and significance of physodes in vivo», Bot. Mar.19 (1976) 145-154.
- [31] M. Dellabella, G. Milanese, G. Muzzonigro, « Randomized trial of the efficacy of tamsulosin, nifedipine and phloroglucinol in medical expulsive therapy for distal ureteral calculi. », Urology, 174(1) (2005) 167-172.
- [32] Q. T., Li, Y. Le, Z.J. Qian, M.M. Kim, et S.K. Kim, « Inhibitory effects of polyphenols isolated from marine alga *Eclonia cava* on histamine release », Process Biochemistry, 44 (2009) 168-176.
- [33] A.M. Ragan et K.W. Glombitza. «Phlorotannins, brown algal polyphenols, in: Progress in phycological Research», Round. F. E, Chapman. D. J, Eds, Biopress. Ltd, 4 (1986) 129-241.
- [34] K.A. Kang, K.H. Lee, S. Chae, R. Zhang, M.S. Jung, Y.M. Ham, J.S. Baik, N.H. Lee et J.W. Hyun, « Cytoprotective effect of phloroglucinol on oxidative stress induced cell damage via catalase activation», J. Cell. Biochem. 97 (2006) 609-620.
- [35] W.F. Hodnick, E.B. Milosavljevic, J.H. Nelson et R.S. Pardini, « Electrochemistry of flavonoids: relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids», Biochem. Pharmacol. 37 (1988) 2607-2611.

- [36] C. J. Barwell, G. Blunden et P.D. Manandhar, « Isolation and characterization of brown algal polyphenols as inhibitors of  $\alpha$ -amylase, lipase and trypsin». *J. Appl. Phycol.*, 1 (1989) 319–323.
- [37] J.-S. Bae, «Antithrombotic and profibrinolytic activities of phloroglucinol». *Food Chem. Toxicol.* 49 (2011) 1572–1577.
- [38] M. Zubia, M.S. Fabre, V. Kerjean, K.L. Lann, V. Stiger-Pouvreau, M. Fauchon et E. Deslandes, «Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts». *Food Chem.* 116 (2009) 693–701.
- [39] B. Quéguineur, L. Goya, S. Ramos, M. Angeles-Martín, R. Mateos et L. Bravo., « Phloroglucinol: Antioxidant properties and effects on cellular oxidative markers in human HepG2 cell line». *Food and Chemical Toxicology* xxx (2012) xxx–xxx.
- [40] K. W. Glombitza et M. Keusgen, «Fuhalols and deshydroxyfuhalols from the brown alga *Sargassum spinuligerum*», *phytochemistry*, 38 (1995) 987-995.
- [41] P. Deffo « Contribution à l'étude chimique de l'algue brune *Cystoseira Amentacea* variété *Stricta* : isolement, caractérisation structurale et analyse de nouveaux mérodiertènes » Thèse de doctorat de l'Université de Toulon et du Var, (1995).
- [42] J.M. Robbitt, A. Schwarting, R.J. Gritter, « Introduction à la chromatographie », édition gauthier-villars, Paris, (1972).
- [43] G. Burgot et J.L. Burgot, « Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: Méthodes chromatographiques, électrophorèses et méthodes spectrales », édition Tec & Doc, Paris, France, (2002).
- [44] Z. Aliche, « Contribution à l'étude chimique des extraits lipidiques et fractions volatiles de l'algue brune *Cystoseira Stéroïdes* », mémoire de magister, USTSD, Algérie, Juin, 2008.
- [45] C.J. Creswel, O.A. Runquist et M.M. Campbell, « Spectral analysis of organic compounds », Burgess Publishing Company, 2ème édition, (1972).
- [46] F. Rouessac et A. Rouessac, « Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes », Masson 3ème édition, Paris, Milan, Barcelone, (1997).



- [47] B. Wathey, J. Tierney, P. Lidstrom et J. Westman, « The impact of microwave assisted organic chemistry on drug discovery », *Drug Discovery Today* 7 (2002) 373-380.
- [48] H. Richard, « Quelques épices et aromates et leurs huiles essentielles. In actualités scientifiques et techniques en industrie agro-alimentaires », Ialine Agorial-Normandie St-LÖ (1974).
- [49] M. Elhatab, G. Culioli, L. Piovetti, S. E. Chitour et R. Valls, « Comparaison of various extraction methods for identification and determination of volatiles metabolites from the brown alga *Dictyopteris membranacea* », *chrom.A*, 1143 (2007) 1-7.
- [50] D.A. Skoog, D.M. West, et F.J. Holler, « chimie analytique » Ed. De boeck, 1991.
- [51] N. Jamin, L. Miller, J. Moncuit, W-H. Fridman, P. Dumas, et J. Teillaud, « Chemical heterogeneity in cell death: combined synchrotron IR and fluorescence microscopy studies of single apoptotic and necrotic cells », *Biopolymers*, 72 (5) (2003) 366-373.
- [52] P. Jacquinet, « Characteristics common to the new methods of interferometric spectroscopy; the factor of merit », *J. phys. Radium*, 19 (3) (1958) 223-229.
- [53] Jr. D. R. Lide, « Status Report on critical compilation of physical chemical data », *Annual Review of physical chemistry*, 24 (1973) 135-158.
- [54] A.H. Lettington, « Infrared Technology and applications », SPIE-proceedings, Ed. Bellingham WA, London, UK, (1990), V. 1320 [Note(s): IX-484 p.].
- [55] D. Bertrand, « La spectroscopie proche infrarouge et ses applications dans les industries de l'alimentation animale », *INRA Prod. Anim.*, 15(3) (2002) 209- 219.
- [56] P.J. Scheuer, « Some marine ecological phenomena: chemical basis and biomedical potential », *Science* 248 (1990) 173-177.
- [57] Y. Daghbouche, S. Garrigues et M. De la Guardia, « liquid chromatography-Fourier transform infrared spectrometric determination of cholesterol in animal greases », *Anal. Chim. Acta*, 354 (1997) 97-106.



- [58] Y. Daghbouche, S. Garrigues, M. T. Vidal et M. De la Guardia, «Flow injection Fourier transform infrared determination of caffeine in soft drinks », *Anal.Chem*, 69 (1997) 1086-1091.
- [59] A. Gonzalvez, S. Garrigues, S. Armenta et M. de la Guardia, « hydrodistillation-liquide-phase micro-extraction for infrared analysis of food », *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 1467-1476.
- [60] M. Khanmohammadi, M. B. Garmarudi et M. de la Guardia « characterization of petroleum-based products by infrared spectroscopy and chemometrics », *Trends in analytical chemistry*, 35 (2012) 135-149.
- [61] N. ElHattab, Y. Daghbouche, M. ElHattab, L. Piovetti, S. Garrigues et M. de la Guardia, « FTIR determination of sterols from red alga *asparagopsis armata* : comparative studies with HPLC », *Talanta*, 68 (2006) 1230-1235.
- [62] N. Bouzidi, Y. Daghbouche, M. Elhattab, Z. Aliche, G. Culioli, L. Piovetti, S. Garrigues et M. de la Guardia, « determination of total sterols in brown algae by Fourier transform infrared spectroscopy », *ACA* 616 (2008) 185-189.
- [63] N. Bouzidi, « Contribution à l'étude chimique d'algues marines méditerranéennes : analyse quantitative des stérols de l'extrait lipidique par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier », thèse de doctorat, USTSD, (2009).
- [64] G. Culioli, C. Vincent-Chabrol, L. Piovetti, R. Valls, *Cryptogamie Algologie*, 19 (1998) 257-258.
- [65] J.F. Biard, J.F. Verbist, Y. Letourneux, R. Floch, «Cétols Diterpeniques à Activité Antimicrobienne de *Bifurcaria bifurcata*» *Planta Med.* 40 (1980) 288-294.
- [66] P. Leberton, « Tanins ou alcaloïdes: deux tactiques phytochimiques de dissuasion des herbivores», *Rev. Ecol. Terre vie*, 36 (1982) 4.
- [67] A. Praud, R. Valls, L. Piovetti, B. Banaigs, G. Malyngamide, « MalyngamideG : Proposition de structure pour un nouvel amide chloré d'une algue bleu-verte epiphyte de *Cystoseira crinita*», *Tetrahedron Letters*, 34 (1993) 5437-5440

- [68] A. Praud, R. Valls, L. Piovetti, B. Banaigs, G. Benaim, «Meroditerpenes from the brown alga *Cystoseira crinita* of the French mediteranean coast», *Photochemistry*, 40 (1995) 495-500.
- [69] G. Ozdemir, Z. Horzum, A. Sukatar, et N. Karabay-yavasoglu, «Antimicrobial activities of volatile components and various extracts of *Dictyopteris membranaceae* and *Cystoseira barbata* from the Coast of Izmir», Turkey. *Pharm. Biol.* 44 (2006) 183-188.
- [70] Z. Kamenarskaa, N. Funda, F.N. Yalçın, T. Ersoz, I. Calis, «Chemical Composition of *Cystoseira crinita* Bory from the Eastern Mediterranean», *Naturforsch.* 57 (2002) 584-590.
- [71] A. Diguardia, R. Valls, V. Mesguiche, J.M. Brunel, Culioli.G, «Enantioselective synthesis of (-)-Bifurcadiol: a natural antitumor marine product», *Tetrahedron Letters*, 40 (1999) 8359-8360.
- [72] S.E. Ayyad, M. O. Slama, A.H. Mokhtar, A.F. Anter, « Cytotoxic bicyclic diterpene from the brown alga *Sargassum crispum*», *Boll Chim. Farm*, 140 (3) (2001) 155-159.
- [73] N. Kotake, M. Kushiro, H. Zhang, T. Sugawara, K. Miyashita, A. Nagao, «Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells», *J. Nutr.*, 131 (12) (2001) 3303-6.
- [74] Culioli.G, Daoudi.M, Ortalo-Magne, Valls.R, Piovetti.L, « (S)-12-Hydroxygeranylgeraniol -derived diterpenes from the brown alga *Bifurcaria bifurcata*», *Phytochemistry*, 57 (2001) 529-535.
- [75] A. Bennamara, A. Abourrich, M. Berrada, M. Charrouf, N. Chaib, M. Boudouma, M. Garneau, «Methoxybifurcarenone: an antifungal and antibacterial meroditerpenoid from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia* »*Phytochemistry* , 52 (1999) 37-40.
- [76] Z. Souhaili, M. Lagzouli, M. Faid, K. Fellat-Zarrouck, « Inhibition of growth and mycotoxins formation in moulds by marine algae *Cystoseira tamariscifolia* », *Afr. J .biotech.*, 3(1) (2004)71-75.
- [77] A. Abourriche, M.Charrouf, M. Berrada, A. Bennamara, N. Chaib, et C. Francisco «Antimicrobial activities and cytotoxicity of the brown alga *Cystoseira tamariscifolia* » *Fitoterapia* 70 (1999) 611-614.

- [78] G. N. Ahn, K. N. Kim, S.H. Cha, C. B. Song, J. Lee, M. S Heo et al. «Antioxidant activities of phlorotannins purified from *Ecklonia cava* on free radical scavenging using ESR and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated DNA damage», *European Food Research and Technology* 226(1–2) (2007) 71–79.
- [79] T. Wang, R. Jónsdóttir et G. Ólafsdóttir. «Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds», *Food Chemistry*, 116 (2009) 240-248.
- [80] C. Jegou, «Etude du genre *Cystoseira* des cotes bretonnes : taxonomie, écologie et caractérisation de substances naturelles», thèse doctorat, Université de Bretagne, France, 2010.
- [81] I. Ignat, I. Volf, V.I. Popa, «Acritical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruit and vegetables», *Food chem.*, 126 (2011) 1821-1835.
- [82] AFNOR, Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles, AFNOR, (2000) 661-663.
- [83] C. Ferret, « Étude de la teneur en composés phénoliques et du potentiel antioxydant associé à ces composés, de plusieurs espèces de *Sargassaceae* du Pacifique Sud » mémoire de master, Bioprospection et Substances actives marines, France, Juin, 2008.
- [84] S. Connan, « Etude de la diversité spécifique des macroalgues de la pointe de Bretagne et analyse des composés phénoliques des Phéophycées dominantes ». Thèse en vue de l'obtention du titre de Docteur de l'Université de Bretagne Occidentale, Spécialité Océanologie Biologique, Brest, (2004).
- [85] K. Le Lann, « Connaissance chimiotaxonomique du genre *Turbinaria* et étude des composés de défense de différentes espèces de *Sargassacées* des Iles Salomon (Pacifique Sud) ». Rapport de stage M2 Sciences de la Mer et du Littoral, mention Sciences Biologiques Marines, IUEM, Brest, (2006).
- [86] A.Y. Loo, K. Jain et I. Darah, «Antioxydant activity of compound isolated from the pyroligneous acid, *Rhizophora apiculata* », *Food chemistry*, 107 (2008) 1151-1160.



[87] G.G. Leitão, S. G. Leitão, et W. Vilegak, « Quik preparative separation of naturel Naphtopyranones with Antioxidant Activity by High-speed Counter-Current Chromatography», *Naturforsch*, 57 (2002) 1051-1055.

[88] Y. R. Naves, « Technologie et chimie des parfums naturels : essences concrètes, résinoïdes, huiles et pommades aux fleurs », Masson et die, Paris, (1974).

[89] S-Y. Wang, J-H. Wu, L-F. Shyur, Y-H. Kuo et S-T. Chang, « Antioxidant Activity of Abietane-Type Diterpenes from Heartwood of *Taiwania cryptomerioides Hayata* ». *Holzforschung* 56 (5) (2002) 487-492.