

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2020

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Présenté par :

Aoun Céline & Demouche Kenza

Thème

Evaluation *in vitro* du pouvoir antioxydant des métabolites bioactifs d'une espèce marine de la famille Dendrophylliidae

Soutenu le: 15 /07/2021

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
MAHDJOUR MOHAMED MALIK	MCB	Univ. de Bouira	Président
CHERGUI ACHOUR	MCB	Univ. de Bouira	Examineur
KADRI NABIL	MCA	Univ. de Bouira	Promoteur
ADOUANE MERIEME	Doctorante	Univ de Bouira	Co-promotrice

Année Universitaire : 2020/2021

REMERCIEMENT

Avant tout, on tient à exprimer nos remerciements les plus sincères tout d'abord au « Bon Dieu » de nous avoir donné la patience et la santé pour réaliser ce travail.

*On tient à remercier très sincèrement Monsieur **Kadri Nabil** notre promoteur d'avoir accepté de nous encadrés.*

*Nous remercions profondément notre chère Co-promotrice
Melle ADOUANE*

***Meriem** pour ses remarques, sa suivie attentive pour la réalisation de ce modeste travail.*

Nous adressons nos remerciements aux nombreuses personnes côtoyées dans les différentes équipes de laboratoire où nous avons réalisé les travaux de recherche de notre projet de fin d'études. Nous avons apprécié l'accueil, le soutien, l'amitié et/ou l'aide multiformes de chacun de vous.

*Mes vifs remerciements s'adressent aussi aux membres du Jury : Mr **Mahdjoub Mohamed Malik** qui nous a fait l'honneur de présider la soutenance de ce mémoire et Mr **CHERGUI A.** pour avoir accepté d'examiner ce manuscrit. Leurs remarques et leurs précieux conseils nous permettront d'améliorer notre travail au mieux*

Un grand merci à tous nos enseignants de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et particulièrement nos enseignants de spécialité Biochimie appliquée.

Enfin, nos remerciements vont à toutes les personnes qui ont contribué dépris ou de loin à la réalisation de ce modeste travail

Dédicace

A mes très chers grands parents Ihaddaden saïd et Azouze rezkia je tiens vous remercier du fond du cœur c'est grâce à vous que j'ai eu une maman en or

Et à la mémoire de mes grand parent paternel Aoun Daï et ma grande

Mère Saadia

A mes parents : Salîha et Aziz

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis, pour mon instruction et mon bienêtre.

Papa, dans ta détermination, ta force et ton honnêteté maman dans bonté, ta patience et ton dévouement pour nous

Merci pour tous vos sacrifices pour que vos enfants grandissent et prospèrent. Merci d'être tout simplement mes parents.

Ces a vous que je dois cette réussite

A ma chère sœur Hiyame et mon cher frère Youcef et sa femme Liza

Une spéciale dédicace à mon magnifique et merveilleux binôme qui compte énormément pour moi ma chérie Kenza

A mon futur conjoint

A mes chers amis : Fatîma (tata), Karîm ; sanîna, Yasmine. Sarah Fodhîl, Sarah Dahache, Amel, Houda

Malek

Céline

Dédicace

A la mémoire de mon grand-père Mohand Akli et mon cousin Samir qui ont béni mon désir d'apprendre et de réaliser leurs rêves de devenir ce que je suis à ce moment-là, que DIEU garde leur âme dans son vaste paradis. Malheureusement vous n'êtes pas présent parmi nous aujourd'hui.

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce travail à mon chère père Hafid et ma mère Sabrina qui se sont sacrifiés pour que je grandisse avec un savoir-faire et qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Que dieux les protège et les accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur.

Je dédie aussi cette réalisation à mes sœurs Ines et Alicia et mon frère Moussa.

A Toute ma famille

Une spéciale dédicace à mon magnifique et merveilleux binôme qui compte énormément pour

Moi « Céline »

A mes amis : Fatima (Tata), Sanina, Dalila, Fairouz, Nafia, Syfexe, Sarrah et Houda.

A tous ceux que j'aime

A tout qui sont dans mon cœur et dans mes yeux

Kenza

Table des matières

Remerciements

Dédicace

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des déviations

Introduction.....1

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.I. Présentation du genre *Astroïde*.....3

I.I.1. Taxonomie.....3

I.I.2. Répartition géographique, reproduction et description morphologique de *Astroïdes calycularis*.....4

I.I.3. Travaux antérieurs sur l'espèce *Astroïdes calycularis*.....5

I.I.3.1. Constituants chimiques.....5

I.I.3.2. Activités biologiques.....6

II. Généralités sur les métabolites primaires et secondaires.....7

II.1. Métabolites primaires.....7

II.2. Métabolites secondaires.....8

III. Activités biologiques, généralités et évaluation.....11

III.1. Méthodes d'évaluation du pouvoir anti radicalaire et antioxydant.....11

III.2. Rôle des antioxydants.....13

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

I. Matière première.....14

II. Analyses physico-chimiques.....14

II.1. Teneur en eau.....14

II.2. Teneur en cendre.....14

II.3. Teneur en lipides.....15

II.3.1. Extraction des lipides.....15

II.3.2. Rendement en lipides.....16

II.4. Teneur en sucres totaux.....16

II.4.1. Extraction des sucres.....16

II.4.2. Dosage des sucres totaux	16
II.5. Teneur des protéines totaux	16
II.5.1. Mode d'extraction des protéines (hydrosolubles).....	16
II.5.2. Dosage des protéines totaux	17
III. Dosages quantitatifs des métabolites secondaires.....	17
III.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux et de flavonoïdes.....	17
III.1.1. Extraction des polyphénols et flavonoïdes.....	17
III.1.2. Dosages des polyphénols et flavonoïdes.....	18
III.2. Teneur des tanins.....	19
III.2.1. Extraction des tanins.....	19
III.2.2. Dosage des tanins.....	19
III.3. Teneur en d'acide ascorbique (vit C)	19
III.3.1. Extraction de vitamine C.....	19
III.3.2. Dosage d'acide ascorbique.....	19
IV. Evaluation de quelques activités biologiques.....	20
IV.1. Activité antioxydant.....	20
IV.1.1. Piégeage du radical ABTS.....	20
IV.1.2. Piégeage du radical 2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	20

Résultats et Discussion

I. Teneur en humidité.....	22
II. Teneur en cendre.....	22
III. Teneur en lipides.....	22
IV. Teneur en protéines.....	23
V. Teneur en sucre.....	24
VI. Teneurs en composées phénoliques (polyphénols, flavonoïdes, tanins)	25
VII. Teneur en acide ascorbique.....	26
VIII. Evaluation de l'activité antioxydante (DPPH et ABTS)	27
CONCLUSION ET PERSPECTIVE	30

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Résumé

LISTE DES ABREVIATIONS

ABTS : 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique

AlCl₃ : Trichlorure d'aluminium

BSA : Albumine sérique bovine

DPPH : 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyle

EAG : Equivalent acide gallique

EQ : Equivalents de quercétine

H₂SO₄ : Acide sulfurique

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%

MgEq AG/g : Milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme

Mg Eq d'acide oxalique /100g d'extrait: Milligrammes d'équivalent d'acide oxalique par 100 gramme

MgEq Q/g : Milligrammes d'équivalent de quercétine par gramme

NaCO₃ : Carbonate de sodium

µl: Microlitre

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Position taxonomique d'Astroïde calycularis.....	3
Tableau II : les rendements de quelques métabolites d' <i>A. calycularis</i>	23
Tableau III: les teneurs en métabolites secondaires et métabolites primaires	27
Tableau IV: Le pouvoir antioxydant DPPH et ABTS (exprimé par IC50 ± écart-type (en mg /ml)) des antioxydants d'extrait testé.....	26

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Colonie d'Astroïdes calycularis.....	3
Figure 2 : Morphologie d'Astroïdes calycularis.....	5
Figure 3 : Structure chimique du phénol simple.....	9
Figure 4 : Structure chimique de base des flavonoïdes.....	10
Figure 5 : Structure chimique de base des anthocyanes.....	10
Figure 6 : Structure générale des Tannins hydrolysables (A) et Tannins condensés (B).....	11
Figure 7 : Modification du DPPH• lors du transfert électronique.....	12
Figure 8 : Structure chimique du Troilo.....	13
Figure 9 : La teneur en sucre totaux.....	24

Introduction générale

Introduction générale

Tous les êtres vivants dans leur forme actuelle sont le résultat d'une histoire évolutive contrainte par les variables physico-chimiques de leur environnement. Ainsi, on distinguera la biodiversité terrestre de la biodiversité marine. Les océans et les mers représentent près des trois-quarts de la surface du globe (**Dewarumez J.-M et al., 2011**). La vie sur Terre est apparue dans le milieu marin il y a environ 3,8 milliards d'années alors que les premières espèces terrestres remontent, quant à elles, à 400 millions d'années. Cette différence se traduit aujourd'hui par une plus grande diversité des espèces dans le milieu marin. Cette biodiversité que l'on retrouve dans les mers et les océans se traduit naturellement par une chimiodiversité toute aussi importante (**Banaigs B et al., 2007**). Les organismes marins ont été beaucoup moins étudiés que leurs analogues terrestres, et ce principalement à cause du manque de connaissance du milieu marin et des difficultés liées à la récolte des échantillons. Ainsi, les premières recherches sur les produits naturels marins datent seulement de la fin des années 60 (**Banaigs B et al., 2007**).

Le milieu marin est un trésor, une richesse inestimable pour l'Homme. Les ressources marines ne sont pas illimitées ainsi, la recherche étudie et développe des moyens, représentés par des molécules aux propriétés intéressantes qui présentent des activités biologiques *in vitro* : antivirale, anti tumorale, antibiotique, antifongique, anti-inflammatoire, etc ; ces molécules peuvent aussi agir au niveau du système cardiovasculaire ou du système nerveux. L'industrie pharmaceutique et cosmétique a dès lors fondé beaucoup d'espoirs sur les « médicaments de la mer » (**Dewarumez J.-M et al., 2011**).

Le corallien se trouve parmi les écosystèmes ayant un degré de biodiversité des plus élevés et des plus originaux de la Méditerranée (**Laborel, 1961 ; Laubier, 1966 ; Hong, 1980 ; Ballesteros, 2006**). Ces constructions naturelles jouent divers rôles dans l'équilibre écologique (lieu d'abri, d'alimentation, de reproduction pour de nombreuses espèces animales). Le corail orange est une espèce qui est affectée par les activités humaines développées sur le littoral. Ainsi, les travaux côtiers, la forte sédimentation ou les activités récréatives développées en mer, entre autres aspects, ont un impact négatif sur leurs populations, les réduisant ou les dégradant.

Introduction générale

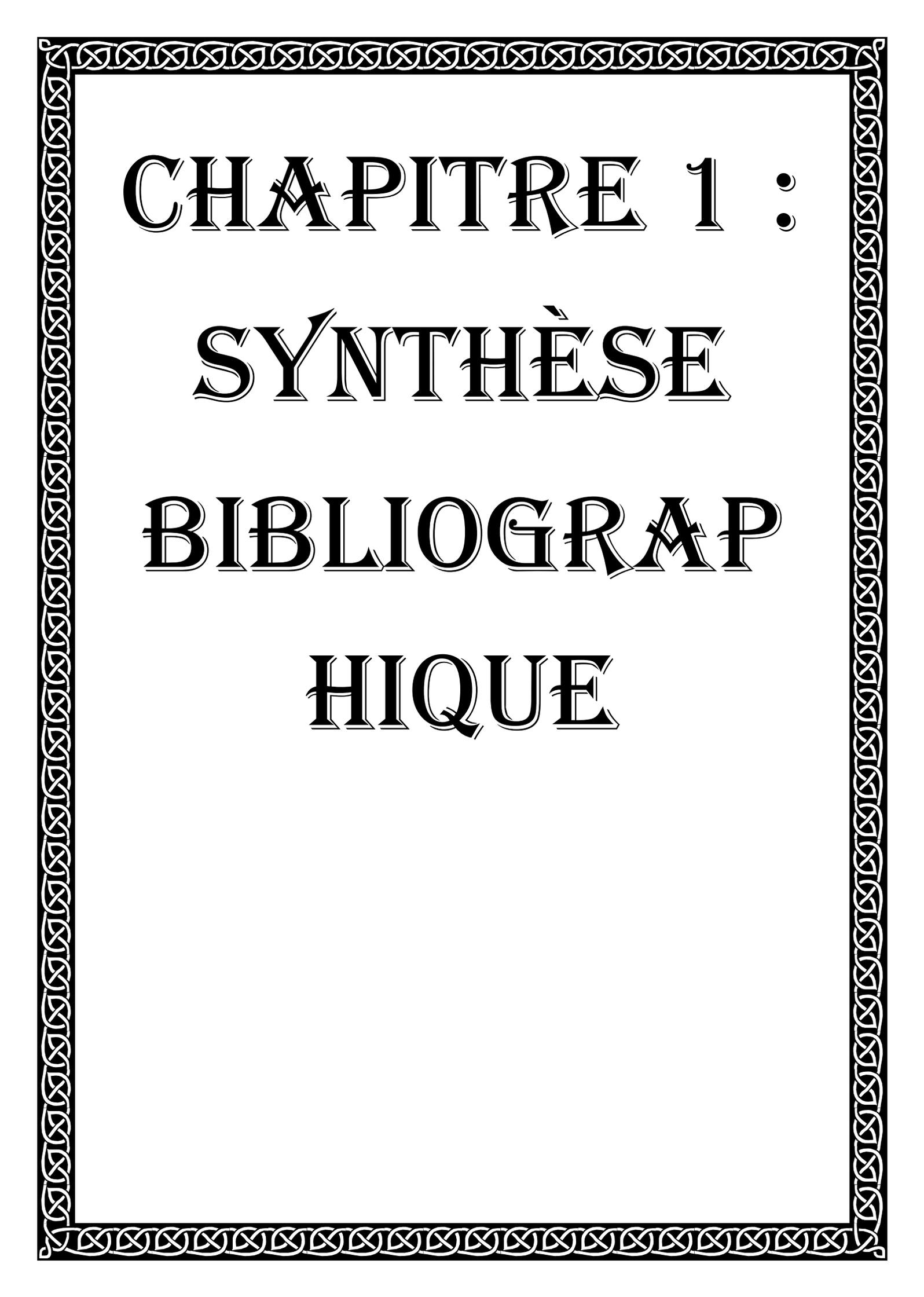
Les coraux intéressent l'industrie pharmaceutique par leur capacité à fournir un substitut osseux bioactif. Celui-ci se compose de la partie purement minérale du corail, constituée de cristaux de carbonate de calcium (> 95%) sous forme d'aragonite. Ils sont utilisés depuis 1979 en soins dentaires (implantologie) et pour la réalisation de certaines greffes osseuses comme substrat pour la reconstruction (utilisation de l'exosquelette). Les trois principaux éléments du corail, le calcium, le silicium et le strontium, sont reconnus pour jouer un rôle dans le processus de minéralisation osseuse et dans l'activation des réactions enzymatiques faisant intervenir les cellules ostéogènes. La structure de l'exosquelette du corail est semblable à celle des os spongieux de l'organisme humain (**Dewarumez J.-M et al., 2011**).

Les invertébrés marins ont été une source importante de métabolites bioactifs ayant un large spectre d'activités intéressantes et menés dans des perspectives de valorisation, prometteuse pour l'avenir en biochimie et en pharmacologie (**Garcia-Dvis et al., 2018**).

L'objectif de ce travail est la valorisation des substances naturelles bioactives issues d'une espèce marine (*Astroïde calycularis*).

Pour cela, notre étude englobe deux parties, dont :

- ✚ La première est une synthèse bibliographique de quelques rappels sur le genre Astroïdes (taxonomie, reproduction...etc), les travaux antérieurs sur l'espèce *A. calycularis*, généralités sur les métabolites primaires et secondaires et l'activité biologique (antioxydante).
- ✚ La deuxième partie est consacrée à l'étude expérimentale, qui porte sur l'extraction des métabolites primaires et secondaires par différentes méthodes, ainsi l'évaluation de leurs activités antioxydantes.



CHAPITRE 1 :

SYNTHÈSE

BIBLIOGRAPH

HIQUE

Synthèse bibliographique

I.I. Présentation du genre *Astroïdes*

Astroïdes calycularis est un corail scléactiniaire colonial azooxanthellé d'une couleur orange caractéristique. Formant ainsi un exosquelette de carbonate de calcium servant de protection aux polypes de la colonie (**Pallas, 1766**).



Figure 1 : Colonie d'*Astroïdes calycularis* (**Pallas, 1766**).

I.I.1. Taxonomie

Le genre *Astroïdes* appartient à la famille des Dendrophylliidae sa position dans le règne animal est schématisé dans le tableau 1.

Tableau I : Position taxonomique d'*Astroïde calycularis* (**Pallas, 1766**).

Taxonomie	Description
Règne	Animalia
Ebranchement	Cnidaria
Classe	Anthozoa
Sous-classe	Hexacorallia
Ordre	Scleractinia
Sous-ordre	Dendrophylliina
Famille	Dendrophylliidae
Genre	<i>Astroïdes</i>
Espèce	<i>Astroïdes calycularis</i>

I.I.2. Répartition géographique, reproduction et description morphologique des *A. calycularis*

I.I.2.1. Répartition géographique

La famille des Dendrophylliidae est cosmopolite et comprend à la fois des coraux solitaires et coloniaux ; 148 espèces vivantes sont décrites et divisées en dix-neuf genres. Le genre *Astroïdes* est composé d'une seule espèce *A. calycularis* (Cairns, 2001). Actuellement, ce corail orange à une distribution étroite en raison de sa tolérance à la température et de son besoin d'eaux propres et bien oxygénées, sa répartition est limitée à la partie centre-sud de la Méditerranée occidentale. En particulier, on la trouve dans les régions suivantes : le sud-est de la péninsule ibérique, du détroit de Gibraltar au Cap Palos (Murcia) ; les côtes nord de l'Afrique, du détroit de Gibraltar au Cap Bon en Tunisie ; autour de la Sicile et des îles voisines ; et le Golfe de Naples dans la mer Tyrrhénienne (Zibrowius, 1980 ; 1995 ; Bianchi 2007 ; Goffredo et al. 2010). En outre, on le trouve également à Malte, est également présent dans les eaux atlantiques au Cap Espartel (Maroc), à La Caleta (Cádiz ; Espagne), probablement en raison des courants qui dispersent les larves hors du détroit de Gibraltar (Casado-Amezúa 2012 ; Casado-Amezúa et al., 2012). Récemment, *A. calycularis* a également été trouvé dans la mer Adriatique, le long de la côte de la Croati jusqu'au Golfe de Venise (Casellato et al., 2007).

I.I.2.2. Reproduction

La plupart des coraux scléactiniaires sont hermaphrodites, cependant, la stratégie de reproduction (diffusion ou couvaion) peut varier au sein d'une même espèce (Kruger & Schleyer 1998). Le cycle de reproduction d'*A. calycularis* (développement des gamètes en fonction des paramètres environnementaux, moment de la planulation, taille à la maturité sexuelle, fécondité, et sex-ratio) est bien étudié en Méditerranée (Goffredo et al. 2010 ; 2011b ; Casado-Amezúa et al., 2013). C'est une espèce gonochorique et couveuse qui a peu de différence sur la libération de la planulation le long des populations géographiques, sûrement en raison de la température. Néanmoins, il n'y a pas eu d'études sur les différences au sein des populations sur certains aspects de leur stratégie de reproduction, ce qui pourrait être essentiel à futurs plans de conservation et de gestion. Les colonies femelles sont présentes dans les eaux peu profondes (entre 0-5 mètres de profondeur) tandis que les colonies mâles sont présentes plus profondément. Par conséquent, tant les observations de terrain que les données expérimentales indiquent une ségrégation sexuelle sur l'espace. Ces résultats sont très importants à prendre en compte lors de la mise en place d'un outil de gestion tel que la

Synthèse bibliographique

réintroduction ou le renforcement des populations. Dans ce sens, il serait fortement recommandé de collecter des colonies de différentes profondeurs afin de garantir une sex-ratio équilibrée (Goffredo *et al.* 2010; 2011b; Casado-Amezúa *et al.* 2013).

II.2.3. Description morphologique d'*A. calycularis*

A. calycularis est un corail scléactinien azooxanthellé avec un exosquelette de calcium carbonaté et constituée en un groupe de polypes qui habite le rivage rocheux, sur les parois verticales ou à l'intérieur des grottes. Elle occupe aussi bien des habitats bien éclairés que des habitats sombres et semble préférer un environnement hautement hydrodynamique (Casado-Amezuaa Pet al, 2013).

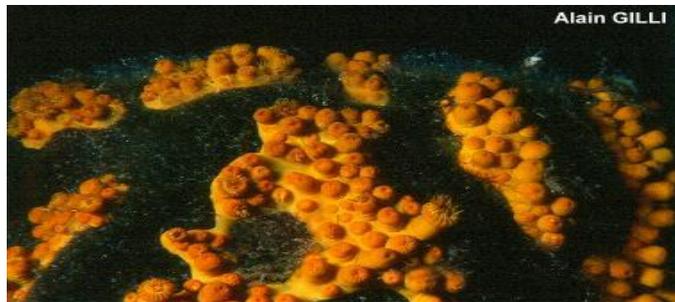


Figure 2: Morphologie d'*Astroïdes calycularis* (Pallas, 1766)

II.1.3. Travaux antérieurs sur l'espèce *A. calycularis*

II.1.3.1. Constituants chimiques

A. calycularis très peu étudié d'un point de vue chimique, il est pourtant présent depuis toujours en Méditerranée, spécialement sur les côtes italiennes, d'où sont issues les premières études chimiques. Les seules études chimiques faites sur *A. calycularis* jusqu'à ce jour ont été menées par Fattorusso et son équipe à la fin des années 80 et ont permis l'isolement de quatre alcaloïdes indoliques : l'aplysinopsine et ses dérivés ainsi qu'un dérivé ptéridine.

L'aplysinopsine est un métabolite secondaire très répandu dans les organismes marins. Elle a été isolée pour la première fois en 1977 de l'éponge *Fascaplysinopsis reticulata* (anciennement connue sous le nom d'*Aplysinopsis reticulata*) puis de l'éponge *Verongia spengelii*. Depuis, cette molécule et ses dérivés ont été isolés d'un grand nombre d'invertébrés marins, tels que les spongiaires et les dendrophylliides du genre *Leptopsammia* et *Tubastrea* ainsi que d'*A. calycularis* (Nadja Cachet, 2009).

Synthèse bibliographique

Ces composés ont intéressé de nombreux groupes de chercheur pour leur potentiel thérapeutique mais également pour l'étude de leur rôle écologique. Parmi certaines hypothèses, ces molécules sont supposées permettre à l'organisme de se protéger des radiations solaires. **Guella et al.** ont étudié la photo-isomérisation (*Z/E*) non destructive de ce type de molécule. Ces études ont montré que l'isomère majoritaire des molécules de type « aplysinopsine » sans substituant sur N-2' est de configuration *Z* et inversement celles avec un méthyle sur N-2' sont préférentiellement de configuration *E* pour des raisons thermodynamiques. Les auteurs ont également mis en évidence la photo-isomérisation de ces molécules par la simple lumière du jour ; les isomères minoritaires de ces molécules deviennent majoritaires lors d'une exposition à la lumière du jour. De plus, lorsque ces molécules sont remises dans une chambre noire, à température ambiante, l'excès isométrique redevient celui caractéristique de l'équilibre thermodynamique (**Nadja Cachet, 2009**).

Le deuxième type de molécule d'*A. Calycularis* est un dérivé ptéridine, les ptéridines ont été découvertes en premier lieu comme pigments de l'aile des papillons (d'où leur nom, provenant du grec *pteron*, aile) et jouent de nombreux rôles dans la coloration de l'organisme. Les ptéridines sont aussi des cofacteurs dans des réactions enzymatiques, ce sont des composés clés pour le transfert biochimique de groupement méthyles. La tétrahydrobioptérine, aussi nommée BH₄, est la ptéridine non conjuguée majeure des vertébrés qui est impliquée dans l'hydroxylation de composés aromatiques et la synthèse de l'oxyde nitrique. La molybdoptérine, dérivée ptéridine, est, quant à elle, impliquée dans des hydroxylation biologiques, la réduction des nitrates et l'oxydation au cours de la respiration (**Nadja Cachet, 2009**).

II.3.2. Activités biologiques de quelques invertébrés marins

Des travaux ont été consacrés à la réalisation d'un criblage chimique et d'un criblage biologique sur 60 échantillons d'invertébrés marins. L'objectif premier de la collaboration des chercheurs était la découverte de molécules d'origine marine, à haute valeur ajoutée dans le domaine de la santé (molécules à activité anticancéreuse, antipaludique, antivirale et antioxydante) (**Pierre-Éric, 2017**).

Certains des métabolites isolés présentent des activités biologiques intéressantes :

- Une activité cytotoxique : la fromiamycaline (M61), la ptilomycaline E (MU6) ainsi que le mélange des ptilomycalines G (MU8) et H (MU9) présentent une cytotoxicité

Synthèse bibliographique

élevée sur cellules KB. Ces molécules peuvent être considérées comme agents anticancéreux potentiels (**Pierre-Éric, 2017**).

- Une activité antipaludique : Avec des IC_{50} inférieures à 0,2 $\mu\text{g/mL}$, la fromiamycaline (M61) et la ptilomycaline F (MU7) sont les deux molécules isolées présentant la meilleure activité antipaludique. Au regard de cette excellente activité, l'index de sélectivité de ces molécules vis-à-vis de cette activité a été évalué. Si la fromiamycaline montre un index de sélectivité moyen (IS 4,9), la ptilomycaline F en revanche présente un bon index de sélectivité (IS 7,0). Cette dernière peut donc être considérée comme un agent antipaludique potentiel (**Pierre-Éric, 2017**).
- Les tests de cytotoxicité sur cellules KB (carcinome buccal) ont permis de mettre en évidence 15 organismes inhibant cette lignée cancéreuse humaine dont 12 éponges, 2 ascidies et un corail mou (**Pierre-Éric, 2017**).
- L'activité antivirale a été évaluée *in vitro* à travers l'activité antiproliférative sur les virus CHIKV (souche 899), l'entérovirus type 71 (souche BrCr) et le rhinovirus type 14 (phénotype sauvage). Ces tests, réalisés selon le protocole décrit par Nothias-Scaglia L. F. et al., 2015, ont permis de mettre en évidence 4 organismes présentant une activité antichikungunya, trois coraux mous et une éponge (**Pierre-Éric, 2017**).
- Les résultats d'activité antioxydante des 60 extraits bruts d'organismes marins testés, cinq extraits d'éponges ont montré une activité sur au moins un des deux tests. En revanche, seule le corail mou *Rhytisma fulvum* (TCN-M161 et TCN-M163) a montré une activité remarquable sur les deux tests (**Pierre-Éric, 2017**).

II. Généralités sur les métabolites primaires et secondaires

II.1. Métabolites primaires

Un métabolite primaire est un type de métabolite qui est directement impliqué dans la croissance, le développement et la reproduction normale d'un organisme ou d'une cellule. Ce composé a généralement une fonction physiologique dans cet organisme, c'est-à-dire une fonction intrinsèque. Les métabolites primaires rassemblent les protéines, les lipides, les carbohydrates, les sucres et les acides nucléiques (**Bruneton, 1999**).

Synthèse bibliographique

II.1.1. Glucides :

Les glucides sont des hydrates de carbone, c'est-à-dire des composés organiques carbonylés polyhydroxylés. Ce sont surtout des éléments de soutien ou de réserve énergétique, précurseurs obligatoires des autres métabolites (**Bruneton, 1999**).

II.1.2. Les lipides :

Ce sont des molécules insolubles dans l'eau, solubles dans les solvants apolaires et caractérisées par la présence d'au moins un acide gras. Les lipides correspondent aux réserves énergétiques des plantes (leur oxydation libère beaucoup d'énergie), ont un rôle structural et servent de messagers pour l'organisme (métabolisme intermédiaire) (**Bruneton, 1999**).

II.1.3. Les protéines :

Les protéines jouent également un rôle structural et participent au renouvellement des tissus végétaux. En industries agroalimentaires, les protéines végétales occupent une place de choix tant par leur valeur et propriété nutritionnelle par rapport à la source animale (**Bruneton, 1999**).

II.1.4. Les cendres :

Les cendres totales représentent la partie inorganique de l'échantillon alimentaire restant après incinération à une très haute température. Ce résidu contient des oligo-éléments essentiels tels que le calcium, le phosphore, le sodium, le potassium, le magnésium et le manganèse (**Bruneton, 1999**).

II.2. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires ou les produits naturels sont des molécules organiques non directement impliquées dans le développement ou la reproduction d'un organisme. Leur absence n'entraîne pas une mort immédiate mais peut limiter la survie, la fécondité ou l'apparence d'un organisme. Cette absence peut aussi n'avoir aucun effet (**Database ,2015**).

Les métabolites secondaires ont essentiellement pour rôle d'accroître la compétitivité de l'organisme qui les biosynthétise : les métabolites secondaires lui procurent un avantage sur d'autres organismes.

II.2.1. Les polyphénols

Le terme « polyphénol » a été introduit en 1980, en remplacement de l'ancien terme de « tanin végétal » ; sont pour la grande majorité des métabolites secondaires du règne végétal. Plus de 8000 structures différentes ont été répertoriées, dont certaines sont ubiquitaires à toutes les plantes, alors que d'autres sont hautement spécifiques à un genre, une espèce, voire même un cultivar en particulier. De nombreuses classes de polyphénols ont pu être définies, rangeant et classant ainsi cet ensemble de molécules en fonction de leur structure chimique. Ces composés font généralement partie des moyens de défense des plantes, afin de lutter contre certains pathogènes, mais également contre les rayonnements UV. Parmi les rôles des polyphénols dans la plante, on peut citer l'action anti-oxydant, antimicrobienne, un rôle de photorécepteur, d'attracteur organoleptique (notamment visuel). La plupart de ces composés phénoliques dérivent d'acides aminés aromatiques : la tyrosine et la phénylalanine (**Pietta, 2000**).

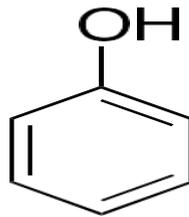


Figure 3 : Structure chimique du phénol simple (**Desmier, 2016**).

II.2.2. Les flavonoïdes

Sont des métabolites secondaires des plantes partageant tous une même structure de base formée par deux cycles aromatiques reliés par trois carbones : C6-C3-C6, chaîne souvent fermée en un hétérocycle oxygéné hexa- ou pentagonal. Certains auteurs, comme Bruneton 2009, préfèrent séparer, pour tenir compte de leurs propriétés particulières, les dérivés flavaniques, les anthocyanosides et les isoflavonoïdes et conserver l'appellation de flavonoïdes stricto sensu pour les autres.

Les flavonoïdes sont responsables de la couleur variée des fleurs et des fruits et représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation. Ils forment une sous-classe des polyphénols. Il y en a plus de 6000 à avoir été décrits chez les plantes (**Bruneton, 2009**).

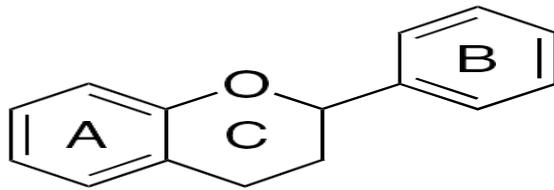


Figure 4 : Structure chimique de base des flavonoïdes (**Desmier, 2016**).

II.2.3. Anthocyane

Les anthocyanes sont des pigments naturels des feuilles, des pétales et des fruits, situés dans les vacuoles des cellules, solubles dans l'eau, allant du rouge orangé au bleu pourpre dans le spectre visible.

Ces composés existent sous forme d'hétérosides formés par la condensation d'une molécule non glucidique (appelé aglycone) et d'oses et souvent, de groupes acyles. L'aglycone qui les caractérise est un anthocyanidol de la classe des flavonoïdes. En 2006, 539 anthocyanosides ont été recensés. Leur activité anti-oxydante laisse supposer que leur apport par l'alimentation pourrait jouer un rôle bénéfique dans la santé humaine, notamment dans le domaine des risques cardiovasculaires (**Boudjouref, 2011**).

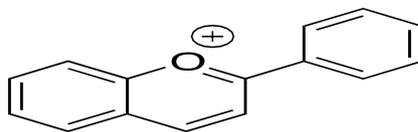


Figure 5 : Structure chimique de base des anthocyanes (**Boudjouref, 2011**).

II.2.4. Les tanins

Sont des composés phénoliques hydrosolubles. Il existe deux groupes principaux de tanins, les tanins non hydrolysables ou condensés (proanthocyanidols car conduisant aux anthocyanidols en milieu acide à chaud) et les tanins hydrolysables (**Bruneton, 1993**).

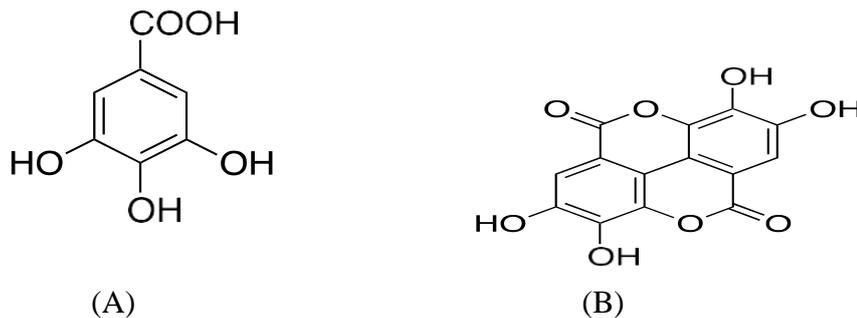


Figure 6 : Structure générale des Tannins hydrolysables (A) et Tannins condensés (B) (Benhammou, 2011).

II.2.5. Acide ascorbique (vitamine C)

La vitamine C, ou l'acide ascorbique, est présente dans divers fruits et légumes. Il s'agit d'un composé organique blanc, cristallin, qui peut être synthétisé à partir du glucose ou d'extrait de certaines sources naturelles telles que le jus d'orange. La vitamine C a été d'abord isolée à partir de jus de lime par Szent-Gyorgy en 1928. Le rôle d'antioxydant de la vitamine C est bien connu (Mansour et Aljoubbeh, 2014).

III. Activités biologiques, généralités et évaluation

III.1. Evaluation de l'activité antioxydant

III.1.1. Test DPPH

Le DPPH• (ou 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est un radical stable à température ambiante et de couleur bleue caractéristique. Sa stabilité provient de la haute délocalisation des électrons π le long de la molécule, Est un des premiers radicaux à avoir été utilisé pour étudier la relation structure/activité antioxydant des composés phénoliques (Brand-Williams et al., 1995). Il possède dans sa structure un électron non apparié sur un atome du pont azote-azote. Sa particularité provient de la modification de ses propriétés d'absorption UV/Visible selon son état : la forme réduite (e.g., après ajout d'électron) absorbe à 515-518nm alors que sa forme oxydée ne présente pas de pic d'absorption.

Synthèse bibliographique

L'efficacité d'un antioxydant peut être mesurée par sa capacité à réduire le radical. Ceci s'observait historiquement par le changement de couleur allant du bleu-violet (forme oxydée) au jaune (forme réduite).

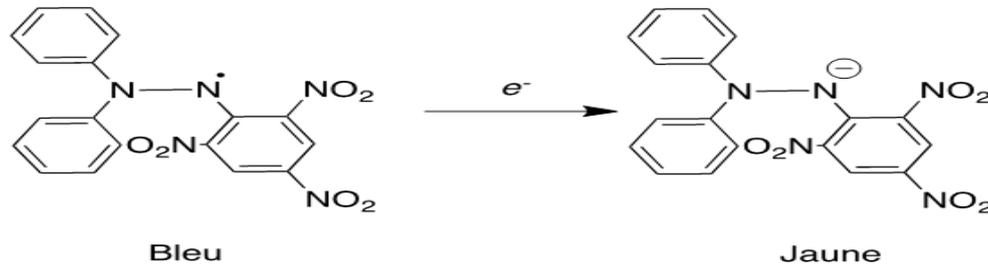


Figure 7: Modification du DPPH[•] lors du transfert électronique (Popovici et al., 2009).

Cette propriété peut dorénavant être quantifiée par spectroscopie UV/Visible en se focalisant sur l'absorption à 515-518 nm. Ce test est encore fréquemment utilisé pour évaluer le potentiel antioxydant de polyphénols. Un avantage indéniable de ce test est qu'il permet également d'évaluer la cinétique de piégeage. Pour cela, il suffit d'évaluer l'augmentation d'absorption à 515-518 nm en fonction du temps. Le mécanisme de piégeage du DPPH reste encore relativement controversé entre le transfert d'atome d'hydrogène concerné et le transfert électronique. Le piégeage des radicaux libres a été décrit ci-dessous comme pouvant suivre deux types de mécanismes. D'une part, le transfert d'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle présenterait une cinétique rapide comme dans le cas de certains acides et dérivés phénoliques. D'autre part, le transfert d'électron aurait une cinétique lente comme montré dans le cas de dérivés glycosylés et des anthocyanes (Huang et al., 2005). En effet, il a été récemment montré que les cinétiques de transfert d'électron sont généralement plus rapides que celles d'un transfert d'atome (Di Meo et al., 2013). Il est important de noter que dans le cas des polyphénols, la capacité à piéger les radicaux libres est tributaire des conditions expérimentales. De nombreux facteurs vont influencer le potentiel antioxydant comme le rapport antioxydant/DPPH[•] ou le pH. Pour évaluer l'activité antioxydant, deux approches sont utilisées : d'une part, la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de DPPH[•] et d'autre part, le suivi de la cinétique de la réduction.

III.1.2. Test TEAC

La méthode TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) permet de mesurer la capacité d'un candidat à piéger le radical cation $ABTS^{•+}$ (obtenu à partir de sels d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique). La particularité de cette méthode est l'aspect compétitif puisque la mesure aura comparé la capacité d'un antioxydant de référence le Trolox (Pellegrini et al., 2003). Il est important de noter que le Trolox est un analogue chimique de la vitamine E.

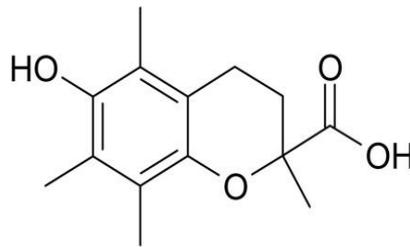


Figure 8 : Structure chimique du Trolox (Pellegrini et al., 2003).

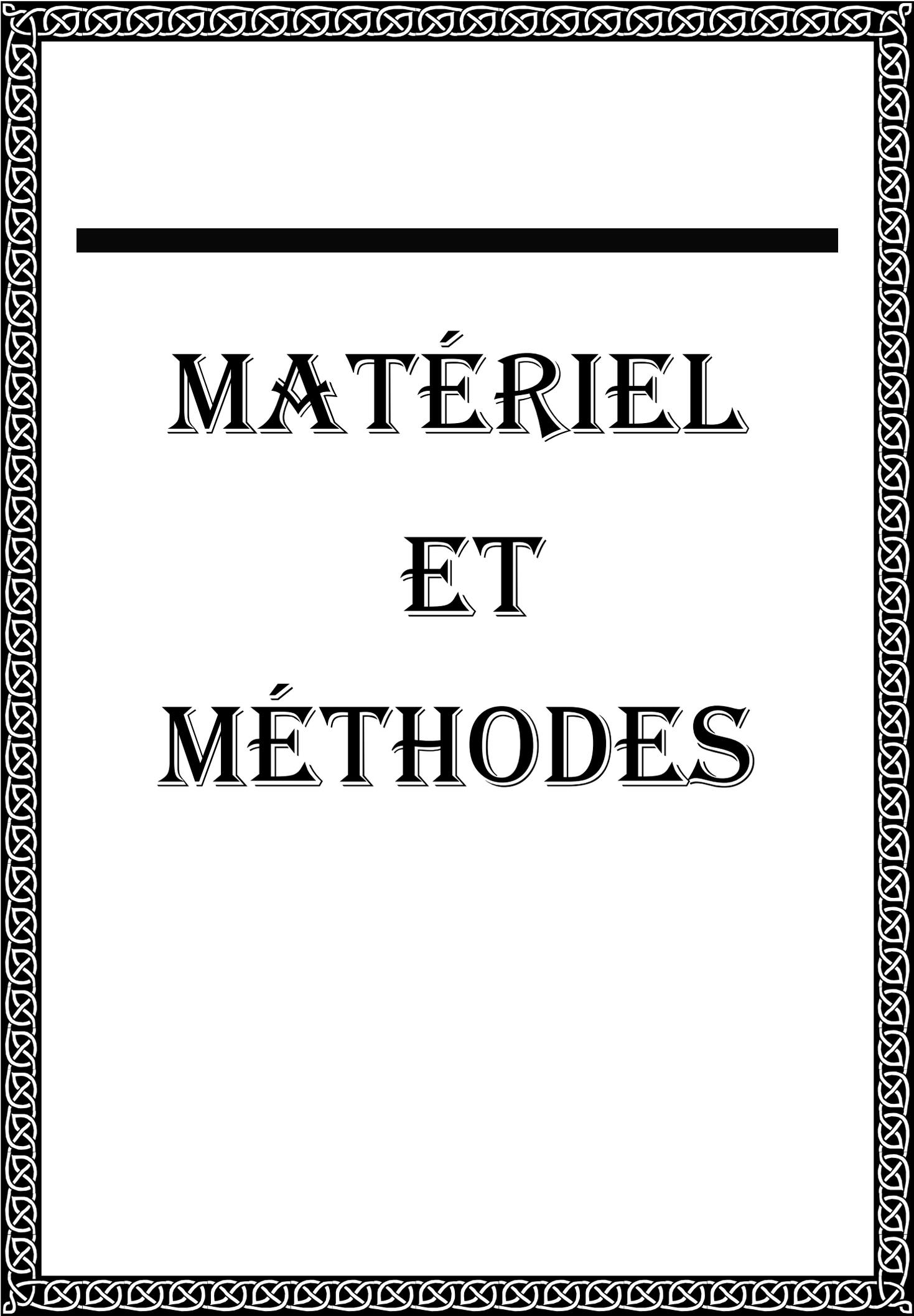
Le test TEAC est également une méthode colorimétrique où une décoloration de la solution bleu-verte contenant $ABTS^{•+}$ sera observée lors de la formation de $ABTSH^+$ (couleur bleue à verte). Cette décoloration pourra également être quantifiée par spectrophotométrie (Absorption UV/Visible) à 734 nm. La valeur TEAC obtenue par ce test correspond à la concentration de Trolox ayant la même activité que la concentration unitaire du composé à tester. C'est une méthode, tout comme le DPPH, conceptuellement facile à mettre en place puisque seuls les réactifs et un spectrophotomètre sont nécessaires. Elle est, de plus, rapide et se corrèle bien avec des tests biologiques. En revanche, l'inconvénient majeur de cette méthode relève de l'instabilité des radicaux $ABTS^{•+}$. Ces derniers doivent être générés extemporanément à partir de sels d'ABTS et la mesure doit être faite assez rapidement.

III.2. Rôle des antioxydants

Les antioxydants sont tout simplement de bonnes molécules (petits soldats) qui transforment ces radicaux libres en produits inoffensifs et réduisent ainsi leurs effets néfastes sur notre santé. Les antioxydants sont essentiels dans notre alimentation chaque jour pour réduire le stress oxydatif dans notre organisme. Ce sont de réels boucliers pour protéger nos cellules saines et notre santé (HERCBERG, S et al, 2004).

Synthèse bibliographique

Le régime méditerranéen riche en fruits et légumes a démontré ses effets sur le système cardiovasculaire. Une des hypothèses avancées pour justifier ce mécanisme protecteur est la richesse en antioxydants des fruits et légumes. En effet, de nombreuses études conseillent une alimentation variée riche en fruits et légumes afin de prévenir l'apparition de nombreuses pathologies, notamment les cancers, vieillissement, les maladies cardio-vasculaires, protégée les yeux et le diabète de type 2. Certaines études confèrent également un rôle important aux polyphénols dans ses effets bénéfiques, ceci étant lié au caractère antioxydant de ces molécules **(HERCBERG, S *et al*, 2004)**.



MATÉRIEL

ET

MÉTHODES

I. 1. Matière première :

L'échantillonnage a été réalisé au niveau d'une région côtière à Bejaia « LA Rozine » durant le mois de mai 2021, d'une manière aléatoire à différentes profondeurs de 1 à 15 m. Les échantillons ont été transportés au laboratoire dans des conteneurs isothermes.

I. 2. Méthode de préparation de la poudre :

Les échantillons, une fois nettoyés et débarrassés des impuretés, sont alors séchés à l'aire libre à température ambiante pendant 7 jours. La matrice sécher est directement broyée à l'aide d'un broyeur métallique puis électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine. La poudre ainsi tamisée à 250 µm et entreposée dans un récipient hermétique.

II. Analyses physico-chimiques

II.1. Teneur en humidité

La teneur en humidité a été déterminée par évaporation de l'eau contenue dans l'échantillon en utilisant une étuve réglée à 105°C. La masse résiduelle a été mesurée à des intervalles de temps réguliers jusqu'à ce que la masse obtenue reste constante. Après dessiccation, le taux d'humidité a été exprimé par la formule suivantes (AOAC, 1998).

$$T = \left(\frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \right) \times 100$$

T (%) : taux d'humidité, m_1 : peser vide, m_2 : peser avant séchage, m_3 : peser après séchage.

II.2. Teneur en cendre

Selon AFNOR, (1982), cette méthode est basée sur la destruction totale de toute. Les particules charbonneuses et la pesée de la matière minérale restante.

La poudre (2 g) est mise dans des creusés (M_1) qui sont placés dans un four réglé à 550°C pendant cinq heures jusqu'à obtention d'une couleur grise, claire ou blanchâtre, après refroidissement on pèse les creusés (M_2).

On exprime la matière organique par la formule suivante :

$$MO \% = (M_1 - M_2 / P) \times 100$$

La teneur en cendre(cd) est calculée comme suit :

$Cd = 100 - MO\%$

Où :

MO : matière organique en %

M₁ : masse des creusés + prise d'essai

M₂ : masse des creusés + cendres

P : masse de la prise d'essai

II.3. Teneur en lipides

II.3.1. Méthode Soxhlet

La méthode Soxhlet est une méthode de référence utilisée pour la détermination de la matière grasse contenant dans les matrices solides déshydratés. C'est une méthode gravimétrique, puisqu'on pèse l'échantillon au début et la matière grasse à la fin de l'extraction.

II.3.2. Principe

La matrice solide est pesée et placée dans une capsule de cellulose. L'échantillon est extrait en continu par de l'hexane à ébullition (P.E. 69 °C) qui dissout graduellement la matière grasse. Le solvant contenant la matière grasse retourne dans le ballon par déversements successifs causés par un effet de siphon dans le coude latéral. Comme seul le solvant peut s'évaporer de nouveau, la matière grasse s'accumule dans le ballon jusqu'à ce que l'extraction soit complète. Une fois l'extraction terminée, l'hexane est évaporé, généralement sur un évaporateur rotatif, et la matière grasse est pesée

II.3.3. Extraction des lipides

L'extraction a été réalisé dans une enceinte fermée selon un processus semi-continu à partir de 20 g de poudre dans 200 ml de solvant organique pendant 5 h. L'hexane contenant les lipides dissous a été ensuite évaporé (AOAC, 1998)

La teneur en matière grasse a été calculée selon la formule suivante :

$$MG\% = \frac{P2 - P1}{P0}$$

P_2 : représente la masse en gramme du ballon contenant la matière grasse, P_1 : représente la masse en gramme du ballon vide, P_0 : représente la masse en gramme de la prise d'essai.

II.4. Teneur en sucres totaux

II.4.1. Extraction des sucres totaux

L'extraction des sucres a été réalisée avec (éthanol pure, éthanol 50%, eau distillée). Environ 1 g de poudre de corail a été mis en contact avec 40 mL de solvant et agiter pendant 1h puis centrifugation pendant 3 min à température ambiante à 13000 tr/min. Les surnageants ont été récupérés après filtration et forment les extraits à doser (**Dubois et al., 1956**).

II.4.2. Teneur en sucres totaux

Les sucres totaux ont été analysés suivant la méthode de phénol sulfurique. Dans le premier temps, la courbe d'étalonnage de monosaccharide (moyenne de 3 solutions standard) a été déterminée, où 10 mg de glucose ont été ajoutés à 10 mL de solvant et différentes concentrations de la solution standard de glucose (1, 3/4, 1/2, 1/4, 0 dilutions) ont été préparées (**Dubois et al., 1956**).

➤ Mode opératoire :

Le dosage consiste à préparer dans un premier temps à 4°C une solution aqueuse de phénol 5 % (m/v) et de l'acide sulfurique concentré 98%, à l'aide d'une micropipette, 200 μ L de solvant, ou de solution étalon ou de solution à doser (diluer à 1/500), 200 μ L de la solution phénolique 5% et 1 ml de H₂SO₄ concentré (à additionner rapidement) ont été ajoutés dans des tubes à essais. On réalise une homogénéisation avant d'incuber le mélange dans un bain-marie à 30°C et pour la 2^{ème} extraction à 100 °C pendant 5 min. Ensuite, le mélange est refroidi pendant 30 min à l'obscurité et la lecture de la densité optique est faite à une longueur d'onde de $\lambda = 480$ nm (**Dubois et al., 1956**).

II.5. Dosage des protéines

II.5.1. Extraction des protéines

L'extraction des protéines a été réalisée selon la méthode de **Clement, Pra mod et al. (2010)**.

5 g de poudre de corail a été macérée avec 100 mL de solution saline tamponnée au phosphate (PBS, pH 7.4). Le mélange a été maintenu à 4° C pendant 2 h, l'extrait a d'abord été

filtré et centrifugé à 3000 g à 4°C pendant 15 min. le surnageant jaune pâle claire obtenu a été utilisé comme extrait brut pour la détermination des protéines (Clement, Pra mod et al., 2010).

II.5.2. Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976). En utilisant de bleu de Coomassie et de l'albumine sérique bovine (BSA) comme standard.

➤ Principe

Il s'agit d'une technique basée sur le changement d'absorbance qui se manifeste par le changement de couleur de bleu de Coomassie après collage (complexassions) avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents. En milieu acide, la forme anionique du bleu de Coomassie G250 interagit (par liaison non covalentes adsorption) avec les radicaux aromatiques des acides aminés constituant les protéines. La longueur d'onde d'absorption maximale passe alors de 456 nm (rouge) à 595 nm (bleu) (Bradford 1976).

➤ Mode opératoire

Le dosage des protéines a été réalisé après la préparation de la solution tamponnée et de réactif protéique, ensuite une introduction d'une quantité de 20 µL de tampon contenant l'échantillon et 1mL de réactif protéique dans des tubes à essai et le contenu a été mélangé par inversion ou par vortex. L'absorbance à 595 nm a été mesurée après 2 min à 1 h contre un blanc de réactif préparé à partir de 20 µL du tampon approprié et de 1 mL de réactif protéique. La BSA a été utilisée comme standard pour réaliser la courbe d'étalonnage. Les teneurs en protéines ont été exprimées en mg par g d'équivalent BSA (Bradford 1976).

III. Dosages quantitatifs des métabolites secondaires

III.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux et de flavonoïdes

III.1.1. Extraction des composés phénoliques

La méthode d'extraction utilisée dans ce travail est celle d'Oomah et al. (2010) avec quelque modification dans le protocole. Elle consiste à dissoudre 0,4 g de la poudre de corail dans 18 mL d'éthanol à 98% à 100%. Le mélange est agité pendant deux heures à température ambiante suivi d'une centrifugation pendant 10 min à 6000 tours/mn. Le surnageant a été évaporé ensuite conserver au frais (Oomah et al., 2010).

III.1.2. Détermination de la teneur en polyphénols totaux :

➤ Principe :

Le principe de dosage des polyphénols totaux repose sur capacités réductrices des complexes ioniques polymériques formés à partir des acides phosphomolybdiques et phosphotungstique (réactif de Folin-Ciocalteu) par les composés phénoliques (**Swain et al., 1959**). Il en résulte la formation d'un complexe bleu qui accompagne l'oxydation des composés phénoliques et qui est stabilisé par l'addition de carbonate de sodium (Na_2CO_3).

Les polyphénols totaux de l'extrait ont été déterminés par l'utilisation de la méthode de Follin-Ciocalteu, l'acide gallique a été utilisé comme standard (**Singleton and Rossi, 1965**).

➤ Mode opératoire :

Les solutions d'essai (échantillons ou standards) de 100 μL ont été ajoutées à 0.8 mL de Na_2CO_3 à 7.5%. Après 2 min, 100 μL de réactif de Folin-Ciocalteu à 1/10 ont été ajoutés et laissés reposer à température ambiante pendant 30 minutes. L'absorbance a été mesurée à 750 nm sur un spectrophotomètre contre un blanc. L'acide gallique a été préparé dans des concentrations de 0,001 mg/mL à 1,0 mg/mL. Les concentrations phénoliques ont été déterminées avec la courbe d'étalonnage ($y = ax + b$). Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme (mg EAG / g d'extrait sec) (**Bray et al., 1954**).

III.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes :

➤ Principe

La méthode colorimétrique de dosage des flavonoïdes repose sur la capacité de ces composés à former des complexes chromogènes avec le chlorure d'aluminium (AlCl_3), qui donne à la solution une coloration jaunâtre dans l'absorption maximale et la longueur d'onde à 430 nm, contre un témoin (**Djeridane et al., 2006**).

➤ Mode opératoire

1 mL d'échantillon dilué a été mélangé avec 1 mL de solution méthanoïque de chlorure d'aluminium à 2%. Après une incubation à une température ambiante pendant 10 min, l'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée à 430 nm avec un spectrophotomètre UV-Vis contre le blanc. La quercétine a été utilisée comme standard pour réaliser la courbe

d'étalonnage. Les teneurs en flavonoïdes ont été exprimées en mg par g d'équivalent quercétine (QE) (Bruneton, 1999).

III.3. La teneur en tanins

➤ Extraction

Une quantité de 10 g de la poudre de corail a été macérée dans 100 ml d'éther de pétrole. Le marc résiduel a été encore repris dans 50 ml d'éther d'éthylrique ensuite repris dans 100 ml de méthanol après une filtration et évaporation de filtrat méthanolique afin de récupérer un extrait sec contenant les tanins (Bruneton, 1999).

➤ Dosage des tanins :

250 µl d'extrait des tanins ont été ajoutés à 2500 µl de sulfate de fer acide Fe_2SO_4 dessous dans (3 :2 butanol, HCL) le tout est chauffé à 95°C pendant 20 min, l'absorbance a été mesurée à 530 nm, la teneur en tanin a été calculée selon la formule suivante :

$$Ct = Abs \times FD \times PM / \epsilon l$$

Ct : concentration en tanin condensés g/l

PM : masse molaire de cyanidine

ϵ : coefficient d'extinction molaire 3700 l/mol

L : longueur de la cuve

III.4. Teneur en acide ascorbique

➤ Extraction de la vitamine C :

0.5 g de la poudre ont été extraits avec 10 mL d'acide oxalique (1%) pendant 60 min. Après centrifugation à 1700 × g pendant 15 min, le surnageant a été filtré (Mau et al. 2005).

➤ Dosage d'acide ascorbique :

La détermination de la teneur en acide ascorbique a été effectuée à l'aide d'une méthode spectrophotométrique décrite par Mau et al. (2005). 200 µL ont été mélangés avec 1,8 ml de DCPIP et l'absorbance a été mesurée à 515 nm. La teneur en acide ascorbique a été exprimée

en milligrammes d'équivalents d'acide ascorbique pour 100 g de poudre (mgAAE/100 g extrait). (Y. Benchikh et al, 2014).

IV. Evaluation de l'activité antioxydant :

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* des métabolites primaire et secondaire a été réalisée par la méthode de piégeage des radicaux libre DPPH et ABTS.

➤ Teste ABTS

L'activité de piégeage des radicaux libres a été mesurée par spectrophotométrie selon la méthode Rufini MS et al. (2010). Une solution d'ABTS a été préparée en mélangeant 7,4 mmol/L d'ABTS et 2,6 mmol/L de persulfate de potassium. Des échantillons de 100 µL ont été mélangés avec 1900 µL de la solution d'ABTS, et l'absorbance des mélanges résultants a été mesurée après 7 min à 737 nm avec un spectrophotomètre UV/VIS (R. Torres-Martínez et al, 2017).

VII.2. Test DPPH

100 µL méthanol d'extrait ont été ajoutés à 1.3 ml de solution de DPPH (0.004 mg/ml). La diminution de l'absorbance a été déterminée à 517 nm, après incubation pendant 30 min dans l'obscurité (Talbi et al., 2015).

Le pourcentage d'inhibition (I %) de l'activité antiradicalaire DPPH et ABTS a été calculé suivant la formule suivante :

$$\% \text{d'activité anti-radicalaire} = \left[\frac{\text{Abs}_{\text{contrôle}} - \text{Abs}_{\text{échantillon}}}{\text{Abs}_{\text{contrôle}}} \right] \times 100$$

Avec : $A_{\text{contrôle}}$: Absorbance de la solution DPPH ou ABTS sans extrait.

$A_{\text{échantillon}}$: Absorbance de l'échantillon

La valeur de la concentration inhibitrice IC_{50} représente la concentration d'extraits qui neutralise 50% des radicaux de DPPH et ABTS.

Les IC_{50} de l'activité antioxydante (DPPH et ABTS) ont été calculés à partir de la courbe de la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction des concentrations de l'extrait. La valeur d' IC_{50} la plus faible correspond à l'efficacité de l'extrait la plus élevée. Cette valeur est exprimée en mg. ml⁻¹ (Boubekri, 2014).

Matériels et Méthodes

Les valeurs de l'EC₅₀ ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire.

Pour chaque composé, les résultats sont la moyenne de 3 expériences menées en parallèle.

V. Analyses statistiques

Toutes les données rapportées ont été réalisées en triplicatas et exprimées en moyennes \pm écart-type. L'analyse de la variance à un facteur (ANOVA) a été calculée à l'aide du logiciel JMP (version 10.0.0, SAS) afin de déterminer les différences significatives entre les résultats.



RÉSULTATS

ET

DISCUSSION

Résultats et discussion

I. Teneur en humidité

Par définition, la masse sèche est la masse d'un échantillon après que toute l'eau libre en a été retirée, une valeur qui est trouvée en soustrayant la teneur en humidité de la masse humide. La valeur moyenne de la masse sèche des échantillons du corail de l'espèce *A. calycularis* obtenue ici était de 59.08, % avec un écart type de 0,22%. Ces résultats ont fourni un indicateur assez bon de la biomasse pour estimer la quantité d'échantillon à prélever en fonction de la masse requise pour une analyse donnée. Nos résultats présentaient une biomasse de la matière sèche assez importante comparant à ceux décrits dans la littérature pour les poissons d'eau salée, dont la teneur en humidité se situe entre 66 et 84% (Vasconcellos, L. M. H et al, 1999).

II. Teneur en cendre

La teneur en cendres du corail *A. calycularis* (68,33%) était beaucoup plus élevée que celle enregistrée pour d'autres espèces de macro algues du golfe Persique dans des études précédentes où les teneurs variaient de 15.50% à 49.14%.

Khairy et El-Shafay (2013) ont signalé des niveaux plus élevés de teneur en cendres d'espèces d'algues pendant l'automne (à basse température) par rapport au ressort et à l'été (à haute température). Par conséquent, la teneur élevée en cendres trouvée dans notre étude est susceptible d'être expliquée par le fait que nos échantillons ont été collectés au cours de la saison basse température. En général, le niveau élevé de cendres est associé à la quantité d'éléments minéraux.

III. Teneur en lipides :

Le résultat de la teneur en lipides totaux du corail méditerranéen *A. calycularis* est mentionnée dans le tableau 1, d'où la teneur en lipide en utilisant la méthode d'extraction par soxhlet à enregistré une teneur de $2,27\% \pm 0,003$. D'autres études réalisées sur des microalgues marines *Nannochloropsis oculata* et *Dunaliella salina* ont démontrés des teneurs variant de 2 % jusqu'à 24 % leurs résultats sont assez élevés par rapport à notre résultat obtenu de notre espèce étudiée. En revanche une optimisation des conditions d'extraction des lipides a été réalisé par (Céline, 2013) afin d'extraire un maximum de lipides contenues dans les microalgues marines. Probablement une optimisation des facteurs influençant sur l'extraction

Résultats et discussion

des lipides de notre espèce marine pourrait être efficace pour extraire le maximum de lipides totaux contenus dans la matrice déjà structurellement complexe.

Toutefois, les lipides totaux présentent également des propriétés qui les rendent très intéressants pour des applications dans des secteurs tels que la cosmétique, la détergence ou la lipochimie. Des études antérieures ont été réalisées afin de rechercher les propriétés des lipides et leurs résultats on permet de les appliquer dans les produits solaires, les crèmes de soin et divers produits de maquillage pour le domaine cosmétique, dans les mousses, savons et shampoings pour la détergence ou dans les peintures, biolubrifiants pour la lipochimie

Tableau II : les rendements de quelques métabolites d'*A. calycularis* (Céline, 2013).

Métabolites	Rendement %
Humidité	59.08% ^b ±0.22
Cendres	68.33% ^a ±0.33
Lipides	2.27% ^c ±0.003

Note : a-c Les lettres en exposant différentes montrent des différences significatives entre les métabolites, déterminées par comparaison de toutes les paires, HSD de Tukey (P < 0,05).

IV. Teneur en protéines

La teneur en protéines totaux est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage ($y=0.3816x + 0.039$, $R^2 =0.9901$) (annexe1) tracée en utilisant comme standard BSA. Les concentrations sont exprimées en mg Evq BSA/ g.

Le résultat de la teneur en protéine pour l'extrait de corail est mentionné dans le tableau 2, une teneur de 6.55 ± 0.13 mg/g a été obtenue en utilisant la méthode de Bradford, d'autre part nos résultats de la teneur en protéine était assez proche de celle obtenue pour l'algue marine *Cystoseira crinita* avec une teneur de $6,8 \pm 1,9$ mg/g.

Bouglé en (2007), a étudié les activités biologiques de protéines marines. Ses résultats ont montré des fonctionnalités dans la défense immunitaire, contre les infections et dans la prévention du cancer, ainsi que des complications cardio-vasculaires et métaboliques liées à l'obésité.

V. Teneur en sucres totaux :

La teneur en sucres totaux est déterminée à partir des courbes d'étalonnages (annexe2) tracée en utilisant comme standard le glucose. Les concentrations sont exprimées en mg Eq glucose/g.

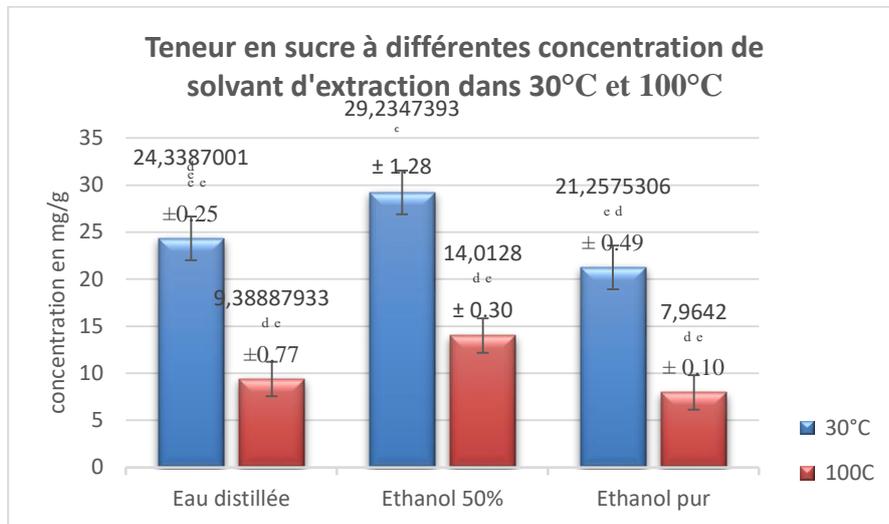


Figure 9: La teneur en sucre totaux

Note : c-e Les lettres en exposant différentes montrent des différences significatives entre les métabolites, déterminées par comparaison de toutes les paires, HSD de Tukey ($P < 0,05$).

Les extraits de polysaccharides de la poudre du corail dur *A. calycularis* ont été obtenus par précipitation, en utilisant de l'éthanol à différentes concentrations (éthanol pure, éthanol 50% et eau distillée) ainsi dans deux températures de traitements 100°C et 30°C. Selon l'histogramme 1, les résultats ont révélé que les rendements d'extraction variaient de 4.17 ± 0.30 à 29.23 ± 1.28 mg/g. L'analyse statistique a montré que les extraits obtenus dans les différentes conditions étaient significativement différents ($p\text{-val} < 0,05$), un meilleur rendement a été obtenu pour l'extrait traité à une température de 30°C avec de l'éthanol 50% avec un rendement de 29.23 ± 1.28 . En effet, les rendements d'extraction dépendent des solvants utilisés ainsi que des concentrations de solvants (J.A.G. Rodrigues, 2011). Bien que des rendements d'extraction plus faibles ont été obtenus pour des espèces *Secamone afzelii* et *Euphorbie hirta* avec des teneurs 4.43 ± 0.76 et 4.08 ± 0.74 respectivement (J.A.G. Rodrigues, 2011). Les rendements en glucides dans les deux températures de traitement 30°C et 100°C ont montrés des différences significatives ($p\text{-val} < 0,05$) et une augmentation de concentration en glucides a été obtenu lorsque la température de traitement était basse (30°C) pour les trois concentrations de solvant, l'effet de traitement à 100°C a probablement dénaturé une fraction glucidique.

VI. Taux en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins

La teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes est déterminée à partir des courbes d'étalonnage ($y = 10.812x - 0.0035$, $R^2 = 0.9957$) (annexe3) et ($y = 16.592x - 0.0648$, $R^2 = 0.9972$) (annexe4) tracées en utilisant comme standard l'acide gallique et de la quercétine, respectivement. Les concentrations sont exprimées en mg EqAG/g d'extrait sec pour les polyphénols totaux et en mg EqQ/ g d'extrait sec pour les flavonoïdes.

Nos résultats sont pertinents présentant ainsi une source riche en polyphénols totaux (155 ± 1.63 mg AG/g d'extrait) et en flavonoïdes (82.14 ± 6.39 mg AG/g d'extrait) en comparant à d'autres espèces marines. **Gopalraj et al ; (2011)** ont montré que l'extrait méthanolique de l'espèce algale *Turbinaria conoides* présentait des teneurs en composés phénoliques de ($1,23 \pm 0.173$ mg AG/g d'extrait) et **Duan et al (2006)** ont également révélés des teneurs en composés phénoliques dans la fraction d'éther diéthylique de l'algue rouge *Polysiphonia ureceolata* de 73.7 mg AG/g d'extrait.

Cox et al, (2010) ont montré aussi des teneurs en flavonoïdes des différents extraits d'algues plus faible à celle obtenu dans notre étude : *Laminaria digitata*, *Laminaria saccharina*, *Himanthalia elongata*, *Palmaria palmata*, *Chondrus crispus* et *Enteromorpha spirulina* d'où la teneur varient entre 7,66 et 42 ,5mg QE/g d'extrait. Les flavonoïdes marins ou terrestres sont reconnus comme substances potentiellement antioxydants ayant la capacité de piéger les radicaux libres et les formes réactives de l'oxygène singulier dans les organismes, ils présentent également des propriétés vasculoprotectives et veinotoniques, en réduisant la perméabilité des vaisseaux sanguins (**Burtin, P, 2003**).

L'analyse des résultats de la teneur en tanins condensés consignés dans le tableau 2 révèle une concentration assez importante en tanins ($68,22 \pm 0,38$ mg éq cat/g). L'augmentation de la température favorise d'une part la diffusion et la solubilité des substances extraites, d'autre part elle détruit certaines substances fragiles (**S. Jokić et al., 2010**). Cette teneur élevée en tanins condensés dans notre extrait peut être expliquée par la destruction par la chaleur des polyphénols oxydases (PPO) qui baissent la teneur en polyphénols ; ainsi, la rupture de liaisons entre les polyphénols et d'autres substances (protéines, polysaccharides...) menant à l'accessibilité à ces principes actifs peut expliquer de sa part cette abondance (**M. Lutz et al., 2011**). Des faibles teneurs en tannins ont été observés au niveau des extraits d'algues. Des

études récentes de Cox et al ont montrés que les teneurs en tanins condensés des extraits méthanoliques de *Laminaria digitata*, *Laminaria saccharina*, *Himanthalia elongata*, *Palmaria palmata*, *Chondrus crispus* et *Enteromorpha spirulina* varient de 3,19 à 38,34 mg CE / g. (Matanjun et al., 2008).

En revanche, la comparaison des résultats des polyphénols totaux avec ceux de la bibliographie est moins fiable car l'utilisation de différentes méthodes d'extraction, réduisent les possibilités de comparaison entre les études (Trabelsi et al., 2010) et même les teneurs en composés phénoliques, changent de façon considérable d'une espèce à une autre et à l'intérieur de la même espèce, à cause des facteurs extrinsèques (température, climat...), physiologiques (le degrés de mutation, organes utilisés) et la durée de stockage (Maisuthisakul et al., 2007).

Les polyphénols prennent une importance croissante notamment grâce à leurs effets bénéfiques pour la santé et leur rôle d'antioxydants naturels qui présentent de plus en plus des intérêts dans la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives. Ils sont également utilisés comme additifs dans l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Kahkonen et al., 2007).

VII. La teneur d'acide ascorbique :

La détermination de la teneur en acide ascorbique de l'extrait de corail est estimée par la méthode spectrophotométrie par Mau et al. (2005). Les teneurs ont été rapportées en mg Eq d'acide oxalique /100 g d'extrait. La méthode consiste à préparer une gamme de dilutions à partir d'une solution mère d'acide ascorbique de concentration connue. Ensuite, on mesure l'absorbance des solutions diluées à 515 nm. L'acide ascorbique considéré comme contrôle positif avec différentes concentrations (0-500 µg/ml), qui a permis de réaliser la courbe d'étalonnage ($R^2= 0.9812$ ($y= -3.3744x+ 0.5082$)) (annexe 5).

Les résultats de dosage de l'extrait de corail orange *A. calycularis* en acide ascorbique a révélé avec une teneur de 127.54 ± 7.54 mg/100g.

Grâce à ses propriétés biologiques et chimiques, la vitamine C peut être utilisée dans l'industrie cosmétique, en particulier dans les soins topiques. La vitamine C étant un agent réducteur, elle détruit les radicaux et agents oxydants agressifs, elle permet ainsi une photoprotection contre les UV A & B (Stamford, 2012). Elle stimule également la synthèse de collagène permettant ainsi une meilleure élasticité de la peau et le comblement des rides. La

Résultats et discussion

vitamine C ou ses dérivés peuvent être utilisés comme antioxydant dans les formulations cosmétiques. Les concentrations utilisées sont de 0,5 à 3% pour l'AA et ses esters hydrosolubles et de 0,1 à 0,5% pour ses esters liposolubles (Martini et Seiller 2006).

Tableau III : Représente les teneurs en métabolites secondaires et métabolites primaires

Métabolites	Teneurs mg /g
Protéine	6.55 ^e ± 0.13
Sucre totaux à 30°C	
Eau distille	24.33 ^{c d} ± 0.25
Ethanol pure	21.26 ^{c d} ± 0.49
Ethanol+eau	29.23 ^c ± 1.28
Sucre totaux à 100°C	
Eau distille	9.38 ^{d e} ± 0.77
Ethanol pure	7.96 ^{d e} ± 0.10
Ethanol+eau	4.17 ^{d e} ± 0.30
Polyphénol (mg Eq Ag/g d'extrait)	155.38 ^a ± 1.63
Flavonoïdes (mg Eq Q/g d'extrait)	82.14 ^b ± 6.39
Tanin	68.22 ^h ± 0.38
Acides ascorbique (mg/100g)	127.54 ^{f gh} ± 7.54

Note : a- Les lettres en exposant différentes montrent des différences significatives entre les métabolites, déterminées par comparaison de toutes les paires, HSD de Tukey (P < 0,05)

VIII. Evaluation de l'activité antioxydant :

La capacité antioxydant d'extrait de corail (*A. calycularis*) a été déterminée à partir de l'IC₅₀, c'est la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH et ABTS. Plus la valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydant d'un composé est importante (Locatelli et al., 2009).

Résultats et discussion

Nous avons déterminé pour chaque extrait, sa concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical libre DPPH et ABTS. À partir des équations des régressions linéaires des graphes.

Les résultats d'évaluation des activités antioxydants sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau IV : Le pouvoir antioxydant DPPH et ABTS (exprimé par $IC_{50} \pm$ écart-type (en mg/ml)) des extraits testés.

métabolites	IC ₅₀ test ABTS	IC ₅₀ test DPPH
Acide ascorbique	24.44±0.18 ^a	41.36±1.38 ^a
Lipides	5.69±0.35 ^b	18.50±2.05 ^b
Protéines	2.26±0.04 ^c	20.50±1.34 ^b
Glucides 50% éthanol	1.61±0.07 ^c	2.45±0.07 ^c
Polyphénols et flavonoïdes	0.73±0.02 ^c	1.15±0.12 ^c
Tanins	0.70±0.7 ^c	0.90±0.01 ^c

Note : a- c Les lettres en exposant différentes montrent des différences significatives entre les métabolites, déterminées par comparaison de toutes les paires, HSD de Tukey (P < 0,05).

La capacité antioxydante test ABTS et DPPH, des métabolites primaires et secondaires du corail coralligène ont été déterminés puis comparés à l'activité des composés antiradicaux de référence, en l'occurrence le BHT. Les résultats obtenus, exprimés en terme de concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC_{50}), ont montrés que tanins, polyphénols totaux et glucides étaient dotés d'un pouvoir antioxydant plus forte, allant de 0.70 à 1.61 mg/ml (test ABTS) et de 0.90 à 2.45 mg/ml (test DPPH). Mais significativement non différents par rapport aux autres métabolites tels que les protéines, lipides et l'acide ascorbique avec des IC_{50} variant de 2.26 à 24.44 mg/ml (test ABTS) et de 20.50 à 41.36mg/ml pour (test DPPH). En revanche d'un pouvoir antioxydant plus faible que celui de BHT dont l' IC_{50} est en moyenne de $15.99 \pm 0.09 \mu\text{g/mL}$. L'activité antioxydante la plus élevée a été enregistré pour les tanins et les polyphénols avec des IC_{50} de 0.70 et 0.73 mg/ml respectivement, ces composés sont déjà connus par leur capacité à induire la réaction de Fenton et limiter ainsi la production des EOR qui possèdent bien une propriété antioxydante intéressante (Prior et al.2005). L'activité antiradicalaire des

Résultats et discussion

lipides de notre matrice était plus forte à celle d'*Elaeoselinum asclepium* avec une $IC_{50} = 26.78 \pm 0.86$ mg/ml (Lu F et al., 2001; Singh G et al, 2006).

Pour les sucres totaux, leur activité antioxydante s'est révélée ainsi forte et non significativement différentes que ceux des composés phénoliques et cela est probablement due au fait que ce n'est pas uniquement les composés majoritaires (glucides) qui sont responsables de cette activité antiradicalaire. Mais, il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres (Lu et Yeap Foo, 2001; Sing et al., 2006). La vitamine C ou l'acide ascorbique est connue comme un puissant antioxydant hydrosoluble, à côté de son rôle dans la régénération de vitamine E. La vitamine C est capable de réduire d'autres biomolécules oxydées et d'agir comme un piègeur direct de radicaux libres (Sordillo, L.M et al., 2009) le faible pouvoir antioxydant enregistré dans notre étude pourrait être justifié par la dégradation de la vitamine C, un temps assez long de conservation (entre extraction et évaluation de l'activité antioxydante).

Les antioxydants issus des sources naturelles sont plus intéressants que les antioxydants synthétiques : ils n'induisent pas d'effets secondaires alors que les antioxydants synthétiques sont génotoxiques (Rohman et al. 2010). En conclusion, quantitativement et qualitativement, le corail coralligène *A. calycularis* constitue une source substantielle d'antioxydants sachant que sont particulièrement riches en tanins, les polyphénols et flavonoïdes et d'un pouvoir antiradicalaires.

Conclusion et perspectives

Ces dernières années, l'augmentation de l'évaluation des métabolites naturels issus des espèces marines pour leurs différentes activités biologiques est remarquable dans le monde. Les métabolites isolés à partir des espèces marines sont intéressantes en terme pharmacologique et thérapie alternative comme des modèles pour avoir des nouvelles substances comme les médicaments de mer.

L'objectif principale de cette étude et d'arriver à valoriser des substances naturelles quelle que soit primaire ou secondaire et d'évaluer leurs activités antioxydantes qui sont issue d'une corail (*Astroïde calycularis*).

À la cour de cette étude, nous avons effectué différentes méthodes de dosages afin d'évaluer les teneurs en substances bioactifs de notre matrice. Ainsi que les résultats obtenus démontrent que notre espèce plus de leurs métabolites primaires (protéines, lipides et sucres) elle synthétise des métabolites secondaires tels que les compose phénoliques qui sont douté d'une forte activité antioxydant.

L'activité antioxydante des extraits a été évaluée *in vitro* par le test DPPH et ABTS, les résultats obtenus confirment que les molécules bioactives des différents métabolites sont douées d'un fort pouvoir antioxydant (DPPH et ABTS).

D'après les résultats, les polyphénols, flavonoïdes et tanins ont présenté l'activité de pouvoir ABTS la plus élevée avec des IC50 : 0.73 ± 0.03 mg/ml, 0.70 ± 0.05 mg/ml.

Au terme de cette étude, et pour la compléter, il serait important :

- ✚ De faire des travaux supplémentaires pour identifier et isoler les métabolites bioactifs.
- ✚ D'approfondir les recherches sur les propriétés pharmacologiques d'*Astroïde calycularis*.
- ✚ De faire des études *in vitro* et *in vivo* pour évaluer d'autres propriétés antioxydantes, antibactériennes, anti-inflammatoires et anticancéreuses.

Références bibliographique

Références bibliographiques

AOAC, 1998. Official methods of analysis. Washington, DC. USA : Association Of Official Analytical.

Ballesteros, E. 2006. Mediterranean coralligenous assemblages: a synthesis of present knowledge. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 44: 123-195.

Banaigs B. & Kornprobst J.M. (2007). La biodiversité marine et le médicament : espoirs, réalités et contraintes. *L'actualité chimique*, 306, 7-13.

Benchikh.Y et al. / *Industrial Crops and Products* 60 (2014) 298–303]

Benhammou N. 2011. Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-ouest Algérien. Thèse de doctorat, Université Abou Bekr Belkaid, Algérie, 174 p.

Bianchi C. N. 2007. Biodiversity issues for the forthcoming tropical Mediterranean Sea. *Hydrobiologia*, 580: 7–21.

Boubekri C (2014) Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de Doctorat en Sciences, Université Mohamed Khider, Biskra.

Boudjouref, A. (2011). Etude de l'activité antioxydant et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Thèse de doctorat. Biochimie appliqué. Université Ferhat abbés, Sétif.

Brand-Williams W, Cavalier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol.* 1995; 28(1):25-30.

Bray, H.G., and W.V. Tharpe, in *Methods of Biochemical Analysis*, edited by D. Glick, John Wiley and Sons, New York, NY, 1954. *Analysis*, edited by D. Glick, John Wiley and Sons, New York, NY, 1954.

Bruneton J. (1993). *Pharmacognosie: phytochimie-plantes médicinales*, 2^o.éd. tec. et doc. lavoisier, Paris, 915 p.

Bruneton, J., “ Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales ”, Tec et doc édition Lavoisier, Paris, 3^{ème} édition, (1999), 1120p.

Bruneton J (1999) Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. *Technique et documentation Lavoisier* 3:286-347.

Bruneton, J., *Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales*, 4^e éd., revue et augmentée, Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, 2009, 1288 p. (ISBN 978- 2-7430-1188-8)

Références bibliographique

- Burtin, P. (2003). Nutritional value of seaweeds. *Electronic journal of Environmental, Agricultural and Food chemistry*, 2(4), 498-503.
- Cairns S. D. 2001. A generic revision and phylogenetic analysis of the Dendrophylliidae (Cnidaria: Scleractinia). *Smithsonian Contributions to Zoology*, 615: 1–75. doi:10.5479/si.00810282.615
- Casado-Amezua P., Gasparini G., Goffredo S. 2013. Phenological and morphological variations in the Mediterranean orange coral *Astroides calycularis* between two distant localities. *Zoology*, 116: 159– 167.
- Casellato S., Masiero L., Sichirollo E., Soresi S. 2007. Hidden secrets of the northern Adriatic: “Tegnùe,” peculiar reefs. *Central European Journal of Biology*. 2:122–136. <http://dx.doi.org/10.2478/s11535-007-0004-3>
- Céline Dejoye. Eco-extraction et analyse de lipides de micro-algues pour la production d’alga-carburant. Autre. Université d’Avignon, 2013. Français. NNT 2013AVIG0251
- Cox. S; Abu-Ghannam. N; Gupta. S (2010). An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of si species of edible Irish seaweeds. *International Food Research Journal* 17: 205-220.
- De Pooter H.L. ET Schamp N., Comparaison of the volatils composition of some Calamintha satureja species. In : Progress in essential oil research. Ed. E-J. Brunk, Walter De Gruyter, Berlin. (1986) 139-150p.
- Desmier T.2016. Les antioxydants de nos jours : définition et applications. Thèse de doctorat d’état, université de Limoges, France, 88 p.
- Dewarumez J.-M., Gevaert F., Massé C., Foveau A., Grulois D., 2011. Les espèces marines animales et végétales introduites dans le bassin Artois-Picardie. UMR CNRS 8187 LOG et Agence de l’Eau Artois-Picardie. 132 p.
- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouma D, Stocker P and Vidal N (2006) Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 97:654-660.
- Di Meo F, Lemaury V, Cornil J, Lazzaroni R, Duroux J-L, Olivier Y, et al. Free Radical Scavenging by Natural Polyphenols: Atom versus Electron Transfer. *J Phys Chem A*. 14 mars 2013;117(10):2082-92.
- Duan. X. J ; Zhang. W. W ; Li. X. M ; Wang. B. G (2006). Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga. *Polysiphonia urceolata*. *Food Chem*; 95:37-43. Chemists. 16th ed, 4th revision.
- Dubois, M., K. A. Gilles, et al. (1956). "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances". *Analytical Chemistry* 28: 350-356.

Références bibliographique

- F. Ramade. 'Eléments d'écologie appliquée', 4ème édition, Edition Dunod, pp 689. (2009) <https://www.sante-sur-le-net.com/ressources-marines-medicaments-demain/>
- Fabienne, O.L., La Nigelle, une épice d'intérêt médicinal. *Thèse*. (2013) P, 44-45.
- Garcia-Davis Sara, Mauricio Munoz-Ochoa, Catalina Rivas-Moral and Ezequiel Viveros-Valdez, 2018. Biological Activities from the Marine Sponge *Suberites aurantiacus*. *Journal of Biological Sciences*, 18: 152-157.
- Goffredo S., Gasparini G., Marconi G., Putignano M. T., Pazzini C., Zaccanti F. 2010. Gonochorism and planula brooding in the Mediterranean endemic orange coral *Astroides calycularis* (Scleractinia: Dendrophylliidae). Morphological aspects of gametogenesis and ontogenesis. *Marine Biology Research*, 6: 421-436. <http://dx.doi.org/10.1080/17451000903428488>.
- Goffredo S., Gasparini G., Marconi G., Putignano M. T., Pazzini C., Airi V., Zaccanti F. 2011b. Sexual reproduction in the Mediterranean endemic orange coral *Astroides calycularis* (Scleractinia: Dendrophylliidae). *Bulletin of Marine Science*, 87 (3): 589-604. <http://dx.doi.org/10.5343/bms.2010.1068>
- HERCBERG, S., GALAN, P., PREZIOSI, P., BERTRAIS, S., MENNEN, L., MALVY, D., ROUSSEL, A., FAVIER, A. and BRIANÇON, S. (2004). The SU.VI.MAX Study. *Archives of Internal Medicine*, 164(21), p.2335.
- Hong, J.S. 1980. *Étude faunistique d'un fond de concrétionnement de type coralligène soumis à un gradient de pollution en Méditerranée nord-occidentale (Golfe de Fos)*. Thèse de Doctorat. Université d'Aix -Marseille II. 258 pp.
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7485537/> Proximate Analysis of Selected Macroalgal Species from the Persian Gulf as a Nutritional Resource.
- Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*. 23 mars 2005;53(6):1841-56.
- Khairy, H.M. and El-Shafay, S.M. (2013) Seasonal Variations in the Biochemical Composition of Some Common Seaweed Species from the Coast of Abu Qir Bay, Alexandria, Egypt. *Oceanologia*, 55, 435-452. <http://dx.doi.org/10.5697/oc.55-2.435>
- Kruger, A. y M.H. Schleyer. 1998. Sexual reproduction in the coral *Pocillopora verrucosa* (Cnidaria: Scleractinia) in KwaZulu-Natal, South Africa. *Marine Biology*, 132: 703-710.
- Laborel, J. 1961. Le concrétionnement algal "coralligène" et son importance géomorphologique en Méditerranée. *Rec. Trav. Stat. Mar. Endoume*, 23: 37-60.
- Laubier, L. 1966. Le coralligène des Albères: monographie biocénétique. *Annales de l'Institut Océanographique de Monaco* 43, 139-316.

Références bibliographique

- Locatelli M, Gingro R, Travaglia F, Coisson JD, Maurizio R and Arlorio M (2009) Study of the DPPH-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chemistry* 114:889-897.
- Lu F. and Yeap Foo L. (2001). Antioxidant Activity of Polyphenols from Sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem.* 75 (2): 197-202. Singh G., Marimuthu P., de Heluani C. S. and Catalan C. A. N. (2006). Antioxidant and Biocidal Activities of *Carum nigrum* (Seed) Essential Oil, Oleoresin, and their Selected Components. *J Agric Food Chem.* 54 (1):174-181.
- M. Lutz, C. Henri'quez, M. Escobar. Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.), raw and cooked. *J. of Food Compos. Anal.* Vol. 24. (2011). pp. 49-54.
- Maisuthisakul, P., M. Suttajit and R. Pongsawatmanit, 2007. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some thai indigenous plants. *Food Chem.*, 100: 1409-1418.
- Maksimovic, Z., Malencic, N., & Kovacevic, N. (2005). Polyphenol contents and antioxidant activity of maydis stigma extracts. *Bioresource Technology*, 96(8), 873–877.
- Mansour, R., AlJoubbeh, M. The effect of Storage Time and Humidity on Vitamin C level in Infant's baby milk powder after opening the package. 2014, Vol.6, No.2, pp 1124-1130.
- Martini M-C et Seiller M. 2006. Actifs et additifs en cosmétologie. Éditions Tec & Doc , Éditions médicales internationales, Paris : Cachan, 1051 p. p.
- Matanjun, P., Mohamed, S., Mustapha, N. M., Muhammad, K., & Ming, C. H (2008). Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo. *Journal of Applied Phycology*, 20(4), 367.
- Nadja Cachet. Métabolites secondaires d'invertébrés marins et biosynthèse in vivo d'alcaloïdes d'Agelas oroides. Chimie. Université Nice Sophia Antipolis, 2009. Français. tel-00455200
- Oomah, B.D., Corbé, A. and Balasubramanian, P. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of bean hulls. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58: 8225-8230.
- Pallas P. S. 1766. *Elenchus zoophytorum sistens generum adumbrationes generaliores et specierum cognitarum succinctas descriptions cum selectis auctorum synonymis.* Hagae comitum: P. van Cleef. XVI: 28-451.
- Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, et al. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr.* sept 2003;133(9):2812-9.
- Pierre-Éric Campos. Biodiversité des invertébrés marins : de l'isolement à la modélisation moléculaire de métabolites secondaires pour la découverte de nouveaux candidats

Références bibliographique

médicaments. Chimie analytique. Université de la Réunion, 2017. Français. ffNNT : 2017LARE0007ff. fftel-01561205

Pietta P.-G. (2000), « Flavonoids as Antioxidants », *Journal of Natural Products*, vol. 63, n°7, pp. 1035-1042

Popovici C, Saykova L and Tylkowski B (2009) Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel* 4:25-39.

R. Torres-Martínez, Y.M. García-Rodríguez, P. Ríos-Chávez, A. Saavedra-Molina, J.E. López-Meza, A. Ochoa-Zarzosa, R.S. Garciglia, Antioxidant activity of the essential oil and its major terpenes of *Satureja macrostema* (Moc. and Sessé ex Benth.) Briq., *Pharmacogn. Mag.* 13 (2017) S875. (ABTS).

Rufino MS, Alves RE, de Brito ES, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F, Mancini-Filho J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chem.* 2010;121:996–1002.

S. Jokić, D. Velić, M. Bilić, A. Bucić-Kojić, M. Plan inić and S. Tomas. Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. *J. Food Sci.* vol. 28. (2010). pp. 206- 212.

Singleton VL and Rossi JAj (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16:85-144.

Sordillo, L.M.; Aitken, S.L. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* **128**, 2009, **104– 109**,

Stamford NPJ. 2012. Stabilité, transdermal penetration, and cutaneous effects of ascorbic acid and its derivatives. *Journal of cosmetic dermatology*, 11 : 310

Swain T, Hillis WE (1959) The phenolics constituents of *Prunus domestica* -I- the quantitative analysis of phenolics constituents. *J Sci Food Agric* 10: 63–81.

Talbi. H, A. Boumaza, K. El-Mostafa, J. Talbi, A. Hilali, Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L, *J. Mater. Environ. Sci.* 6 (2015) 1111–1117 (DPPH).

Trabelsi D., Mengoni A., Aouani M.E., Bazzicalupo M. and Mhamdi R. 2010. Genetic diversity and salt tolerance of *Sinorhizobium* populations from two Tunisian soil. *Ann Microbiol.* 60: 541-547.

Vasconcellos, L. M. H.; Lauria, D. C.; Silva, L. H. C.; Taddei, J. F.; *Quim. Nova* 1999, 22, 889.

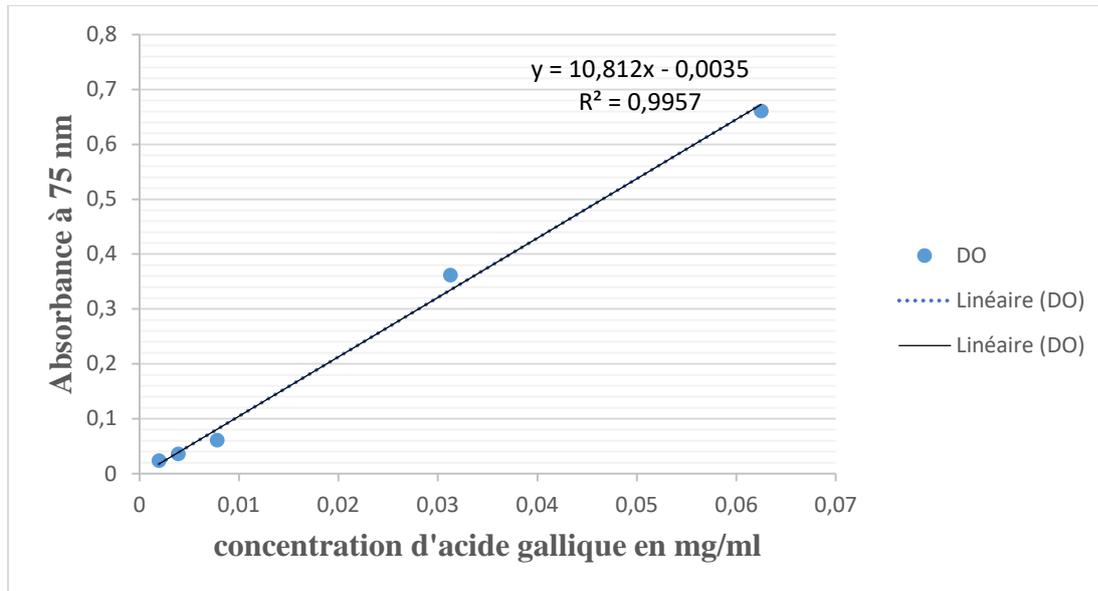
Yassir. Bengueddour et al. 2013. Etude de l'activité anti oxydante de *Gelidium Sesquipedale* par chromatographie liquide haute performance

Références bibliographique

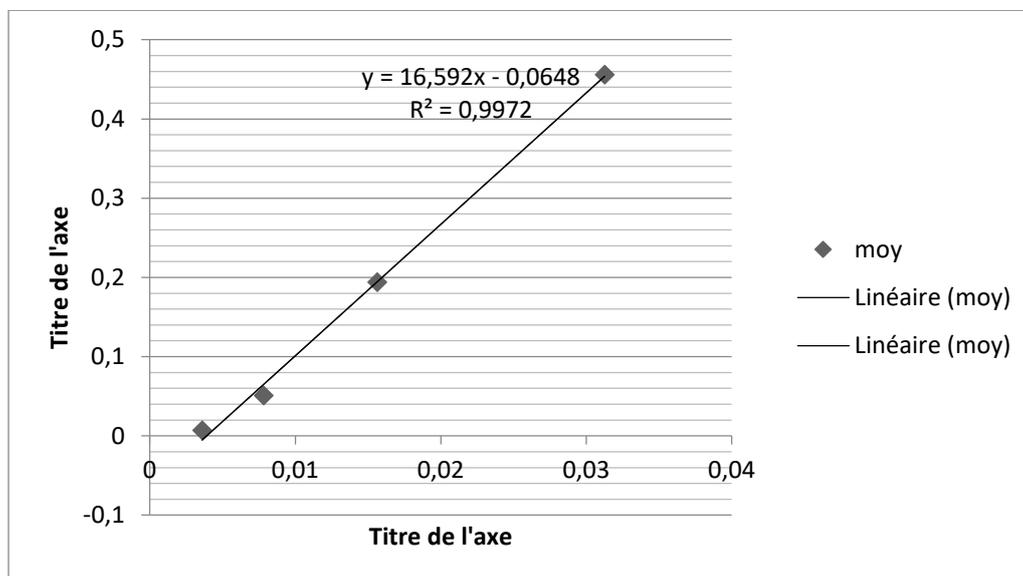
Zibrowius H. 1983. Nouvelles données sur la distribution de quelques scléactiniaires 'méditerranéens' à l'Est et à l'Ouest du détroit de Gibraltar. Rapports et procès-verbaux des réunions. Commission internationale pour l'exploration scientifique de la Mer Méditerranée, 28: 307-309.

Zibrowius H. 1995. The Southern *Astroides calycularis* in the Pleistocene of the Northern Mediterranean – An indicator of climatic changes (Cnidaria, Scleractinia). *Geobios*, 28: 9-16.

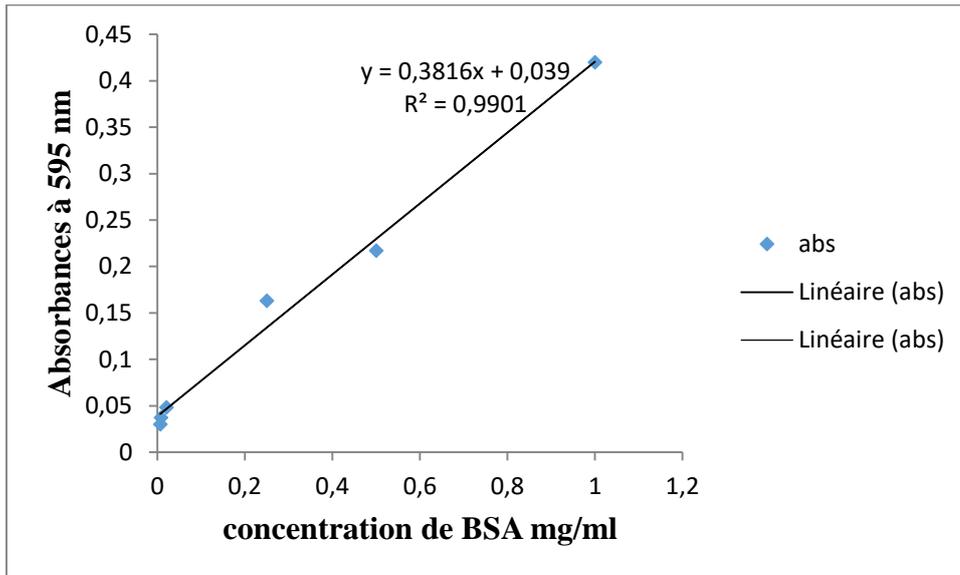
Annexe 1 : Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux



Annexe 2 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes

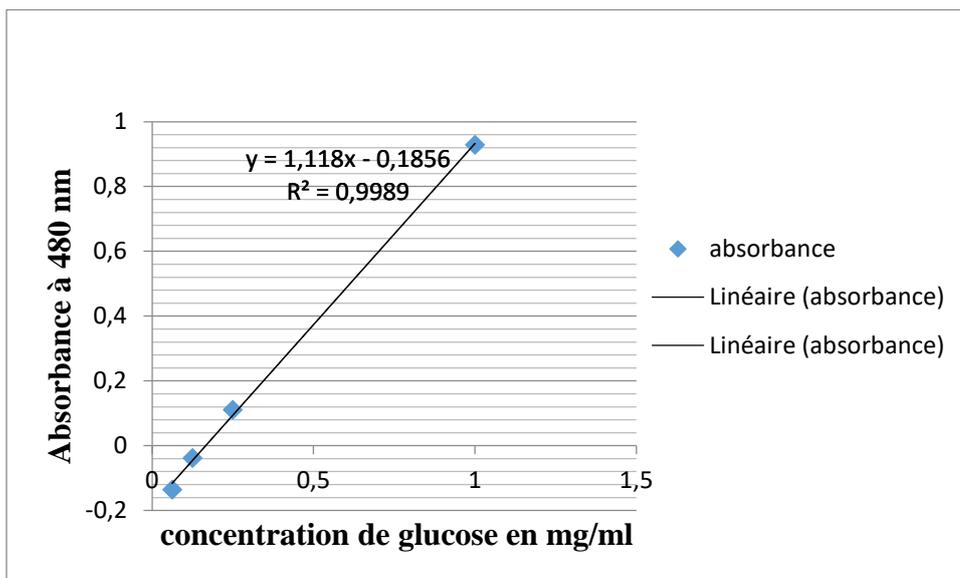


Annexe 3 : Courbe d'étalonnage des protéines

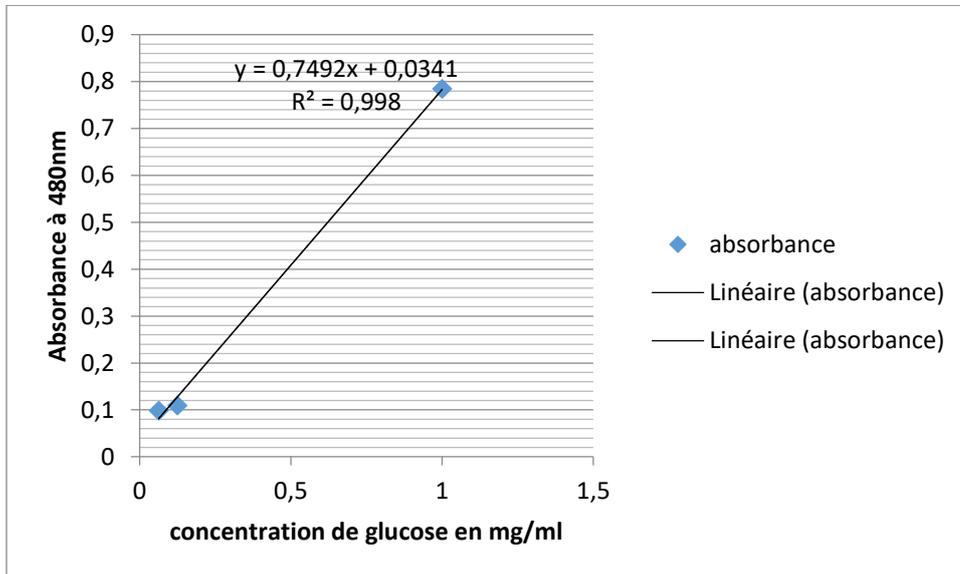


Annexe 4 : Courbes d'étalonnages de glucose (30°C)

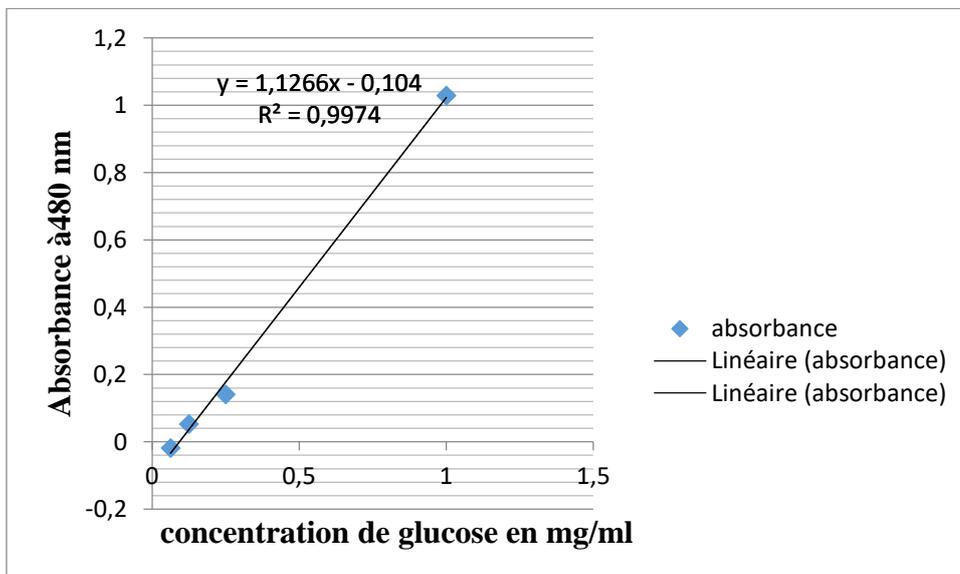
1.1. Eau distillé



1.2. Ethanol+eau



1.3. Ethanol pure



La préparation des réactifs utilise :

DCPIP (dichloro-phéno-indo-phénol)

1. Préparation de DPPH :

Mélanger 0.004 mg de DPPH avec 100 ml de méthanol et agitation.

2. Préparation d'ABTS :

La solution d'ABTS a été préparée en mélangeant 7.4 mmol/L d'ABTS et 100 ml d'éthanol.

3. Préparation de DCPIP :

La solution de DCPIP a été préparée en mélangeant 1g de dcpip et 100ml d'eau distillé.

4. Préparation tampon phosphate buffered saline a PH=7.4

1 solubiliser 2g de NaCl on ajoute 50mg KCl puis on ajoute 0.36g de Na_2HPO_4 puis 61.25g de KH_2PO_4 dissoudre le tout dans un peu moins de 200ml d'eau distillée ajuste le PH a 7.4 on complete la solution a 250ml

NaCl : la masse volumique 58.4 g/mol

KCL : masse volumique 74.551g/mol

Na_2HPO_4 : masse volumique 141.96 g/mol

KH_2PO_4 : masse volumique 136.086 g/mol

Résumé

Les invertébrés marins ont été une source importante de métabolites bioactifs ayant un large spectre d'activités intéressantes et menés dans des perspectives de valorisation, prometteuse pour l'avenir en biochimie et en pharmacologie.

Dans le cadre de la découverte de nouveaux antioxydants à partir des ressources naturelles, nous nous sommes intéressées par l'étude phytochimique et l'activité antioxydante des métabolites bioactifs d'une espèce marine *Astroïdes calycularis*. Les résultats obtenus montrent la richesse de notre espèce en cendre, en tanins, en polyphénols, en flavonoïdes et moyennement en vitamine C, de plus en métabolites primaires. Nous avons enregistré des rendements élevés en composés phénoliques 155.38 ± 1.63 mg EqAG/g, en Flavonoïdes 82.14 ± 6.39 mg EqQ/g d'extrait et en tanins $68,227 \pm 0,38$ mg/g d'extrait.

L'évaluation du pouvoir antioxydant *in vitro* par deux méthodes a révélé des capacités antioxydantes chez tous les métabolites primaires et secondaires. L'extrait de tains a montré une meilleure capacité antioxydante, un bon piègeur de radical libre DPPH• ($IC_{50} = 0.90 \pm 0.01$ mg/ml), il possède également une forte capacité réductrice ABTS ($IC_{50} = 0.70 \pm 0.07$ mg/ml), suivi des polyphénols et flavonoïdes avec une capacité réductrice ABTS ($IC_{50} = 0.70 \pm 0.07$ mg/ml) ($IC_{50} = 0.73 \pm 0.02$ mg/ml) et DPPH ($IC_{50} = 1.15 \pm 0.12$ mg/ml).

Mots clés : *Astéroïde calycularis*, molécules bioactifs, extraction, dosage, Activité antioxydante.

Abstract

Marine invertebrates have been an important source of bioactive metabolites with a wide spectrum of interesting activities and conducted in perspectives of valorization, promising for the future in biochemistry and pharmacology. In the framework of the discovery of new antioxidants from natural resources, we are interested in the phytochemical study and the antioxidant activity of bioactive metabolites of a marine species *Astroïdes calycularis*. The results obtained show the richness of our species in ash, tannins, polyphenols, flavonoids and moderately in vitamin C, furthermore in primary metabolites. We recorded high yields of phenolic compounds 155.38 ± 1.63 mg EqAG/g, Flavonoids 82.14 ± 6.39 mg EqQ/g extract and tannins 68.227 ± 0.38 mg/g extract. In vitro antioxidant capacity evaluation by two methods revealed antioxidant capacities in all primary and secondary metabolites. The tanins extract showed better antioxidant capacity, a good free radical scavenger DPPH• ($EC_{50} = 0.90 \pm 0.01$ mg/ml), it also has a strong reducing capacity ABTS ($EC_{50} = 0.70 \pm 0.07$ mg/ml), followed by polyphenols and flavonoids with a reducing capacity ABTS ($EC_{50} = 0.70 \pm 0.07$ mg/ml) ($EC_{50} = 0.73 \pm 0.02$ mg/ml) and DPPH ($IC_{50} = 1.15 \pm 0.12$ mg/ml).

Key words: Astroides calycularis, bioactive molecules, extraction, dosage, antioxidant activity.

ملخص

كانت اللافقاريات البحرية مصدرا مهما للأيضات النشطة بيولوجيا مع مجموعة واسعة من الأنشطة المثيرة للاهتمام وتم تنفيذها من منظور التنمية ؛ واعدة للمستقبل في الكيمياء الحيوية والصيدلة. كجزء من اكتشاف مضادات الأكسدة الجديدة من الموارد الطبيعية، كنا مهتمين بالدراسة الكيميائية النباتية والنشاط المضاد للأكسدة للمستقلبات النشطة بيولوجيا من الأنواع البحرية *Astroids calycularis*.

النتائج التي تم الحصول عليها تظهر ثراء جنسنا في الرماد والعفص والبوليفينول والفلافونويد وبشكل معتدل في فيتامين سي ، وأكثر في المستقلبات الأولية. سجلنا إنتاجية عالية من المركبات الفينولية 1.63 ± 155.38 مجم EqAG / جم ، في مركبات الفلافونويد.

6.39 ± 82.14 مجم مكافئ / جرام من المستخلص وفي العفص 0.38 ± 68.227 مجم / جرام من المستخلص. كشف تقييم قوة مضادات الأكسدة في المختبر بطريقتين عن القدرات مضادات الأكسدة في جميع المستقلبات الأولية والثانوية أظهر مستخلص التانين قدرة مضادات أكسدة أفضل ، كاسح جيد للجذور الحرة $IC_{50} = 0.90 \pm 0.90$ DPPH • 0.01 مجم / مل) ، كما أن لديها قدرة اختزال قوية $IC_{50} = 0.70 \pm 0.07$ ABTS (مجم / مل) ، تليها البوليفينول والفلافونويد مع قدرة مختصرة مجم / مل $IC_{50} = 0.70 \pm 0.07$ ABTS ($IC_{50} = 0.73 \pm 0.02$ مجم / مل) و $IC_{50} = 1.15 \pm 0.12$ DPPH (مجم / مل).

الكلمات المفتاحية: *Astroides calycularis*، جزيئات نشطة بيولوجياً، استخراج، جرعة، نشاط مضاد للأكسدة