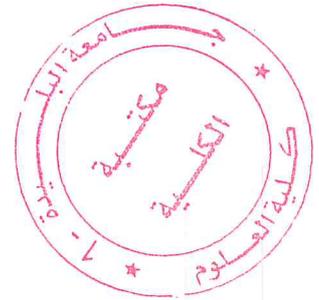


République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université BLIDA 1
Faculté des Sciences
Département de Chimie



Mémoire présenté par
FAIDI YASMINA

En vue d'obtenir le diplôme de Master

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

Titre

**Etude chimique de l'extrait obtenue par un agro-solvant à
 partir de *Zonaria tournefortii* : Détermination de l'activité
 biologique**

Soutenu publiquement le 28 octobre 2015 devant le jury composé de :

Y. Daghbouche	Pr	Président	Université de Blida
H. Belmeskine	Dr	Examineur	Université de Blida
M. El Hattab	Pr	Promoteur	Université de Blida

Promotion 2014-2015

Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord à ALLAH tout puissant pour m'avoir Donné la volonté, la patience et le courage nécessaire pour mener ce modeste Travail à bout ce mémoire.

Ce travail a été effectué au laboratoire de chimie des substances naturelles du département de chimie, Faculté des Sciences de l'Université Blida. au niveau de laboratoire d'hygiène de wilaya de BLIDA et le Laboratoire l'INCC-Gendarmerie National-, sous la direction de Monsieur EL HATTAB Mohamed.

Je tiens à remercier très sincèrement mon promoteur Pr. EL HATTAB Mohamed d'avoir accepté de m'encadrer. Je le remercie pour son aide, ses conseils et ses orientations, sa disponibilité et sa patience avec moi. Je le remercie vivement pour le choix du sujet qui est intéressant et d'actualité.

Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance Mme Y. DAGHBOUCHE Professeur à l'Université de Blida 1, de m'avoir fait honneur de présider ce jury.

J'exprime mes vifs remerciements à Mme H.Belmeskine Docteur à l'Université de Blida 1, Département de Biologie, d'avoir accepté d'examiner ce travail

J'adresse également mes sincères remerciements à la doctorante du laboratoire de chimie des substances naturelles et de biomolécule Melle HAMICHE SONIA pour sa gentillesse et son aide dans la réalisation de ce modeste travail.

De même je remercie infiniment Mr Toufahi Djamel de nous avoir ouvert les portes de son laboratoire. Avec ses qualités humaines et son expérience, il a su nous faire aimer le monde merveilleux des bactéries

*J'adresse mes remerciements et ma reconnaissance à tous les enseignants, étudiants
et
travailleurs de l'université de Blida 1, qui ont contribué de près ou de loin à ma
formation pédagogique et scientifique.*

*Je ne saurais oublier tous ceux et celles qui m'ont marqué par leur soutien et
encouragements : tous les membres de notre laboratoire et tous les collègues de ma
promotion, je leur exprime mon respect et ma profonde sympathie.*

Dédicace

JE dédie ce travail

A ma chère maman et Mon Cher papa

*Qui sont les meilleurs parents dans ce monde, en témoignage
de ma profonde gratitude et de mon incontestable reconnaissance pour tous les
sacrifices qu'ils me contentent toute la confiance qu'ils
m'accordent et tout l'amour dont ils m'entourent C'est Grâce à votre encouragement
et votre soutien que je suis arrivée jusqu'ici*

A ma très chère sœur

Â mes frères

En témoignage de mon amour et de ma profonde admiration

A ma nièce et mon neveu

A toutes mes familles

A mes chères amies

*Nabila, Rekia, Safia, Nassira , Imen, Lynda ,Ouidad, Hafidha,
Amina, Omar, Hamza et Abdo.*

*En témoignage de mon profond amour et ma sincère gratitude.
Je ne saurais remercier ici les personnes dont la collaboration a été
essentielle pour la réalisation du présent mémoire de proche ou de loin
Sans citer les noms*

Yasmina

Résumé

L'objectif de cette étude est le développement d'un nouveau procédé d'extraction vert appliqué à l'algue brune *Zonaria tournefortii* en utilisant l'eugénol comme agro-solvant. Deux autres extraits ont été préparés par la voie classique en utilisant le CH₂Cl₂ et le mélange de solvant CH₂Cl₂/MeOH (v/v : 1/1). En effet, une étude comparative a été effectuée en termes de rendement d'extraction et d'analyse chimique et biologique. Les analyses chimiques portent sur le dosage des produits phénoliques totaux par le test de Folin-Ciocalteu, et sur la comparaison des profils chromatographiques CLHP des extraits obtenus. Les analyses biologiques consistent à la réalisation des tests d'activité antibactérienne et antifongique en utilisant la méthode de diffusion sur disques, et à l'évaluation de l'activité antioxydante, en procédant à la mesure du pouvoir anti-radicalaire par le test DPPH (2,2-diphenyle-1-picrylhydrazyle), et à la détermination du pouvoir antioxydant réducteur du fer ferrique FRAP.

Mots clés : Zonaria tournefortii, agrosolvant, composés phénoliques, Folin-Ciocalteu, CLHP, antioxydante, DPPH, FRAP, activité antimicrobienne.

Abstract

The objective of this study is the development of a new green process of extraction applied to the brown algae *Zonaria tournefortii* using the eugenol as agro-solvent. Two other extracts were prepared by the classic way using the CH₂Cl₂ and the mixture of solvent CH₂Cl₂ / MeOH (v / v: 1/1). A comparative study was performed in terms of extraction yield, chemical and biological analysis. The chemical analyses focus on the determination of total phenolics content measured by the Folin-Ciocalteu assay, and comparing the profile chromatographic (HPLC). The biological analysis is devoted to evaluate the antibacterial and antifungal activity tests using the disk diffusion method. Thereafter, antioxidant activities assessed by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay, and ferric reducing power (FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power),

Keywords: Zonaria tournefortii, agro-solvent, eugenol, phenolics compounds, Folin-Ciocalteu, HPLC, antioxidant, DPPH , FRAP antimicrobial activity.

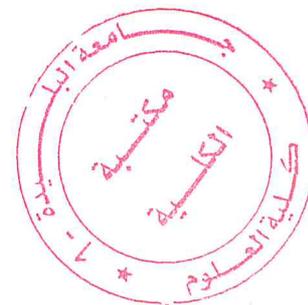
ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تطوير تقنية خضراء للاستخلاص مطبقة على الطحلب البني "زوناريا توغنيفورتي", تستند على استخدام مذيب زراعي متمثل في الاوجينول. لقد تم إعداد مستخلصات أخرى بالاعتماد على الطريقة التقليدية باستعمال CH_2Cl_2 و مزيج المذيب ($CH_2Cl_2 / MeOH$ (1/1 :V/V). ولهذا فلقد أجريت دراسة مقارنة من حيث المستخلص, التحليل الكيميائي والبيولوجي.

التحليل الكيميائي للمستخلصات المتحصل عليها اعتمد على مردود المركبات الفينولية الشاملة المقاسة بواسطة الفحص اللوني " فولان - سيوكالتو" و مقارنة المقاطع الكروماتوغرافية (CLHP) .

التحاليل البيولوجية ركزت على القيام بفحوصات المضادة للبكتيريا و الفطريات بواسطة طريقة الانتشار على الهلام و كذلك على تقييم النشاط المضاد للأوكسدة المقيم من خلال اختبار DDPH (2,2- دي فينيل -1- بكريل هيدرازيل) و خاصية إرجاع مركب الحديد الفيري (FRAP).

الكلمات الرئيسية: زوناريا توغنيفورتي, مذيب زراعي, الاوجينول , مركبات فينولية, فولان . سيوكالتو, الكروماتوغرافيا المضاد للأوكسدة, DDPH, FRAP, النشاطات المضادة للمكروبات.



Liste des abréviations

ABS	: Absorbance
ATCC	: American Type Culture Collection
ARP	: pouvoir anti-radicalaire, égale à 1/CE50
BHA	: Butyl-hydroxyanisol
BHT	: Butyl-hydroxytoluène
°C	: Degré Celsius
CCM	: Chromatographie sur Couche Mince
CE₅₀	: Concentration effective correspondant à une inhibition de 50% de l'adhésion bactérienne
CLHP	: Chromatographie Liquide à Haute Performance
DAD	: Détecteur à barrette de Diode
DIR	: Détecteur à Indice de Réfraction
DMSO	: Dimethylsulfoxyde
DPPH	: 2,2-Diphenylpicrylhydrazyl
DSR	: Déviation Standard Relative
EPA	: Environmental Protection Agency
EPG	: Equivalent en Phloroglucinol
ESI	: Ionisation par Electrospray (electrospray ionisation).
EPS	: Extraction en Phase Solide
FC	: Folin-Ciocalteu
FRAP	: Ferric Reducing Antioxydant Power
g	: Gramm
IRTF	: Infrarouge à Transformer de Fourier
L.D	: Limite de Détection
L.Q	: Limite de Quantification
MAE	: Extraction Assistée par Microonde
min	: Minute

mm	: millimeter
nm	: Nanomètre
PG	: Phloroglucinol
PH	: Potentiel Hydrogène
Rf	: Facteur de Rétention
REACH	: Registration Evaluation Autorisation and restriction of Chemicals
RP	: Reversed Phase
UV	: Ultra - Violet
USAE	: Extraction Assistée par Ultrasons
Vis	: Visible
Vit C	: Vitamin C
µm	: Micromètre
%	: Pourcent
λ	: Longueur d'onde

Liste des figures

Figure 1	Structure chimique de l'eugénol	9
Figure 2	<i>Zonaria tournefortii</i>	10
Figure 3	Dérivés du phloroglucinol isolés de <i>Zonaria tournefortii</i>	16
Figure 4	Dérivés du phloroglucinol isolés de <i>Zonaria diesingiana</i>	17
Figure 5	Dérivés du phloroglucinol isolés de <i>Zonaria farwolii</i>	17
Figure 6	Dérivés du phloroglucinol isolés de <i>Zonaria crenata</i>	18
Figure 7	Produits isolés des espèces du genre <i>Zonaria</i> possédants des activités biologiques	19
Figure 8	Préparation des extraits classiques à partir de l'algue brune <i>Zonaria tournefortii</i>	23
Figure 9	Préparation de l'extrait à partir d'une matière végétale sèche en utilisant un procédé d'extraction vert	24
Figure 10	Forme libre et réduite du radical DPPH·	28
Figure 11	Schéma simplifié du principe de la méthode des aromatogrammes	31
Figure 12	Chromatographie sur couche mince des extraits de <i>Zonaria tournefortii</i> obtenus respectivement par extraction classique et par un procédé « vert »	34
Figure 13	Spectre IRTF de l'eugénol préparé directement dans CH ₂ Cl ₂	36
Figure 14	Spectres IRTF du l'eugénol préparé dans le CH ₂ Cl ₂ (18.8mg.ml ⁻¹) (Spectre noir) et des résidus préparés directement dans le CH ₂ Cl ₂ (18.8mg.ml ⁻¹) obtenus après 5 lavages (spectre rouge) ,10 lavages (spectre bleu) et 15 lavages (spectre rose).	37
Figure 15	Spectres IRTF du l'eugénol préparé dans le CH ₂ Cl ₂ (3mg.ml ⁻¹) (Spectre noir) et de l'extrait brut obtenu à partir du procédé d'extraction vert après	38

25 lavages préparé dans le CH₂Cl₂ (3mg.ml⁻¹) (Spectre vert)

Figure 16	Spectres IRTF du l'eugénol préparé dans le CH ₂ Cl ₂ (18.8mg.ml ⁻¹) (Spectre noir) et du l'eugénol récupéré après extraction liquide-liquide préparé dans le CH ₂ Cl ₂ (18,8 mg.ml ⁻¹) (Spectre rose)	39
Figure 17	Droite d'étalonnage des solutions standards de phloroglucinol de concentration allant de 0,008 à 0,099 mg.ml ⁻¹ obtenue par le test de Folin-Ciocalteu	39
Figure 18	Teneurs en composés phénoliques totaux (TPC) dans les trois extraits étudiés.	41
Figure 19	Profil chromatographique de l'extrait obtenu avec l'eugénol à trois longueurs d'onde	42
Figure 20	Profil chromatographique de l'extrait obtenu avec le dichlorométhane à trois longueurs d'onde	42
Figure 21	Profil chromatographique de l'extrait obtenu avec le mélange dichlorométhane/méthanol (1/1) à trois longueurs d'onde	43
Figure 22	Photographie des résultats d'un test DPPH sur plaque CCM permettant d'estimer l'activité antiradicalaire des extraits de <i>Zonaria tournefortii</i>	44
Figure 23	Variation du taux de piégeage du DPPH• par l'extrait vert de <i>Zonaria tournefortii</i> en fonction des différentes concentrations	46
Figure 24	Variation du taux de piégeage du DPPH• par les deux extraits classique de <i>Zonaria tournefortii</i> en fonction des différentes concentrations	46
Figure 25	Variation du taux de piégeage du DPPH• par la vitamine C et BHT en fonction des différentes concentrations	47
Figure 26	Comparaison des valeurs ARP des extraits de <i>Zonaria tournefortii</i> et des antioxydants standards	48
Figure 27	Histogrammes, exprimés en valeur FRAP, illustrant l'activité antioxydante des extraits de <i>Zonaria tournefortii</i> obtenus à partir du procédé d'extraction classique et du procédé d'extraction vert	49

Figure 28	: Aromatogrammes des bactéries testées avec l'extrait classique et l'extrait vert de <i>Zonaria tournefortii</i>	50
Figure 29	Histogrammes illustrant les zones d'inhibition exprimées en millimètre	52
Figure 30	Aromatogrammes des fongiques testées avec l'extrait classique et l'extrait vert de <i>Zonaria tournefortii</i>	52

Liste des tableaux

Tableau 1	Solvants d'extraction des composés phénoliques des algues brunes	13
Tableau 2	Conditions du gradient d'analyse HPLC	27
Tableau 3	Caractéristiques organoleptiques et rendements d'extraction des extraits obtenus à partir du procédé d'extraction vert et du procédé d'extraction classique	35
Tableau 4	Caractéristiques analytiques de la droite de calibration	40
Tableau 5	Teneur en composés phénoliques totaux (TPC) des extraits obtenus à partir du procédé d'extraction classique et du procédé d'extraction vert exprimé en mg.EPG/g d'extrait sec	40
Tableau 6	CE50 des extraits de <i>Zonaria tournefortii</i> et des antioxydants standards	47
Tableau 7	Activité antimicrobienne des extraits de <i>Zonaria tournefortii</i> sur les souches de références	51

SOMMAIRE

Remerciements.....	I
Dédicace.....	III
Résumé	IV
Abstract.....	V
ملخص.....	VI
Liste des abréviations	VII
Liste des figures	IX
Liste des tableaux.....	XII
Introduction.....	1
Partie I : Synthèse bibliographique	
I.1 Extraction verte des produits naturels	
I. 1.1 Définition de la chimie verte.....	4
I. 1.2 Les douze principes de la chimie verte.....	4
I. 1.3 Eco-extraction des produits naturels	5
I. 1.4 Les six principes de l'éco-extraction.....	5
I. 1.5 Procédés d'extractions vertes	6
I. 1.6 Solvants verts	7
I. 1.7 Eugénol	8
I.2 Présentation générale des algues brunes	9
I. 3 Étude de l'espèce algale <i>Zonaria tournefortii</i>	
I. 3.1 Systématique	10
I. 3.2 Description	10
I. 3.3 Biologie	11
I. 3.4 Ecologie	11
I. 4 Etude chimique du genre <i>Zonaria</i>	
I. 4.1 Généralités sur les produits phénoliques	11
I. 4.2 Extraction, séparation et dosage des produits phénoliques	
I. 4.2.1 Extraction	12
I. 4.2.2 Séparation	14
I. 4.2.3 Dosage	15
I. 4.3 Produits phénoliques des algues brunes du genre <i>Zonaria</i>	16
I. 5 Activités biologiques des espèces du genre <i>Zonaria</i>	18

Partie II : Etude expérimentale

II. 1 Méthodes et matériels	
II. 1.1 Introduction	21
II. 1.2 Extraction et analyse préliminaire	
II. 1.2.1 Récolte et traitement du matériel végétal	21
II. 1.2.2 Extraction du matériel algal	22
II. 1.2.2.1 Préparation des extraits bruts.....	22
II. 1.2.3 Analyse préliminaire par chromatographie sur couche mince (CCM)	25
II. 1.3 Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	25
II. 1.4 Estimation du contenu en composés phénoliques totaux (TPC, Total Phenolic Content)	26
II. 1.4.1 Mise en œuvre pratique	26
II. 1.5. Analyse par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)	27
II. 1.6. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de <i>Zonaria tournefortii</i>	27
II. 1.6.1. Mesure du pouvoir anti-radicalaire par le test DPPH	
II. 1.6.1.1 Principe de la méthode.....	27
II. 1.6.1.2 Mise en œuvre pratique	28
II. 1.6.1.2.1 Test antiradicalaire sur plaque CCM	28
II. 1.6.1.2.2 Test antiradicalaire mesuré au spectrophotomètre.....	29
II. 1.6.2. Pouvoir réducteur (FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power)	29
II. 1.6.2.1 Mise en œuvre pratique.....	30
II. 1.7 Etude du pouvoir antimicrobien des extraits de <i>Zonaria tournefortii</i>	
II. 1.7.1 L'aromatogramme	31
II. 1.7.2 Souches microbiennes choisies.....	32
II. 1.7.3 Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits classique et vert de <i>Zonaria tournefortii</i>	
II. 1.7.4.1 Procédure générale.....	32

II. 2 Résultats et discussion

II. 2.1 Analyse préliminaire par chromatographie sur couche mince (CCM).....	34
II. 2.2 Préparation des extraits bruts	
II.2.2.1 Caractéristiques organoleptiques et rendements d'extraction	34
II. 2.3 Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	
II. 2.3.1 Spectre infrarouge à transformée de Fourier du l'eugénol.....	36
II. 2.3.2 Optimisation du nombre de lavages au cours de l'extraction liquide-liquide	
II. 2.3.2.1 Comparaison des spectres infrarouge à transformée de Fourier des résidus obtenus après cinq, dix et quinze lavages	36
II.2.3.2.2 Détermination de l'absence de l'eugénol dans l'extrait brut obtenu après 25 lavages	37
II. 2.3.3 Spectre infrarouge à transformée de Fourier du l'eugénol récupéré.....	38
II. 2.4 Estimation du contenu en composés phénoliques totaux (TPC, Total Phenolic Content).....	39
II. 2.5 Analyse par chromatographie liquide à haute performance (CLHP).....	41
II. 2.6 Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de <i>Zonaria tournefortii</i>	
II. 2.6.1 Test antiradicalaire sur plaque CCM.....	44
II.2.6.2 Test antiradicalaire mesuré au spectrophotomètre.....	45
II.2.6.3 Pouvoir réducteur (FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power).....	49
II. 2.7 Etude du pouvoir antimicrobien des extraits de <i>Zonaria tournefortii</i>	
II.2.7.1 Activité antibactérienne.....	49
II.2.7.2 Activité antifongique	52
Conclusion	54
Références bibliographiques	57
Annexes.....	68

INTRODUCTION

GENERALE

Introduction générale

Aujourd'hui, tout procédé de fabrication de principes actifs dans l'industrie cosmétique, la parfumerie, l'agroalimentaire, la pharmacie ou la valorisation de la biomasse met en œuvre, directement ou indirectement, l'extraction du végétal, devenue incontournable dans les différents secteurs d'applications.

Toutefois, les méthodes d'extraction classiques souffrent de problèmes technologiques et scientifiques considérables qui sont difficiles à surmonter, tels que la réduction de la consommation d'énergie (l'étape d'extraction nécessite souvent plus de 70% de l'énergie totale du procédé utilisé), et le respect des exigences légales strictes sur les émissions de produits dangereux [1].

Depuis quelques années, le domaine de l'extraction est entré dans sa révolution « verte », en opérant une mutation vers l' « Eco-extraction », pour développer et proposer aux industriels une chimie plus « durable » utilisant moins de solvants, moins d'énergie et diminuant les rejets, tout en assurant la qualité des produits finis. Simultanément, il est nécessaire de veiller à maintenir les industries dans une dynamique de compétitivité tout en respectant des critères environnementaux stricts. La recherche dans ce domaine ne cesse de croître pour découvrir de nouveaux procédés ou procédures plus efficaces et apporter une contribution significative au développement durable [2].

Ces dernières années, les substances naturelles connaissent un intérêt croissant dans de nombreux domaines. En effet, avec un public de plus en plus réticent à consommer des produits contenant des molécules issus de la synthèse chimique, un certain nombre de secteurs industriels (cosmétique, pharmaceutique, agroalimentaire) se tournent de nouveau vers l'incorporation de ces molécules d'origine naturelle, aux caractéristiques chimiques et biologiques originales, dans leurs formulations. Parmi les molécules bioactives, les produits phénoliques naturels sont considérés comme ayant d'excellentes propriétés en tant qu'agents de conservation, et jouent un rôle important dans la protection contre un certain nombre de troubles pathologiques. Par conséquent, un grand intérêt a été démontré dans l'extraction de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles, notamment, les algues brunes [3].

L'obtention de ces molécules nécessite de nombreuses étapes telles que l'extraction par un solvant d'origine naturelle « agro-solvant » comme solution de remplacement des solvants classiques issus du pétrole, Ils ont un haut pouvoir solvant, sont peu volatils et non

inflammables, biodégradables et non écotoxiques. Ils ne présentent pas de risques pour la santé [4].

Bien que ce sujet revête une importance capitale sur le plan environnementale, la littérature n'a mentionné que quelques rapports sur le remplacement des solvants pétroliers par des solvants verts.

Notre travail porte sur le développement d'un procédé d'extraction vert appliqué à l'algue brune *Zonaria tournefortii*, basé sur l'utilisation « d'agrosolvants » l'eugénol. Il s'articule autour de deux parties principales :

- La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique dans laquelle nous présentons le concept de chimie vert et de l'Eco-extraction des produits naturels, suivi des différents travaux de recherche portant sur les procédés d'extraction verts et les solvants alternatifs. Ensuite, nous décrivons brièvement l'algue étudiée *Zonaria tournefortii*, ainsi que l'étude chimique et biologique des espèces du genre *Zonaria*.
- La seconde partie est réservée à une étude expérimentale qui a pour objectif, le développement d'une nouvelle procédure d'extraction verte, appliquée à l'algue brune *Zonaria tournefortii*, basée sur l'utilisation du l'eugénol comme un solvant alternatif. Par ailleurs, des études comparatives sont réalisées en termes de procédures d'extraction et des analyses chimiques et biologiques.

Ces deux parties seront suivies de la conclusion générale ainsi que les perspectives de notre travail.

PARTIE I

Synthèse bibliographique

I. 1 Extraction verte des produits naturels

I. 1.1 Définition de la chimie verte

Le concept de Chimie Verte « green chemistry » fut développé aux Etats-Unis afin d'apporter un cadre à la loi de prévention de la pollution (Pollution Prevent Act) adoptée sur leur territoire en 1990. La chimie verte est un ensemble de principes qui ont pour but de réduire ou d'éliminer l'utilisation ou la génération de substances dangereuses émanant des processus de design, de fabrication et d'application de produits chimiques [5].

I. 1.2 Principes de la chimie verte

Les 12 principes de la chimie verte ont été développés à l'origine par des ex agents de l'EPA, Paul Anastas et John Warner, dans *Green Chemistry: Theory and Practice* en 1998. Ces principes tracent la feuille de route pour les chimistes en vue d'instaurer une logique chimie verte dans leurs actions.

- 1. Prévention** : produire moins de déchets plutôt que d'investir dans l'assainissement ou dans leur élimination.
- 2. Economie d'atomes** : concevoir les synthèses de manière à maximiser l'incorporation des matériaux utilisés au cours du procédé dans le produit final.
- 3. Synthèses chimiques moins nocives** : concevoir autant que possible des méthodes de synthèse utilisant et créant des substances le plus faiblement toxiques pour les humains et sans conséquences sur l'environnement.
- 4. Conception de produits chimiques plus sûrs** : concevoir des produits de manière à répondre efficacement à leur fonction primaire tout en minimisant leur toxicité.
- 5. Réduction des Solvants et auxiliaires** : supprimer autant que possible l'utilisation de substances auxiliaires (solvants, agents de séparation, etc.) et utiliser des substances inoffensives.
- 6. Amélioration du rendement énergétique** : les procédés chimiques ont des besoins énergétiques impactant l'économie et l'environnement. L'objectif de ce principe est de définir des méthodes de synthèse à température et à pression ambiantes.
- 7. Utilisation de matières premières renouvelables** : lorsque la technologie et les moyens financiers le permettent, les matières premières doivent être renouvelables et non fossiles.
- 8. Réduction de la quantité de produits dérivés** : réduire ou éliminer autant que possible toute déviation du schéma de synthèse initial par l'utilisation d'agents bloquants, protection/déprotection, modification du procédé physico-chimique.

9. **Catalyse** : du fait de leur efficacité supérieure, favoriser l'utilisation de réactifs catalytiques les plus sélectifs possible.
10. **Conception de substances non persistantes** : concevoir les produits chimiques en intégrant leur dissociation en produits de dégradation non nocifs à l'issue de leur durée d'utilisation, afin d'éviter leur persistance dans l'environnement.
11. **Analyse en temps réel de la lutte contre la pollution** : élaborer des méthodologies analytiques pour assurer la surveillance et le contrôle, en temps réel et en cours de production, avant apparition de substances dangereuses.
12. **Chimie essentiellement sécuritaire afin de prévenir les accidents** : choisir les substances et leurs formes utilisées dans un procédé chimique de façon à minimiser les risques d'accidents chimiques dont les rejets, les explosions et les incendies [6].

I. 1.3 Eco-extraction des produits naturels

L'Eco-extraction est basée sur la découverte et la conception de procédés d'extraction permettant la réduction de la consommation énergétique, l'utilisation de solvants alternatifs et de ressources végétales renouvelables, tout en garantissant un produit/extrait naturel sûr et de qualité.

I. 1.4 Les six principes de l'éco-extraction

La notion d'«Eco-extrait » est nécessaire à travers des principes directeurs qui montrent des bonnes pratiques à suivre et des exemples de réussite :

Principe 1: Favoriser l'innovation par la sélection variétale et l'utilisation de ressources végétales renouvelables.

Principe 2: Privilégier les solvants alternatifs et principalement ceux issus des agro-ressources.

Principe 3: Réduire la consommation énergétique par l'assistance des technologies innovantes et favoriser la récupération d'énergie.

Principe 4: Favoriser la création de coproduits au lieu de déchets pour intégrer la voie de la bio- ou agro- raffinerie.

Principe 5: Réduire les opérations unitaires grâce à l'innovation technologique et favoriser les procédés sûrs, robustes et contrôlés.

Principe 6: Privilégier un produit non dénaturé, biodégradable, sans contaminants et surtout porteur de valeurs : « éco-extrait ».

Plus de 250 chercheurs et experts, représentant plus de 25 pays, venant des milieux industriels (50 %) et académique (50 %) ont participé dans le congrès sur « l'Eco-extraction des produits naturels » (GENP2013) dans la Cité des papes, Avignon, France, ce congrès a permis au domaine de l'extraction d'entrer dans sa révolution « verte », en opérant une mutation vers l'Eco-extraction, pour développer et proposer une chimie plus « durable » utilisant moins de solvants, moins d'énergie et diminuant les rejets, tout en assurant la qualité des produits finis [7].

I. 1. 5 Procédés d'extraction verts

Parmi les différentes étapes que constituent l'analyse et l'identification de molécules bioactives, l'étape d'extraction, qui a pour but la désorption des molécules d'intérêt des sites actifs de la matrice végétale, est primordiale puisqu'elle déterminera la nature et la quantité des molécules extraites et par conséquent le succès des étapes suivantes.

L'extraction de produits naturels est généralement de type solide-liquide, c'est-à-dire qu'un solide, la matrice végétale, est mélangé avec un liquide, le solvant d'extraction. Des méthodes dites traditionnelles, comme la macération, le Soxhlet, l'hydrodistillation et l'extraction par percolation ou par reflux, étaient jusqu'ici utilisées et considérées comme des techniques de choix pour extraire les composés naturels. Cependant, ces procédés sont généralement longs, fastidieux et nécessitent de grande quantité de solvant organique. Ces dernières années ont été marquées par le développement de méthodes d'extraction alternatives qui font intervenir des fluides compressés comme agents extracteurs [8], tel que l'extraction par les fluides supercritique, l'extraction par l'eau subcritique, l'extraction avec les agro solvants, l'extraction assistée par micro-ondes, et/ou par ultrasons, l'extraction accélérée par extrusion, l'extraction assistée par les enzymes, la détente instantanée contrôlée, les champs électriques pulsés... [9].

Par ailleurs, ces dernières années, certaines inquiétudes ont été émises vis-à-vis de la nature dangereuse de certains solvants, de leur impact sur l'atmosphère, l'environnement et la santé humaine, et sur les coûts que peuvent engendrer le traitement de ces déchets toxiques [10]. En chimie analytique, l'impact de ces solvants toxiques peut être réduit en limitant leur utilisation ou bien possible le recours à des solvants qui sont respectueux de l'environnement et de la santé humaine « verts » [9].

I. 1.6 Solvants verts

Dans le secteur de l'extraction de substances naturelles, l'extraction par solvant organique reste la méthode la plus pratiquée. Ces solvants sont inflammables, très volatils et toxiques (cancérogènes, mutagènes, etc.). À cause de ces effets négatifs diverses recherches universitaires ont été axées sur la recherche d'agrosolvant afin de réduire les solvants issus du pétrole [11].

Les solvants « verts » ou agrosolvants, issus de sources renouvelables, présentent des caractéristiques techniques leur permettant de se substituer aux solvants d'origine pétrochimique. Ces solvants renouvelables peuvent être produits à partir de la biomasse telle que le bois, l'amidon, les huiles végétales, des fruits ou même des plantes aromatiques [12]. Globalement, les agrosolvants présentent des avantages indéniables. Ils ont un haut pouvoir solvant, sont peu volatils et non inflammables, biodégradables et non écotoxiques. Ils ne présentent pas de risques pour la santé.

Suite à toutes les directives et réglementations notamment la loi de REACH, certaines substances chimiques sont interdites ou déconseillées comme le trichlorométhane, pour faire face à cela, une des alternatives possibles est donc l'utilisation des solvants d'origine végétale [4]. L'extraction des produits naturels par des solvants terpéniques a fait l'objet de divers travaux, sont une alternative intéressante au solvant typiques, on les trouve dans les huiles essentielles, oléorésines de fruit et des plantes aromatiques [12]. Les terpènes les plus utilisés en tant qu'agrosolvants sont : α -pinène, d-limonène et p-cymène, leurs propriétés physiques ont été comparées avec ceux de l'hexane dans l'extraction des produits naturels [9]. Un monoterpène susceptible d'être un solvant alternatif intéressant est α -pinène qui représente le constituant majeur des huiles de la térébenthine de la plupart des conifères, il est généralement obtenu par distillation fractionnée de térébenthine. L' α -pinène utilisé comme un solvant vert peut substituer le toluène dans la détermination de l'humidité ; en utilisant un appareil de Dean-Stark [13]. D'autre application pour l' α -pinène, d-limonène ou p-cymène comme un solvant de remplacement du n-hexane a été développée par Dejoye Tanzi et al, elle consiste à l'extraction de huile essentielle à partir de la micro-algue « *chlorella vulgaris* » en utilisant l'extraction au Soxhlet suivie par l'élimination du solvant à l'aide d'une hydrodistillation en utilisant un appareil de type Clevenger [14]. En outre, l' α -pinène a récemment été utilisé comme un solvant de remplacement du n-hexane pour l'extraction du β -carotène à partir de la carotte par macération [9].

Dans le domaine de chimie verte, le solvant terpénique le plus utilisé est le d-limonène qui est le plus important et le répandu des monoterpènes, c'est le constituant majoritaire des essences de citrus (orange), grâce à ses propriétés, il est utilisé comme un solvant vert substitut du toluène dans la procédure de Dean-Stark basé sur son aptitude à former un mélange azéotropique avec l'eau [15].

Un autre procédé écologique « verts » pour déterminer les lipides et les huiles à partir des graines oléagineuses, fût développé, il est réalisé en deux étapes : l'extraction par soxhlet, suivi par l'élimination du solvant à l'aide d'une distillation avec un appareil du type Clevenger [16]. En outre, le d-limonène a également été utilisé comme solvant vert substituant du solvant organique pour l'extraction des caroténoïdes à partir des matrices comme la tomate [17] et micro-algue [18].

Parmi les agrosolvants, on peut citer également l'éthanol obtenu par fermentation des matières riches en sucres comme la betterave et les céréales. L'éthanol est un solvant utilisé à grande échelle dans l'industrie chimique compte tenu de sa disponibilité, sa pureté, son faible prix, son caractère non toxique et parfaitement biodégradable [11]. Grâce à ses propriétés, l'éthanol offre des avantages avec l'eau pour l'extraction d'antioxydants de romarin en utilisant différents procédés d'extraction (extraction conventionnelle, extraction assistée par micro-onde -MAE- et l'extraction assistée par ultrasons -USAE-) [19]. De même, l'acétone et l'isopropanol ont été utilisés comme solvant alternatifs de l'hexane, pour l'extraction de différents produits naturels. [20].

L'huile de tournesol a récemment été utilisée comme un substitut aux solvants organiques pour l'extraction des caroténoïdes de carottes, le processus est en accord avec le concept de l'extraction verte et du bio-raffinerie [21]. Les esters méthyliques d'acides gras (EMAG) d'huiles végétales (soja, coco et colza) [11] et le glycérol ont été également utilisés en substitution de solvants pétrochimiques [22].

I. 1.7 Eugénol

L'eugénol est un composé aromatique dérivé de la voie de biosynthèse du shikimate, [23]. Il est présent à l'état naturel dans le clou de girofle auquel il donne son goût et son odeur caractéristique [24]. Il s'agit du 4-allyl-2-méthoxyphénol. On remarque que la molécule (figure 1) possède une fonction alcène (en rouge), une fonction éther : le groupement méthoxy en violet et une fonction phénol en bleu. Il s'agit d'un liquide bouillant à 253 °C et se solidifiant à -9°C, insoluble dans l'eau salée et peu soluble dans l'eau douce [25].

L'eugénol est un phénol autorisé par la FDA (Food and Drug Administration) comme ingrédient alimentaire. La valeur ADI (Acceptable Daily Intake) a été fixée à 2,5 mg/kg. A plus fortes doses, lorsque la capacité détoxifiante du foie est manifestement dépassée, l'huile essentielle ainsi que l'eugénol conduisent à des dommages hépatiques. Non diluée, l'huile essentielle est irritante pour les tissus et neurotoxique. Des sujets présentant des eczémas aux mains et des allergies aux cosmétiques ou aux parfums, réagissent souvent positivement à l'eugénol, l'iso-eugénol, et à l'huile essentielle de girofle lors de tests épi cutanés [26].

Il est beaucoup utilisé en médecine dentaire pour sa propriété d'anesthésique local [27], ainsi que pour l'anesthésie des poissons [28]. Il a été également testé pour produire une anesthésie chez les amphibiens et les rongeurs [27]. Chez les rats et les souris, par contre, le méthyleugénol, un dérivé de l'eugénol, présente quelques caractéristiques plus intéressantes que l'eugénol [29]. Outre cette propriété d'anesthésique local, l'eugénol était déjà utilisé au siècle dernier comme anti-infectieux contre la tuberculose et la gangrène bronchique [30]. Depuis, d'autres propriétés lui ont été découvertes, comme par exemple l'effet anti-inflammatoire, l'effet antibactérien, anti-cancers, antioxydante [31].

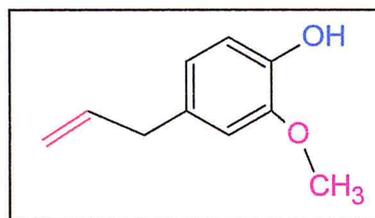


Figure 1 : Structure chimique de l'eugénol

I. 2 Présentation générale des algues brunes

Les algues brunes, ou Phéophycées, forment une classe d'organismes photosynthétiques presque exclusivement marins qui appartiennent au phylum des Hétérokontes, ou Straménopiles -plusieurs flagelles différents portant des mastigonèmes; plastes endosymbiotiques secondaires à chlorophylles a et c-. Elles sont communes dans le monde entier ; elles se développent essentiellement dans les eaux tempérées profondes mais également dans les eaux tropicales chaudes. Une diversité très importante de la taille et de la forme des thalles est observée au sein de cette classe. La coloration brune de ces organismes est attribuée à la prédominance de pigments orangés, tels que les carotènes et les xanthophylles, par rapport aux chlorophylles (*a*, *c1* et *c2*).

Avec 239 espèces connues, les Dictyotales représentent le troisième ordre le plus important parmi les algues brunes en termes de nombre d'espèces (après les Ectocarpales et les Fucales). Les espèces issues de cet ordre sont caractérisées par des thalles aplatis parenchymateux et des poils regroupés sous forme de petites touffes à la surface des frondes. Leur croissance est apicale et leur cycle de vie est diplohaplontique isomorphe. L'ordre des Dictyotales se compose d'une large famille, les « *Dictyotaceae* », ainsi que d'une famille peu commune, celles des « *Scoresbyellaceae* ». La famille des *Dictyotaceae* se subdivise en deux tribus, les « *Dictyoteae* » et les « *Zonarieae* » sur la base du nombre de cellule méristématiques aux sommets des thalles [32].

I. 3 Étude de l'espèce *Zonaria tournefortii*

I. 3.1 Systématique

Actuellement appelée *Zonaria tournefortii* (Lamouroux) Montagne (Figure 2), antérieurement, cette espèce portait l'appellation *Fucus tournefortii* (Lamouroux), *Zonaria flava* Clément C. Agardh et *Padina tournefortii* (Lamouroux) Montagne [33]. Cette espèce a pour systématique :

Embranchement: Phaeophyceophyta

Classe : Phéophycées

Ordre : Dictyotales

Famille : Dictyotacées

Tribu : Zonarieae

Genre : *Zonaria*

Espèce : *Tournefortii*



Figure 2 : *Zonaria tournefortii*

I. 3.2 Description

Zonaria tournefortii, est une algue possédant un thalle vertical, fixé au substrat par un crampon, très ramifié, composé de segments linéaires [34]. Les plantes matures sont touffues, de plus en plus en érections, et atteignant une hauteur de 6 à 7 pouces [35]. La couleur normale de l'algue est, en effet, d'un fauve verdâtre tirant sur le brun, et ce n'est que chez quelques individus malades que celle-ci passe au fauve clair jaunâtre [36].

I. 3.3 Biologie

Cette algue à biotopes sciaphiles est présente toute l'année. Elle est gamétophyte et sporophyte, à spores dispersés à la surface du thalle. Elle se trouve de la surface jusqu'à une quarantaine de mètres de profondeur [37].

I. 3.4 Ecologie

Zonaria tournefortii est une algue brune (ordre Dictyotale) se trouvant généralement dans les eaux profondes [34]. Elle possède une raie de répartition sur les côtes nord-est de l'océan atlantique (Afrique occidentale), dans l'atlantique nord-est et la méditerranée (à l'exception du golfe du lion et de l'adriatique) [33].

I. 4 Etude chimique du genre *Zonaria*

I. 4.1 Généralités sur les produits phénoliques

Les composés phénoliques constituent une famille de molécules largement répandues dans le règne végétal. Ces produits sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales dans l'organisme végétal, comme la croissance, ou la reproduction [38].

L'expression de « composés phénoliques » est utilisée pour toute substance chimique possédant dans sa structure un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles. Un nombre considérable de ces composés sont formés de deux noyaux benzéniques A et B reliés par un hétérocycle de type pyranne. Ces composés diffèrent les uns des autres par la position des substitutions sur les noyaux A et B, par la nature de l'élément central et par la position, la nature et le nombre de molécules de sucre fixées [39].

D'un point de vue biosynthétique, les composés phénoliques peuvent être engendrés par deux voies métaboliques : la voie du shikimate, la plus courante, qui conduit entre autre à la formation des acides phénoliques, flavonoïdes et lignines ; et la voie des polyacétates qui est à l'origine de composés polycycliques tels que les coumarines, les xanthones et les quinones [40]. Ils sont bénéfiques pour l'homme vis-à-vis de certaines maladies de par leur action sur le métabolisme humain et leur propriété antioxydant, ainsi ces composés ont été rapportés comme une source important dans les algues marines qui se caractérisent par la présence de phlorotannins. Ces derniers constituent un groupe très hétérogène de molécules (structure et degré de polymérisation) fournissant ainsi une grande variété d'activités biologiques potentielle. Les teneurs les plus élevées sont retrouvées dans les algues brunes qui en contiennent entre 5 et 15% du poids sec [41].

I. 4.2 Extraction, séparation et dosage des produits phénoliques

I. 4.2.1 Extraction

L'analyse et l'identification des composés phénoliques comprennent différentes étapes, notamment l'étape d'extraction. De nos jours, beaucoup de procédés de fabrication dans l'industrie agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique utilisent, directement ou indirectement, l'extraction. Celle-ci est généralement de type : solide-liquide, c'est-à-dire qu'un solide, la matrice végétale, est mis en contact avec un liquide, le solvant d'extraction. Une méthode dite conventionnelle comme la macération était jusqu'ici utilisée. Cette procédure, malgré les temps longs d'extraction et l'utilisation d'une quantité considérable de solvants, est relativement peu coûteuse. En plus, elle se déroule à température ambiante ce qui est très positif pour conserver l'intégrité des molécules polyphénoliques qui sont sensibles aux changements de température.

Les composés phénoliques sont majoritairement extraits par des solvants de polarité moyenne à forte tels que l'éthanol, le méthanol ou l'acétone pure ou en présence d'eau [42]. La présence de sucres, parfois liés aux polyphénols, les rendent plus solubles dans l'eau douce tandis que les combinaisons des solvants avec de l'eau s'utilisent dans le but d'extraire les glycosides. Les aglycones moins polaires sont plus solubles dans les solvants apolaires [43].

La macération est souvent suivie d'une l'extraction liquide-liquide et d'un fractionnement sur colonne ou d'une préconcentration en utilisant l'extraction en phase solide.

→ Extraction liquide –liquide

L'extraction liquide-liquide ou extraction par solvant est une technique physicochimique de séparation et de concentration de composés ou d'éléments chimiques. Elle est basée sur la distribution d'un soluté entre deux phases liquides non miscibles dont l'une est aqueuse et l'autre organique. La phase organique constituée par un ou plusieurs extractants dissous dans un diluant encore appelée solvant [44]. Le n-butanol, [45] l'acétate d'éthyle, n-hexane et le chloroforme [46] sont des solvants utilisés pour le traitement des extraits et l'élimination des composés non phénoliques.

→ Extraction en phase solide

L'extraction en phase solide (EPS) constitue aussi une autre option rapide et économique puisqu'elle réduit de manière significative le volume des solvants requis. Elle est employée dans le but d'extraire les composés à partir d'une matrice liquide ou comme complément à

l'extraction par solvants. L'EPS peut être également employée comme méthode de fractionnement/purification ou pour obtenir la préconcentration des composés [43].

L'extraction en phase solide est basée sur la rétention sélective de certains analytes et leur élution ultérieure par un solvant approprié [47]. Si le soluté présente une forte affinité vis-à-vis de l'adsorbant, il y reste totalement fixé au cours de la percolation de l'échantillon aqueux. Le soluté est ensuite désorbé par un petit volume de solvant éluant. Les phases solides mettent en jeu des interactions polaires (phases normales), apolaires (phases apolaires ou inverses) ou des interactions par échanges d'ions [48].

L'extraction des composés phénoliques à partir des matières végétales est influencée par leurs natures chimiques, le procédé d'extraction utilisé, la taille des particules de l'échantillon, la durée de stockage et d'autres conditions telle que la présence de substances interférentes [49].

Différents solvants peuvent être utilisés pour l'extraction de ces composés à partir des algues brunes, décrits par différents auteurs sont indiqués dans le tableau 1.

Tableau 1 : Solvants d'extraction des composés phénoliques des algues brunes

Matrice	Solvant d'extraction	Références
<i>Sargassum spinuligerum</i>	Ethanol	[50]
<i>Carpophyllum angustifolium</i>	Ethanol	[51]
<i>Bifurcaria bifurcate</i> <i>Cystoseira baccata</i>	Méthanol / Eau (50/50, v/v)	[52]
<i>Eckonia cava</i>	Méthanol	[53]
<i>Ishige okamurae</i>	Méthanol	[54]
<i>Cystophora moniliformis</i> <i>Cystophora scalaris</i>	Acétone	[55]
<i>Zonaria tournefortii</i>	CHCl ₃	[56]

<i>Himanthalia elongata</i> , <i>Laminaria</i> sp., <i>Undaria pinnatifida</i> <i>Laminaria saccharina</i>	Acétone/Eau (70/30)	[57]
---	---------------------	------

I. 4.2.2 Séparation

La complexité des extraits de matière végétale nécessite des techniques de séparation efficaces pour identifier les diverses molécules d'intérêt. Différentes techniques d'analyse s'offrent à l'expérimentateur pour la séparation des produits naturels telles que la chromatographie liquide haute performance (HPLC, High Performance Liquid Chromatography), la chromatographie en phase gazeuse (GC, Gas Chromatography), la chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC, High Performance Thin Layer Chromatography), la chromatographie à contre courant (CCC, CounterCurrent Chromatography), la chromatographie en phase supercritique (SFC, Supercritical Fluid Chromatography) ou l'électrophorèse capillaire (CE, capillary electrophoresis) [58].

Parmi ces techniques, la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) à polarité de phases inverses, combinée à la spectroscopie ultraviolette et visible (UV-VIS) est, sans doute, la méthode la plus communément utilisée pour l'identification et la quantification des différents composés phénoliques [43].

Plusieurs travaux ont été publiés dans la littérature au cours des dernières années, concernant l'isolement et la séparation des composés phénoliques des algues brunes par HPLC combinée avec d'autres techniques de détection plus ou moins complexes. Nous citons comme exemple, les phlorotannins séparés soit par HPLC-ESI-MS [59], ou par RP-3DHPLC-DAD [60].

La RP-HPLC couplée à un détecteur à barrettes de diodes (DAD) à également été très employée pour la séparation des acides phénolique [61], du Dieckol [62] et du Bifuhalol [63]. L'analyse par CLHP inclut la détermination des conditions opératoires qui seront employées pendant l'analyse, à savoir les types de colonnes à utiliser, les solvants, le temps d'analyse etc. En général, les colonnes qui s'utilisent pour faire l'analyse de polyphénols sont presque exclusivement de phase inverse (RP) avec 100 à 300 millimètres de longueur et 4.6 mm de diamètre interne.

Les systèmes d'élution sont habituellement binaires (solvant A et solvant B) : un solvant aqueux polaire acidifié tel que l'acide acétique aqueux, l'acide perchlorique, l'acide phosphorique ou l'acide formique (solvant A) et un autre solvant organique moins polaire tel que le méthanol ou l'acétonitrile qui peut être acidifié (solvant B).

Habituellement, on utilise un gradient d'élution où l'éluant B augmente avec le temps [43]. De même la chromatographie sur couche mince a été utilisée dans plusieurs études pour la séparation et la purification de composés phénoliques d'un extrait selon leur force de migration dans la phase mobile qui est en général un mélange de solvant; adapté au type de séparation recherché, et leur affinité vis-à-vis la phase stationnaire qui peut être un gel de polyamide ou un gel de silice. Elle nous permet d'avoir les empreintes du contenu polyphénoliques de l'extrait [64].

I. 4.2.3 Dosage

→ Dosage des composés phénoliques totaux par colorimétrie (méthode de Folin Ciocalteu)

Les méthodes de Folin-Denis et Folin-ciocalteu sont les plus utilisées pour l'estimation des composés phénoliques extractibles totaux [65]. La méthode de folin-ciocalteu repose sur l'oxydation des cycles phénoliques, couplée à la réduction d'acide phosphomolybdique. Dans la méthode de Folin-Ciocalteu, du lithium sulfate est ajouté au réactif de Folin-Ciocalteu, afin de diminuer la formation de précipité, permettant ainsi de faciliter la lecture de l'absorbance. Cette méthode a été utilisée en raison de sa rapidité. Ainsi cette méthode est basée sur la présence de cycles aromatiques hydroxylés, caractéristiques du phloroglucinol, dont les polyphénols algaux sont des polymères mais aussi d'acides aminés dits aromatiques, comme la tyrosine, le tryptophane ou encore la phénylalanine qui peuvent être présent dans certaines protéines. Toutefois, ces acides aminés peuvent être négligés. Ils constitueraient moins de 5% des composés réagissant au réactif de Folin-Ciocalteu se trouvant dans les algues brunes [66].

Ce réactif de Folin-Ciocalteu, préparé de façon industrielle, à l'origine de couleur jaune, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux [67].

I. 4.3 Produits phénoliques des algues brunes du genre *Zonaria*

Plusieurs travaux ont été réalisés sur l'étude chimique du genre *Zonaria*, Nous reprenons, ci-dessous, les principaux travaux relatifs à l'étude de ce genre.

- V. Amico [56,68], C. Tringalli [69] et M. El- Hattab [70] ont effectué des recherches sur l'espèce *Zonaria tournefortii* qui leur ont permis d'isolé sept métabolites dérivés du phloroglucinol à partir de l'extrait lipidique traité par la soude
- P. Wisespongpan [71] à isolé trois dérivés du phloroglucinol à partir de *Zonaria diesingiana*, lesquels ont été aussi isolés à partir de *Zonaria farwolii* et *Zonaria tournefortii*.
- Une nouvelle structure d'un phloroglucinol avec un résidu acyle C-20 a été également isolée à partir de *Zonaria diesingiana* en 1994 par T. Kusumis [72].
- Des travaux menés par W. Gerwick et W. Fenical [73] ont permis d'isoler trois produits à partir des espèces *Zonaria farwolii* récoltée sur les côtes sud de la Californie et *Zonaria tournefortii*.
- Blackman et Rogers [74] ont effectué des travaux sur trois espèces du genre *Zonaria*, se trouvant dans les zones subtidales le long de la Tasmanie. Ceux-ci concernent *Zonaria turneriana* J.Agardh, *Zonaria creneta* J. Agardh, et *Zonaria angustata* Kuetz. Ces travaux leurs ont permis d'isoler trois dérivés de phloroglucinol déjà rapportés chez d'autres espèces du genre *Zonaria* [56, 69, 68].

Les structures des dérivés de phloroglucinol isolés à partir de différentes espèces du genre *Zonaria* sont représentées ci-dessous.

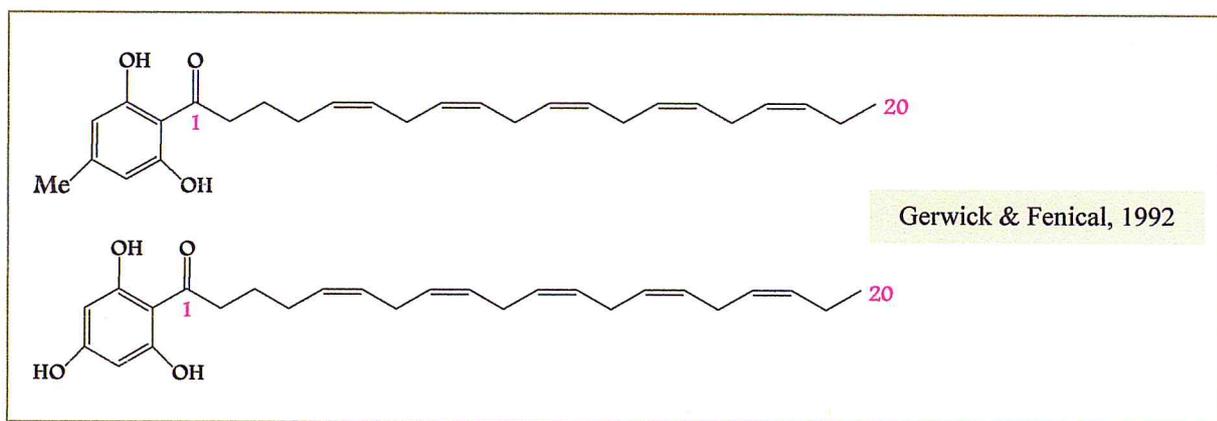


Figure 3 : Dérivés du phloroglucinol isolés de *Zonaria farwolii*

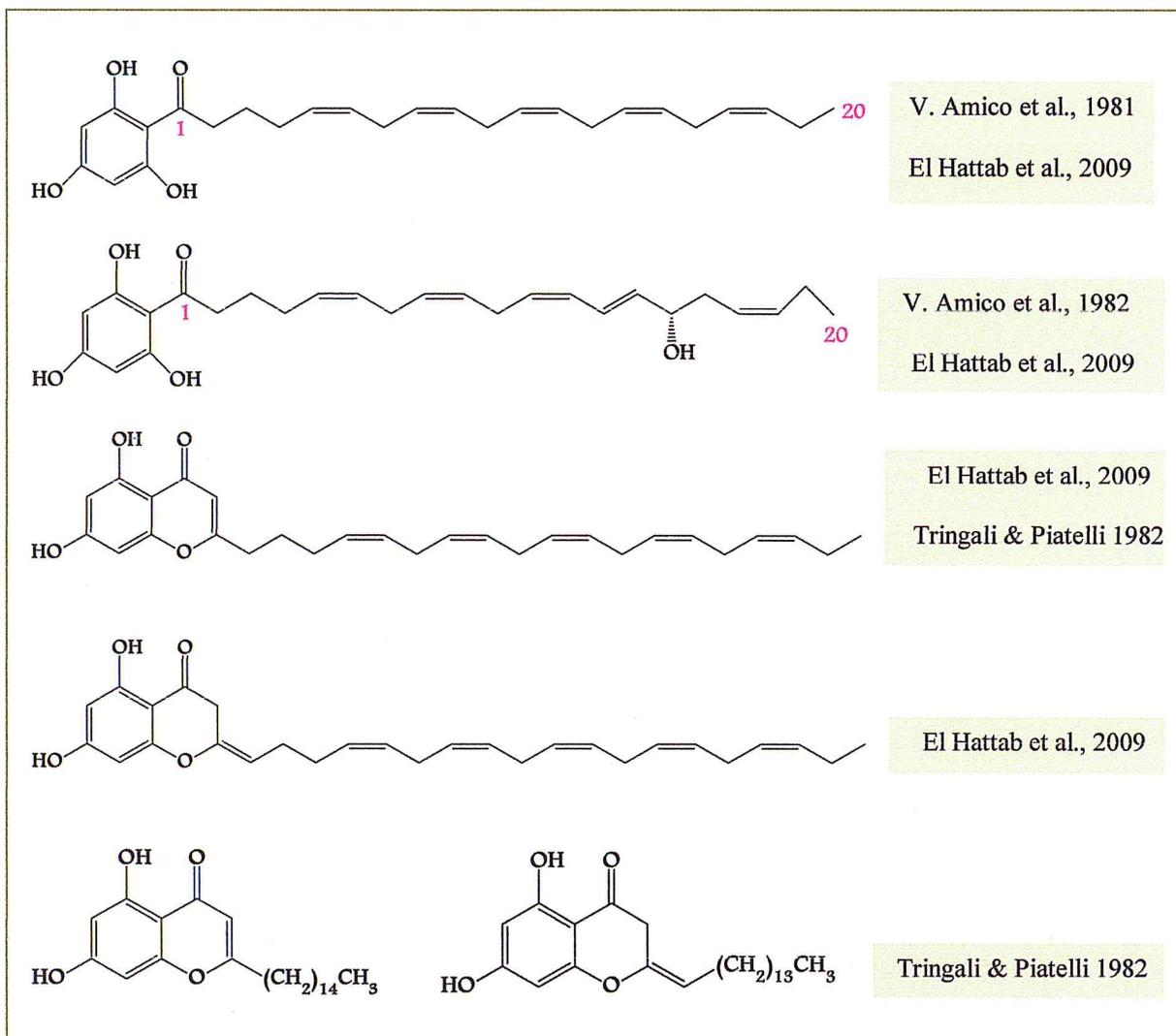


Figure 4 : Dérivés du phloroglucinol isolés de *Zonaria tournefortii*

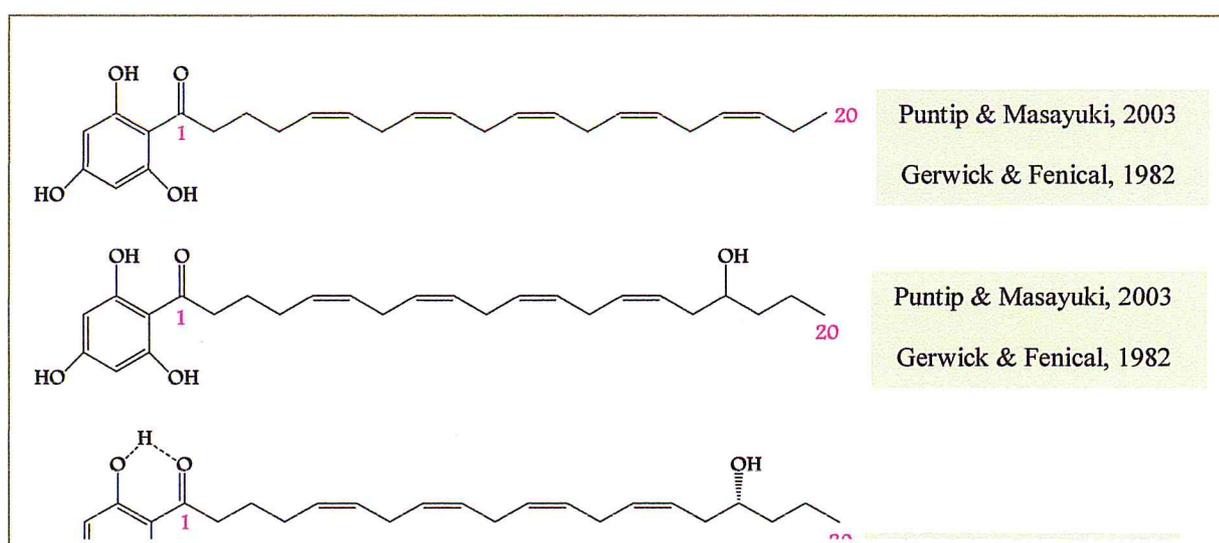


Figure 5 : Dérivés du phloroglucinol isolés de *Zonaria diesingiana*

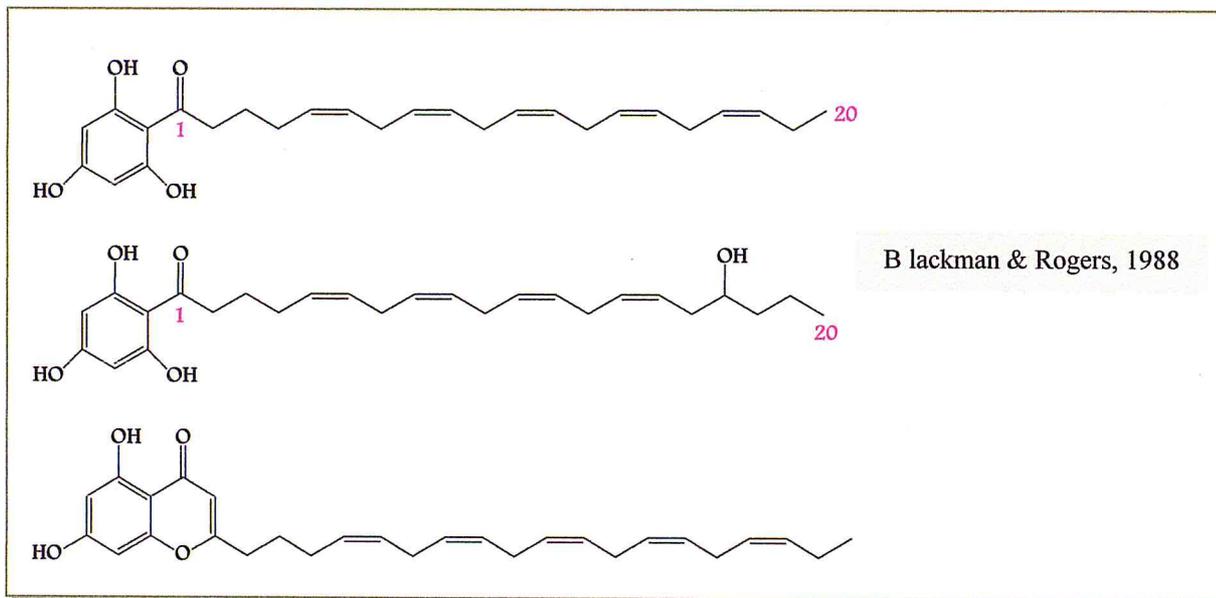


Figure 6 : Dérivés du phloroglucinol isolés de *Zonaria crenata*

I. 5 Activités biologiques des espèces du genre *Zonaria*

Comme les algues sont des organismes photosynthétiques, ils produisent des radicaux libres et d'autres réactifs d'oxydation lorsqu'ils sont exposés à des concentrations élevées d'oxygène et la lumière. Il est considéré en raison de l'absence de dommage oxydatifs dans leurs éléments de structures, ces organismes sont capables de produire les composés nécessaires pour se protéger contre l'oxydation, par conséquent, les algues est un puissant composés antioxydants qui pourraient également convenir à la protection de notre corps contre les effets nocifs des espèces réactives de l'oxygène produit à la suite du métabolisme normal de l'organisme [75].

Les produits naturels polyinsaturés ont attiré un intérêt croissant dans les programmes de découverte de médicaments. Par exemple, dans le développement de remèdes contre les maladies neurodégénératives, cette classe de produits naturels est d'un intérêt primordial en raison de leur piégeage des radicaux et de leur forte capacité antioxydante. En effet, l'évaluation de l'activité antioxydante cellulaire du chromone tout-(*Z*)-5,7-dihydroxy-2-(4*Z*, 7*Z*, 10*Z*, 13*Z*, 16*Z* nonadecapentaenyl) **1**, isolé à partir de plusieurs espèces du genre *Zonaria*, indique qu'il possède un effet antioxydant intéressant avec une valeur d'CE50 de $14 \pm 9 \mu\text{M}$, et suggère qu'il était presque aussi puissant que l'antioxydant standard, la quercétine. En outre, le produit **1** a également montre des effets protecteurs puissants contre les espèces réactives de l'oxygène avec un CE50 = $160 \pm 25\mu\text{M}$ [76].

De même, les composés bioactifs dérivés d'algues brunes, à savoir les phlorotannins, ont été signalés comme ayant des effets antimicrobiens, qui peuvent être utiles en tant qu'agents potentiels antimicrobiens pour les industries alimentaires et pharmaceutiques [77]. Les algues brunes du genre *Zonaria* sont connues d'être riches en acylphloroglucinol avec un résidu C-

20. Très peu de travaux ont été réalisés sur l'étude des propriétés antimicrobiennes de l'algue des dérivés de phloroglucinol du genre *Zonaria*. Nous reprenons, ci-dessous, les principaux travaux relatifs à l'étude de l'algue du genre *Zonaria*.

Les travaux menés par W. Gerwick et W. Fenical [73], ont permis l'isolement de trois produits 2, 3 et 4 à partir des espèces *Zonaria farwolii* et *Zonaria diesingiana* comme décrit dans la figure 7. Ces composés ont présenté différents degrés d'activité antibactérienne *in vitro* contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*. Cependant, Wisespongpan & Kuniyoshi [78] ont également rapporté l'évaluation de l'activité antimicrobienne des produits 3 et 4 ainsi que le produit 5. Les résultats ont indiqué que le composé 5 a montré une puissante activité contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*, tandis que les composés 3 et 4 ont montré moins d'activité. Aucune activité contre les bactéries à Gram négatif n'a été observée.

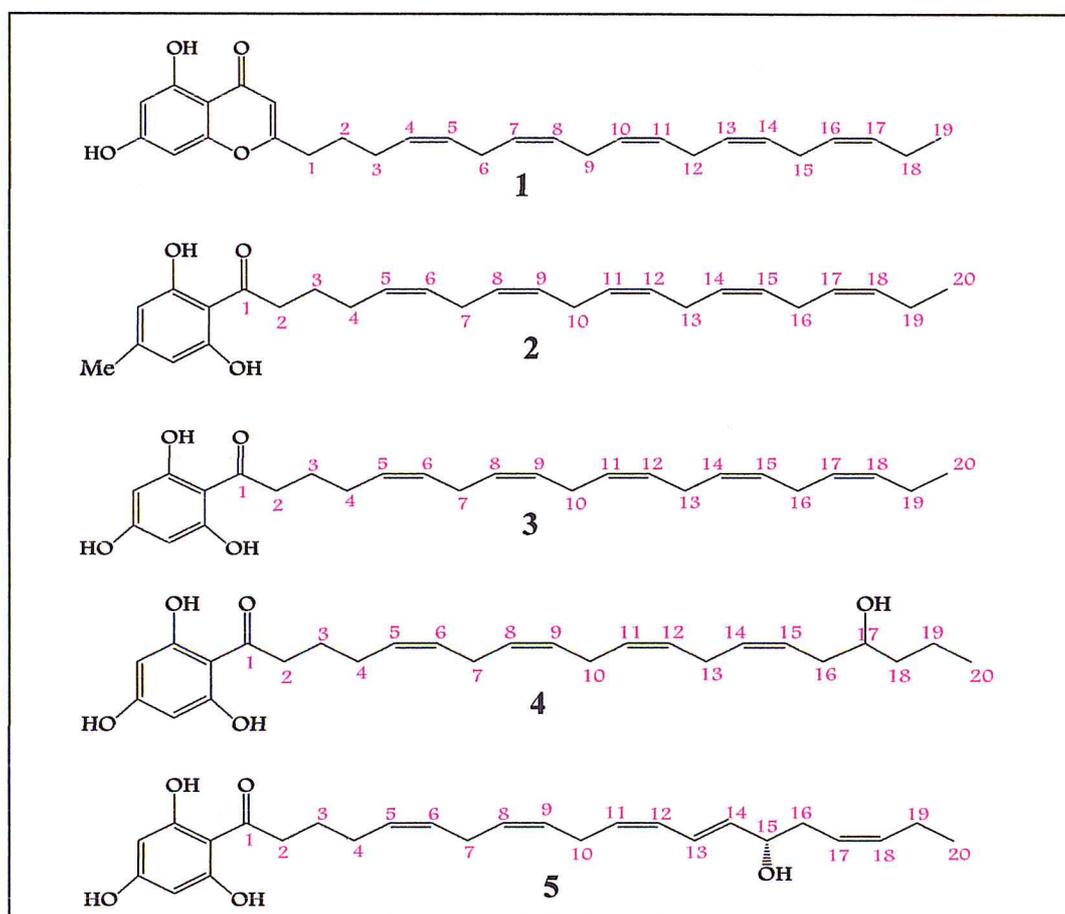


Figure 7 : Produits isolés des espèces du genre *Zonaria* possédant des activités biologiques

PARTIE II

Etude expérimentale

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

II. 1.1 Introduction

Notre travail s'orienté vers le développement d'un nouveau procédé d'extraction vert basé sur l'utilisation de l'eugénol comme bio-solvant et son application dans la préparation de l'extrait brut de l'algue brune *Zonaria tournefortii*. Dans un but comparatif, d'autres extraits classiques ont été préparés par macération dans des solvants organiques à savoir le CH₂Cl₂ et le mélange CH₂Cl₂/MeOH (v/v : 1/1).

En effet, la nature chimique des extraits obtenus, ainsi que leurs activités biologiques ont été comparées sur la base de:

- Mesure de la teneur en composés phénoliques totaux par le test colorimétrique de Folin-Ciocalteu.
- L'analyse par chromatographie liquide à haute performance (CLHP).
- La détermination de l'activité antioxydante évaluée par la mesure du pouvoir antiradicalaire par le test DPPH (2,2-diphenyle-1-picrylhydrazyle) et du pouvoir réducteur de fer ferrique (FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power).
- La détermination de l'activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique) évaluée par la méthode de diffusion sur gélose.

II. 1.2 Extraction et analyse préliminaire par chromatographie sur couche mince

II. 1.2.1 Récolte et traitement du matériel végétal

Le matériel végétal qui a fait l'objet de notre travail est l'algue brune « *Zonaria tournefortii* » récoltée en 2012, à une profondeur de 5 mètre sur le littoral méditerranéen, à Tipaza (Algérie). L'identification à été faite par Dr. H. Seridi au niveau du laboratoire d'océanographie Biologique et environnemental marine de l'Université des Sciences et de la Technologie d'Alger.

L'algue fraîchement récoltée, a été soumise à un tri manuel afin d'éliminer les différents épiphytes (organismes capables de contaminer la nature chimique des extraits) qui consistent souvent en des algues ou d'autres organismes animaux. L'algues a été ensuite séchée dans un endroit sec et aéré et à l'abri du soleil, et conservée à l'état sec dans des sacs propres en plastique. L'algue a été réduite en petits copeaux, et les échantillons soumis à l'extraction ont été obtenus par échantillonnage.

II. 1.2.2 Extraction du matériel algal

II. 1.2.2.1 Préparation des extraits bruts

Dans un but comparatif, deux procédés d'extraction ont été effectués à savoir le procédé d'extraction classique et le procédé d'extraction vert. Le premier procédé (Figure 8) est basé sur la préparation d'extraits par des solvants d'origine pétrochimique à savoir : le Dichlorométhane (Réf : Sigma Aldrich 24233) et le mélange Dichlorométhane (Réf : Sigma Aldrich 24233) / Méthanol (Réf : Panreac 141091) (v/v : 1/1). L'extraction a été réalisée dans un système statique à une température ambiante pendant une semaine, suivie d'une filtration et de l'évaporation du solvant. Les résidus secs obtenus ont été traités par la suite avec de l'éther diéthylique pour éliminer les traces d'eau et les produits aqueux. L'éther est ensuite évaporé afin d'obtenir des extraits étherés constitués d'un mélange complexe de produits phénoliques et d'autres de nature chimique diverses. Les deux extraits obtenus ont été conservés au réfrigérateur à 4C° pour les analyses qualitatives et quantitatives ultérieures.

Le second procédé (Figure 9) repose sur la préparation d'un extrait par un agrosolvant phénolique, en l'occurrence l'eugénol. La macération a été effectuée à une température ambiante pendant une semaine. L'intérêt du procédé réside dans la méthodologie de séparation du solvant vert, basée sur une série d'extraction liquide-liquide avec de l'eau (Annexe 1(a)), suivie d'une centrifugation (4000 tours pendant 10 min) et élimination de la phase aqueuse (eau+eugénol) conduisant à un extrait brut. Un recyclage du solvant vert est en outre effectué par une hydrodistillation en utilisant un Clevenger (Annexe 1(b)) ou un appareil de type Dean-Stark.

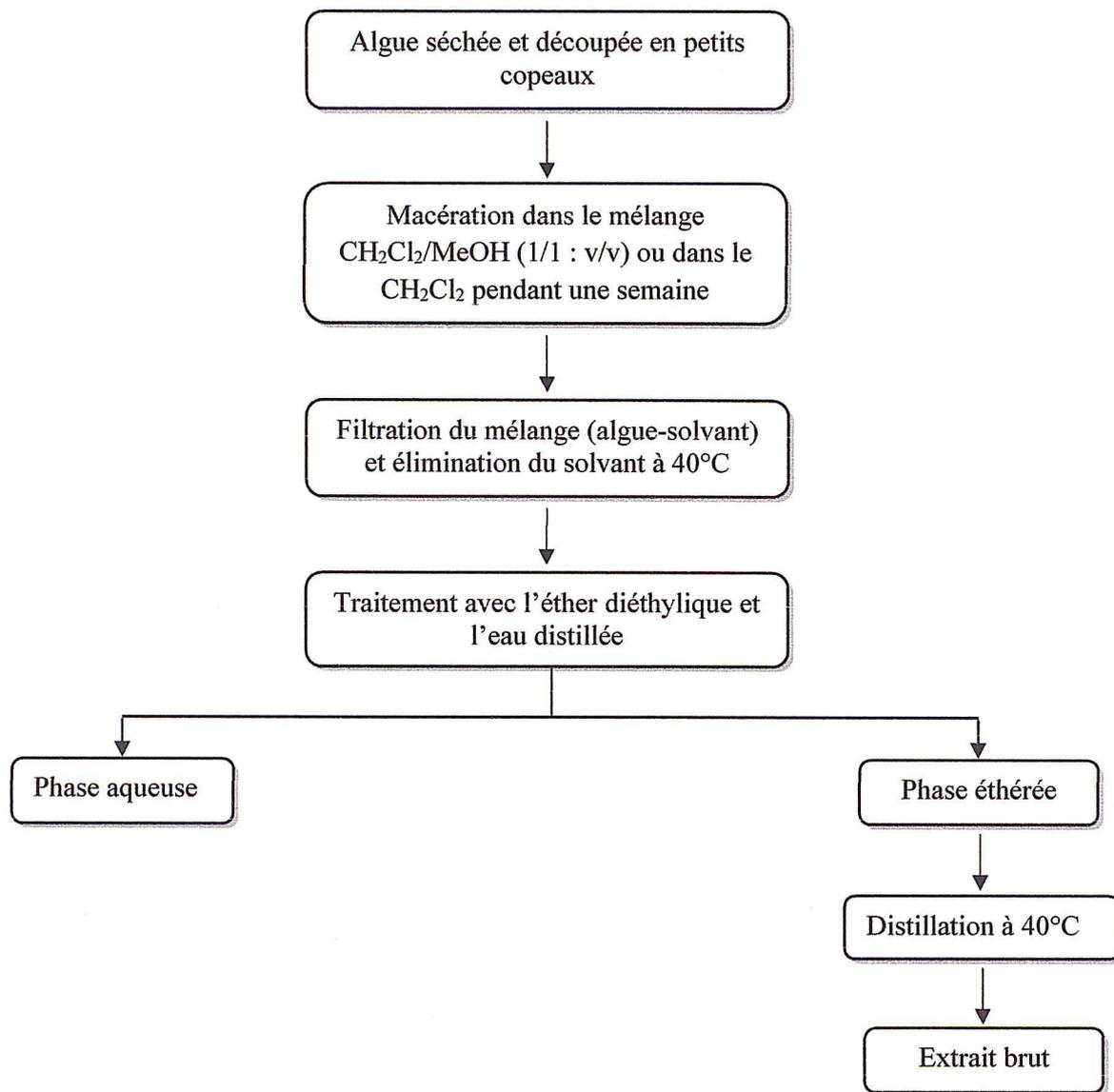


Figure 9 : Préparation de l'extrait à partir d'une matière végétale sèche en utilisant un procédé d'extraction classique

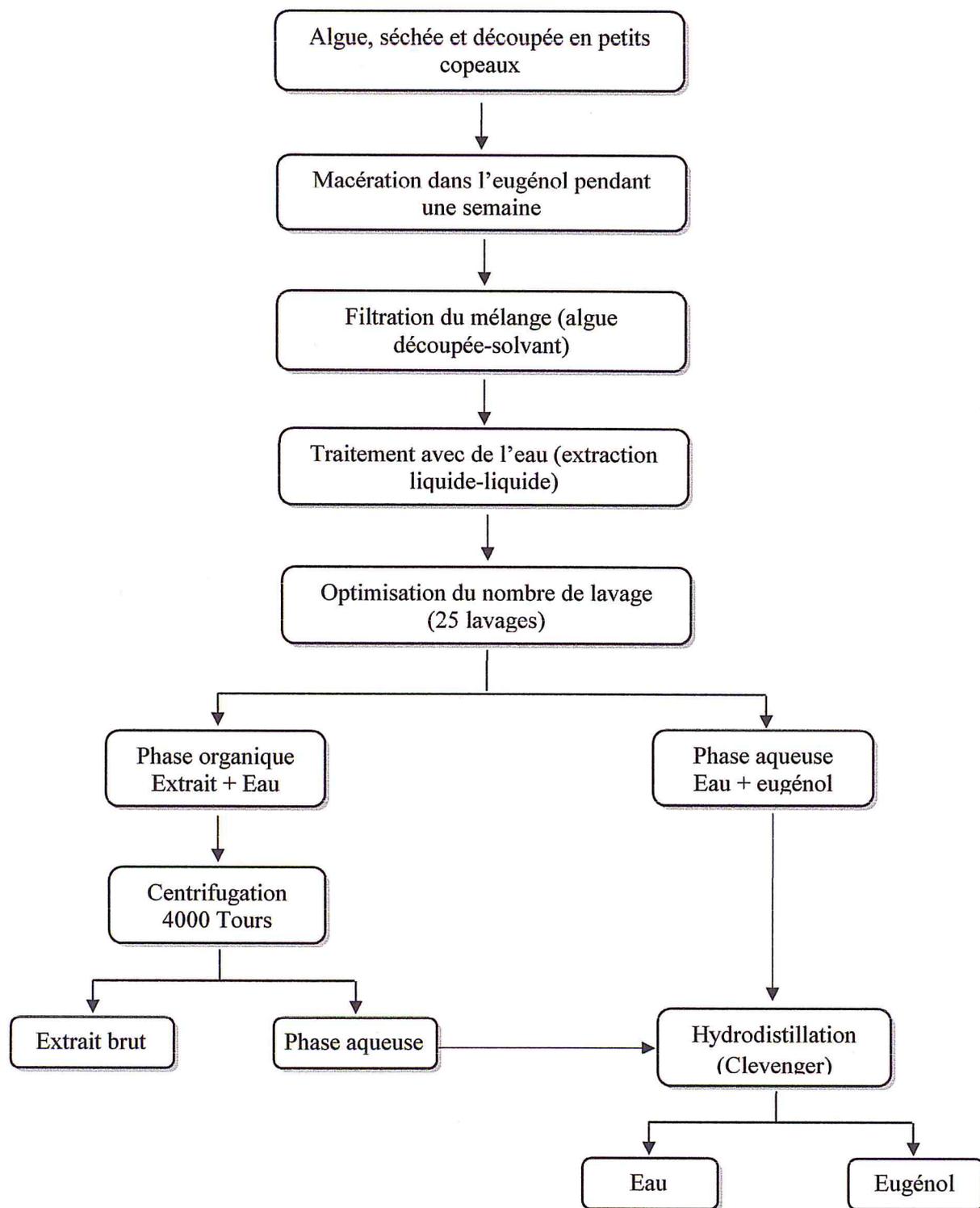


Figure 10 : Préparation de l'extrait à partir d'une matière végétale sèche en utilisant un procédé d'extraction vert

II. 1.2.3 Analyse préliminaire par chromatographie sur couche mince (CCM)

Une analyse par chromatographie sur couche mince a été réalisée pour procéder à une identification qualitative préliminaire des extraits de *Zonaria tournefortii* obtenus à partir du procédé d'extraction classique et du procédé d'extraction vert.

La chromatographie sur couche mince est effectuée sur une feuille d'aluminium recouverte de gel de silice Si60 en utilisant le mélange éluant acétate d'éthyle (Ref : Panreac 141318) / 2, 2,4-triméthylpentane (Réf : Panreac 172064) (v/v : 1/1), et se basant sur phloroglucinol comme témoin. La révélation est réalisée par l'exposition de la plaque CCM aux vapeurs de diiode.

II. 1.3 Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Des analyses par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) ont été effectuées sur des extraits obtenus avec l'eugénol dans le but d'optimiser le nombre de lavages. A cet effet des spectres infrarouges ont été enregistrés pour des extraits en fonction du nombre de lavages.

Un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) de marque Bruker type Tensor 27 (Annexe 2(a)) équipé d'un détecteur sulfate triglicine deutéré DTGS à température ambiante, d'une source infrarouge moyen (4000-400 cm^{-1}), d'un rayonnement laser et un diviseur de faisceau KBr a été utilisé. L'acquisition des spectres a été effectuée avec une résolution de 4 cm^{-1} et un nombre de scan égal à 10 spectres. Le traitement des spectres est réalisé avec le logiciel OPUS 6.5 sous le système d'exploitation Microsoft Windows XP. Les fenêtres utilisées pour l'analyse de la phase liquide sont en chlorure de sodium (NaCl), avec une entretoise en téflon de 0.5 mm d'épaisseur. Les tubes de connections sont en téflon avec un diamètre intérieur de 0.8 mm et le chargement est réalisé en employant des tubes de chlorure de polyvinyle de diamètre intérieur de 2.79 mm.

L'introduction des solutions se fait avec un système à écoulement bloqué dans une cellule de flux, l'avantage d'une telle cellule est d'éviter les inconvénients relatifs au nettoyage et au remplissage des cellules conventionnelles et de minimiser la consommation des solvants organiques est de réduire le temps d'analyse (15- 60 s). Les spectres enregistrés sont traités à l'aide d'une macro qui a été construite à partir de l'option « ApPro » développé par Winfirst.

II. 1.4 Estimation du contenu en composés phénoliques totaux (TPC, Total Phenolic Content)

Les composés phénoliques produits par les végétaux en tant que métabolites secondaires constituent une large gamme de molécules chimiques, dont leur nature chimique et teneur sont extrêmement variables d'une espèce à une autre. Les composés phénoliques de l'algue brune *Zonaria tournefortii* sont des dérivés du phloroglucinol, résultants d'un couplage entre une molécule de phloroglucinol et une oxylipine à 20 ou à 22 atomes de carbone [79].

Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des produits phénoliques totaux. Cependant, l'analyse par le réactif de Folin-Ciocalteu reste la méthode de dosage la plus utilisée [80]. Cette méthode est basée sur la réduction du réactif de Folin-Ciocalteu, constitué d'acides phosphotungstique et phosphomolybdique, en milieu légèrement alcalin, par les ions phénolates. Les produits de réduction (tungstène et molybdène) présentent une coloration bleue et montrent une absorption maximale aux environs de 760 nm, permettant de déterminer la concentration des produits phénoliques en se référant à une courbe d'étalonnage à partir des concentrations connues [42].

II. 1.4.1 Mise en œuvre pratique

La teneur en composés phénoliques totaux des extraits d'algue obtenus à partir du procédé d'extraction classique et du procédé d'extraction vert a été déterminée par spectrophotométrie, suivant le protocole adapté par Nathalie Blanc [81] avec de légères modifications.

4 mg d'extraits d'algue ont été préalablement dissous dans 6 mL d'eau distillée et 2 mL de méthanol à la température ambiante. 2 mL de chaque solution d'extrait ont été mélangés à 10 mL d'eau distillée et 12 mL de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à $290 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. 1 mL du réactif de Folin-Ciocalteu a été ajouté, et la coloration a été développée pendant 30min à l'obscurité à température ambiante. La lecture de l'absorbance a été faite à 760 nm contre un blanc contenant le mélange réactif à l'exception de l'échantillon testé. La quantification des composés phénoliques a été faite en se référant à une courbe d'étalonnage d'une allure linéaire ($y = ax+b$) en utilisant le phloroglucinol comme étalon avec une gamme de concentration allant de 0,008 à 0,099 mg/mL. Cependant, les résultats sont exprimés en mg équivalent de phloroglucinol par gramme d'extrait sec.

II. 1.5 Analyse par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

Des analyses par chromatographie liquide à haute performance ont été réalisées afin d'avoir une idée plus précise des composés extraits à partir du procédé d'extraction classique et du procédé d'extraction vert. En effet, une comparaison des profils chromatographiques des extraits obtenus a été réalisée.

Les analyses ont été effectuées sur une chaîne de chromatographie liquide (annexe 2(b)) de type Agilent 1100/1200, muni d'un injecteur automatique avec un module de chauffage des échantillons, d'une pompe quaternaire équipée d'un système de programmation de débit, d'un four pour colonne équipé d'un module de chauffage par effet Peltier, et d'un détecteur UV/Visible à barrettes de diodes. Cet appareillage, piloté par le logiciel Chem Station Agilent, permet de travailler en mode isocratique (composition constante de la phase mobile) ou en mode gradient (phase mobile de composition variable en cours d'analyse). Les séparations sont réalisées à une température de 35 °C sur une colonne analytique de type Zorbax Eclipse XDB-C8 (RP 8 ; 5 μ m ; Φ : 4,6mm, l : 250mm).

Tableau 2 : Conditions du gradient d'analyse HPLC.

t (min)	0.00	2.00	15.00	25.00	60.00
H ₂ O	60	50	35	20	20
MeOH	40	50	65	80	80

II. 1.6 Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Zonaria tournefortii*

II. 1.6.1 Mesure du pouvoir antiradicalaire par le test DPPH·

II. 1.6.1.1 Principe de la méthode

Le test DPPH est la méthode indirecte la plus ancienne. Le principe de cette méthode repose sur la réduction du radical DPPH· par un antioxydant phénolique donneur d'hydrogène. Le DPPH· est un radical libre de couleur violet présentant un maximum d'absorption vers 517 nm. Quand il est recombinaison, le DPPH· se décolore. La diminution de l'absorbance du mélange réactionnel est donc proportionnelle à la recombinaison du radical. Il est donc très aisé de suivre cette diminution par spectrophotométrie visible. Le transfert d'un hydrogène de l'échantillon testé vers le radical libre est très fréquemment exprimé en CI₅₀. Il s'agit de la concentration en échantillon entraînant la recombinaison de cinquante pourcent des radicaux [42].

L'activité antiradicalaire des composés phénoliques contenus dans les extraits de *Zonaria tournefortii* est évaluée en mesurant leurs capacités de piéger le radical libre DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl). En effet, la couleur violette foncée de ce dernier se transforme en jaune lors de sa réduction (capté par les produits testés). La rapidité de la perte de la couleur est directement proportionnelle à l'activité antioxydante du donneur d'hydrogène [82].

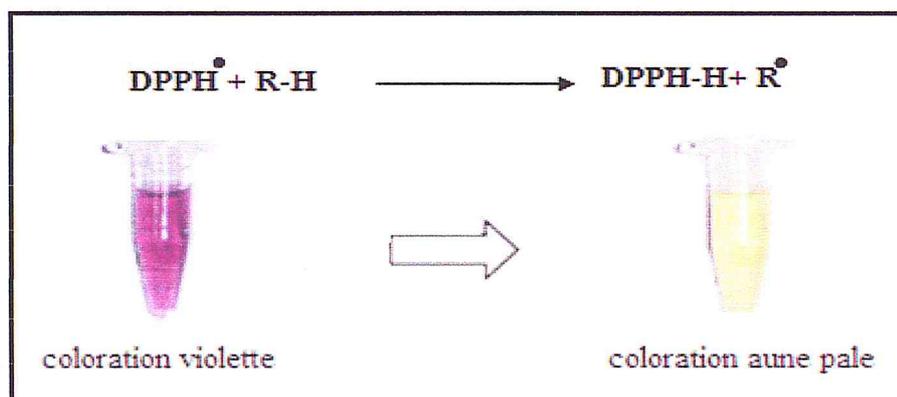


Figure 11 : Forme libre et réduite du radical DPPH·

II. 1.6.1.2 Mise en œuvre pratique

Au cours de ces travaux de mémoire, l'activité antioxydante a été évaluée par deux méthodes. La première est basée sur la mesure du pouvoir antiradicalaire par le test DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle) impliquant le transfert d'atome d'hydrogène, et la seconde est présentée par le test déterminant le pouvoir réducteur antioxydant de fer ferrique (FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power) impliquant le transfert d'électron.

II. 1.6.1.2.1 Test antiradicalaire sur plaque CCM

Afin d'estimer le pouvoir antiradicalaire des métabolites secondaires de l'algue brune *Zonaria tournefortii*, les extraits obtenus à partir du procédé d'extraction classique et du procédé d'extraction vert sont soumis à une chromatographie sur couche mince en utilisant l'acide ascorbique comme témoin positif et la solution de DPPH pour la révélation.

En effet, l'analyse a été effectuée en utilisant une phase stationnaire présentée par une plaque d'aluminium recouverte de gel de silice Si 60 Mesh/F254 de type Merck, et une phase mobile constituée d'un mélange de solvants AcOEt/TMP (v/v : 1/1). La plaque de silice est laissée se développer pendant 30 min dans l'obscurité, à température ambiante. Après migration, la plaque est révélée avec une solution de DPPH (2%).

II. 1.6.1.2.2 Test antiradicalaire mesuré au spectrophotomètre

Les composés phénoliques semblent être de bons candidats pour leur activité antioxydante du fait de la présence de nombreux hydroxyles, pouvant réagir avec ces radicaux, la méthode choisie pour mesurer l'activité antiradicalaire des extraits de *Zonaria tournefortii* est celle de DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) utilisée par Loo [83], avec quelques modifications.

La solution de DPPH a été préparée par la solubilisation de 4 mg de DPPH dans 100 mL de méthanol (La solution ne se conserve pas plus de 4 à 5 jours à l'obscurité à 4C°). Un volume de 1ml d'extrait (à différentes concentrations) a été ajouté à 1ml de la solution de DPPH. Le mélange réactionnel a été agité vigoureusement et incubé pendant 30 min à l'obscurité et à température ambiante. Le passage de la couleur violette à la couleur jaune de la solution est mesurable par un spectrophotomètre UV-VIS à 517 nm contre un blanc constitué de 1 ml de méthanol et 1 ml de la solution DPPH préparé dans les mêmes conditions opératoires.

Afin de comparer les extraits entre eux, l'indice CE₅₀ est calculé, ce dernier est défini comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH, ou encore, c'est la concentration de l'échantillon exigé pour donner une diminution de 50% de l'absorbance de la solution contrôle constituée de méthanol et de la solution de DPPH.

Les témoins positifs utilisés sont le BHT (2,6-di-tert-butyle-4-méthyle phénol) et l'acide ascorbique « vitamine C ».

II. 1.6.2 Pouvoir Réducteur FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

L'activité antioxydante des extraits de *Zonaria tournefortii* a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Elle est considérée comme une méthode universelle, simple, rapide et reproductible, qui peut être appliqué aussi chez les plantes et dans les extraits organiques et aqueux.

Cette méthode repose sur la réduction de l'ion ferrique (Fe³⁺) en ion ferreux (Fe²⁺). La réaction se manifeste par l'apparition d'une coloration verte dont l'intensité est proportionnelle au potentiel réducteur.

II. 1.6.3.1 Mise en œuvre pratique

Le pouvoir réducteur des extraits de *Zonaria tournefortii* a été déterminé selon le procédé décrit par T.Kuda [84] avec quelques modifications. En effet, 1ml de chaque extrait diluée dans du méthanol à une concentration de 3 mg/ml a été mélangé avec 2,5ml de la solution tampon phosphate (0,2M, pH 6,6) et 2,5ml de ferricyanure de potassium ((K₃Fe(CN)₆) à 1%). L'ensemble a été incubé à 50°C pendant 30 min. 2,5ml d'acide trichloracétique (TCA) (10%) a été ensuite additionné au mélange, le tout a été centrifugé pendant 10 min à 3000 rpm. L'eau distillée (2,5ml) et le chlorure ferrique (FeCl₃) (2,5ml à 0,1%) ont été ajoutés à 2,5ml du surnageant. L'absorbance a été mesurée à 700 nm contre un blanc.

Le butyl-hydroxytoluène (BHT) a été utilisé comme contrôle positif, dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons réels. Les résultats sont exprimés en valeur FRAP suivant la formule [85]:

$$\text{Valeur FRAP} = \frac{\text{Abs échantillon} - \text{Abs contrôle}}{\text{Abs standard} - \text{Abs contrôle}} \times [\text{Standard}]$$

Avec :

Abs échantillon : Absorbance à 700 nm de l'échantillon à t=30 min.

Abs standard : Absorbance à 700 nm du standard utilisé à t=30 min.

[Standard] : Concentration en standard antioxydant utilisé.

II. 1.7 Etude du pouvoir antimicrobien des extraits de *Zonaria tournefortii*

Les algues marines constituent un énorme réservoir de molécules naturelles potentiellement actives, des études ont permis d'isoler et d'identifier un très grand nombre de molécules nouvelles de grande originalité structurale et dont beaucoup d'entre elles ont une activité biologique intéressante. Sur le plan pharmacologique, la présence de différentes activités a été mise en évidence depuis longtemps chez plusieurs espèces d'algues marines.

L'activité antibactérienne, antivirale, anti-tumorale et d'autres propriétés comme celle qui entre dans la régulation du taux du cholestérol sanguin ou dans la régulation du système immunitaire ont été également étudiées [86].

Les algues brunes présentent de différentes activités biologiques, leurs dérivés phénoliques interviennent comme antimicrobiens et anti appétent vis-à-vis des herbivores [87]. Face à l'apparition de formes résistantes de plusieurs bactéries à certains antibiotiques,

la recherche de nouvelles molécules actives est devenue une nécessité. Cette partie de notre mémoire tente de trouver une activité antibactérienne chez l'algue brune *Zonaria tournefortii*.

II. 1.7.1 L'aromatogramme

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée « antibiogramme » ou « méthode par diffusion en milieu gélosé » ou encore « méthode des disques ». Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des antibiotiques testés, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale [88]. Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar réalisé dans une boîte de pétri (in vitro). Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque absorbant sur lequel on dépose une quantité donnée de l'extrait.

➤ Principe

La technique consiste à utiliser des disques de papier absorbants stériles (de 9 mm de diamètre) imprégnés d'une quantité d'extrait et déposés à la surface d'une gélose inoculée et uniformémentensemencée par la suspension bactérienne à étudier. La diffusion de l'extrait à partir du disque au sein de la gélose détermine un gradient de concentration.

Les micro-organismes poussent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'extrait suffisante pour inhiber leur croissance dont on observe après incubation tout autour des disques une zone circulaire claire indemne de colonies, appelée « zone d'inhibition » (Figure 11). Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'extrait. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante [88].

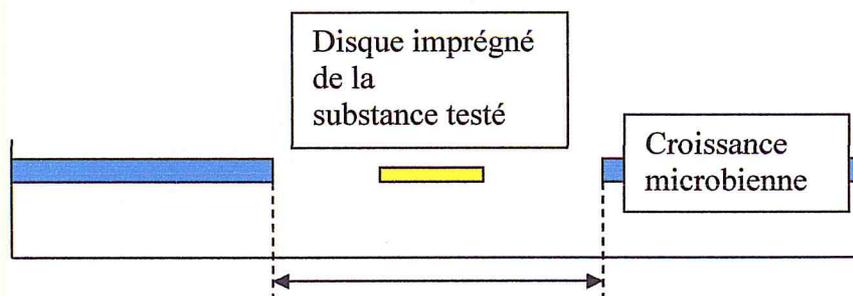


Figure 11 : Schéma simplifié du principe de la méthode des aromatoigrammes.

II. 1.7.2 Souches microbiennes choisies

Les souches de références utilisées pour les tests antimicrobiens sont : *Escherichia coli* (ATCC 25922) *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27835) et *Bacillus ceureus*(ATCC10876) pour l'activité antibactérienne et une levure *Candida albicans* et un champignon *Aspergillus Braziliensens* pour l'activité antifongique.

II. 1.7.3 Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits classiques et vert de *Zonaria tournefortii*

Le protocole expérimental utilisé est le suivant [89]:

→ Repiquage des souches bactériennes

- Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37 °C afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

→ Préparation de l'inoculum

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

→ Préparation des disques

- Des disques de 9 mm de diamètre, stériles, sont chargés de l'extrait naturel à tester.
- Des disques imbibés de DMSO ont été appliqués sur chaque boîte de pétri, ces disques ont servi de contrôle *négatif* contre toutes les souches microbiennes utilisées dans l'étude.
- Les différents disques sont séchés à froid à l'aide d'un sèche cheveu afin d'éliminer le solvant, mis sous une lampe UV pendant 45 minute afin de les stériliser puis posés sur la surface de la gélose.

→ Préparation des milieux de culture

- La gélose de Muller Hinton stérile prête à l'usage pour l'activité antibactérienne et Sabouraud pour l'activité antifongique (La préparation de la gélose est exprimée dans l'annexe 3(b)), sont coulés dans des boîtes de Pétri stériles de 90 mm de diamètre.
- L'épaisseur du milieu de culture est de 4 mm répartie uniformément dans les boîtes. Ces dernières doivent être séchées 30 min à une température ambiante du laboratoire avant leur emploi.

→ Ensemencement

- Des boîtes de Pétri stériles préalablement coulées, sont ensemencées par étalement à l'aide d'un étaloir, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries. A l'aide d'une pince stérile, les disques de papier filtre contenant les produits à tester sont déposés à la surface de la gélose inoculée au préalable.

→ Lecture

- Les activités antibactérienne et antifongique sont déterminées par la mesure avec précision des diamètres de zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée, produite autour des disques après 24 h d'incubation à 37 °C pour les bactéries, et après 48 h d'incubation à 30 °C pour les levures et 5 jour pour les champignons.

Remarque

Les extraits ont été dilués dans le DMSO (diméthyle sulfo-oxyde) dans les proportions suivantes :

- Extrait obtenu avec du dichlorométhane : 100 mg/ml.
- Extrait obtenu avec du méthanol/dichlorométhane : 100 mg/ml.
- Extrait obtenu avec de l'eugénol : 23 mg/ml.

Chapitre 2 : Résultats et discussions

II.2.1 Analyse préliminaire par chromatographie sur couche mince (CCM)

Nous avons observé l'apparition des taches jaunes pour les extraits de *Zonaria tournefortii* au même niveau que celui de phloroglucinol (Figure 12), caractérisés par le même facteur de rétention ($R_f = 0,2$).

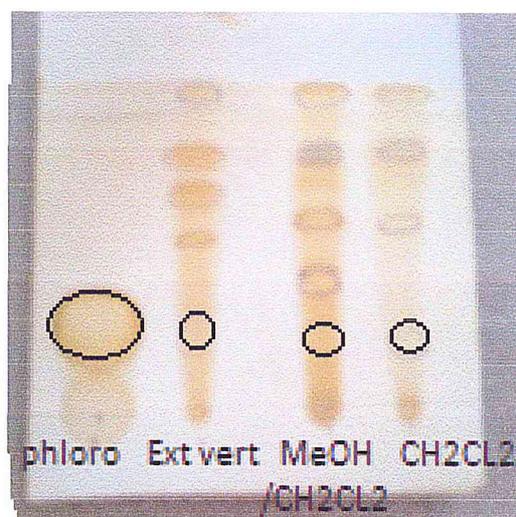


Figure 12 : Chromatographie sur couche mince des extraits de *Zonaria tournefortii* obtenus respectivement par extraction classique et par un procédé « vert »

II. 2.2 Préparation des extraits bruts

II.2.2.1 Caractéristiques organoleptiques et rendements d'extraction

Les extraits obtenus ont été soumis à l'évaluation de leurs caractéristiques organoleptiques à savoir, l'aspect, la couleur et l'odeur, les rendements obtenus ainsi que les caractéristiques organoleptiques sont regroupés dans le tableau 3.

$$R(\%) = \frac{M \text{ Extrait}}{M_{mv}} \times 100$$

R (%) : Rendement en extrait (%)

M Extrait : Masse de l'extrait en grammes

M mv : Masse de la matière végétale en grammes

Tableau 3 : Caractéristiques organoleptiques et rendements d'extraction des extraits obtenus à partir du procédé d'extraction vert et du procédé d'extraction classique.

Extraits	Rendement (%)	Aspect	Couleur	Odeur
Extrait préparé avec CH ₂ Cl ₂	0.47	Visqueux	Verdâtre	Caractéristique
Extrait préparé avec l'eugénol	0.49	Visqueux	Verdâtre	Caractéristique
Extrait préparé avec CH ₂ Cl ₂ /MeOH	2.16	Visqueux	Verdâtre	Caractéristique

→ Influence de la nature du solvant sur le rendement global d'extraction

Le choix du solvant d'extraction peut se faire sur la base de ses capacités de pénétration dans la matière végétale, de son pouvoir de solubilisation et de ses propriétés de transfert de matière, mais également sur la base de sa toxicité et le respect des exigences légales strictes sur les émissions de produits dangereux. En effet, dans notre étude nous avons choisi de travailler avec deux solvants organiques à savoir le CH₂Cl₂ et le mélange CH₂Cl₂/MeOH et un solvant vert en l'occurrence l'eugénol.

Les résultats indiqués dans le tableau ci-dessus montrent que le rendement d'extraction avec le mélange CH₂Cl₂/MeOH est le plus élevé par rapport à celui de dichlorométhane et de l'eugénol. En effet, le dichlorométhane est un solvant moyennement polaire avec un comportement assez similaire à celui de l'eugénol, ce qui explique leurs valeurs proches de rendement. Cependant, le mélange de solvants CH₂Cl₂/MeOH couvre tout l'intervalle de polarité contrairement au dichlorométhane et l'eugénol. Par conséquent, le résultat de son rendement d'extraction est probablement dû au fait que le mélange CH₂Cl₂/MeOH a sa capacité de dissoudre les différentes classes de composés (polaires et apolaires) de l'extrait. Bien que le mélange CH₂Cl₂/MeOH donne un rendement plus important en extrait, l'eugénol

est considéré comme un bon solvant d'extraction car il est moins toxique et plus respectueux de l'environnement.

II. 2.3 Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

II. 2.3.1 Spectre infrarouge à transformée de Fourier de l'eugénol

La figure 13 montre le spectre IRTF de l'eugénol préparé directement dans le dichlorométhane. Le spectre de l'eugénol montre des bandes à 3539 cm^{-1} et 3684 cm^{-1} représentant l'élongation de la liaison OH d'un alcool. La région entre 2941 cm^{-1} et 2861 cm^{-1} est caractéristique de l'élongation des groupes CH_2 et CH_3 . Il présente également une bande intense à 1514 cm^{-1} caractéristique de l'élongation du groupement $\text{C}=\text{C}$ aromatique et une bande moyenne à 1637 cm^{-1} correspond à l'élongation du groupement $\text{C}=\text{C}$ d'un alcène. Des bandes à 1183 cm^{-1} et 1368 cm^{-1} correspondent à l'élongation de la liaison OH d'un alcool. Les deux bandes à 1148 cm^{-1} et 1122 cm^{-1} correspondent à l'élongation de la liaison $\text{C}-\text{O}$ et à la déformation de la liaison $\text{O}-\text{H}$ d'un phénol.

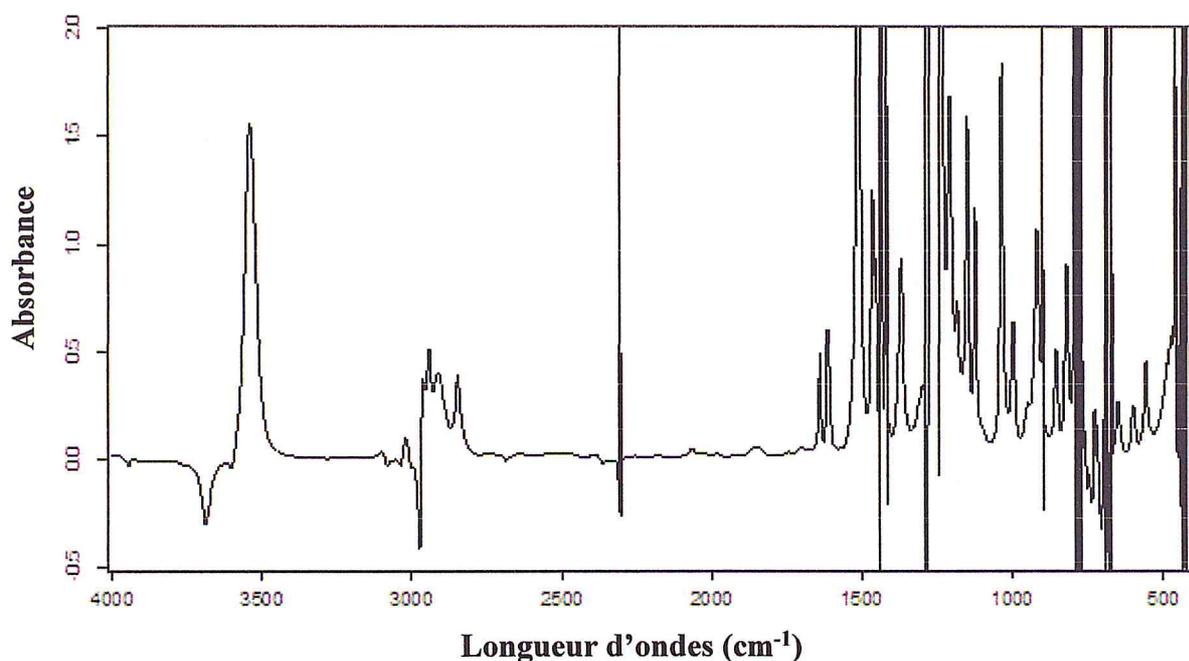


Figure 13: Spectre IRTF de l'eugénol préparé directement dans CH_2Cl_2 (18.8 mg.ml^{-1})

II.2.3.2 Optimisation du nombre de lavages au cours de l'extraction liquide-liquide

II.2.3.2.1 Comparaison des spectres infrarouge à transformée de Fourier des résidus obtenus après cinq, dix et quinze lavages

Afin d'optimiser le nombre de lavages au cours de l'extraction liquide-liquide, nous avons procédé à la comparaison du spectre infrarouge à transformée de Fourier de l'eugénol

pure avec ceux des résidus obtenus après 5, 10 et 15 lavages pour suivre l'évolution de l'élimination de l'eugénol en fonction du nombre de lavage.

Nous avons sélectionné à partir de la figure 14 une bande spécifique de l'eugénol à 1122 cm^{-1} au dessous de la zone des empreintes digitales (1500 cm^{-1}), nous avons constaté une diminution de l'intensité de la bande spécifique à partir du 15^{ème} lavage.

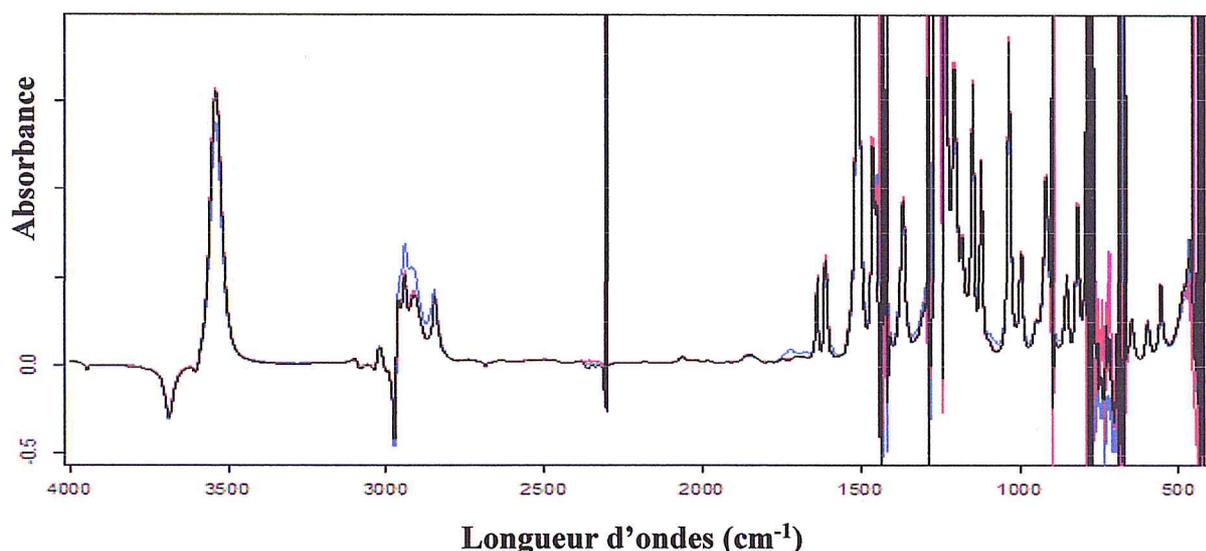


Figure 14 : Spectres IRTF du l'eugénol préparé dans le CH_2Cl_2 (18.8mg.ml^{-1}) (Spectre noir) et des résidus préparés directement dans le CH_2Cl_2 (18.8mg.ml^{-1}) obtenus après 5 lavages (spectre rouge) ,10 lavages (spectre bleu) et 15 lavages (spectre rose).

II.2.3.2.2 Détermination de l'absence de l'eugénol dans l'extrait brut obtenu après 25 lavages

La figure 15 illustre les spectres infrarouge à transformée de Fourier de l'eugénol et de l'extrait brut obtenu après 25 lavages préparés directement dans le dichlorométhane à une concentration de 3 mg/ml. La comparaison des deux spectres nous a permis de constater l'absence de la bande spécifique de l'eugénol à 1122 cm^{-1} dans le spectre du résidu obtenu après 25 lavages, ce qui démontre clairement l'efficacité des extractions liquide-liquide dans l'élimination du solvant vert et la récupération de l'extrait.

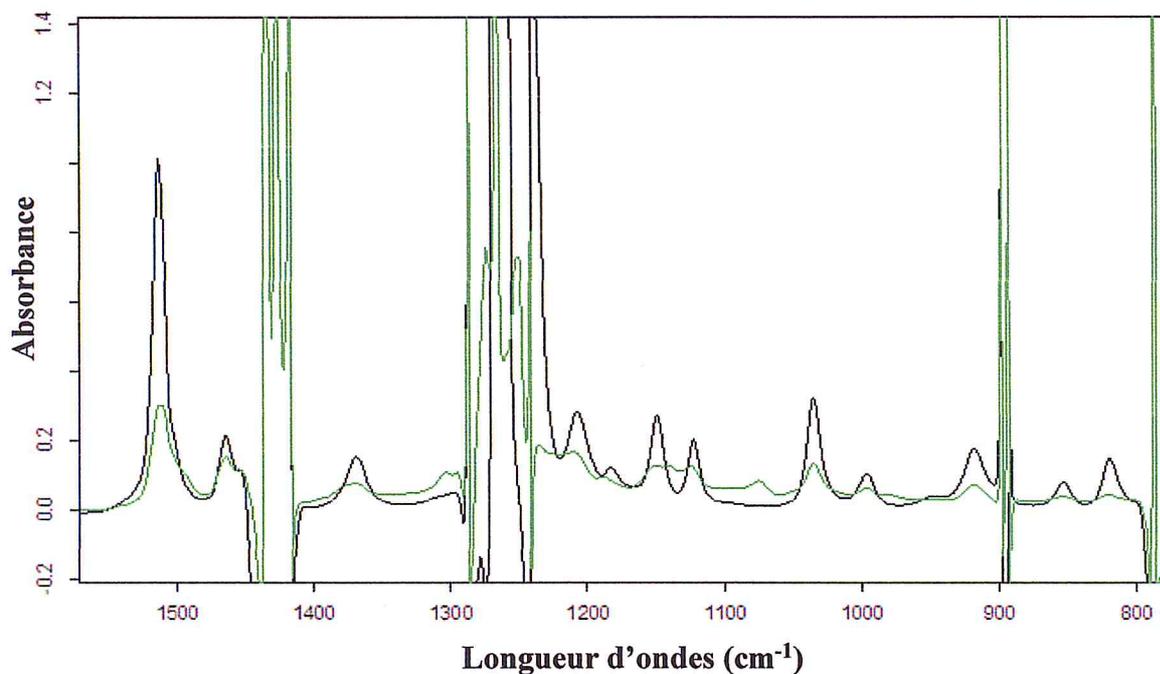


Figure 15 : Spectres IRTF du l'eugénol préparé dans le CH_2Cl_2 (3mg.ml^{-1}) (Spectre noir) et de l'extrait brut obtenu à partir du procédé d'extraction vert après 25 lavages préparé dans le CH_2Cl_2 (3mg.ml^{-1}) (Spectre vert)

II. 2.3.3 Spectre infrarouge à transformée de Fourier du l'eugénol récupéré

En comparant les deux spectres de l'eugénol utilisé dans le procédé d'extraction vert et de l'eugénol récupéré après extraction liquide-liquide en utilisant un appareil Clevenger, nous avons constaté que les deux spectres sont superposables (figure 16), ce qui démontre que le procédé d'extraction vert permet un bon recyclage du solvant.

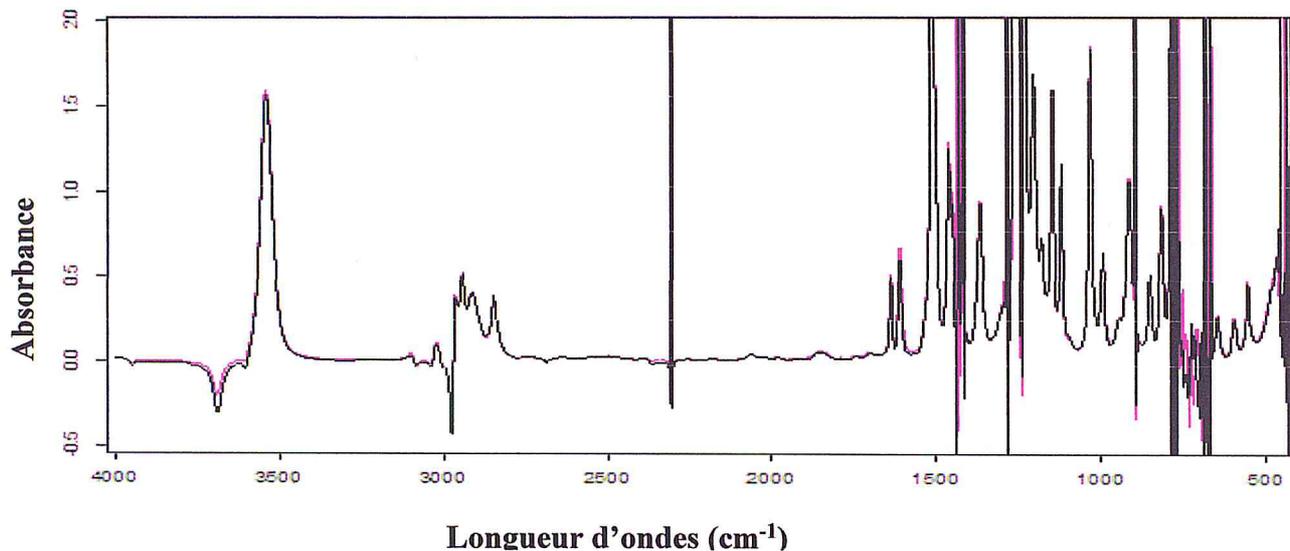


Figure 16 : Spectres IRTF du l'eugénol préparé dans le CH_2Cl_2 (18.8mg.ml^{-1}) (Spectre noir) et du l'eugénol récupéré après extraction liquide-liquide préparé dans le CH_2Cl_2 ($18,8\text{ mg.ml}^{-1}$) (Spectre rose).

II. 2.4 Estimation du contenu en composés phénoliques totaux (TPC, Total Phenolic Content)

La courbe d'étalonnage (figure17) établie à l'aide de différentes concentrations de phloroglucinol traité de la même manière que les échantillons réels, nous a permis d'obtenir les concentrations d'extraits équivalentes au phloroglucinol obtenues par extrapolation des valeurs d'absorbance des extraits dans la droite de calibration, et d'estimer la valeur de la teneur en composés phénoliques de chacun des trois extraits testés.

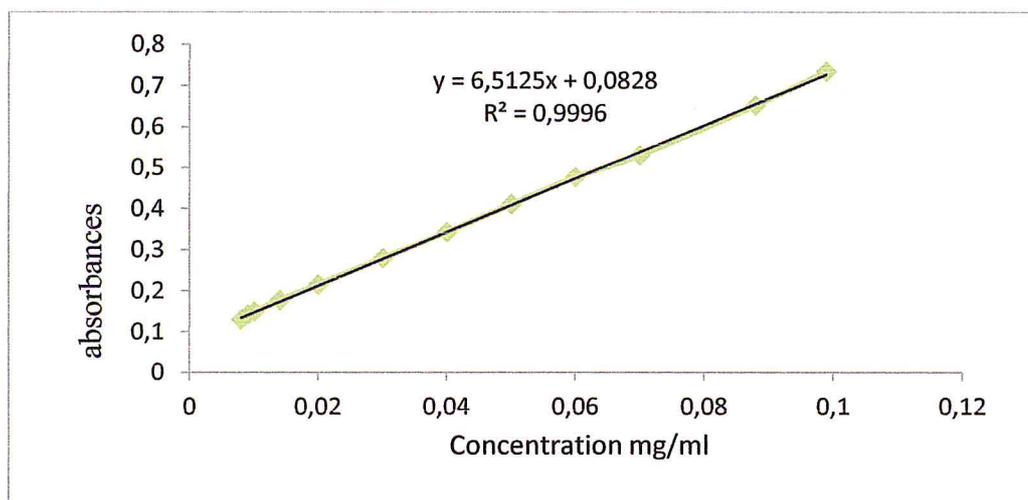


Figure 17 : Droite d'étalonnage des solutions standards de phloroglucinol de concentration allant de $0,008$ à $0,099\text{ mg.ml}^{-1}$ obtenue par le test de Folin-Ciocalteu

Tableau 4 : Caractéristiques analytiques de la droite de calibration

Equation de la droite d'étalonnage	R ²	L.D (µg.ml ⁻¹)	L.Q (mg.ml ⁻¹)	D.S.R (%)
y = 6,512x + 0,082	0.999	1,57x10 ⁻³	5,2x10 ⁻³	0.54

Les résultats de l'analyse colorimétrique des composés phénoliques totaux déterminés selon la relation ci-dessous [90], sont regroupés dans le tableau 5, et illustrés par la figure 18.

$$T = \frac{C \times V}{M}$$

T : Taux des composés phénoliques (mg EPG / g d'extrait sec d'algue)

C : Concentration d'extrait équivalente au phloroglucinol

V : Volume d'extrait (ml)

M : Poids sec d'extrait d'algue (g).

Tableau 5 : Teneur en composés phénoliques totaux (TPC) des extraits obtenus à partir du procédé d'extraction classique et du procédé d'extraction vert exprimé en mg.EPG/g d'extrait sec

Extraits	Absorbances	Concentration d'extrait en EPG	Taux des composés phénoliques en mg.EPG/g
Extrait préparé avec l'eugénol	0.652	0.088	22
Extrait préparé avec le CH ₂ Cl ₂	0.177	0.014	3.5
Extrait préparé avec CH ₂ Cl ₂ /MeOH	0.275	0.029	7.25

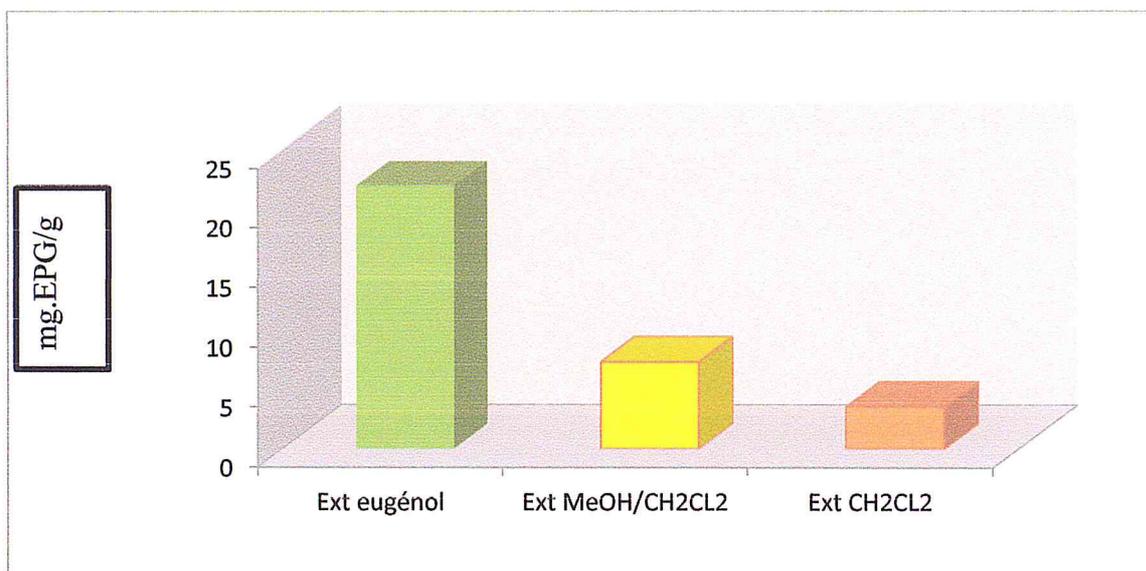


Figure 18: Teneurs en composés phénoliques totaux (TPC) dans les trois extraits

L'histogramme de la figure 18 montre que la teneur en composés phénoliques totaux dans les extraits classiques préparés avec le CH₂Cl₂ et le mélange de solvant CH₂Cl₂/MeOH est nettement inférieure à celle de l'extrait vert préparé avec l'eugénol avec des valeurs respectives de 3.5, 7.25 et 22mg EPG/g d'extrait sec. Ce résultat est expliqué par la présence résiduelle de l'eugénol dans l'extrait brut.

N.B :

Dans la méthode de Folin Ciocalteu beaucoup de composés réducteurs peuvent interférer, donnant un taux phénolique apparent élevé. Tels que les thiols, les protéines, les vitamines, les acides aminés, les sucres et les acides insaturés, par conséquent le test de Folin Ciocalteu est un test qui donne une idée globale du potentiel antioxydant des extraits et non seulement de la teneur des composés phénoliques totaux.

II. 2.5Analyse par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

Les extraits analysés ont été préparés par extraction par solvant à l'aide du dichlorométhane, du mélange dichlorométhane /méthanol et de l'eugénol. Nous avons enregistré des chromatogrammes à trois longueurs d'onde : 210, 230 et 255 nm. Les profils chromatographiques obtenus sont donnés par les figures, 19, 20,21.

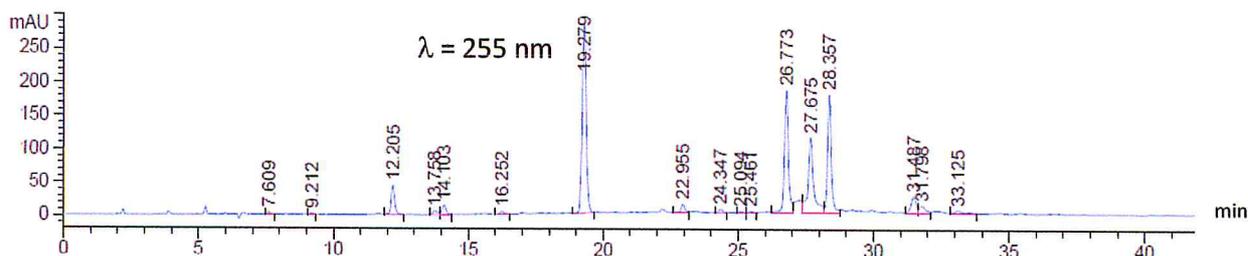
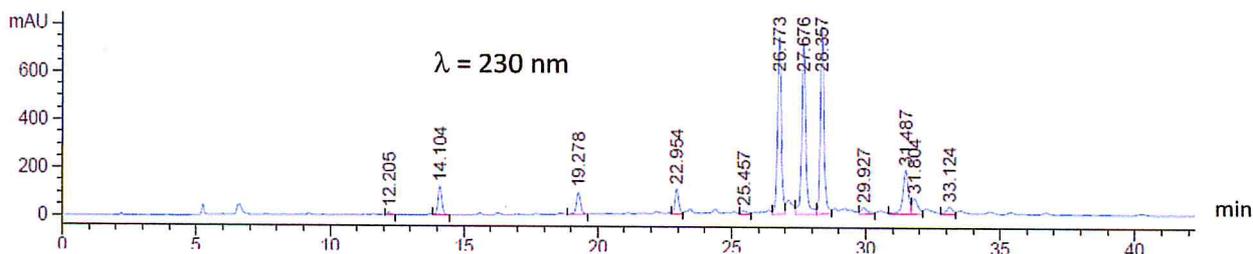
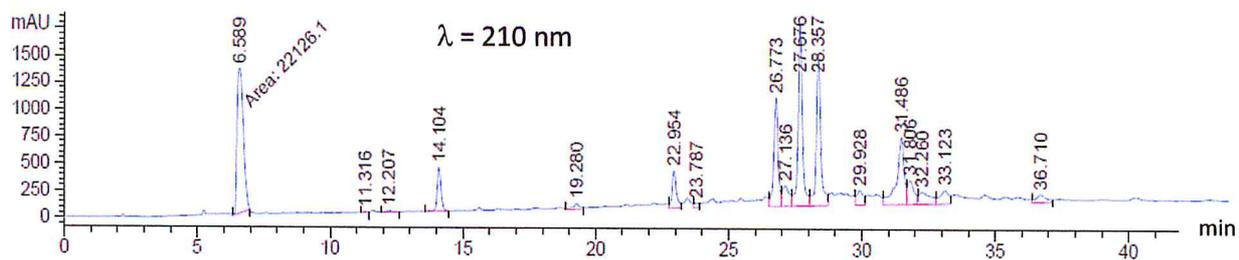


Figure 19 : Profils chromatographiques de l'extrait obtenu avec l'eugénol à trois longueurs d'onde

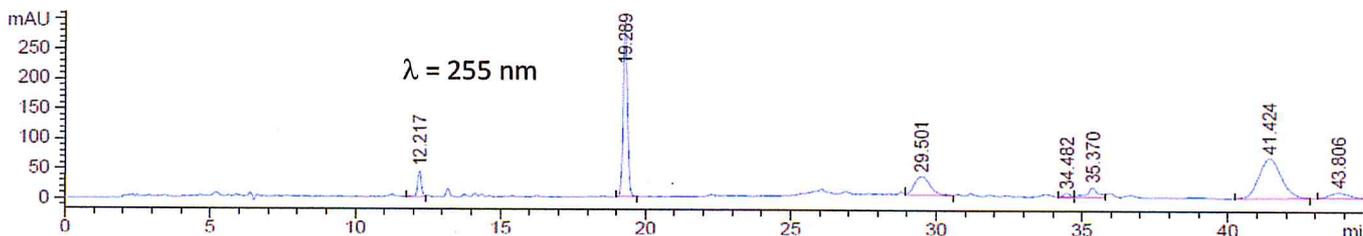
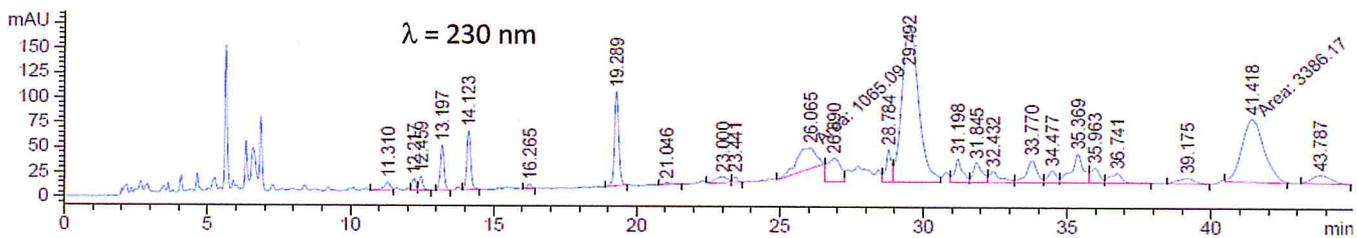
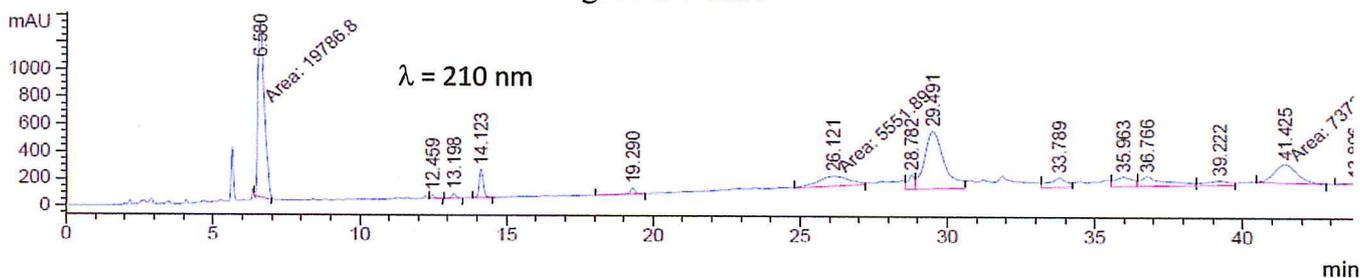


Figure 20 : Profil chromatographique de l'extrait obtenu avec le dichlorométhane à trois longueurs d'onde

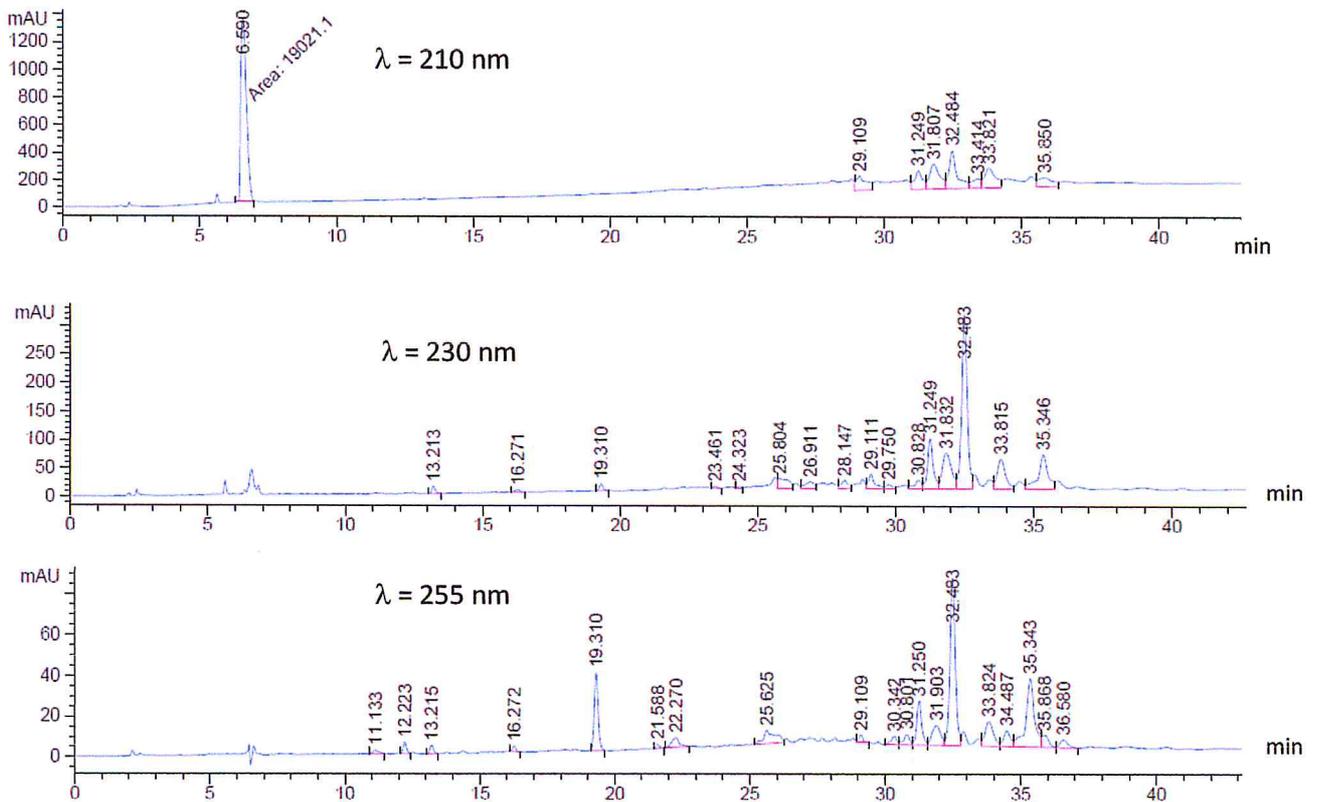


Figure 21 : Profil chromatographique de l'extrait obtenu avec le mélange dichlorométhane/méthanol (1/1) à trois longueurs d'onde

Solvant	Temps de rétention
Dichlorométhane	210 : 12.4, 13.1, 14.1, 19.3, 26.1, 29.5, 41.4
	230 : 12.4, 13.1, 14.1, 19.3, 26.1, 29.5, 41.4
	255 : 12.2, 19.3, 29.5, 41.4
Eugéno	210 : 12.2 (t.f.), 14.1, 19.2(f.), 22.95, 26.7, 27.6, 28.3, 31.5
	230 : 12,2 (t.f.), 14.1, 19.2, 22.9, 26.7, 27.6, 28.3, 31.5
	255 : 12.2, 14.1, 19.2, 22.9 (f.), 26.7, 27.6, 28.3, 31.5
CH ₂ Cl ₂ /MeOH	210 : 29.1, 31.2, 31.8, 32.4, 33.8
	230 : 13.2 (t.f.), 19.3 (f.), 29.1 (f.), 31.2, 31.8, 32.5, 33.8, 35.3
	255 : 12.2(f.), 13.2 (f.), 19.3, 25.6, 29.1 (f.), 31.2, 31.9, 32.5, 33.8, 34.4, 35.3

Signal : t.f. : très faible, f. : faible

L'examen des chromatogrammes obtenus à trois longueurs d'onde (210, 230 et 255) pour les trois solvants (eugéno, dichlorométhane et CH₂Cl₂/MeOH) montre que les extraits obtenus avec l'eugéno et le dichlorométhane contiennent relativement les mêmes composés, donc chimiquement comparable. Ce résultat est tout à fait cohérent au regard de la nature chimique des deux solvants qui possèdent une polarité similaire. Nous constatons sur le

chromatogramme de l'extrait obtenu à l'eugénol l'élution de trois composés bien séparés à 26,7, 27,6, 28,35 min, il s'agit à notre sens des mêmes produits élués sous forme d'un mélange (pic large) à 29,5 min dans le cas du dichlorométhane. Le chromatogramme obtenu à l'aide du mélange de solvant dichlorométhane/méthanol (1/1) paraît légèrement différent. Nous estimons que la nature du profil chromatographique est liée probablement à la concentration de l'extrait injecté et/ou à la composition complexe de l'extrait dû notamment au large intervalle de polarité du mélange de solvant CH₂Cl₂/MeOH.

Le profil chromatographique de l'extrait obtenu avec l'eugénol (solvant vert) montre que ce dernier pourrait être utilisé en tant que substituant des solvants issus du pétrole, la nature chimique de l'extrait obtenu est similaire à celle obtenue avec du dichlorométhane, de plus l'extrait final obtenu avec le solvant vert ne contient pas de trace de solvants toxiques.

II. 2.6 Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Zonaria tournefortii*

La surproduction des radicaux libres dans l'organisme et le déficit du système de défense endogène peuvent engendrer de diverses pathologies, cancer, et des maladies neuro-dégénératives. Actuellement, la recherche vise à renforcer ces défenses endogènes par des substances naturelles issues des algues, qui sont douées des propriétés antiradicalaires. L'intérêt croissant des effets bénéfiques des antioxydants sur la santé a mené au développement d'un grand nombre de tests pour déterminer les capacités antioxydantes des extraits naturels. Les tests DPPH· et FRAP sont parmi les plus utilisés dans la littérature.

II. 2.6.1 Test antiradicalaire sur plaque CCM

Les chromatogrammes des extraits de *Zonaria tournefortii* (extraits classiques et vert), révélés par une solution de DPPH· à une concentration de 2 mg.ml⁻¹ dans le méthanol, présentent une activité antiradicalaire comme la montre, à titre indicatif, la Figure 22. Les composés à propriété antiradicalaire sont localisés par l'apparition des zones jaunes sur fond violet.

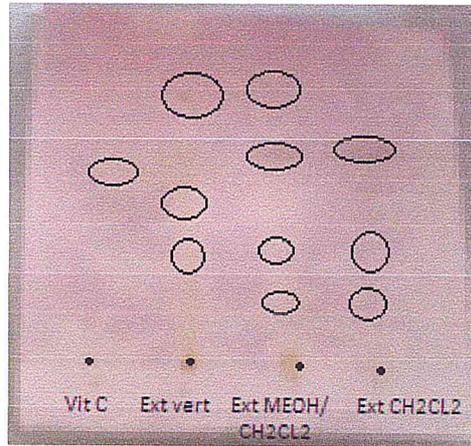


Figure 22 : Photographie des résultats d'un test DPPH sur plaque CCM permettant d'estimer l'activité antiradicalaire des extraits de *Zonaria tournefortii*

II.2.6.2 Test antiradicalaire mesuré au spectrophotomètre

L'activité antiradicalaire a été évaluée en utilisant le DPPH, qui fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant. En effet, les absorbances $A_{\text{contrôle}}$ et $A_{\text{échantillon}}$ obtenues permettent de calculer pour chaque solution préparée le pourcentage d'inhibition (% inh) correspondant selon la formule suivante [91] :

$$\% \text{ Inh} = \frac{\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

Avec :

% Inh : Pourcentage d'inhibition.

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

Abs contrôle : Absorbance à 517 nm de la solution méthanol + DPPH.

Le radical libre DPPH \cdot a permis l'estimation de l'activité antioxydante des extraits préparés grâce à sa sensibilité à détecter les composants actifs à des basses concentrations. L'activité antiradicalaire a été estimée spectrophotométriquement en suivant la réduction du DPPH \cdot à 517nm. Les figures 23 et 24 illustrent l'efficacité des extraits obtenues par le procédé d'extraction classique et le procédé d'extraction vert à piéger le radical DPPH \cdot , traduite par le taux d'inhibition (I%) en fonction des différentes concentrations.

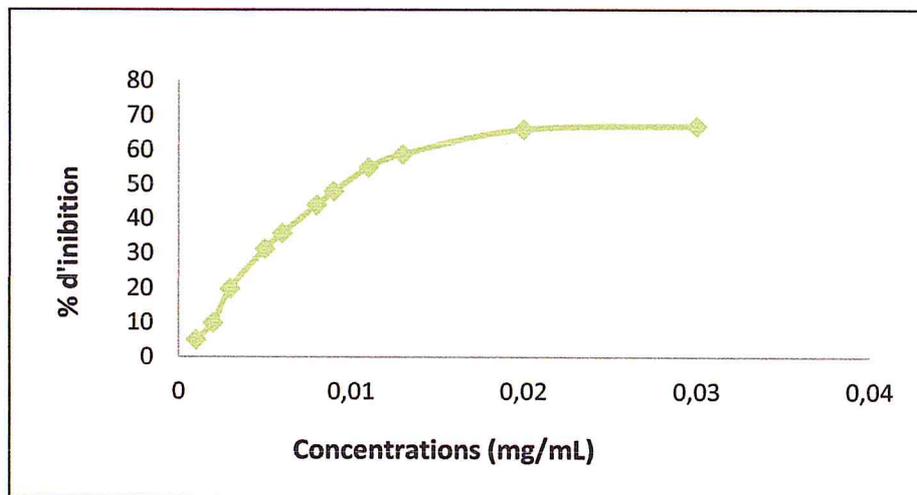


Figure 23 : Variation du taux de piégeage du DPPH• par l'extrait vert de *Zonaria tournefortii* en fonction des différentes concentrations

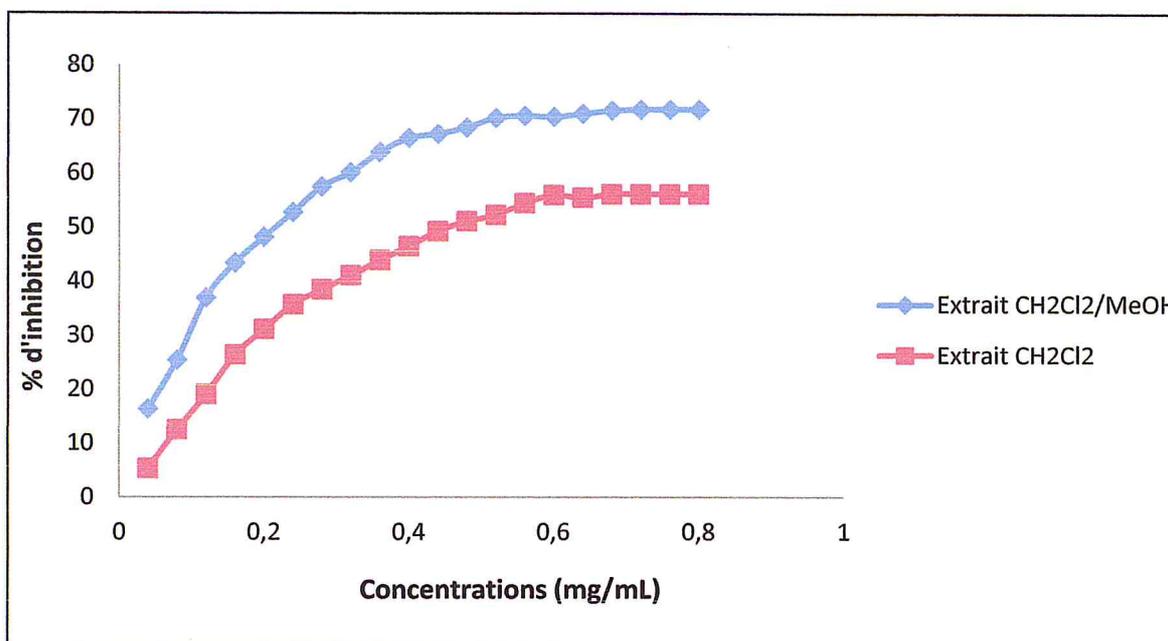


Figure 24 : Variation du taux de piégeage du DPPH• par les deux extraits classique de *Zonaria tournefortii* en fonction des différentes concentrations

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide ascorbique (vitamine C) et le BHT. Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 25.

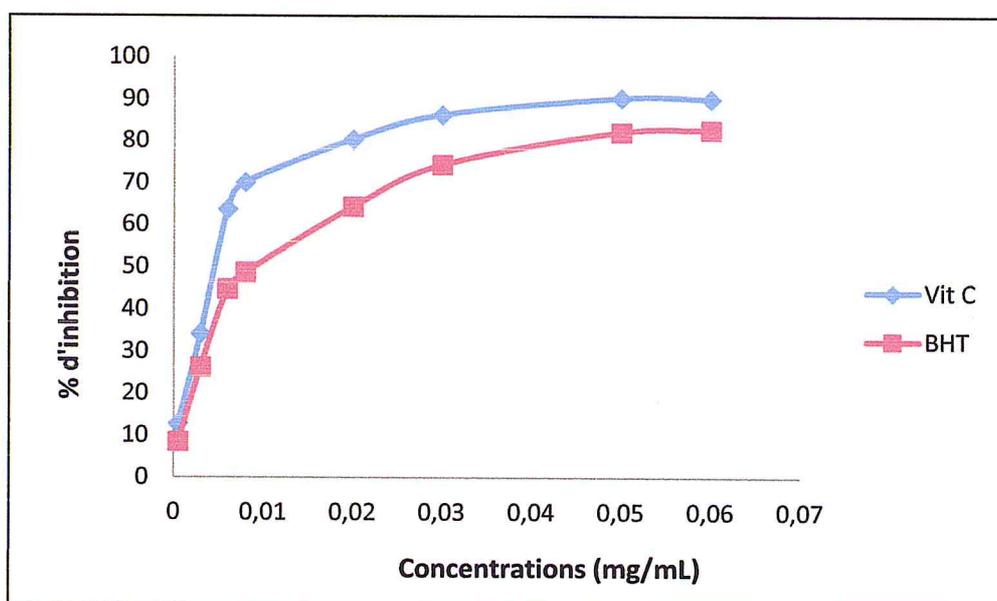


Figure 25 : Variation du taux de piégeage du DPPH• par la vitamine C et BHT en fonction des différentes concentrations

Le pourcentage d'inhibition augmente graduellement ou progressivement jusqu'à arriver à un plateau qui correspond à l'enrayement presque total du DPPH• présent dans le milieu. A partir des courbes des taux d'inhibition, nous avons pu déduire graphiquement les valeurs de CE_{50} des extraits de *Zonaria tournefortii* et des antioxydants standards, la Vitamine C et le BHT, les résultats sont représentés dans le tableau 06.

Tableau 06: CE_{50} des extraits de *Zonaria tournefortii* et des antioxydants standards

Echantillons testés	CE_{50} (mg/mL)
Vitamine C	0.0049
BHT	0.0085
Extrait vert	0.0094
Extrait MeOH/CH ₂ CL ₂	0.229
Extrait CH ₂ CL ₂	0.470

La valeur de CE_{50} est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante (taux d'inhibition I%) d'un composé, car elle reflète la quantité d'antioxydant requise pour neutraliser 50% de la concentration initiale du radical libre dans le milieu. Notons que plus la valeur de CE_{50} est faible, plus l'activité antiradicalaire d'un composé est appréciable [92].

Un autre paramètre exprime la puissance antiradicalaire a été calculée à partir du premier est noté : "ARP" (pouvoir antiradicalaire, égale à $1/CE_{50}$) [93].

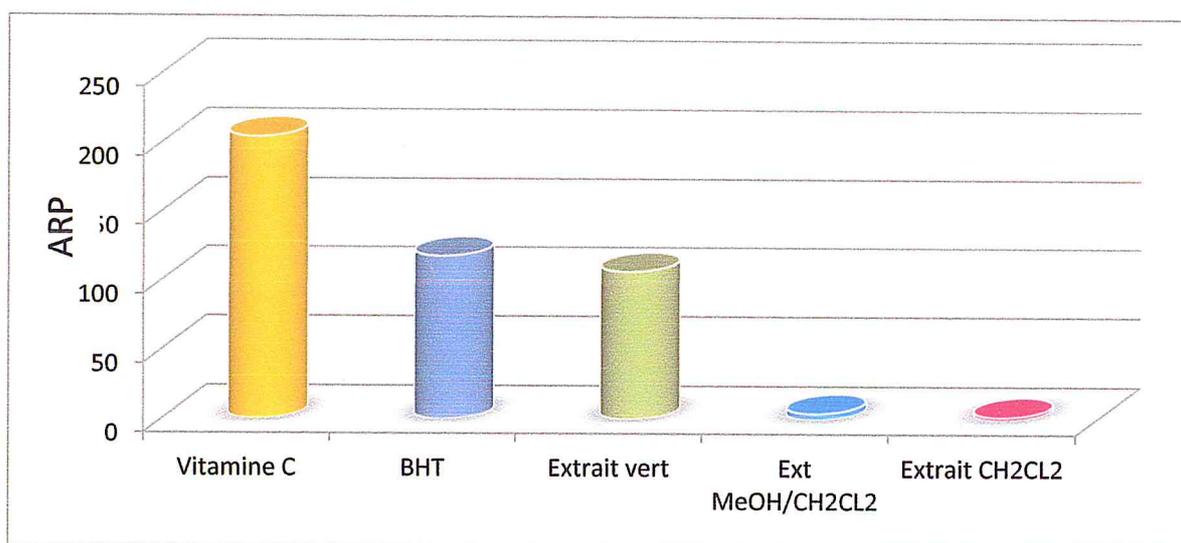


Figure 26 : Comparaison des valeurs ARP des extraits de *Zonaria tournefortii* et des antioxydants standards

Le potentiel antiradicalaire global des extraits d'algue brune *Zonaria tournefortii* est inférieur à celui des antioxydants standards la vitamine C et le BHT, dont les valeurs CE_{50} sont respectivement de 0,0049 mg/ml et 0.0085 mg/ml. Ceci est expliqué du fait que les extraits naturels sont composés d'un mélange complexe de produits actifs et inactifs, en comparaison avec les standards antioxydants qui sont des produits purs.

Cependant, parmi les trois extraits testés, l'extrait vert arrive en tête des résultats avec une CE_{50} égale à 0.0094 mg/ml, suivi de l'extrait classique préparé avec le mélange MeOH/CH₂Cl₂ avec une valeur de 0.229 mg/ml et finalement l'extrait préparé avec le CH₂Cl₂ qui semble être le moins performant avec une CE_{50} de 0.470 mg/ml. La très forte activité inattendue de l'extrait vert préparé avec l'eugénol par rapport à celle des extraits classiques est fort probablement due à la présence résiduelle du solvant vert dans l'extrait, notant que l'eugénol est un composé phénolique pur possédant une très forte activité antioxydante [94].

II. 2.6.3 Pouvoir réducteur (FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power)

Le pouvoir réducteur d'un composé peut servir à indiquer significativement son potentielle d'activité antioxydante. Dans la méthode FRAP, la présence des réducteurs dans la solution cause la réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}).

Les résultats obtenus illustrés par la figure 27, montrent que la capacité de réduction du fer est extrêmement variable d'un extrait à autre. En effet, l'extrait vert présente une valeur FRAP plus élevée par rapport aux deux extraits classiques avec une valeur de 7,2 mg/ml.

Les extraits classiques préparés avec le mélange MeOH/ CH_2Cl_2 et CH_2Cl_2 donnent respectivement des valeurs FRAP de 2,5 et 0.80 mg/ml. Les résultats obtenus avec la méthode FRAP sont en accord de ceux obtenus avec le test DPPH•.

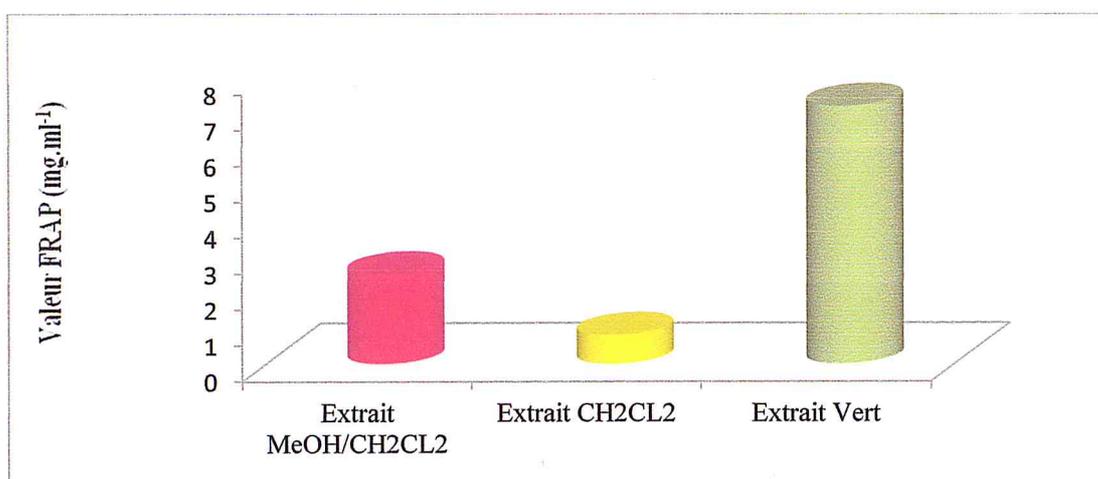


Figure 27 : Histogrammes, exprimés en valeur FRAP, illustrant l'activité antioxydante des extraits de *Zonaria tournefortii* obtenus à partir du procédé d'extraction classique et du procédé d'extraction vert

II. 2.7 Etude du pouvoir antimicrobien des extraits de *Zonaria tournefortii*

II. 2.7.1 Activité antibactérienne

Nous avons étudié le pouvoir antibactérien des extraits de *Zonaria tournefortii* par la méthode de diffusion sur un milieu gélosé (Aromatogramme). L'activité antibactérienne de nos extraits est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester. L'estimation de l'activité antimicrobienne des extraits est basée sur une échelle de mesure mise en place par Ponce et al [95], ils ont classé le pouvoir antimicrobien, en fonction des diamètres des zones d'inhibitions de la croissance microbienne, en 04 classes :

- ◆ Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieure à 20 mm.

- ♦ Modérément inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition varie entre 15 et 19 mm.
- ♦ Légèrement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition varie entre 9 et 14 mm.
- ♦ Non inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition varie entre 0 et 8 mm.

Selon les résultats représentés dans le tableau 07, l'extrait préparés par le procédé d'extraction classique montrent une activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries à Gram positif, à savoir : *Bacillus ceureus* et *Staphyloccocus aureus*, tandis que les bactéries à Grams négatif *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* n'ont présenté aucune activité.

Cependant, les résultats de l'évaluation qualitative de l'activité antibactérienne de l'extrait vert ont montré un pouvoir antibactérien légèrement inhibiteur sur la bactérie *Staphyloccocus aureus* tandis que les autres bactéries n'ont présenté aucune activité.

Les résultats qualitatifs du pouvoir antibactérien des différents extraits sur les souches bactériennes étudiées sont représentés en photos par la figure 28.

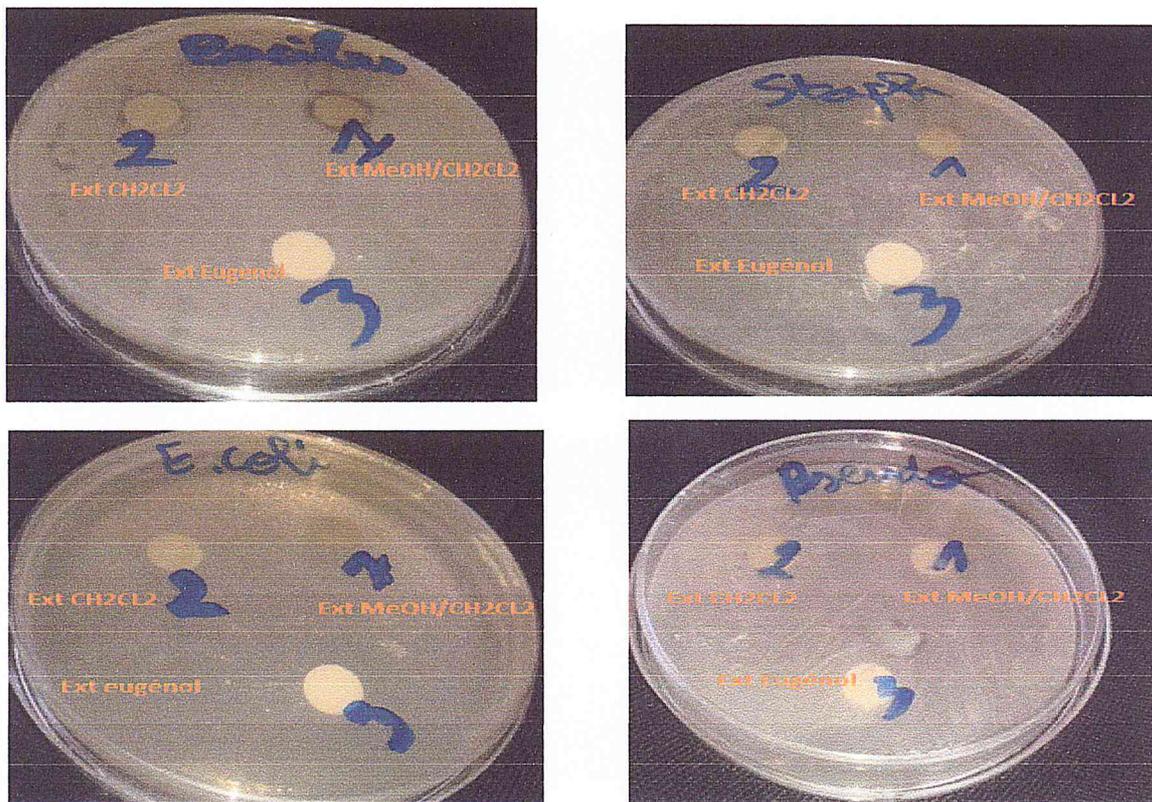


Figure 28 : Aromatogrammes des bactéries testées avec l'extrait classique et l'extrait vert de *Zonaria tournefortii*

Tableau 07 : Activité antimicrobienne des extraits de *Zonaria tournefortii* sur les souches de références

Extrait		Souches	Gram	Diamètre d'inhibition (mm)
Extrait Classique	Extrait préparé avec le mélange MeOH/CH ₂ CL ₂	<i>Escherichia coli</i>	-	Résistante
		<i>Bacillus ceureus</i>	+	16
		<i>Staphyloccocus aureus</i>	+	13
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Résistante
	Extrait préparé avec le CH ₂ CL ₂	<i>Escherichia coli</i>	-	Résistante
		<i>Bacillus ceureus</i>	+	14
		<i>Staphyloccocus aureus</i>	+	12
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Résistante
Extrait Vert	Extrait préparé avec l'eugénol	<i>Escherichia coli</i>	-	Résistante
		<i>Bacillus ceureus</i>	+	Résistante
		<i>Staphyloccocus aureus</i>	+	11
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Résistante

Les diamètres des zones d'inhibition ont été traduits dans l'histogramme suivant :

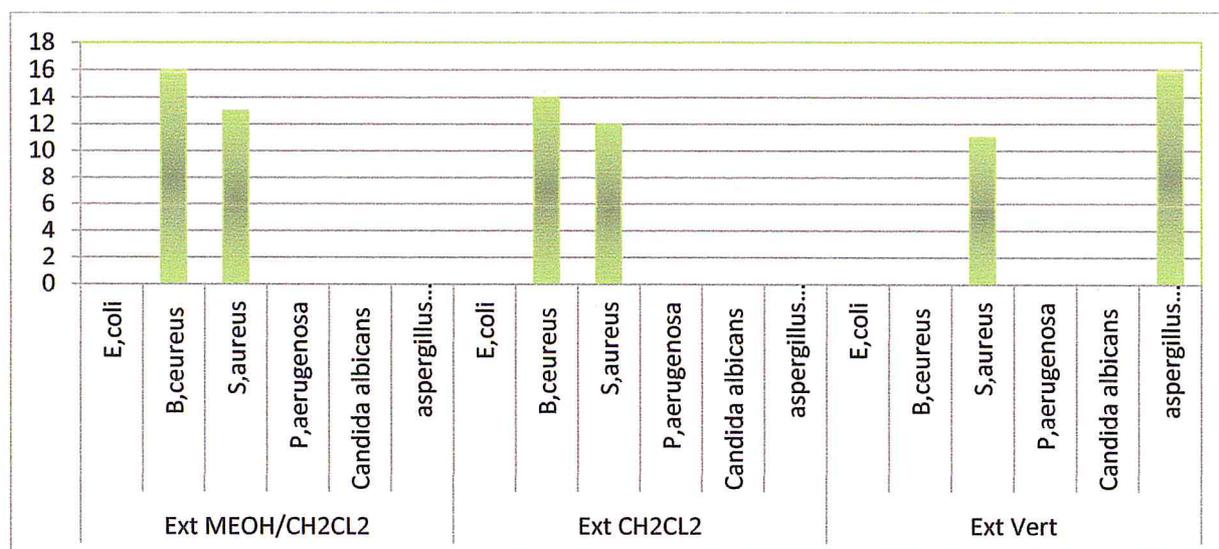


Figure 29 : Histogrammes illustrant les zones d'inhibition exprimées en millimètre

II. 2.7.2 Activité antifongique

Les extraits de *Zonaria tournefortii* ont été testés sur une levure *Candida albicans* et un champignon *Aspergillus Braziliensens* afin d'évaluer son pouvoir antifongique, les résultats illustrés par la figure 30 montrent que les extraits testés n'ont pas d'activité antifongique, excepté, l'extrait vert qui possède un pouvoir antibactérien modéré sur la souche *Aspergillus Braziliensens*.



Figure 30 : Aromatochromes des fongiques testées avec l'extrait classique et l'extrait vert de *Zonaria tournefortii*

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

L'objectif de notre mémoire est le développement d'une nouvelle méthodologie d'extraction « verte » basée sur l'utilisation d'un « agro-solvant » en l'occurrence l'eugénol.

La première partie de notre travail a été consacrée à une synthèse bibliographique portant d'une part, sur le concept de chimie verte et de l'Eco-extraction des produits naturels, et les différents travaux de recherche portant sur les procédés d'extraction verts et les solvants alternatifs, et d'autre part sur, l'étude de l'espèce *Zonaria tournefortii*.

La seconde partie de ce travail consiste à une étude expérimentale qui met en évidence le développement d'un procédé d'extraction basé sur l'utilisation d'un agro-solvant, dans notre cas l'eugénol. Dans un but comparatif, deux autres extraits ont été préparés par macération dans des solvants classiques à savoir le CH_2Cl_2 et le mélange ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (v/v : 1/1)). En effet, des rendements d'extraction de 0,49%, 0,47% et 2.16% ont été obtenus respectivement à partir des extraits préparés par l'eugénol, le CH_2Cl_2 et le mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$.

Les deux extraits obtenus par les deux procédés d'extraction ont été soumis à des analyses chimiques et biologiques. Les analyses chimiques ont porté sur le dosage des produits phénoliques totaux par le test de Folin-Ciocalteu et sur la comparaison des profils chromatographiques CLHP des deux extraits obtenus. Les analyses biologiques ont consisté à la réalisation des tests d'activité antibactérienne et antifongique, et à l'évaluation de l'activité antioxydante, en procédant à la mesure du pouvoir anti-radicalaire par le test DPPH, et à la détermination du pouvoir antioxydant réducteur du fer ferrique FRAP.

Les résultats du dosage des produits phénoliques par le test de Folin-Ciocalteu ont met en évidence que la teneur en composés phénoliques d'extrait vert est significativement supérieure à celle des extraits classiques préparés avec le CH_2Cl_2 et le mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ avec des valeurs respectives de 22, 3.5 et 7.25 mg.EPG/g d'extrait sec. Par ailleurs, l'analyse par CLHP/DAD-UV, a montré que les profils chromatographiques des extraits de *Zonaria tournefortii* sont relativement semblables.

Les résultats de l'activité antioxydante indiquent une variation de CE50 entre 0.0094mg/ml, 0.470 et 0.229 mg.ml⁻¹ correspond respectivement aux extraits préparés par l'eugénol le CH_2Cl_2 et le mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. En outre, l'activité antimicrobienne des extraits de *Zonaria tournefortii* a été évaluée par la méthode de diffusion sur gélose. Les résultats obtenus ont montré que les extraits de *Zonaria tournefortii* possèdent une activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries à Gram positif, tandis que les bactéries à Grams négatif

Escherichia coli, *Pseudomonas aeruginosa* n'ont présenté aucune activité. De même les extraits testés n'ont présenté aucune activité antifongique à l'exception de l'extrait vert qui possède un pouvoir antibactérien modéré sur le champignon *Aspergillus Braziliensis*.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail sont très encourageant pour la suite de notre étude. Nous comptons généraliser le travail en procédant à l'utilisation d'autres « agrosolvants » et la comparaison chimique et biologique des extraits obtenus avec ceux préparés avec des solvants classiques.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- [1]- A. Farhat, A.-S. Fabiano-Tixier, M. El Maataoui, J. Maingonnat, M. Romdhane, F. Chemat, « Microwave steam diffusion for extraction of essential oil from orange peel: Kinetic data, extract's global yield and mechanism », *Journal of Food Chemistry*, 125, 255-261, (2011).
- [2] - F. Chemat « Eco-Extraction des produits naturels : procédés innovants et solvants Alternatifs » Groupe de Recherche en Eco-Extraction des produits Naturels. Ed. Technique et Ingénierie, Dunod, p. 336, 2014.
- [3]- I. Ignat, I. Volf, V.-I. Popa « A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables », *Journal of Food Chemistry*, 126 1821-1835, (2011).
- [4]- H. Bewa. C. Alfos « Le marché des agrosolvants », *OCL*, 12 (4), 295-298, (2005).
- [5]-Kh. R.Temsamani « la chimie vert », article de synthèse, les technologies de laboratoire– 19, n°5 juillet-août, (2007).
- [6]- C.John, Warner, S .Amy, Cannon, M.Kevin, Dye« Green chemistry», *Environmental Impact Assessment Review*, 24, 775–799,(2004).
- [7]- F. Chemat, et al. « Green extraction of natural products (GENP2013). » *C. R. Chimie* (2014).
- [8]- J.A Mendiola,,M. Herrero,,A.Cifuentes . and Ibañez, « Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. » *Journal of Chromatography A*, 1152(1-2)234-246,(2007).
- [9]- F.Chemat , M. AbertVian «Alternative solvents for natural products extractions»; *Green extraction and sustainable technology*, Springer Heidelberg New York (2014).
- [10]- P.T Anastas, « Green Chemistry and the role of analytical methodology development. » *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 29(3), 167–175, (1999).
- [11]- F. Chemat, « Éco-extraction du végétal, Procédés innovants et solvants alternatifs », Ed .Technique et Ingénierie, Dunod, (2011).

- [12]- M .Francesca, Kerton « Alternative Solvents for Green Chemistry»*Department of Chemistry, Memorial University of Newfoundland, St. John's, NL, Canada* (2009).
- [13]- S. Bertouche, V. Tomao, K. Ruiz, A. Hellal, C. Boutekedjiret, F. Chemat, « First approachon moisture determination in food products using alpha-pinene as an alternative solvent for Dean–Stark distillation », *Journal of Food Chemistry*, 134, 602-605, (2012).
- [14]- C.-D.Tanzi, M.-A. Vian, C. Ginies, M. Elmaataoui, F. Chemat, « Terpenes as Green Solvents for Extraction of Oil from Microalgae », *Journal of Molecules*, 17, 8196-8205, (2012).
- [15]- S. Veillet, V. Tomao, K. Ruiz, F. Chemat, « Green procedure using limonene in the Dean–Stark apparatus for moisture determination in food products », *Journal of AnalyticaChimicaActa*, 674, 49-52, (2010).
- [16]- M. Viroto, V. Tomao, C. Ginies, F. Visinoni, F. Chemat, « Green procedure with a green solvent for fats and oils' determination Microwave-integrated Soxhlet using limonene followed by microwave Clevenger distillation », *Journal of Chromatography A*, 1196-1197, 147-152, (2008).
- [17]- Z. Chemat-Djenni, M.-A.Ferhat, V. Tomao, F. Chemat, « Carotenoid Extraction from Tomato Using a Green Solvent Resulting from Orange Processing Waste », *Journal of Jeobp*, 13 (2), 139-147, (2010).
- [18]- M.Castro-Puyana, M.Herrero,I.Urreta ,JA. Mendiola,A. Cifuentes , E.Ibáñez ,S. Suárez- Alvarez , «Optimization of clean extraction methods to isolate carotenoids from the Microalga *Neochlorisoleoabundans* and subsequent chemical characterization using liquid chromatography tandem mass spectrometry. », *Anal.Bioanal. Chem.*, 405, 4607– 4616, 2013.
- [19]- S.Rodriguez-Rojo, A. Visentin, D. Maestri, M.-J. Cocero, « Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents », *Journal of Food Engineering*, 109, 98-103, (2012).
- [20]- R .Cardoso de Oliveira, S.-T.Davantel de Barros, M.-L.Gimenes, « The extraction of passion fruit oil with green solvents », *Journal of Food Engineering*, 117, 458-463, (2013).

- [21]- Y. Li, A.-S. Fabiano-Tixier, V. Tomao, G. Cravotto, F. Chemat, « Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent », *Journal of Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 12-18, (2013).
- [22]-A. Wolfson .Ch. Dlugy . Yoram Shotland«Glycerol as a green solvent for high product yields and selectivities»,*Environ Chem Lett* 5, 67–71, (2007).
- [23]-F.Bakkali.,S. Averbek.,D. Averbek. et M. Idaomar., « Biological effects of essential oils » A review, *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475, (2008).
- [24]-A.Sabri « synthèse des amino-dérivés des sym-triazines contenant des résidus de phénol stériquement encombrés et leurs applications », mémoire de magister, génie chimique, Université M'Hamed Bougara de Boumerdes (2006).
- [25]- S. Berger & D. Sicker « Classics in Spectroscopy: Isolation and Structure Elucidation of Natural products» WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (2009).
- [26]- E.Teuscher.,R. Anton. et A.Lobstein., « Plantes aromatiques épicées, aromates », condiments et huiles essentielles, Edition Tec and Doc, Lavoisier : (6), 266-272, (2005).
- [27]-G. Kozam, « The effect of eugenol on nerve transmission », *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* (44), 799-805, (1977).
- [28]-Y. Hikasa., K.Takase , T. Ogasawara , et S.Ogasawara., « Anesthesia and recovery with tricaine methanes ulfonate, eugenol and thiopental sodium in the carp », *Cyprinus carpio*, *Jpn J. Vet.Sci.* 48,341-351, (1986).
- [29]- AB Sell. et EA Carlini « Anesthetic action of methyleugenol and other eugenol derivatives», *Pharmacology*, 14, 367-377, (1996).
- [30]- P. Lebeau ,et G.Courtois G, « Traité de pharmacie chimique – Tome II », Masson et Cie, (1929).
- [31]- I.Sudarma, M. Ulfa, et Sarkono, « Chemical transformation of eugenol isolated from clove oil to 4-allyl- 2-methoxy-6-sulfonicphenol and 4-allyl-2-methoxy-6-aminophenol », *Indo. J. Chem.*, 9 (2), 267-270, (2009).
- [32]- O. De Clerck ,F. Leliaert , H.Verbruggen , CE Lane, JC .De Paula, DA Payo et E. Coppejans,« A revised classification of the Dictyoteae (Dictyotales, Phaeophyceae) based on *rbc* and 26S ribosomal DNA sequences analyses. »*Journal of Phycology*, 42

- (6), 1271-1288, (2006).
- [33]- F. Debray, « Catalogue des algues du Maroc, de l'Algérie et de la Tunisie », Librairie A. Ed. Jourdan-Alger, 78p.(1893),
- [34]- J.-A. Phillips, « Genus and species concepts in *Zonaria* and *Homoeostrichus* (Dictyotales, Phaeophyceae), including the description of *Exallosorus* gen. nov. », *Journal of Phycology*, 32(3), 303-311, (1997).
- [35] - C.-J. Hillson, « Seaweeds, a Color-Coded, Illustrated Guide to Common Marine Plants of the East Coast of the United States », Pennsylvania State University, (1977), 194p.
- [36] - M.-C. Durieu de Maisonneuve, Delamare, « Exploration scientifique de l'Algérie pendant les années 1840, 1841, 1842... », Imprimerie nationale, 600p, (1849).
- [37] J. Cabioch, J.-Y. Floch, A. Le Toquin, C.-F. Boudouresque, A. Meinesz, M. Verlaque « Guide des Algues des mers d'Europe : Manche/Atlantique », Ed. Delachaux et Niestlé, 231p,(1992),
- [38]- F. Belkhiri « Activité antimicrobienne et antioxydante des extraits du *Tymus communis* L. et *Carthamus scaberrimus* L. » Mémoire de Magister, Université de SETIF (2009).
- [39]- J. Bouayed « Etude de la corrélation anxiété / statut oxydatif des granulocytes chez la souris et évaluation des effets antioxydants / neuroactifs des polyphénols extraits de *Prunus domestica* L. » Thèse de doctorat, Université de Paul Verlaine-Metz. (2007).
- [40]-J.Bruneton, « Pharmacognosie, Phytochimie, Plante médicinales. Lavoisier Technique & Documentation, » 3ème éd., Paris, pp. 1120, (2008).
- [41]- A. Chouikhi « Les applications potentielles des macroalgues marines et les activités pharmacologiques de leurs métabolites : Revue » *Institute of Marine Sciences & Technology/ Dokuz Eylul University*(2013).
- [42]- A. Peroumal «caractérisation des fruits et de la pulpe de six accessions de *mammea americana*. Aptitude a la transformation des fruits et caractérisation des composés phénoliques de la pulpe » Thèse de doctorat, Sciences agronomiques, biotechnologies agro – alimentaires (2014).

- [43]- M. Estrella ,G.Perez, « Caractérisation de composés phénoliques des extraits de Ramilles du bouleau jaune : étude de leur capacité antioxydante », Mémoire pour l'obtention du grade de maître es sciences (M.Se.), Université Laval, (2008).
- [44]- I. Khaldoun « optimisation du transport des cations cu(ii), zn(ii) et cd(ii) par le tri-n-butylphosphate (tbp) a travers les membranes d'affinite »,Memoire de Magister, Chimie de l'Environnement,Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou (2011).
- [45]- S.-m. kang, s.-h. cha, j.-y. ko, m.-c. kang, d. kim, s.-j. heo, j.-s. kim, m.-s. heu, y.-t. kim, w.-k. jung, y.-j. jeon, « neuroprotective effects of phlorotannins isolated from a brown alga, *ecklonia cava*, against h₂O₂-induced oxidative stress in murine hippocampal ht22 cells », Journal of environmental toxicology and pharmacology, 34, 96-105, (2012).
- [46]- Soo-Jin Heo , Seok-Chun Ko , Sung-Myung Kang , Seon-Heui Cha , Seung-Hong Lee , Do-Hyung Kang , Won-Kyo Jung , Abu Affan , ChulhongOha, You-Jin Jeon «Inhibitory effect of diphlorethohydroxycarmalol on melanogenesis and its protective effect against UV-B radiation-induced cell damage »Food and Chemical Toxicology, 48, 1355–1361 (2010).
- [47] - R. Castro, R. Natera, E. Durán, C. García-Barroso, « Application of solid phase extraction techniques to analyse volatile compounds in wines and other enological products »,European Journal of Food Research and Technology,228, 1-18, (2008).
- [48]- N. Bouzidi, « Determiation des sterols de l'algue rouge *Asparagopsisarmata* par spectrométrie infrarouge a transformée de fourier en employant l'extraction en phase solide : Etude comparative avec la chromatographie liquide a haute performance », Mémoire de Magister, (2003).
- [49]- H. Ye, C. Zhou, Y. Sun, X. Zhang, J. Liu, Q. Hu. X. Zeng, « Antioxidant activities in vitro of ethanol extract from brown seaweed *Sargassum pallidum* », Journal of European Food Research and Technology, 230, 101-109, (2009).
- [50]- K.Werner Glombitza,M. Keusgent, « Fuhalols and deshydroxyfuhalols from the Brown alga *SargassumSpinuligerum*»,Phytochemistry, 38 (4), 987–995, (1995).
- [51]- K.-W. Glombitza, A. Schmidt, «Trihydroxyphlorethols from the brown alga *Carpophyllumangustifolium*», Journal of Phytochemistry, 51, 1095-1100, (1999).
- [52]- K. Le Lann, S. Connan, V. Stiger-Pouvreau, « Phenology, TPC and size-fractioning

phenolics variability in temperate Sargassaceae (Phaeophyceae, Fucales) from Western Brittany: Native versus introduced species », *Journal of Marine Environmental Research*, 80, 1-11, (2012).

- [53]- S.-J. Heo, S.-C.Ko, S.-H. Cha, D.-H.Kang, H.Sik Park, Y.-U.Choi, D. Kim, W.-K. Jung, Y.-J. Jeon, « Effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on melanogenesis and their protective effect against photo-oxidative stress induced by UV-B radiation » , *Journal of Toxicology in Vitro*, 23, 1123-1130, (2009).
- [54]- S-Jin Heo , S-Chun Ko , S-Myung Kang , S-Heui Cha , S-Hong Lee, Do-HyungKang , Won-Kyo Jung , Abu Affan , ChulhongOha, You-Jin Jeon «Inhibitory effect of diphllorethohydroxycarmalol on melanogenesis and its protective effect against UV-B radiation-induced cell damage »*Food and Chemical Toxicology*,48, 1355–1361, (2010).
- [55] - D.-W. Laird, S. Bennett, B. Bian, B. Sauer, K. Wright, V. Hughes, I-A.vanAltena, «Chemical investigation of seven Australasian Cystophora species: New chemistry and taxonomic insights», *Journal of Biochemical Systematics and Ecology*, 38, 187-194, (2010).
- [56]- V. Amico, R. Currenti, G. Oriente, M. Piattelli, C. Tringali, « A phloroglucinol Derivative from the brown alga *Zonariatournefortii*», *Journal ofPhytochemistry*,20, 1451-1453, (1981).
- [57]- A .Rodriguez-Bernaldo de quiros ,S. Frecha-Ferreiro., A.M.Vidal-Perez ,J.Lopez-Hernandez «Antioxidant compounds in edible brown seaweeds. »*Eur. Food Res. and Technol.*, 23 (3), 495-498, (2010).
- [58]- T. Michel, « Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification :Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippopharhamnoides*) », Thèse de Doctorat: Chimie Analytique - Phytochimie, Université d'Orléans, (2011).
- [59]- H. Liu, L. Gu, « Phlorotannins from Brown Algae (*Fucusvesiculosus*) Inhibited the Formation of Advanced Glycation Endproducts by Scavenging Reactive Carbonyls », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 1326-1334, (2012).
- [60]- T. Shibata, K. Ishimaru , S. Kawaguchi, H. Yoshikawa, Y. Hama, « Antioxidant activities of phlorotannins isolated from Japanese *Laminariaceae* », *Journal of Applied Phycology*,20, 705-711 (2008).

- [61]- R-J. Gauthuret « Les composés phénoliques des végétaux. » Université de Bordeaux. p 7-87-1234-133, (1968).
- [62]- A. López, M. Rico, A. Rivero, M. Suárez de Tangil « The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulonscoparium* algae extracts », *Journal of Food Chemistry*, 125, 1104-1109, (2011).
- [63]- S.-H. Lee, M.-H.Park, S.-J.Heo, S.-M.Kang, S.-C.Ko, J.-S. Han, Y.-J. Jeon, « Dieckol isolated from *Ecklonia cava* inhibits α -glucosidase and α -amylase in vitro and alleviates postprandial hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice », *Journal of Food and Chemical Toxicology*, 48, 2633-2637, (2010).
- [64]- M. Nakai, N. Kageyama, K. Nakahara, W. Miki, « Phlorotannins as Radical Scavengers from the Extract of *Sargassumringgoldianum* », *Journal of Marine biotechnology*, 8, 409-414, (2006).
- [65]- W J. Hurst, « Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals. », 2^{ème} édition. CRC presse. Taylor et Francis. London, 548 p, (2008).
- [66]- S. Connan « Etude de la diversité spécifique des macroalgues de la pointe de la Bretagne et analyse des composés phénoliques des phéophycées dominantes », thèse de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale (2004).
- [67]- C. Bonnaillie, M. Salacs, E. Vassiliova, I. Saykova « Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachishypogaea L.*) » *Revue de génie industriel*, 7, 35-45 (2012).
- [68]- V. Amico, G. Nicolosi, G. Oriente, M. Piatelli, C. Tringali, « A novel acylphloroglucinol from the brown alga *Zonariatournefortii* », *Journal of Phytochemistry*, 21, 739-741, (1982).
- [69]- C. Tringali, M. Piatelli, « Two chromanederivatives from the brown alga *Zonariatournefortii* », *Journal of Tetrahedron Letters*, 23, 1509-1512, (1982).
- [70]- M. El Hattab, N. Bouzidi, A. Ortalo-Magné, Y. Daghbouche, M. Richou, S.-E. Chitour, B. Reviers, L. Pioveti, « Eicosapentaenoic acid: Possible precursor of the phloroglucinol derivatives isolated from the brown alga *Zonariatournefortii* (J.V. Lamouroux) Montagne », *Biochemical Systematics and Ecology*, 37, 55-58, (2009).

- [71]- P. Wisespongpan, M. Kuniyoshi, « Bioactive phloroglucinols from the brown alga *Zonaria diesingiana* », *Journal of Applied Phycology*, 15, 225-228, (2003).
- [72]- A.-j. Blackman, G.-I. Rogers, « Phloroglucinol derivatives from three Australian marine algae of the genus *Zonarza* », *Journal of Natural products*, 51, 158-160, (1988).
- [73]- W. Gerwick, W. Fenical, « Phenolic lipids from related marine algae of the order dictyotales », *Journal of Phytochemistry*, 21, 633-637, (1982).
- [74]- Y. Li, I. Wijesekara, S. Kim, « Phlorotannins as bioactive agents from brown algae », *Journal of Process Biochemistry*, 46, 2219-2224, (2011).
- [75]- N. Munir, N. Sharif, Sh. Nazand, F. Manzoor « Algae: A potent antioxidant source », *Sky Journal of Microbiology Research*, 1(3), pp. 22-31, (2013).
- [76]- Y.-M. A. Mohamed, A. Vik, T. Hofer, J.-H. Andersen, T.-V. Hansen, « Polyunsaturated fatty acid-derived chromones exhibiting potent antioxidant activity », *Journal of Chemistry and Physics of Lipids*, 170-171, 41-45, (2013).
- [77]- S.-H. Eon, Y.-H. Kim, S. Kwonkim, « Antimicrobial effect of phlorotannins from marine brown algae », *Journal of Food and chemical Toxicology*, 50, 3251-3255, (2012).
- [78]- A. Haddara, S. Sellimia, R. Ghannouchia, O.-M. Alvarezb, M. Nasria, A. Bougatefa, « Functional, antioxidant and film-forming properties of tuna-skin gelatin with brown Algae extract », *International Journal of Biological Macromolecules*, 51, 477-483 (2012).
- [79]- J.-M. Kornprobst. « Substances naturelles d'origine marine, chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologie », Ed. TEC & DOC, 598p, (2005).
- [80]- E. Portes « Synthèse et Etudes de Tétrahydrocurcuminoïdes : Propriétés Photochimiques et Antioxydantes, Applications à la Préservation de Matériaux d'Origine Naturelle. » Thèse de doctorat Université Bordeaux I, (2008).
- [81]- N. Blanca, D. Haucharda, L. Audibertb, E. Ar Gall, « Radical-scavenging capacity of phenol fractions in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*: An electrochemical approach », *Journal of Talanta*, 84, 513-518, (2011).

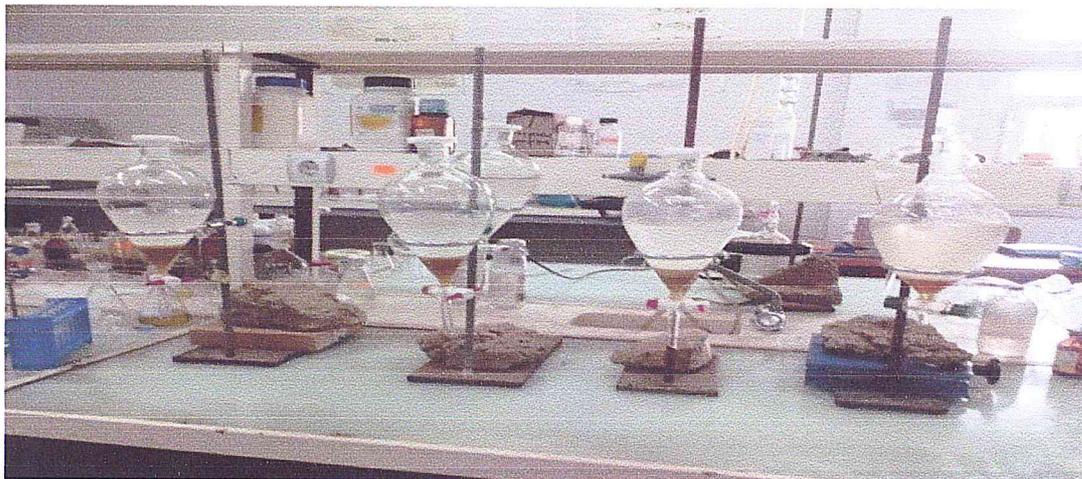
- [82]- A. Boudier, J. Tournebize, G. Bartosz, S. El Hanic, R. Bengueddourc, A. Sapin-Minet, P. Leroy, « High-performance liquid chromatographic method to evaluate the hydrogen atom transfer during reaction between 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical and antioxidants », *Journal of Analytica Chimica Acta*, 711, 97-106, (2012).
- [83]- A.-Y. Loo, K. Jain, I. Darah, « Antioxydant activity of compound isolated from the pyroligneous acid, *Rhizophora apiculata* », *Journal of Food Chemistry*, 107, 1151-1160, (2008).
- [84]- K. Tawaha, , F.-Q. Alali, M. Gharaibeh, M. Mohammad, T. El-Elimat « Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species », *Journal of food chemistry*, 104, 1372-1378, (2007).
- [85]- I.-F. F. Benzie, « An Automated, Specific, Spectrophotometric Method for Measuring Ascorbic Acid in Plasma (EFTSA) », *Journal of Clinical Biochemistry*, 29 (2), 111-116, (1996).
- [86]- Y. Farid, S. Etahiri et O. Assobhei « Activité antimicrobienne des algues marines de la lagune d'Oualidia (Maroc) : Criblage et optimisation de la période de la récolte. » *Journal of Applied Biosciences* ,24, 1543 - 1552. (2009).
- [87]- J.A.Estes. and P.D Steinberg «predation herbivory,and kelp evolution paleobiology», 14, 19-36, (2008).
- [88]- J.-L Fauchère, J.-L Avril, « Bactériologie générale et médicale, » Ed. Ellipses, 365 p, (2002).
- [89]- Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale, ministère de la sante, de la population et de la reforme hospitalière 5^{ème} édition, 112, 15-16 (2008).
- [90]- Y.-M. A. Mohamed, A. Vik, T. Hofer, J.-H. Andersen, T.-V. Hansen, « Polyunsaturated fatty acid-derived chromones exhibiting potent antioxidant activity », *Journal of Chemistry and Physics of Lipids*, 170-171, 41-45, (2013).
- [91]- G. G Leitão, S. G Leitão et W Vilegak, « Quik preparative separation of naturel Naphtopyranones with Antioxidant Activity by High-spee CounterChromatography.Z.», *Naturforsch*, 57c, 1051-1055,(2002).

- [92]- 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.*, 33,325-337,(2006).
- [93]- W. Brand-Williams, M.-E.Cuvelier, C. Berset, « Use of a Free Radical Method to evaluate antioxidant activity », *Journal of Lebensmittel-Wissenschaft and Technology*, 28, 25-30, (1995).
- [94]- I. Gülçin ,M.Elmastas .et H.Y Aboul-Enein, « Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source », original article, *Arabian Journal of Chemistry*, 5 (4), 489–499, 2012.
- [95]- A.-G. Ponce, R. Fritz, C. Valle, S.-I.Roura, « Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard », *Journal of LW- University of Technology*,36, 679-684, (2003).

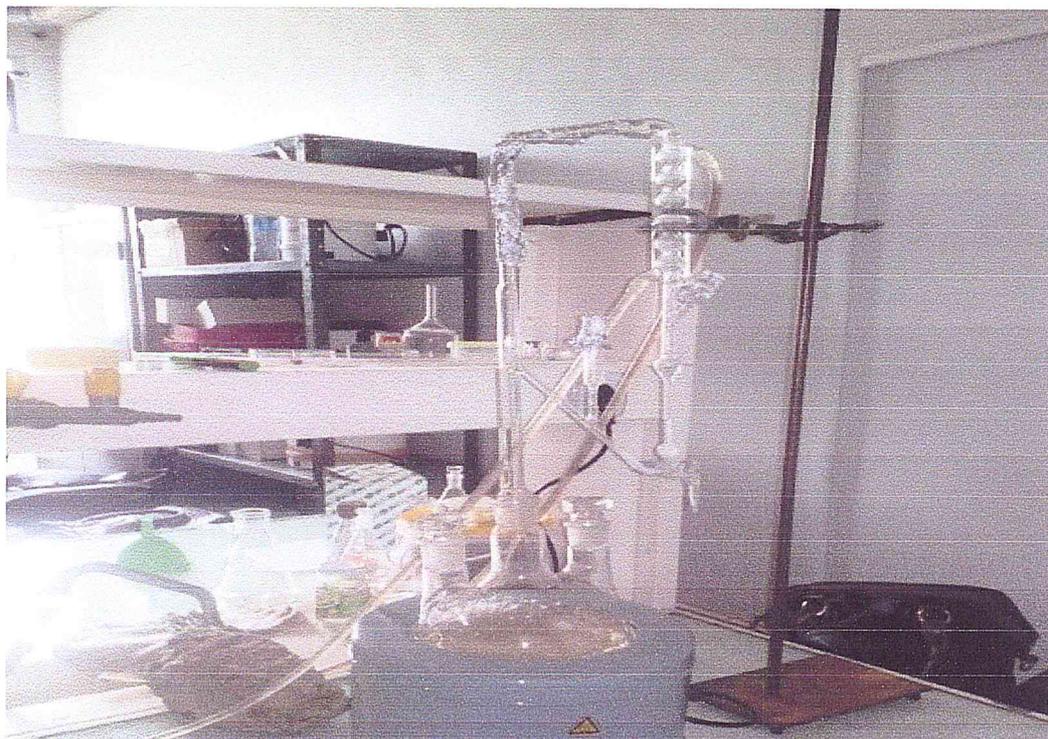
ANNEXES

ANNEXE 1

Annexe 1 (a) : Méthodologie de séparation du solvant vert « extraction liquide-liquide »

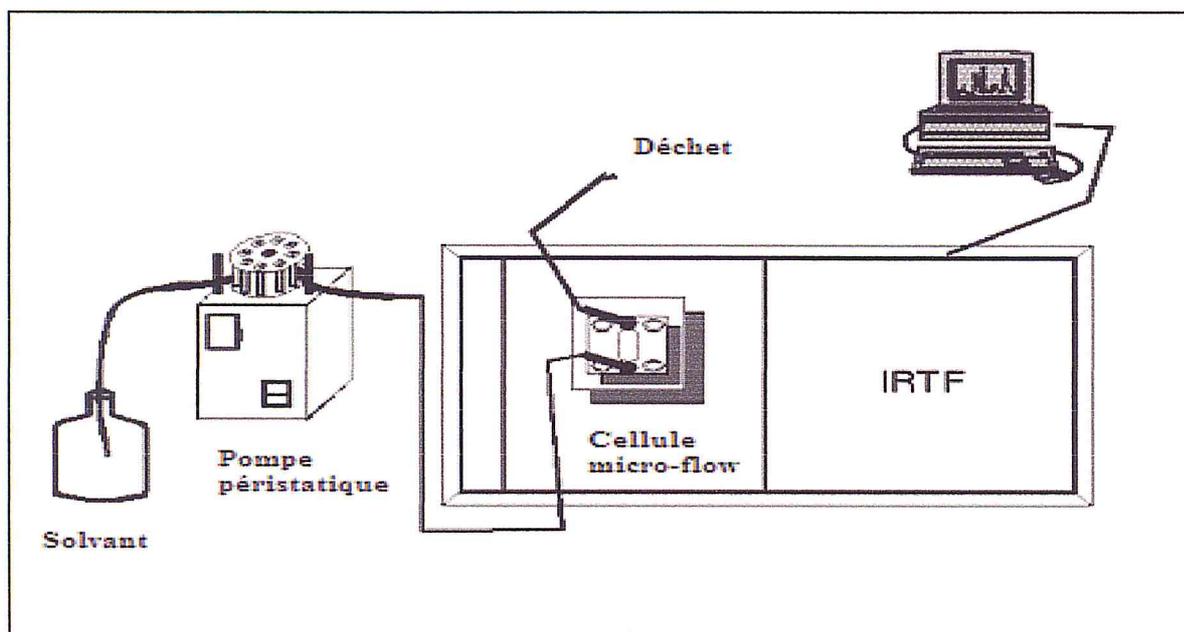


Annexe 1 (b) : Recyclage du solvant vert « hydrodistillation par un Clevenger »



ANNEXE 2

Annexe 2 (a) : Montage IRTF utilisé pour l'introduction des solutions dans la cellule

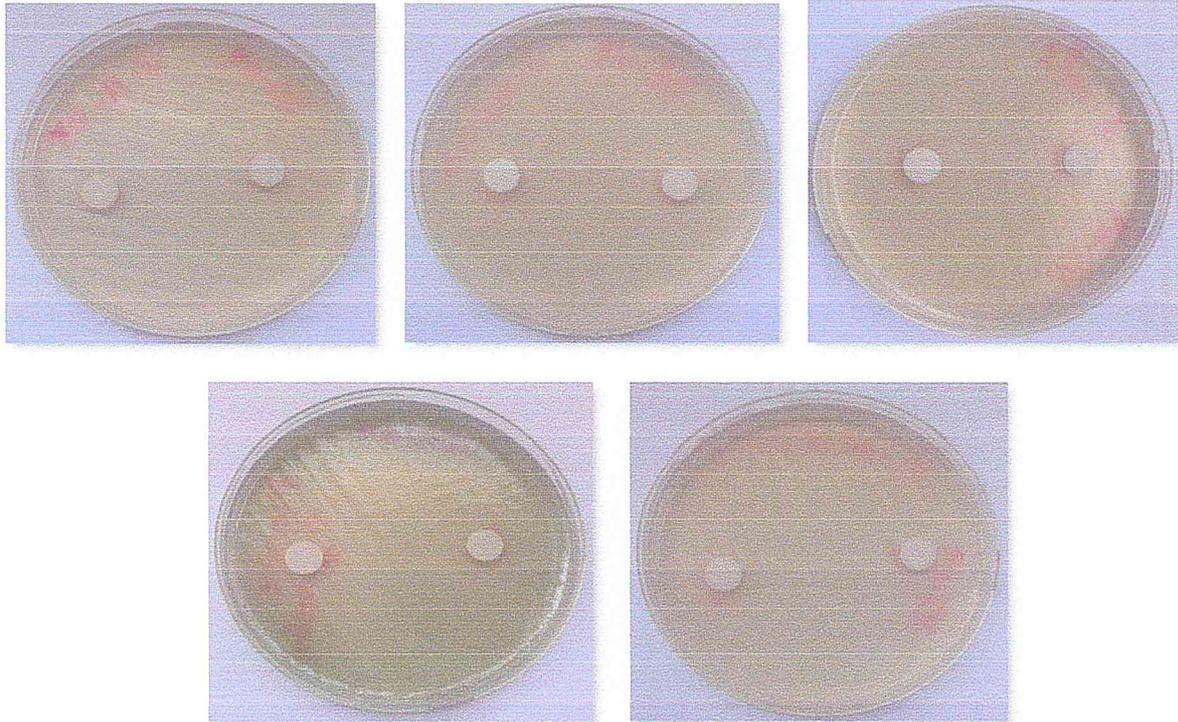


Annexe 2 (b) : Appareillage de la chromatographie liquide haute performance



ANNEXE 3

Annexe 3 (a) : Aromatogrammes des microorganismes testés avec les témoins négatifs MeOH et DMSO



Annexe 3 (b) : Composition des milieux de culture

Gélose Muller Hinton

Sabouraud

Infusion de viande de bœuf déshydraté 300g
 Hydrolysate de caséine 17,5g
 Amidon de maïs 15g
 Agar 13g
 Eau distillée 1L

pH = 7,4

Peptone de caséine 5g
 Peptone de viande 5g
 Glucose 40g
 Agar 15g
 Eau distillée 1L

pH = 5,6

