

N° d'ordre :

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE &
POPULAIRE**

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR &
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**



UNIVERSITE DJILLALI LIABES
FACULTE DES SCIENCES De La Nature
Et De La Vie
SIDI BEL ABBES

THESE
DE DOCTORAT EN SCIENCES

Présentée par

FELLOUS Samir

Spécialité : Sciences de l'environnement

Option : Algologie

Intitulé

*Etude biologique et biochimique de l'algue brune
Cystoseira amantacea stricta de la baie d'Oran*

Devant l'honorable jury composé de :

Président :

Mr MEHDADI ZOHEIR

Professeur UDL SBA

Examineurs :

Mr AOUES ABDELKADER,

Mr CHAHROUR FAYÇAL,

Mr KHAROUBI OMAR,

Professeur Université Oran I

MCA Université Oran I

Professeur Université Oran I

Directeur de thèse :

Mr AMAR YUCEF,

Professeur UDL SBA

Année universitaire 2018-2019

Remerciements

Plus de 6 ans se sont écoulés depuis le début de la thèse de doctorat. Je me permets donc de prendre un peu de temps et d'espace pour remercier l'ensemble des personnes qui, de près ou de loin m'ont permis de venir à bout de ce projet.

Je remercie mon directeur de thèse Youcef Ammar. Merci Pr Ammar de m'avoir permis de découvrir la mer pendant toute la durée de mon travail de thèse et que je continue de découvrir au point d'être passionné de m'avoir initié aux sciences de l'environnement alors que je suis titulaire d'un magistère en génétique et amélioration des plantes.

Remerciement et profonde gratitude vont aux membres de la commission d'examen, le Pr Mehdadi Zouhir de l'université Djillali Liyabes, Pr Aoues Abdelkader, Pr Kharoubi Nouredine, et Chahrour Faycal Maître de conférence de l'université d'Oran I.

Je ne serais jamais venue à bout de cette thèse sans le soutien de mes ami(e)s et de ma famille. Cette thèse est aussi la vôtre. Je n'ai pas été très disponible pour vous ces derniers mois, années, mais je compte bien me rattraper.

Mon ami le Dr Benzaoui Mohamed Yacine, malgré le temps qui passe, trop vite, et les kilomètres qui nous séparent, Je n'ai pas été très disponible ces dernières années mais à chaque fois qu'on se voit, j'ai l'impression qu'on s'est quitté la veille. Je suis fière de toi, de cette entreprise que tu as créée toute seule. Bravo mon ami. Maintenant que ma thèse est finie on va enfin pouvoir créer notre entreprise dont tu m'as tant parlé.

Papa, Maman, merci de m'avoir offert une enfance pleine d'insouciance et d'amour. Ce cocon que vous avez créé m'a permis d'arriver où je suis aujourd'hui. J'admire votre droiture et votre intégrité. Merci pour votre soutien sans faille.

Imad, Rafic, Aïcha, ma femme et mon ange Inès je n'aurais pas pu rêver meilleurs « modèles » que vous. Je suis heureux de voir que le temps qui passe nous rapproche. À quelques jours près. Un immense merci à Hichem, Ilyes, Chafii pour tous ces moments partagés depuis 3 ans.

Je remercie particulièrement mon adorable femme, qui m'a soutenue moralement et qui m'a laissé réquisitionner son résistance son PC.

Merci à toi mon amour mon soleil Inès pour m'avoir donné la joie et le courage de continuer ma thèse.

*Je dédie ce travail
à ma grande mère
et à mon frère
houcine*

A mon chère frère Hocine et à mes grands parents

Résumé

Ce travail de doctorat traite de l'optimisation des facteurs d'extraction des composés phénoliques à partir d'extraits bruts méthanoïques de l'algue brune *Cystoseira amontacea var. stricta*, par la méthodologie de surface de réponse (RSM), une méthode basée sur un modèle mathématique et statistique. Pour les polyphénols, On a utilisé du méthanol, un solvant organique aqueux, avec différentes concentrations (20%, 50%, 80%), un ratio liquide / solide 20 ; 50 ; 80, des températures de 20 °C ; 40°C ; 60°C, les temps d'extraction (30 - 150 min). Les résultats ont montré que la valeur optimale des polyphénols totaux (65,98 mg d'équivalents d'acide gallique/g) de *C. amontacea var. Stricta* a été obtenu avec du méthanol aqueux à 20%, un rapport liquide / solide (80) à 40 °C pendant 150 minutes. L'ajustement des données expérimentales et la prédiction de la réponse ont été faits avec un modèle d'équation de second ordre qui a produit un bon ajustement : $R^2 = 0,72$ % pour les TPC. Pour les flavonoïdes, les résultats ont montré que la valeur optimale des flavonoïdes totaux (23,80 mg d'équivalents de Quercétine / g) de *C. amontacea var. Stricta* a été obtenu avec du méthanol aqueux à 80%, un rapport liquide / solide (1/5) à 20 °C pendant 123,29 minutes. L'ajustement des données expérimentales et la prédiction de la réponse ont été faits avec un modèle d'équation de second ordre qui a produit un bon ajustement: $R^2 = 0,91$ pour TFC.

Mots clés: Macroalgae, *C. amontacea var. Stricta*, TPC, TFC, méthodologie de surface de réponse

Abstract:

This doctoral work deals with the optimization of the extraction methods of phenolic compounds from crude methanolic extracts of the brown alga *Cystoseira amontacea var. stricta*, by response surface methodology (RSM) a method based on a mathematical and statistical model. For the polyphenols, methanol, an aqueous organic solvent, with different concentrations (20%, 50%, 80%), a liquid / solid ratio (20, 50, 80), temperatures (20 °C, 40 °C, 60 °C), the extraction times (30 - 150 min). The results showed that the optimal value of total polyphenols (65.98 mg Gallic acid equivalents / g) of *C. amontacea var. Stricta* was obtained with 20% aqueous methanol, a liquid / solid ratio (80) at 40 °C for 150 mn. The fit of the experimental data and the prediction of the response were made with a second-order equation model that produced a good fit: $R^2 = 0.72\%$ for the TPC. For flavonoids, the results showed that the optimal value of total flavonoids (23.80 mg Quercetin equivalents/g) of *C. amontacea var. Stricta* was obtained with 80% aqueous methanol, a liquid / solid ratio (20) at 20 °C for 123.29 minutes. The fit of the experimental data and the prediction of the response were made with a second-order equation model that produced a good fit: $R^2 = 0.91$ for TFC.

Keywords: Macroalgae, *C. amontacea var. Stricta*, TPC, TFC, response surface methodology

ملخص

مشروع الدكتوراه يتعامل مع الاستفادة المثلية من طرق استخراج المركبات الفينولية من مستخلصات الميتانويد الخام من الطحلب البني *Cystoseira amontacea var stricta*. بصرامة، من خلال طريقة (methodology surface de response RSM) التي تعتمد على نموذج رياضي وإحصائي. النسبة لمادة البوليفينول، الميتانول، مذيب عضوي مائي، بتركيزات مختلفة (20%، 50%، 80%)، نسبة سائلة / صلبة (20، 50، 80)، درجات حرارة (20°C، 40°C، 60°C)، وأوقات الاستخلاص (30 - 150 دقيقة). أظهرت النتائج أن القيمة المثلى لإجمالي البوليفينول (65.98 مجم من مكافئات حمض جاليك / غرام) من *C. amontacea var stricta* يتم الحصول عليه بدقة باستخدام 20% من الميتانول المائي، ونسبة سائلة / صلبة (80) عند 40 درجة مئوية لمدة 150 دقيقة. تم عمل ملاءمة البيانات التجريبية والتنبؤ بالاستجابة مع نموذج معادلة من الدرجة الثانية أنتجت معامل جيد: $R^2 = 0.72$ % لـ TPC. بالنسبة للفلافونويد، أظهرت النتائج أن القيمة المثلى للفلافونويد الكلي (23.80 ملغ من كيرسيتين مكافئ / غرام) من *amentacea var stricta*. *Cystoseira* يتم الحصول عليه بدقة باستخدام 80% من الميتانول المائي، ونسبة سائلة / صلبة (20) عند 20 درجة مئوية لمدة 123.29 دقيقة. تم إجراء ملاءمة البيانات التجريبية والتنبؤ بالاستجابة مع نموذج معادلة من الدرجة الثانية التي أنتجت ملاءمة جيدة: $R^2 = 0.91$ لـ TFC.

كلمات البحث: الطحلب البني RSM, TPC, TFC, *C. amontacea var stricta*, الميتانول, فلافونويد

Objectif de la thèse

Vu, la simplicité de manipulation et la disponibilité relative des produits d'analyse et de dosage des métabolites secondaires par rapport aux réactifs et kit de préparation de l'ADN et des protéines qui sont quant à eux, très chères et souvent indisponibles, la plupart des projets de fin d'études de master et de doctorat, en biologie et en biochimie sont orientés vers l'étude des principes actifs et les métabolites secondaires tels que les polyphénols, les tanins, les flavonoïdes...etc.

Pour l'industrie pharmaceutique, toutes les décisions critiques sont prises sur la base des résultats obtenus par le laboratoire de contrôle, telles que la libération d'un lot de produit pharmaceutique, l'établissement et la vérification de la durée de validité d'un produit, la bioéquivalence entre deux médicaments, les études de pharmacocinétique ou le diagnostic d'une maladie, etc. la fiabilité de ces décisions ne dépend que de la fiabilité et la cohérence des résultats obtenus par les méthodes d'analyses. Les coûts des résultats erronés peuvent être énormes dans tous les domaines. Par exemple la nécessité de faire des répétitions d'analyse.

L'objectif principal de cette thèse est l'optimisation de l'extraction de deux métabolites secondaires à savoir les polyphénols et flavonoïdes à partir d'extraits bruts d'algue brune du genre *Cystoseira*. Ces données optimales nous permettent d'utiliser la juste valeur des facteurs et des produits pendant la manipulation au laboratoire avec la même espèce ou les espèces apparentées, et ainsi d'économiser notre temps, notre énergie mais aussi le coût général de l'expérimentation.

Pour atteindre notre objectif, nous avons eu recours à la méthodologie de surface de réponse qui à l'aide d'analyse statistique et de modèle mathématique polynomiaux de second degré nous a permis justement d'utiliser la valeur optimale de chacun des quatre paramètres utilisés dans notre étude (concentration de méthanol ; ratio ; température et temps d'extraction).

Liste des figures

FIGURE	Page
Figure 1.1: Algues brunes: <i>Himanthalia elongata</i> (a); <i>Laminaria digitata</i> (b); <i>Palmaria palmata</i> (c) ; <i>Codium fragile</i> (Suringar) (d), (Source: http://www.mer-littoral.org)	3
Figure 1.2. a: <i>Palmophyllum crassum</i> ; b : <i>Codium tomentosum</i> (Source: http://www.mer-littoral.org)	4
Figure 1.3. a : <i>Cystoseira baccata</i> ; b: <i>Desmarestia ligulata</i> (Source: http://www.mer-littoral.org).	5
Figure 1.4. a: <i>Asparagopsis armata</i> ; b: <i>Peyssonnelia cf. squamaria</i> (Source: http://www.mer-littoral.org).	6
Figure 1.5 : photo de <i>Cystoseira stricta</i> à gauche, aspect général de <i>Cystoseira stricta</i> d'après Verlaque (1995) à droite	8
Figure 1.6 : Quelques sites de distribution de l'espèce <i>Cystoseira amentacea var. stricta</i> , (en haut : site de Ain Defla de Kristel à l'est d'Oran ; en bas : site Sidi Mejdoub à l'est de Mostaganem (Belmokhtar, 2012)	10
Figure 1.7: Schéma du cycle de vie des espèces du genre <i>Cystoseira</i> . A-individu mature, B-extrémité d'une ramification avec des conceptacles, C-conceptacle en coupe transversale (D-gamète femelle, E-gamète mâle, F-zygote et G-zygote avec rhizoïdes (Gómez Garreta <i>et al.</i> , 2001).	12
Figure 1.8: Schéma du cycle de vie des espèces du genre <i>Cystoseira</i> . A-individu mature, B-extrémité d'une ramification avec des conceptacles, C-conceptacle en coupe transversale (D-gamète femelle, E-gamète mâle, F-zygote et G-zygote avec rhizoïdes (Gómez Garreta <i>et al.</i> , 2001).	14
Figure 1.9 : A) Schéma d'un embryon de 10 jours du groupe <i>C. mediterranea</i> avec ses 4 rhizoïdes. (Guern, 1962). B) Schéma d'un embryon de 2 jours du groupe <i>C. compressa</i> avec ses 8 rhizoïdes. (Guern, 1962).	15
Figure 1.10 : Squelette de base des flavonoïdes.	21
Figure 1.11: Les différentes classes de flavonoïdes.	22
Figure 1.12: Le niveau bas du facteur est noté par - 1 et le niveau haut par +1. Le domaine de variation du facteur est constitué de toutes les valeurs comprises entre le niveau bas et le niveau haut.	30
Figure 1.13 : Chaque facteur est représenté par un axe gradué et orienté. Les axes des facteurs sont orthogonaux entre eux. L'espace ainsi défini est l'espace expérimental.	30

Figure 1.14 : Dans l'espace expérimental, les niveaux des facteurs définissent des points expérimentaux.	31
Figure 1.15 : Les points expérimentaux sont disposés dans le domaine d'étude défini par l'expérimentateur.	31
Figure 1.16 : Les meilleurs emplacements des points expérimentaux sont les sommets du domaine d'étude lorsque le modèle postulé est du premier degré.	34
Figure 2.1 : Zones d'échantillonnage de <i>C. amontaceae var stricta</i>	36
Figure 2.2 : Schéma du traitement des échantillons de <i>Cystoseira amentacea var. stricta</i> .	37
Figure 2.3 : Schéma Échantillonnage, mesures et analyses	38
Figure 2.4 : Schéma de la procédure de dosage des polyphénols selon Wong <i>et al.</i> (2006) modifiée.	39
Figure 2.5 : Schéma de la procédure de dosage des flavonoïdes selon Djeridane <i>et al.</i> (2006) modifié	40
Figure 2.6 : schéma de la <u>RMS et Box Benken</u>	42
Figure 2.7 :schéma de l'quation polynomiale, analyse statistique et désirabilité	43
Figure 3.1 : Effet de la concentration du méthanol et du temps d'extraction sur le TPC	48
3.2 : Effet du ratio et de la concentration du méthanol sur le TPC	49
Figure 3.3 : Effet de la température et du temps d'extraction sur le TPC	50
Figure 3.4 : Effet du temps et de la température d'extraction sur le TPC	51
Figure 3.5 : Effet de la concentration du méthanol et du ratio sur le TFC.	57
Figure 3.6 : Effet du ratio et de la concentration du méthanol sur le TFC	58
Figure 3.7 : Effet de la température d'extraction et de la concentration du méthanol sur le TFC	60
Figure 3.8 : Effet du temps et de la température d'extraction sur le TFC	61

Liste des tableaux

Tableaux	page
Tableau 1.I: Classification linnéenne du genre <i>cystoseira</i> (Carl Von Linné, 1758)	11
Tableau 1.2: Absorption UV des flavonoïdes dans le méthanol (Harborne, 1989; Markham, 1982 ; Merghem, 2009 ; Voirin, 1983)	23
Tableau 2.1.: Les valeurs codées et décodées des variables indépendantes dans la conception expérimentale	40
Tableau 2.2 : La matrice Box-Behnken de la réponse du rendement en TPC de <i>C. amontaceae var stricta</i>	41
Tableau 3.1.: La matrice Box-Behnken de la réponse du rendement en TPC de <i>C. amontaceae var stricta</i>	44
Tableau 3.2. : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur le TPC.	46
Tableau 3.3: Analyse de variance de TPC ANOVA	47
Tableau 3.4 : La matrice Box-Behnken de la réponse du rendement en TFC de <i>C. amontaceae var stricta</i>	53
Tableau 3.5: Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur le TFC.	55
Tableau 3.6 : Analyse de variance de TFC (ANOVA)	56

Table des matières

Introduction générale	1
CHAPITRE 1 : Revue bibliographique	3
1. Données bibliographiques sur les algues marines	3
1 .1. Définition	3
1 .2. Les grands groupes des algues marines	4
1 .2. 1. Les Chlorophytes	4
1 .2. 2. Les Chromophytes	4
1 .2. 3. Les Rhodophytes	5
1.3. Présentation du genre <i>Cystoseira</i> description de l'espèce <i>Cystoseira stricta</i>	6
1.3.1. Présentation du genre <i>Cystoseira</i>	6

1.3.2. Description de l'espèce <i>Cystoseira stricta</i>	7
1.4. Répartition géographique des espèces de <i>Cystoseira</i> en méditerranée et en Algérie	8
1.4.1. Répartition géographique des espèces de <i>Cystoseira</i> en méditerranée	9
1.4. 2. Les Cystoseires des côtes Algériennes	10
1.5. Position taxonomique et phylogénie du genre <i>Cystoseira</i>	11
1.5.1. Position taxonomique	11
1.5.2. Phylogénie	11
1.6. Cycle de vie et reproduction	12
1.6.1. Cycle de vie	12
1.6.2. Reproduction	13
1.7. Importance écologique du genre <i>Cystoseira</i>	16
1.8. Intérêt pharmacologique des espèces marines :	17

1.9. Métabolites secondaires des algues brunes et méthodes d'extractions	19
1.9.1. Généralités sur les composés phénoliques	19
1.9.2. Classification des composés phénoliques	19
1.9.2.1. Les composés non-flavonoïdes	19
A. Les acides phénoliques	19
A.1. Les acides hydroxybenzoïques	19
A.2. Les acides hydroxycinnamiques	20
B. Les tannins hydrolysables	20
C. Les stilbénoides	20
D. Les lignines	20
1.9.2.2. Les flavonoïdes	20
1.9.3. Bioactivité et application des composés phénolique	24

1.9.4. Extraction solide-liquide des composés phénoliques	26
1.9.4.1. Effet du matériel végétal	27
1.9.4. 2. Effet du soluté	27
1.9.4.3. Effet de l'agitation	27
1.9.4.4. Effet du ratio liquide solide	27
1.9.4.5. Effet du solvant	28

1.9.4.6. Effet du couple température-temps	28
1.10. Les plans d'expériences	29
1.10.1. Notion d'espace expérimental	29
1.10.2. Notion de surface de réponse	32
1.10.3. Notion de modélisation mathématique	32
1.10.4. Le modèle de l'expérimentateur	32
1.10.5. Plans factoriels complets à deux niveaux	33
1.10.6. Plans de Box-Behnken	34
Chapitre 2: MATÉRIELS ET MÉTHODES	36
2.1. Site d'étude	36

2.2. Matériels végétal	37
2.3. Procédure d'extraction	37
2.4. Contenu total en polyphénols (TPC)	38
2.5. Contenu total en flavonoïdes (TFC).	39
2.6. Analyses statistiques	40
3. RESULTATS ET DISCUSSION	44
3.1. Résultats et discussion des polyphénols	44

3.1.1. L'effet des variables d'extraction sur le taux de polyphenol totaux (TPC)	47
3.1.1.1. Effet du solvant (méthanol)	47
3.1.1.2. Effet du ratio	49
3.1.1.3. Effet de la température	50
3.1.1.4. Effet du temps	51
3. 1.2. Validation du model	52
3.2. Résultats et discussion des flavonoïdes	53
3.2.1. L'effet des variables d'extraction sur le taux de flavonoïdes totaux	57
3.2.1.1. Effet du solvant (méthanol)	57
3.2.1.2. Effet du ratio	58
3.2.1.3. Effet de la température	59
3.2.1.4. Effet du temps	60

3.2.2. Validation du model	62
CONCLUSION	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
Annexe	
Article	
Résumé	

Introduction générale

Introduction générale

Le milieu marin et les organismes qui l'habitent constituent une source infinie de molécules actives à structure chimique originale (Smit, 2004). Ces composés sont synthétisés par des voies métaboliques différentes de celles observées en milieu terrestre. Parmi les organismes marins, les algues, qui sont le plus souvent fixées sur un substrat, ont élaboré des défenses chimiques pour empêcher leur colonisation par d'autres espèces, y compris les microorganismes (Paul, 1987 ; Chbani, 2011).

Les algues occupent une place importante dans le milieu marin d'où leur abondance et leur accessibilité. Ce sont des organismes peu évolués, dépourvus d'armes de défense, qui vivent dans des conditions environnementales et écologiques sévères (pression, salinité, absence de lumière, compétence inter et intra spécifique...). Ces facteurs poussent ces organismes à produire des molécules de défense : ce sont les métabolites secondaires. Ces derniers sont des molécules biologiquement actives et de grandes originalités structurales (Rinehart, 1992 ; Tringali, 1997). Ils pourraient agir directement et ayant ainsi moins d'effets secondaires (Stewart *et al.*, 2003). À l'image des végétaux terrestres, les algues marines ont également développé des mécanismes de défense contre les agressions extérieures tels que l'exposition au soleil. Ces agressions extérieures entraînent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) capables de générer des dommages responsables de la destruction des cellules. De nombreuses études ont démontré que les algues, comme les végétaux terrestres, produisent des enzymes pro-oxydantes et des molécules antioxydantes pouvant empêcher la survenue d'un stress oxydatif (Zubia *et al.* 2009 ; Farvin et Jacobsen 2013)

La méthode des surfaces de réponse est un ensemble de technique mathématiques qui se base sur la conception expérimentale pour déterminer la portée des variables d'entrée indépendantes. Cette méthode permet, grâce à des modèles mathématiques empiriques, de déterminer une relation d'approximation entre les réponses de sortie et le variables d'entrée pour optimiser les paramètres du procédé afin d'atteindre des réponses souhaitables. Dans cette méthode, la réponse peut s'écrire sous la forme suivante

L'importance des propriétés médicales et économiques des composés polyphénols (CP) ont conduit à des spéculations sur la manière d'obtenir un extrait très riche en ces composés. L'extraction est l'une des opérations les plus largement utilisées pour obtenir certains composants initialement retenus dans une matrice biologique. Les phénols étant très réactifs,

Introduction générale

les conditions et paramètres d'extraction peuvent modifiés profondément leur interaction avec leur matrice et leur environnement. Dans la littérature, les paramètres les plus étudiés qui ont eu un impact important sur l'extraction des CP et MA étaient: 1) le type de solvant d'extraction ou de mélange de solvants; 2) temps d'extraction et 3) température d'extraction. La littérature révèle que le méthanol et l'acétone sont les solvants d'ex-traction les plus utilisés pour la récupération du phénol et des anthocyanes à partir de matériel végétal (El Hajj *et al.*, 2012). Il a été prouvé que les mélanges d'eau et de solvants donnaient des extraits plus riches dans leur diversité phénolique (Jayaprakasha, 2001 ; Spigno et De Faveri, 2007) que le solvant utilisé seul.

La méthodologie de surface de réponse (MSR) contribuera à une meilleure compréhension de l'effet et de l'interaction des paramètres opératoires permettant une optimisation de l'opération : une maximisation de l'extraction des composés phénoliques à partir des matrices végétales et de leurs coproduits et une minimisation du temps et de la consommation de solvant.

Dans ce contexte, nous avons réaliser une optimisation des paramètres d'extraction tels que la concentration du solvant, le ratio, temps et la température d'extraction des métabolites secondaires (polyphénols et flavonoïdes) à partir d'extraits bruts méthanoïques de l'algue brune *Cystoseira amontacea var. stricta*, une espèce endémique de la Méditerrané qui été récolté de la côte est algérienne (la plage de Kristel). 27 échantillons avec des combinaisons différentes des niveaux de paramètres d'extraction ont été testés pour chaque métabolite secondaire (polyphénols et flavonoïdes), et les résultatsont été traités par un logiciel permettant l'optimisation des paramètres d'extractions utilisant la méthodologie des surfaces de réponses.

Chapitre I :
Revue bibliographique

Chapitre 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Données bibliographiques sur les algues marines**1.1. Définition :**

C'est un ensemble de végétaux photosynthétiques très divers et dont l'appareil végétatif relativement simple est appelé « thalle », elles peuvent être de forme microscopiques alors que d'autres mesurent plusieurs mètres de longueur. Quoiqu'elles aient des dimensions et des formes très variables, elles ont toutes des caractères communs (Figure 1.1). Elles sont essentiellement aquatiques dans les eaux douces ou marines, et certaines vivent sur la neige ou la glace des régions polaires et des hautes montagnes. D'autres au contraire supportent dans les eaux des sources thermales des températures élevées (algues thermophiles). Elles comprennent 20 000 à 30 000 espèces dans le monde, soit 18% du règne végétal (Ainane, 2011).

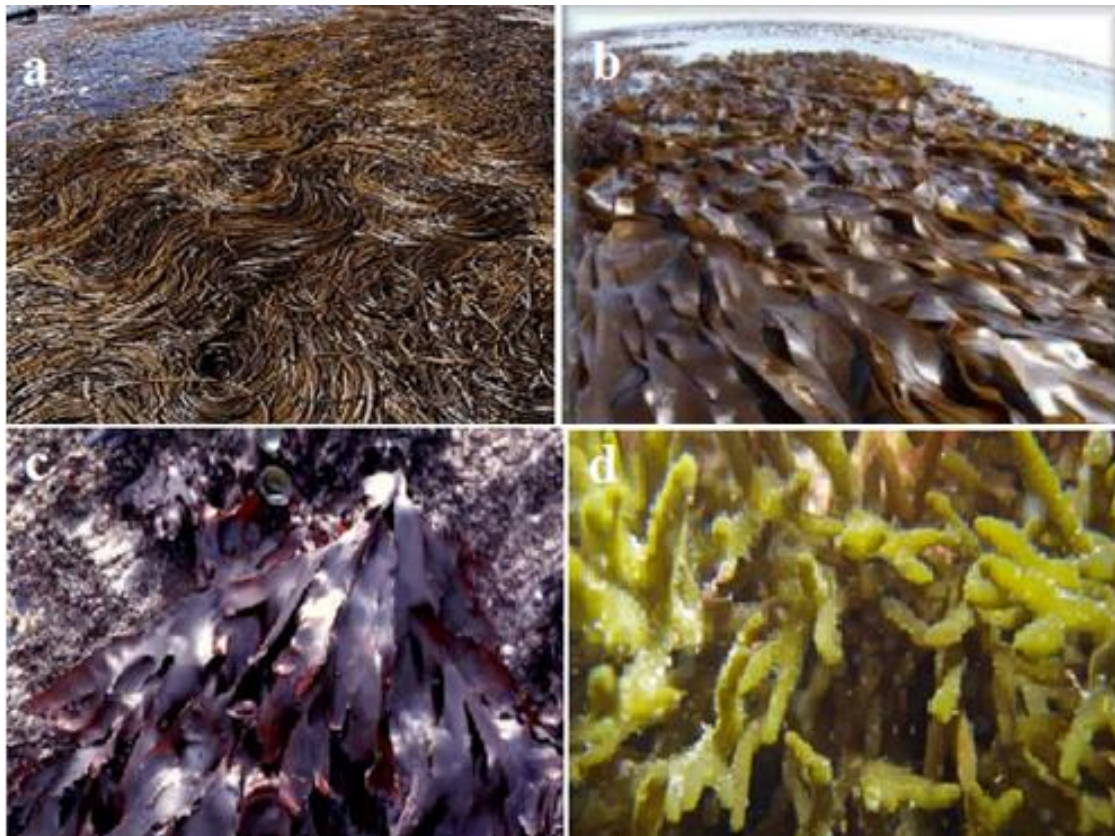


Figure 1.1: Algues brunes: *Himanthalia elongata* (a); *Laminaria digitata* (b); *Palmaria palmata* (c) ; *Codium fragile* (Suringar) (d), (Source: <http://www.mer-littoral.org>)

1 .2. Les grands groupes des algues marines

1 .2. 1. Les Chlorophytes

Dans cette classe les chlorophylles a et b dominant dans les chloroplastes donnant une couleur typiquement verte des thalles, cependant, l'exposition prolongée aux fortes intensités lumineuses provoque la synthèse de pigments photoprotectants (caroténoïdes), qui confèrent aux thalles des couleurs orangées à jaunâtres. Dans les eaux tropicales ce groupe d'algues est riche en espèces et en formes alors que dans les eaux tempérées, ce groupe d'algues est peu diversifié. Les algues vertes sont présentes dans tous les systèmes aquatiques depuis les milieux marins jusqu'aux eaux douces (Figure 1.2).

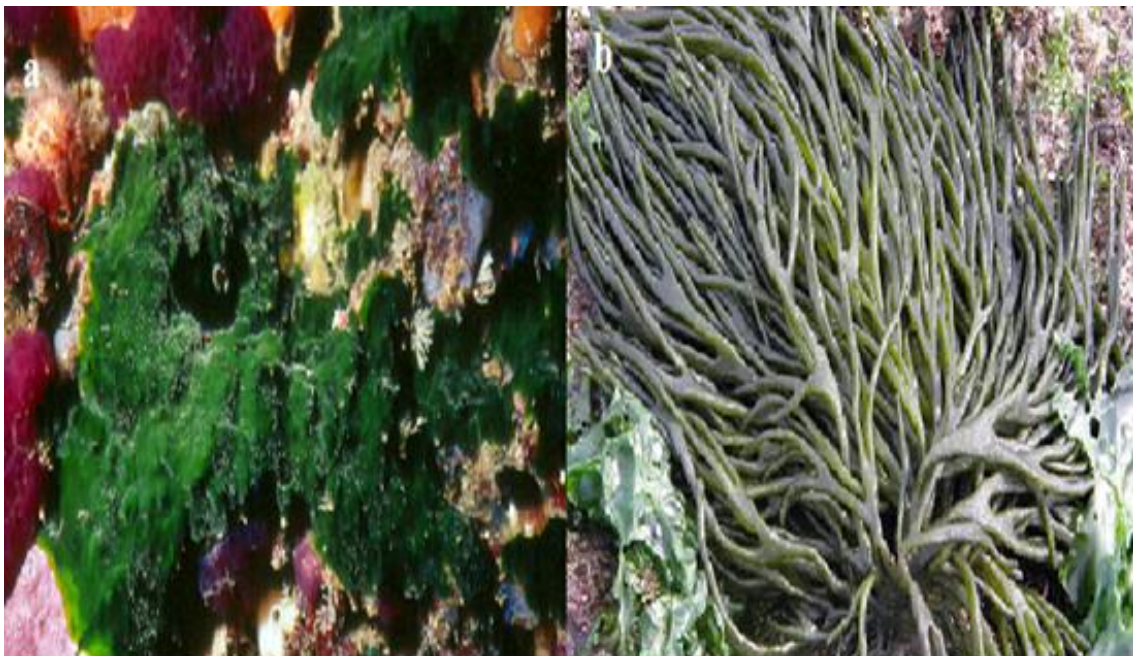


Figure 1.2. *a*: *Palmophyllum crassum* ; *b* : *Codium tomentosum* (Source: <http://www.merlittoral.org>)

1 .2. 2. Les Chromophytes

Les Chromophytes, regroupent la classe des Fucophycées qui sont représentés par les algues brunes de cette classe étaient appelées autrefois Phéophycées. Ils sont exclusivement marins. La fucoxanthine un pigment bruns très abondant dans cette classe masque les chlorophylles a et c ce qui confère une couleur brune aux thalles. Les Phéophycées ont une grande diversité morphologique couvrant les formes filamenteuses relativement simples aux grandes algues

brunes dont l'organisation morphologique complexe évoque les tiges feuillées des végétaux supérieurs.

Les Chromophytes se sont principalement diversifiées dans les mers froides et tempérées où elles forment les grandes forêts sous-marines. Dans les eaux tropicales, elles sont moins nombreuses en espèces, mais représentent les plus grands thalles et forment les populations les plus denses (Figure 1.3).

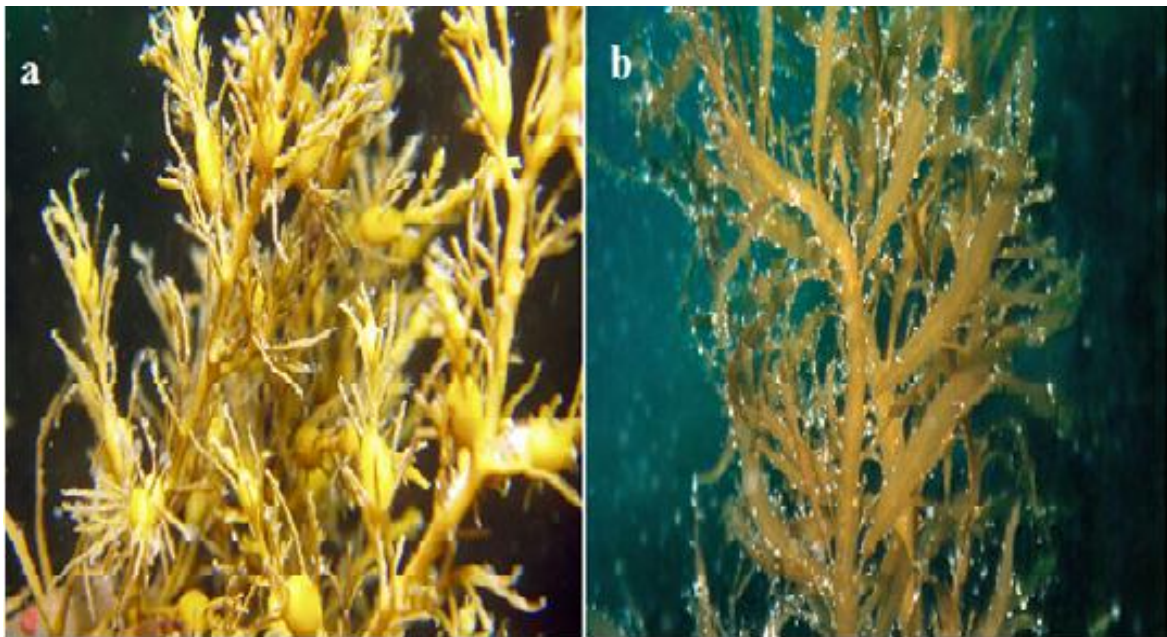


Figure 1.3. **a :** *Cystoseira baccata* ; **b:** *Desmarestia ligulata* (Source: <http://www.mer-littoral.org>).

1 .2. 3. Les Rhodophytes

Les algues rouges sont représentées par les Rhodophytes, la Phycoérythrine (rouge) et la Phycocyanine (bleue) qui sont des pigments surnuméraires masquant la chlorophylle et donnent à ces algues une couleur originale. Les proportions relatives entre les différents pigments, conjuguées avec la forme du thalle, donnent à la lumière du jour toutes les couleurs imaginables depuis le brun noirâtre jusqu'au rose très clair en passant par les rouges pourpres et les orangés. De plus, pour une même espèce, la couleur varie en fonction de l'exposition aux rayons lumineux : souvent les individus qui se développent aux forts éclaircissements

montrent des couleurs délavées, où dominent les jaunes orangés en raison de la forte concentration en pigments caroténoïdes photoprotectants (Figure 1.4).

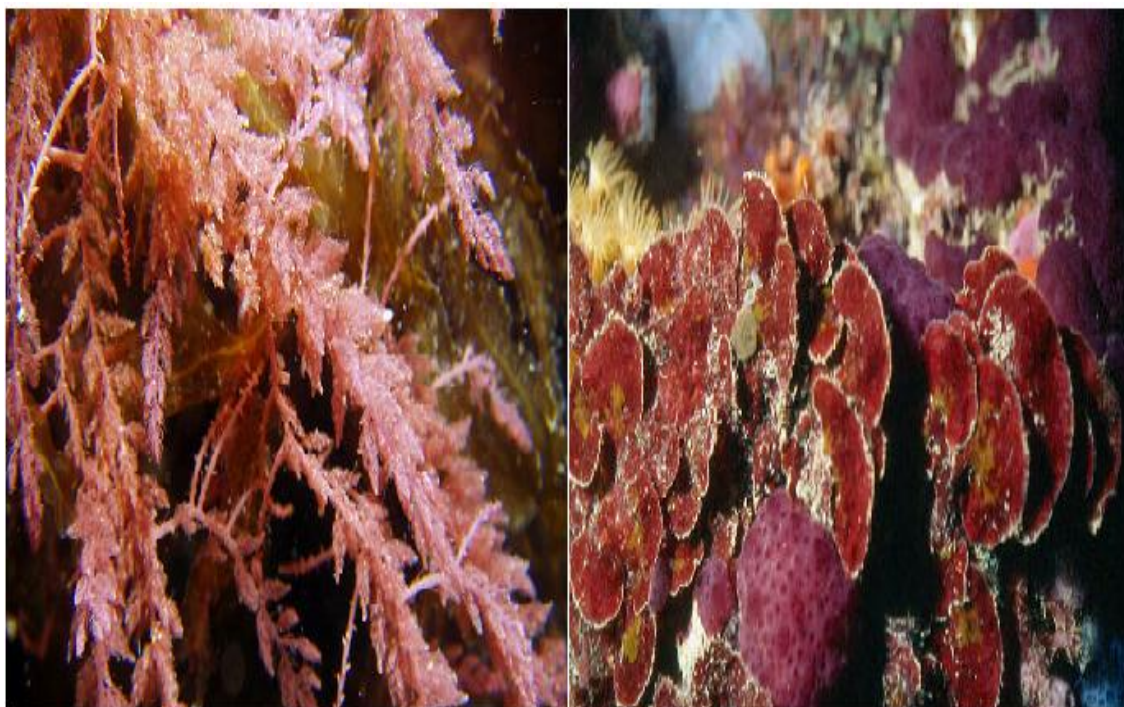


Figure 1.4. a: *Asparagopsis armata* ; b: *Peyssonnelia cf. squamaria* (Source: <http://www.mer-littoral.org>).

1. 3. Présentation du genre *Cystoseira* description de l'espèce *Cystoseira stricta*

1.3.1. Présentation du genre *Cystoseira*

Le genre *Cystoseira*, qui regroupe 51 espèces, est essentiellement représenté dans les eaux froides et tempérées de l'hémisphère nord, et à la mer Méditerranéenne (Dahmani, 2014).

Les espèces du genre *Cystoseira* ont été décrites par Agardh (1820) comme des algues arborescentes, très ramifiées qui peuvent atteindre, pour les plus grandes, plus d'un 1 mètre de hauteur (Gómez *et al.* 2001). Les ramifications donnent à l'algue un aspect touffu. Les espèces du genre *Cystoseira* sont caractérisées par la présence d'un disque basal épais qui les fixe au substrat. Ce disque est d'autant plus développé que l'espèce vit dans une zone agitée (Dahmani, 2014). D'après Gómez *et al.* (2001) ; Cormaci *et al.* (2012) ; Taskin *et al.* (2012), les principaux caractères servant à la détermination des espèces sont :

- Plante libre/ attachée (*C. barbata* / *C. foeniculacea*)
- Cespiteuse/ axe simple (*C. stricta*/ *C. barbata*)
- Présence/absence de tophule (*C. funkii*/ *C. brachycarpa* var. *balearica*)
- Présence/absence d'aérocystes (*C. usneoides*/ *C. algeriensis*)
- Iridescence (*C. stricta*/ *C. mediterranea*, *C. elegans*)
- Apex lisse/épineux (*C. barbata*/ *C. crinita*).

1.3.2. Description de l'espèce *Cystoseira stricta*

Cystoseira stricta est une algue érigée de couleur brune dont les thalles peuvent atteindre 40 cm de hauteur. Cette espèce est fixée au substrat par une base encroûtante étendue, d'où partent plusieurs axes dressés (thalle cespiteux). Ces axes sont cylindriques à sommet épineux à peine saillant et mesurent de 2 à 15 cm de hauteur (Figure 1.5). Ils produisent des rameaux primaires caducs, cylindriques et souvent sinueux, pouvant atteindre 30 cm de longueur qui portent des rameaux secondaires beaucoup plus courts, disposés irrégulièrement et eux-mêmes divisés (Dahmani, 2014).

Tous ces rameaux sont couverts de nombreux ramules courts spiniformes assimilés à de petites feuilles (Cabioc'h *et al.* 2006). Les rameaux primaires, très flexibles, suivent le mouvement des vagues. Lorsqu'ils sont émergés, ils s'étalent sur la roche. Les jeunes rameaux et les extrémités de l'algue ont souvent une iridescence bleu-vert. L'algue est couverte de petites cryptes pilifères dispersées (Delepine *et al.*, 1987).

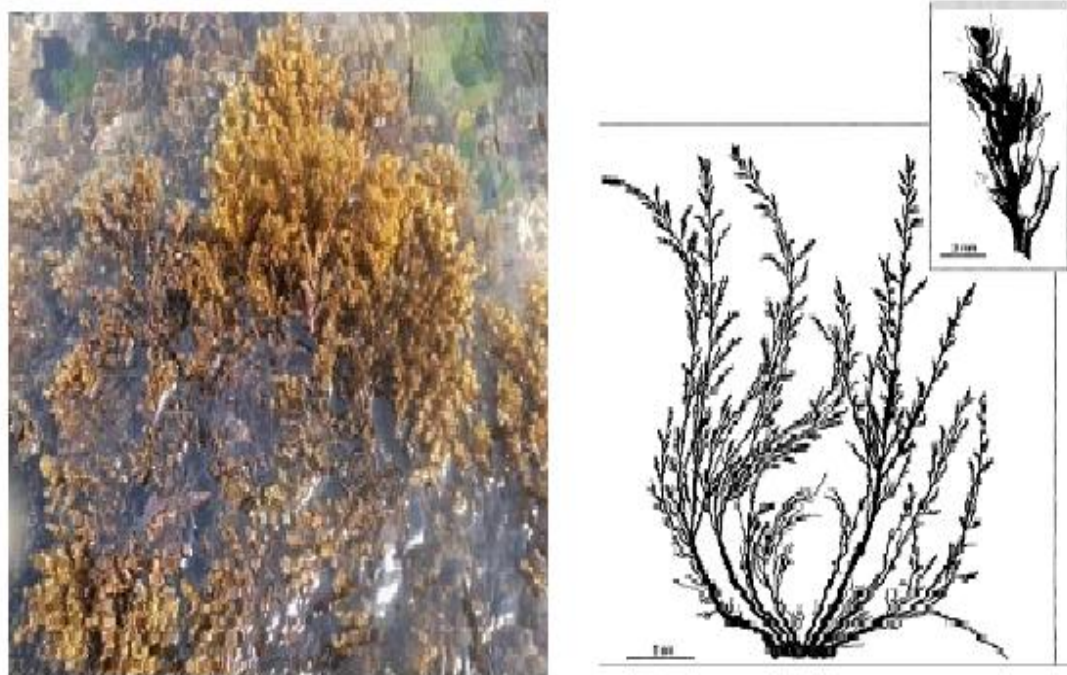


Figure 1.5 : photo de *Cystoseira stricta* à gauche, aspect général de *Cystoseira stricta* d'après Verlaque (1995) à droite

1.4. Répartition géographique des espèces de *Cystoseira* en méditerranée et en Algérie

Plusieurs études ont signalé la présence de *C. stricta* qui est endémique de la Méditerranée plus particulièrement sur les côtes de la Méditerranée occidentale. On peut citer par exemple :

- ✓ Espagne : côtes de Catalogne (Pinedo *et al.*, 2007), ile de Minorque (sales et Balesteros, 2009).
- ✓ France : golfe du Lion (Sauvageau, 1912), Corce (Boudouresque et Perret-Boudouresque, 1987), Cap-Croisette (Boudouresque, 2005), côtes Albères (Thibaut *et al.*, 2005), côtes de la région « Provence-Alpes-Côte d'Azur » (Sunini *et al.*, 2007).
- ✓ Italie : région de Livorno (Cinelli, 1969), Sicile (Giaccone *et al.*, 1985), Gênes (Mangialajo *et al.*, 2008).
- ✓ Tunisie : l'espèce est mentionnée à la Galite (Feldmman, 1961) et à Korbous (Ben Maiz, 1984), Archipel de Jalta (Omrane, 2009).

- ✓ Algérie : elle a été signalée à El Marsa (Sauvageau, 1912; Boudouresque, 1970a; 1971b), El Kala (Grimes, 2005), Kristel (Tremblin *et al.*, 1986; Kawas, 2010) et à Cherchell et Tamenfoust (Seridi *et al.*, 2007).

1.4.1. Répartition géographique des espèces de *Cystoseira* en méditerranée

Les espèces du genre *Cystoseira* se développent dans l'étage infralittoral. En Méditerranée, les marées lunaires sont très faibles et confondues avec les marées barométriques. Des marées supérieures à 1 m sont observées au Nord de l'Adriatique (Italie et Slovénie) et dans le Golfe de Gabes (Tunisie) (Robvieux, 2013).

L'étage infralittoral s'étend de la surface, jusqu'à la limite inférieure des herbiers de magnoliophytes marines et des macrophytes photophiles. Cette limite inférieure varie, de quelques mètres à 40m de profondeur, en fonction de la qualité d'eau et de la topographie.

L'infralittoral est composé de trois horizons :

- un horizon supérieur (de 0 à -1 m), où l'intensité de la lumière et l'hydrodynamisme est forte ;
- un horizon moyen (de -1 à -15 m), où l'intensité de la lumière et hydrodynamisme, est atténuée ;
- un horizon profond (de -15 à -40 m), où l'intensité de la lumière et l'hydrodynamisme est faible.

Trente-cinq associations ou faciès ont été décrits pour cette biocénose (Peres et Picard 1964 ; Pérès, 1967 ; Meinesz *et al.*, 1983; Bellan-Santini *et al.*, 1994; Relini et Giaccone, 2009).

Les différents taxons du genre *Cystoseira* se développent principalement dans toute la Méditerranée (Mer de Marmara et Mer Noire incluses). Certains se développent aussi dans le proche Atlantique.

Seize taxons présents en Méditerranée, sont aussi présents dans d'autres mers et océans du monde *C. compressa* est signalée comme introduite depuis 1970 aux Bermudes (Schneider et Lane, 2007).

Cependant, certaines localisations sont douteuses pour certains taxons, comme *C. amentacea* observée au Soudan ou *C. foeniculacea* observée en Mer Rouge dont Papenfuss (1968) pense

qu'il y a eu une erreur d'identification. La signalisation de Silva *et al.* (1996) de *C. zosteroides* en Inde est douteuse ainsi que celle de *C. usneoides* au Sénégal par Price *et al.* (1978).

1.4. 2. Les Cystoseires des côtes Algériennes

En Algérie, les forêts de Cystoseires sont constituées essentiellement de *Cystoseira amentacea var. stricta*, une algue Fucophyceae endémique de la Méditerranée qui est inféodée à la frange infralittorale (du niveau 0 à 0,5 m de profondeur) en mode battu à très battu. *Cystoseira amentacea var. stricta*, est signalée le long du littoral rocheux oranais (Kawas *et al.*, 2010) (figure 1.6), et algérois (Chalabi *et al.*, 2002; Seridi *et al.*, 2007) ainsi qu'au niveau de la région d'El Kala à l'extrême est (Grimes, 2005).

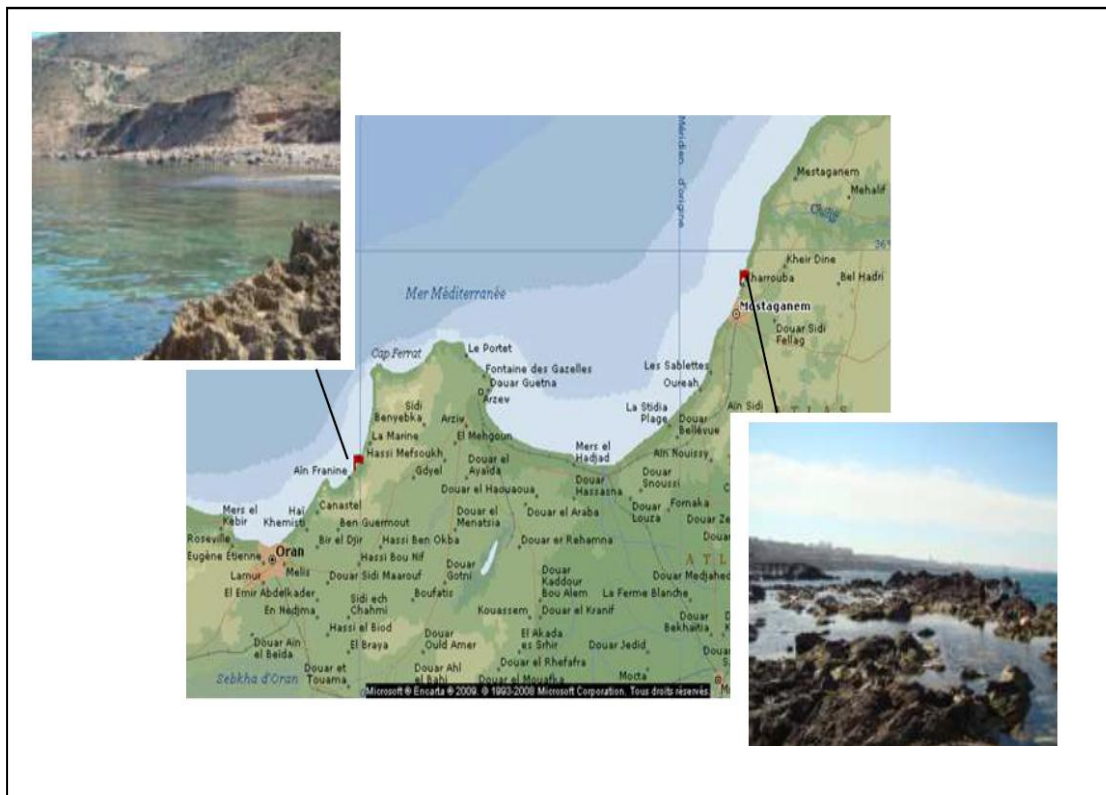


Figure 1.6 : Quelques sites de distribution de l'espèce *Cystoseira amentacea var. stricta*, (en haut : site de Kristel à l'est d'Oran ; en bas : site Sidi Mejdoub à l'est de Mostaganem (Belmokhtar, 2012)

1.5. Position taxonomique et phylogénie du genre *Cystoseira*

1.5.1. Position taxonomique

Les *Cystoseiracées* sont des algues brunes de l'embranchement de *Chromophytes*, de la division des *Péophycées* et de l'ordre des *Fucales*. D'autre part, cette famille constitue plusieurs genres comme nous l'avons décrit précédemment, et parmi ces genres on trouve : *Cystoseira* (Ainane, 2011).

Tableau 1.I: Classification linnéenne du genre *cystoseira* (Carl Von Linné, 1758)

Rang taxonomique	Nom latin
Règne	Plantae
Sous-règne	Chromobiota
Embranchement	Ochrophyta
Classe	Phaeophyceae
Ordre	Fucales
Famille	Cystoseiraceae
Genre / Espèce	<i>Cystoseira amentacea</i> var. <i>stricta</i>

1.5.2. Phylogénie

Une première étude de phylogénie a été réalisée dans la thèse de Susini (2006) qui a montré une polyphylie du genre *Cystoseira* suggérant de scinder ce genre en trois. Ce travail de thèse a mis en évidence des espèces sœurs comme *C. mediterranea*, *C. amentacea* var. *stricta* et *C. tamarascifolia* ou encore *C. compressa* var. *pustulata* et *C. compressa*. Ce travail a été augmenté dans une contribution plus large sur la famille des *Sargassaceae* (Draisma *et al.*, 2010).

Soixante-trois espèces réparties dans dix-neuf des vingt-quatre genres de la famille ont été analysées. La polyphylie du genre *Cystoseira* a été confirmée.

1.6. Cycle de vie et reproduction

1.6.1. Cycle de vie

Les espèces du genre *Cystoseira*, présentent un cycle monogénétique diplobiontique (Richerd *et al.*, 1993). En effet la majorité du cycle correspond à un sporophyte diploïde (2N), la phase haploïde étant uniquement représentée par les gamètes (Figure 1.7).

La partie terminale renflée des rameaux (réceptacles) regroupe les cryptes pilifères fertiles (conceptacle) ou sont produits les gamètes mâles et femelles. Les réceptacles, longs de quelques mm à 2 cm, sont cylindriques, plus ou moins compacts et couverts de ramules épineux. A maturité, les spermatozoïdes puis les oosphères passent à l'extérieur par l'ouverture du conceptacle (ostiole) et la fécondation a lieu dans l'eau, il faut noter que cette espèce est hermaphrodite.

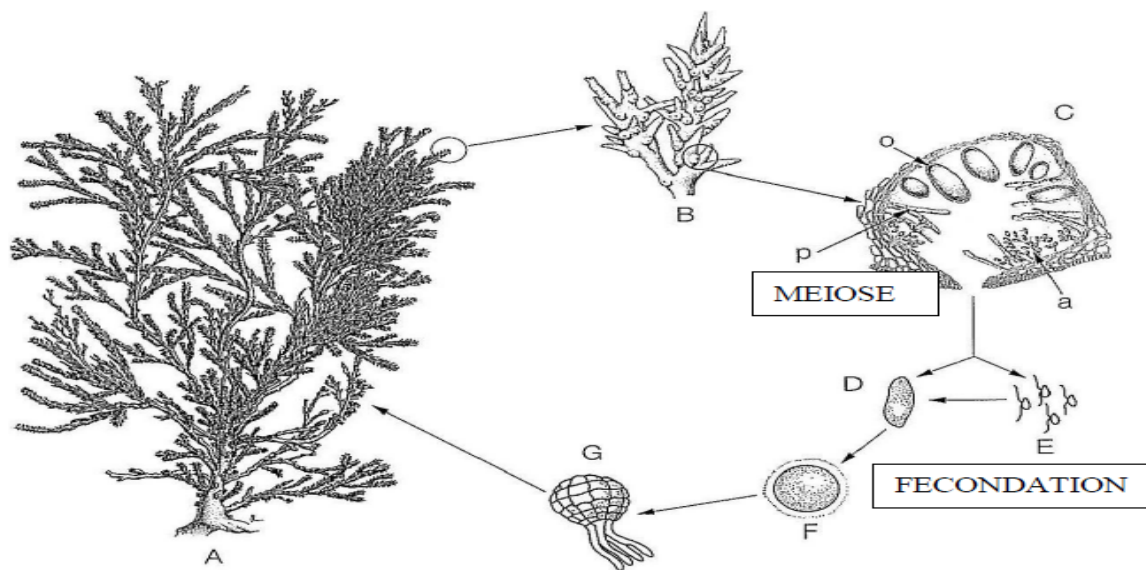


Figure 1.7: Schéma du cycle de vie des espèces du genre *Cystoseira*. A-individu mature, B-extrémité d'une ramification avec des conceptacles, C-conceptacle en coupe transversale (D-gamète femelle, E-gamète mâle, F-zygote et G-zygote avec rhizoïdes (Gómez Garreta *et al.*, 2001).

Après les 12 heures qui suivent la fécondation les œufs se déposent et se collent au substrat, ce qui limite la dispersion de cette espèce et peut expliquer sa vulnérabilité face aux perturbations (faible capacité de recolonisation) (Guern, 1962). Cependant, les thalles fertiles arrachés du substrat peuvent être disséminés et contribuer à la propagation de cette espèce en présence de courants (Coleman et Brawley, 2005a ; Coleman et Brawley, 2005b).

1.6.2. Reproduction

Les études successives de Thuret (1854), Sauvageau (1912), Guern (1962), Susini (2006) entre autres, ont permis de mieux comprendre le mode de reproduction des Fucales et plus particulièrement des espèces du genre *Cystoseira*.

Chez les Fucales, la reproduction est oogame. En effet, il existe une différence de la morphologie entre gamète mâle petit (5 µm) et mobile grâce à ses deux flagelles et le gamète femelle qui est lui gros (100-200 µm) et peu ou pas mobile (Thuret, 1854 ; Sauvageau, 1912 ; Guern 1962).

Les gamétocystes mâles sont décrites par Thuret (1854) comme des sacs ovoïdes transparents abritant les 64 gamètes mâles. La principale différence qu'observe Guern (1962), et qu'a observée Sauvageau avant elle, est la présence d'un stigma rouge chez certaines espèces (groupe *C. mediterranea*). Pour d'autres espèces (groupe *C. compressa*) ce stigma est absent. Susini (2006) a observé ce stigma rouge chez *C. amentacea*. Thuret (1854) avait déjà remarqué ce point rouge-orangé mais le pensait systématique.

Au moment de la reproduction, les gamètes mâles sont les premiers émis. D'après Sauvageau (1912) la membrane du gamétocyste mâle reste dans le conceptacle. Seuls les gamètes sont expulsés à travers l'ostiole. Ils apparaissent dans le milieu en un paquet, commencent à agiter leurs flagelles et se séparent.

Pour Guern en revanche, la membrane interne du gamétocyste mâle est expulsée dans le milieu, se gélifie avant de libérer un nuage de gamètes mâles ; nuage orangé pour le groupe *C. mediterranea* et nuage brillant pour le groupe *C. compressa*. Aucune étude plus récente ne permet de privilégier une des deux observations. L'absence de point rouge sur ceux du groupe *C. compressa* rend la fécondation plus difficile à observer et à décrire (Sauvageau, 1912 ; Guern, 1962). Les gamètes mâles sont vifs et actifs pendant plusieurs heures (Thuret, 1854).

Ils sont mobiles grâce à deux flagelles : un long dirigé vers l'arrière et un court dirigé vers l'avant (Guern, 1962). Ils restent à proximité de l'ostiole.

Les gamètes femelles sont décrits par Thuret (1854) comme de grandes spores ovoïdes qu'il est facile de faire germer. Le noyau du gamète femelle subit plusieurs divisions et donne 8 noyaux fils. Chez les Fucales, le nombre de gamétocystes femelles formées à partir de ces noyaux dépend du genre (Figure 1-8) (Guern, 1962).

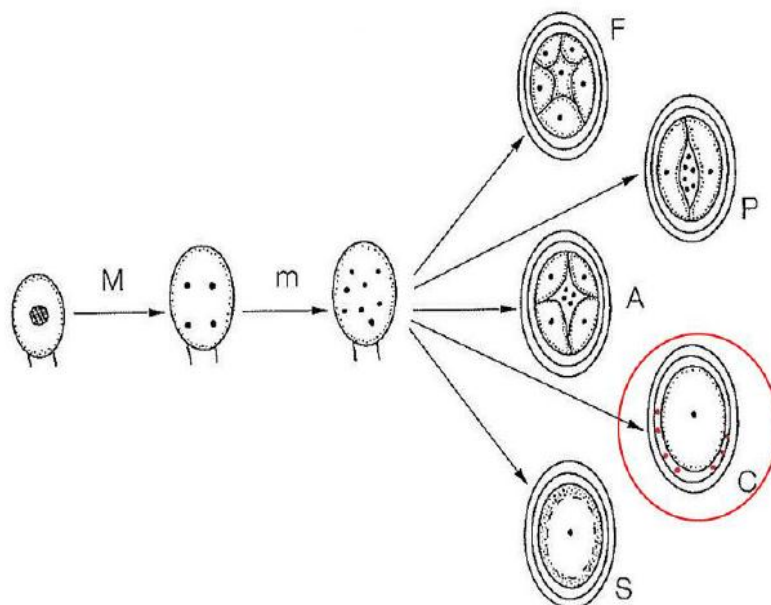


Figure 1.8 : Schéma des différents types de formation de l'oogone. M-méiose, m-mitose, F-*Fucus*, P-*Pelvetia*, A-*Ascophyllum*, C-*Cystoseira* et S-*Sargassum* (Gómez Garreta *et al.* 2001).

Guern (1962) décrit deux types d'émission des gamètes femelles : Le premier type (groupe C. *mediterranea*) est une émission en un temps. En 30 minutes, 5 à 6 gamètes femelles sont expulsés. A leur sortie, ils traversent le nuage de gamètes mâles, la fécondation a lieu et les œufs tombent sur le substrat.

Dans les 12 à 15 h qui suivent la fécondation, les gamètes femelles fécondés s'entourent d'une membrane de fécondation qui les protège de la polyspermie létale, et les fixe au substrat. L'œuf, ainsi formé, commence alors sa segmentation soit 15 à 24 h après la fécondation (Susini, 2006). La cellule rhizoïdale apparaît à la seconde segmentation et définit ainsi le pôle rhizoïdal de l'embryon. Pour le groupe C. *mediterranea* de Guern (1962) ou

groupe III de Draisma *et al.* (2010), la cellule rhizoïdale donne 4 rhizoïdes primaires (Figure I-8A).

Quand ces derniers atteignent 200 μm , soit 4-5 jours après le début de la segmentation, l'embryon augmente de volume et se sépare de la membrane de fécondation devenue trop petite. L'embryon est désormais fixé au substrat par ses rhizoïdes.

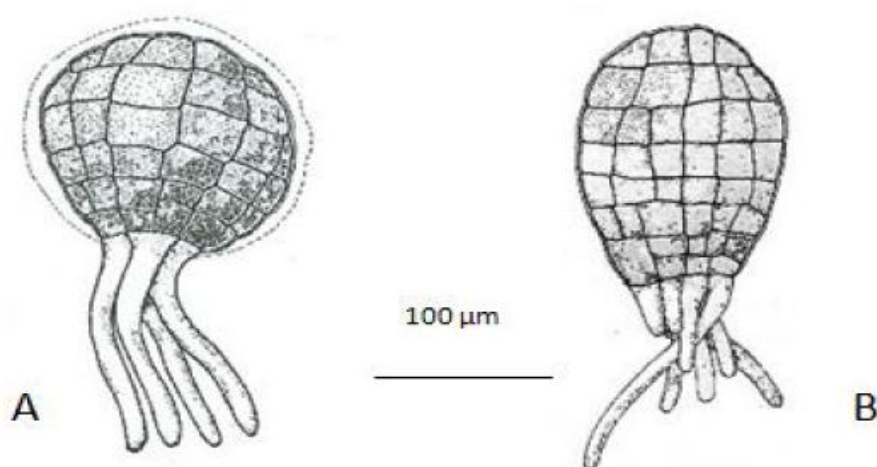


Figure 1.9 : A) Schéma d'un embryon de 10 jours du groupe *C. mediterranea* avec ses 4 rhizoïdes. (Guern, 1962). B) Schéma d'un embryon de 2 jours du groupe *C. compressa* avec ses 8 rhizoïdes. (Guern, 1962).

Le second type (groupe *C. compressa*) est une émission en deux temps. Le gamète femelle, de forme ovoïde, est émis mais reste attaché au conceptacle par une épaisse enveloppe mucilagineuse (ou membrane de fécondation). Le mucilage le protège des bactéries et des diatomées mais n'empêche pas la fécondation. Les gamètes femelles restent accrochés au thalle 12 à 15 heures. Quand la segmentation commence, l'embryon est toujours entouré de la membrane de fécondation, puis les œufs se détachent, coulent et se fixent au substrat à l'aide de leurs rhizoïdes.

Dans ce groupe, correspondant aux groupes 1 et 2 chez Draisma *et al.* (2010), il se développe en moyenne 8 rhizoïdes primaires d'après Guern (1962) (Figure 1-9) et peut en présenter jusqu'à 12 pour *C. foeniculacea* f. *tenuiramosa*.

Ces deux groupes avaient déjà été remarqués par Sauvageau (1912) sans qu'elle les distingue complètement.

1.7. Importance écologique du genre *Cystoseira*

Les Cystoseires constituent des habitats remarquables en termes de biodiversité et de productivité. Ces assemblages abritent ainsi un grand nombre d'espèces de faune et de flore (Robvieux, 2013). En effet, les forêts de *C. brachycarpa* var. *balearica* et *C. crinita* jouent un rôle essentiel d'abris dans la phase juvénile de nombreuses espèces de Téléostéens côtiers comme *Symphodus* spp., *Labrus* spp et *Seranus* spp. (Cheminée et al., 2012; Cheminée et al., 2013).

Du fait de leur grande taille, ces habitats sont analogues aux forêts du domaine terrestre (Belmokhtar, 2012). Les Cystoseires ont une forte valeur patrimoniale de Méditerranée (Delepine et al., 1987; Boudouresque et al., 1996). Les forêts à *Cystoseira* abritent un grand nombre d'espèces (Sauvageau, 1912 ; Funk, 1927; Rull Lluç et Garreta, 1989; Ballesteros, 1992; Ballesteros et al., 1998).

Des associations phytosociologiques et de véritables forêts peuvent être former par certaines espèces: *Cystoseiretem crinitae* (Molinier, 1960), *Cystoseiretum strictae* (Molinier, 1960), *Cystoseiretum sauvageauanae* (Giaccone et al., 1994), *Cystoseiretum barbatae* (Pignatti, 1962), *Cystoseiretum balearicae* (Verlaque, 1987; Giaccone et al., 1994), *Cystoseiretum caespitosae* (Ballesteros, 1990a ; Ballesteros, 1990b).

Cette espèce est considérée comme un indicateur biologique performant des eaux pures et utilisée à ce titre. En effet, cette espèce semble être très sensible à la pollution car une forte régression est constatée autour des grandes agglomérations (belmokhtar, 2012). *C. sedoides* est une espèce endémique de la rive sud de la Méditerranée occidentale la limite orientale de son aire de répartition se trouve au niveau du canal de Sicile. L'érosion dans l'infralittoral supérieur moyennement agité crée une plateforme naturelle pour l'installation de cette espèce. *C. spinosa* semble présente dans une plus grande partie de la Méditerranée.

Elle se développe surtout en profondeur (-15 à -35m) à cause de son affinité pour le mode relativement calme et à faible éclaircissement sur les substrats durs de l'infralittoral (Cap Segleb) (Grimes, 2005). *C. zosteroides* est endémique de Méditerranée et est présente dans la majorité

du bassin au niveau du circalittoral rocheux, dans des zones de faible sédimentation en présence de courant (Cap Segleb) (Grimes, 2005).

Comme indicateurs écologiques, les algues présentent plusieurs avantages intrinsèques (Belmokhtar, 2012) :

- ✓ elles sont benthiques, et donc peuvent servir à caractériser les conditions environnementales intégrées à un lieu, pendant une période ;
- ✓ facile à récoltés dans divers habitats ;
- ✓ elles accumulent directement les composés présents dans l'eau de mer, ce qui fait de l'analyse des tissus, un indicateur fiable de la qualité de l'eau et évite les difficultés logistiques souvent associées aux échantillonnages représentatifs et comparatifs de l'eau de mer (Levine, 1984).

Les Phéophycées sont souvent choisit (Laminaires, Ascophylles, Fucus) pour la bio surveillance ou les expériences du fait de leurs bonne résistance aux manipulations de laboratoire et à leurs sensibilités à divers niveaux de pollution (Levine, 1984). D'un autre côté, ces algues sont géographiquement étendues, permettant des comparaisons généralisées.

1.8. Intérêt pharmacologique des espèces marines :

Actuellement le besoin de nouveaux médicaments est grand, du fait de l'évolution des populations et des pathologies. Une des voies d'innovation repose sur la découverte de principes actifs originaux, qui peuvent provenir de la chimie de synthèse, de l'extraction à partir de sources biologiques, enfin, plus récemment, des biotechnologies fondées sur le génie génétique. En ce qui concerne l'extraction, les végétaux ont été et sont encore largement exploités, mais la tendance actuelle est d'évaluer la pertinence d'autres groupes du vivant, tels les insectes, les micro-organismes ou les organismes marins, comme source de molécules actives, avec pour idée que de nouveaux groupes livreront des contenus chimiques différents, et donc une plus grande variété exploitable.

Les macro- et micro-organismes marins occupent une place de choix dans ce domaine : très nombreux en termes d'espèces, soumis à un environnement spécifique très différent de celui des organismes terrestres, ils sont aussi facilement accessibles qu'au début de ces recherches, dans les années 1950. L'attention de la communauté scientifique avait en effet, été attirée par les produits marins en 1951, lors de la découverte de nucléosides dans un spongiaire, puis, en

1969, quand la très forte teneur en prostaglandines d'une Gorgone des Caraïbes a été révélée : un organisme marin fabriquait en grande quantité des produits que la chimie de synthèse peinait alors à élaborer. Ce fût le point de départ d'une aventure qui a livré jusqu'à ce jour plus de 15 000 produits originaux d'origine marine (Ainane. 2011).

La place des molécules d'origine marine dans l'arsenal thérapeutique est encore modeste, un fait qui doit être relativisé du fait de la courte période de recherche correspondante, et des difficultés de la mise au point, actuellement, d'un nouveau médicament. Pour l'industriel, ces produits n'ont pas un statut différent de ceux obtenus à partir d'autres procédés, seuls comptent l'efficacité et le caractère novateur. C'est précisément sur ce point que les molécules d'origine marine, issues de métabolismes originaux et encore largement inexploitées, se singularisent et montrent tout leur intérêt (Ktari. 2000 ; Biard.2004).

1.9. Métabolites secondaires des algues brunes et méthodes d'extractions

1.9.1. Généralités sur les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des plantes qui jouent un rôle dans la croissance, la reproduction et la protection de la plante contre les prédateurs et les agents pathogènes. Ils agissent comme phytoalexines (Popa *et al.*, 2008), anti-appétents, attractifs des pollinisateurs, contributeurs à la pigmentation, antioxydants et protecteurs contre les rayons UV (Naczki *et al.*, 2006). Ils contribuent également aux caractéristiques nutritives et sensorielles des fruits et légumes. La majorité des composés phénoliques dérive de la voie des shikimates (Collin *et al.*, 2011). Un des deux cycles des flavonoïdes provient d'une autre voie, c'est celle de l'acétate/malonate (Merken *et al.*, 2000). Les composés phénoliques peuvent être simples ou composés de plusieurs noyaux aromatiques. De nos jours le terme « polyphénol » est utilisé pour désigner les composés phénoliques complexes et même les plus simples (Lattanzio *et al.*, 2014).

1.9.2. Classification des composés phénoliques

1.9.2.1. Les composés non-flavonoïdes

Les composés non-flavonoïdes contiennent les acides phénoliques (un noyau aromatique), les tannins hydrolysables, les stilbènes (deux noyaux aromatiques) et les lignines.

A. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques constituent le tiers des composés phénoliques alimentaires et peuvent être présents sous forme libre ou liée aux composants de la plante (Robbins, 2003). Ils sont subdivisés en deux groupes, les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques.

A.1. Les acides hydroxybenzoïques

Les acides hydroxybenzoïques dérivent de l'acide benzoïque. Ils incluent les acides galliques, hydroxybenzoïque, protocatéchuique, vanillique et syringique ayant en commun la structure C6-C1 (un carbone dans la chaîne latérale) (Bravo, 1998).

A.2. Les acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques dérivent de l'acide cinnamique. Ils incluent les acides caféique, férulique, *paracoumarique* et sinapique partageant la même structure C6-C3 (trois carbones dans la chaîne latérale) (Bravo, 1998).

B. Les tannins hydrolysables

Les tannins hydrolysables résultent de l'association des esters d'acides phénoliques (acide gallique ou ellagique) à un polyol (surtout le glucose). Ils seront par la suite divisés en ellagitannins et gallotannins (Collin *et al.*, 2011).

C. Les stilbénoides

Les stilbénoides sont des composés phénoliques naturels, dérivant de l'acide hydroxycinnamique et identifiés dans 70 espèces de plantes. Leur squelette de base est formé par deux noyaux aromatiques reliés par un pont méthylène (C6-C2-C6) (Collin *et al.*, 2011).

D. Les lignines

Les lignines sont des polymères pariétaux des plantes responsables de la rigidité et de la défense contre les pathogènes. Ce sont des polymères d'alcools coniférylique, *paracoumarylique* et sinapylique. Leur structure est (C6-C3)_n (Collin *et al.*, 2011).

1.9.2.2. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes (de *flavus*, « jaune » en latin) sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles ; près de 6500 flavonoïdes repartis en 12 classes sont connus. L'existence des différentes classes structurales des flavonoïdes serait fonction des modifications de l'hétérocycle C ; on distingue différents types de noyaux : flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavan-3-ols, flavylum, chalcones, aurones, isoflavones, isoflavonols, isoflavanes, ptérocarpanes, coumaronochromones, 3-arylcoumarines... etc (Wollgast et Anklam, 2000). A l'heure actuelle, près de 6500 flavonoïdes ont été identifiés. Ils ont une origine biosynthétique commune par conséquent, possèdent un squelette de base à quinze carbones, qui consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à

trois carbones (structure en C6-C3-C6). Le pont en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (Figure 1.10) (Bruneton, 1999).

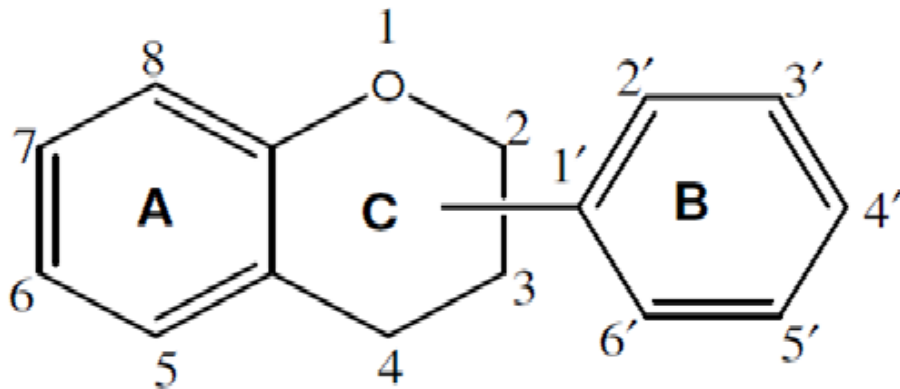


Figure I.10 : Squelette de base des flavonoïdes.

Plusieurs classes de flavonoïdes ont été proposées selon le chemin biosynthétique (Figure 1.11) (Bruneton, 1999):

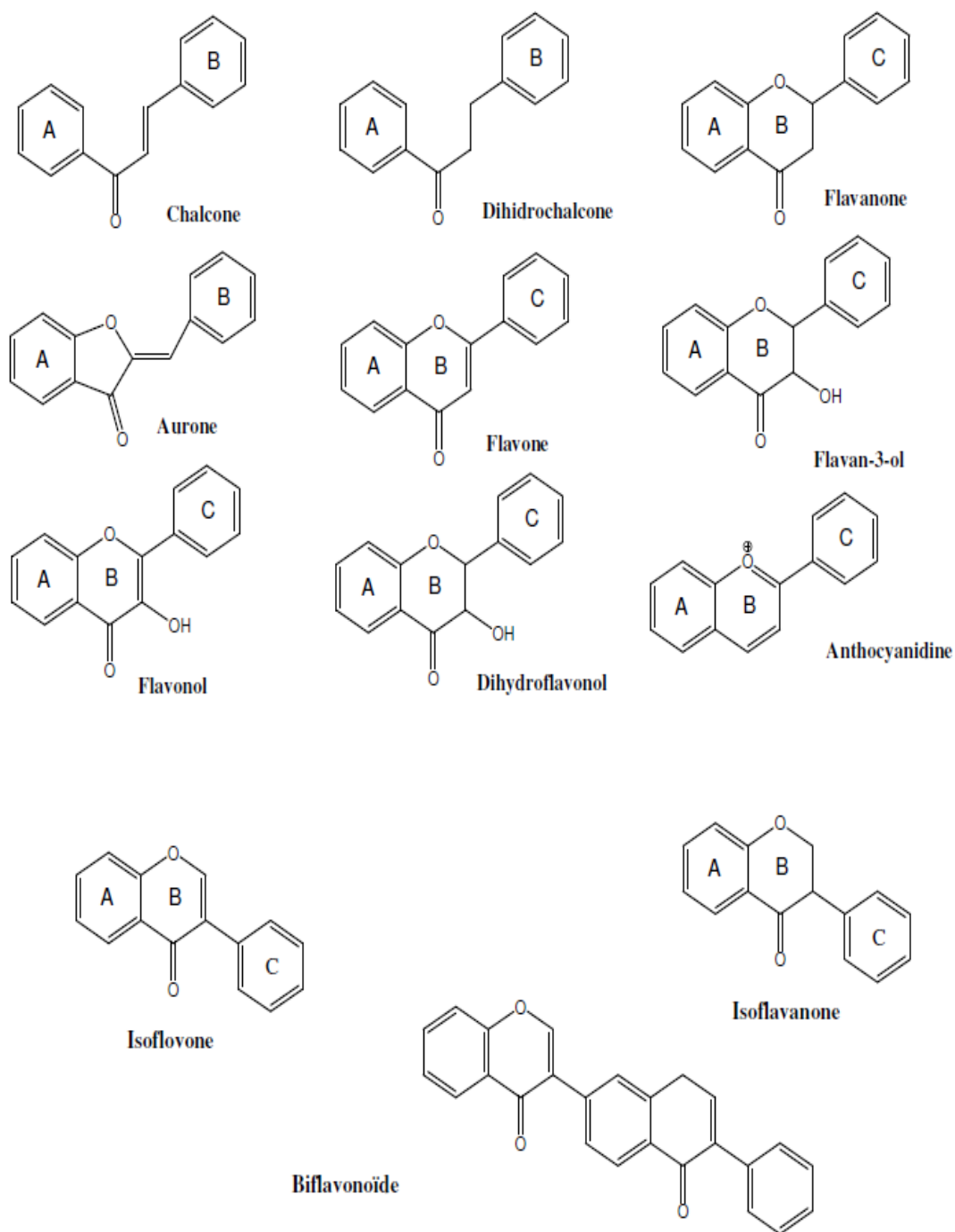


Figure 1.11: Les différentes classes de flavonoïdes.

En présence d'un solvant, la structure du flavonoïde pourrait être différente selon les diverse interactions (type hydrophobe, liaisons hydrogène, type électrostatique...) (Mompon *et al.*, 1996; Saidman *et al.*, 2002).

Les différences structurales au sein d'une même famille sont tellement importantes qu'il est difficile d'estimer la solubilité d'un composé dans un solvant. Toutefois, les flavonoïdes sont faiblement solubles dans l'eau (Pulley, 1936; Calias *et al.*, 1996; Abou El Hassan *et al.*, 2000; Benavente- García *et al.*, 2001; Walle, 2004).

Les spectres UV des flavonoïdes permettent d'observer deux bandes d'absorption principales dans la région 240-400 nm. La bande I (300-395 nm) due à l'absorption de la partie cinnamoyle (noyau B) du flavonoïde et la bande II (240-280 nm) qui est associée à l'absorption de la partie benzoyle (Harborne et Williams, 2000) (Tableau 1.2).

En absence d'hydroxyle en position 3 (cas des flavones), la longueur d'onde de la bande I est plus courte de 20 à 30 nm. La méthylation comme la glycosylation, en particulier sur les hydroxyles en position 3, 5, 7, 4', provoquent un déplacement hypsochrome vers les longueurs d'ondes plus courtes. Toutefois, la nature du sucre n'a généralement pas d'effet (Markham, 1982). Pour l'acylation, peu de données existent sur l'effet de cette réaction sur les propriétés spectrales des flavonoïdes.

Tableau 1.2: Absorption UV des flavonoïdes dans le méthanol (Harborne, 1989; Markham, 1982 ; Merghem, 2009 ; Voirin, 1983)

Classe des flavonoïdes	λ max (nm)	
	Bande II	Bande I
Flavonols	250-280	330-385
Quecétine	255,269s	301s,370
Quecétine 3-O-glucoside	257,269s	299s, 362
Hespéretine	288	300s
Taxifoline	290	327s
Flavone	250-280	310-350
Chryisine	247s, 268	313
Apigénine	267, 296s	336

Favanone et dihydroflavanol	275-295	300-330
Flavanol	270-280	-
Chalcone	230-270	340-390
4'-Hydroxychalcone	-	328
2',4,4'-Trihydroxychalcone	-	367
Aurone	320-270	380-430
4-Hydroxyaurone	-	389
	-	405
Anthocyane	270-280	465-560
Cyanidin -3- glucoside	274	523
Pelargonidine 3,7-diglucoside	279	498

La lumière, le pH, la température, la nature du solvant, la présence d'enzyme, d'ion métallique ou non, d'oxydant exercent une influence sur la stabilité des flavonoïdes (Fargeix, 2000). Des travaux sur la cinétique d'oxygénation des flavonoïdes ont été décrits (Barhacs *et al.*, 2000 ; Fargeix, 2000; Balogh-Hergovich et Speier, 2001; Mochizuki *et al.*, 2002 ; Ramos-Tejada *et al.*, 2002).

Les substituants (alkyle, alcoxy, glycosyle) interviennent également dans la stabilité des flavonoïdes (Friedman et Jurgens, 2000; Smith *et al.*, 2000; Makris et Rossiter, 2002; Ungar *et al.*, 2003).

1.9.3. Bioactivité et application des composés phénolique

Les composés phénoliques sont connus pour leurs activités antioxydantes et antiradicalaires élevées. Ils ont la capacité de piéger les radicaux libres en leur transférant un hydrogène ou un électron. De même, ils peuvent agir indirectement, en chélatant les métaux de transition qui accélèrent la formation des espèces réactives de l'oxygène (radical hydroxyle, superoxyde et peroxyde d'hydrogène), ou en inhibant les enzymes qui interviennent dans la catalyse des

espèces radicalaires. Les composés phénoliques ont également des effets antibactériens, antiviraux et antifongiques (Friedman, 2007). Ils protègent contre des troubles pathologiques chez les humains, notamment l'athérosclérose, le cancer et le dysfonctionnement cérébral, d'où l'intérêt de leur application dans le domaine de la santé (Gordon, 1996).

Les anthocyanes sont utilisés dans les préparations pharmaceutiques pour lutter contre les inflammations de la gorge, les douleurs articulaires, les ulcères, etc. Ils sont également utilisés en ophtalmologie pour améliorer la vision nocturne. Les composés phénoliques ont aussi de nombreuses applications dans l'agroalimentaire comme agents de conservation et colorants naturels.

D'un autre côté, la classe la plus importante des composés phénoliques à savoir les flavonoïdes présentent aussi des effets intéressants et ont plusieurs applications dans des domaines variés parmi ces applications on trouve:

- Complexants réversibles et irréversibles : (Charlton *et al.*, 2002 ; Cornard et Merlin, 2002a ; Cornard et Merlin, 2002b ; Ficarra *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2002; Walle *et al.*, 2003; Zsila *et al.*, 2003; Le Nest *et al.*, 2004; Tommasini *et al.*, 2004).
- Inhibiteurs d'enzymes (Chi *et al.*, 2001; Arockia Babu *et al.*, 2002; Havsteen, 2002 ; Sadik *et al.*, 2003).
- Photoprotecteurs (Bonina *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997; Saliou *et al.*, 1999 ; Zhai et Maibach, 2002; Saija *et al.*, 2003).
- Anti-HIV, Antiviraux (Formica et Regelson, 1995; Mantas *et al.*, 2000).
- Anti-inflammatoires et anti-tumoraux (Di Carlo *et al.*, 1999; Formica et Regelson, 1995).
- Protecteurs des cartilages, inhibiteurs de la dégradation du protéoglycane et traitement de l'arthropathie (Watanabe *et al.*, 1993; Watanabe *et al.*, 1994 a; Watanabe *et al.*, 1994 b).
- Antibactériens (Alcaraz *et al.*, 2000; Syuchi *et al.*, 2006).
- Traitement d'anomalies thrombotiques et artérioscléreuses (Cavazza, 2003).
- Anti-angiogéniques (Matsubara *et al.*, 2004).
- Dans la prévention du cancer et des maladies cardio-vasculaires (Manach *et al.*, 1996).
- Dans le traitement et la prévention des maladies liées à l'hyperlipidémie (Bok *et al.*, 2001).

- Veinotoniques, analgésiques, antiallergiques, antispasmodiques, oestrogéniques et/ou anti-oestrogéniques, (Galvez *et al.*, 1993a; Galvez *et al.*, 1993b ; Basile *et al.*, 1999; Martini *et al.*, 2004; Goodarzi *et al.*, 2006; Ouali *et al.*, 2007).
- Antioxydants et antiradicalaires (Rice-Evans *et al.*, 1996; Van Acker *et al.*, 1996; Burda et Oleszek, 2001).

1.9.4. Extraction solide-liquide des composés phénoliques

L'extraction solide-liquide est l'utilisation d'un solvant pour dissoudre et récupérer une fraction soluble (appelée soluté) d'un solide insoluble et perméable. Les plantes possèdent un réseau de communication qui permet à l'eau et aux nutriments de se répartir dans tous les tissus. Cette porosité donnera accès au solvant d'y pénétrer pour extraire le soluté (Mazza, 1998). La diffusion est possible grâce au gradient de concentration du soluté entre le solide et le liquide. Au bout d'un certain moment un équilibre est atteint.

Il y a différentes méthodes d'extraction solide-liquide. On parle de macération, lorsqu'on trempe un solide dans un solvant à température ambiante, de percolation quand l'écoulement du solvant a lieu sur et à travers le solide, de décoction quand la dissolution des solutés a lieu dans l'eau bouillante, d'infusion quand le solvant est initialement bouillant mais qu'on laisse refroidir au fur et à mesure de l'extraction et d'élution quand le solvant entraîne un soluté fixé à la surface d'un solide (Cissé, 2010). Le procédé d'extraction se subdivise en quatre étapes principales : la diffusion du solvant à l'intérieur de la particule via la structure poreuse de cette dernière, la dissolution des solutés du solide dans le liquide, la diffusion des solutés dissous dans le liquide vers la surface de la particule et le lavage du solvant situé à la surface du solide vers la solution environnante (Rajha, 2015). L'étape (3) de diffusion des solutés, via les pores, à la surface des particules est l'étape cruciale de l'extraction (Mazza, 1998).

Le procédé d'extraction solide-liquide des métabolites secondaires des algues brunes est souvent utilisé pour l'étude des molécules bioactives telles que les polyphénols, les flavonoïdes et pour mesurer l'activité antioxydante, antimicrobienne...etc, (Rastian, 2007; Rodriguez-Bernaldo de Quiro's, 2010; Rajauria, 2012; Tierney, 2013).

Les extractions solide-liquide sont généralement suivies d'une ou plusieurs étapes de purifications et d'une étape de séchage pour enfin obtenir la poudre de composés phénoliques.

L'extraction solide-liquide des composés phénoliques, dépend de l'effet de plusieurs paramètres opératoires, tel que le temps, la température, le solvant, le ratio liquide solide, l'agitation, la taille des particules.

1.9.4.1. Effet du matériel végétal

Le procédé d'extraction est influencé par la taille et la structure de la matière première ou le solide. La réduction de taille des particules affecte le transfert interne, en augmentant la surface spécifique et en diminuant la distance de diffusion des solvants et des solutés (Poirot, 2007). Ainsi la réduction de la taille des particules a permis des rendements élevés de composés phénoliques extraits à partir du matériel algal (Luthria, 2008), La microstructure de la matière végétale, sa porosité et ses parois cellulaires influencent également le procédé d'extraction.

1.9.4. 2. Effet du soluté

La taille du soluté à extraire, sa structure moléculaire, sa localisation cellulaire et tissulaire, son accessibilité, ses liaisons avec les composants structuraux ou avec d'autres composés sont tous des paramètres qui influencent la diffusion. La vitesse de diffusion est inversement proportionnelle à la taille moléculaire. Par exemple, les sucres sont plus rapidement extraits que les phénols qui sont plus rapidement extraits que les pectines (Lalou, 1995).

1.9.4.3. Effet de l'agitation

L'agitation a un effet positif sur la diffusion moléculaire, puisqu'elle maintient les particules en suspension homogénéisant le milieu. Elle réduit également la résistance de transfert des solutés augmentant ainsi le coefficient de transfert (Leybros *et al.*, 1990; Zhao *et al.*, 2011).

1.9.4.4. Effet du ratio liquide solide

Le ratio liquide solide joue un rôle important dans l'extraction des composés phénoliques. En effet, le rendement s'améliore avec l'augmentation du ratio liquide solide, puisqu'il agit sur le gradient de concentration entre la matrice végétale et le solvant qui favorise le transfert de matière. Plusieurs études ont montrés l'effet du ratio solide liquide sur l'extraction des polyphenol à partir de macroalgues (Rajauria, 2012).

1.9.4.5. Effet du solvant

Les extractions par solvants sont les procédures les plus couramment utilisées pour préparer des extraits de matériel végétal en raison de leur facilité d'utilisation, de leur efficacité et de leur grande applicabilité. Il est généralement connu que le rendement de l'extraction dépend du type de solvants ayant des polarités variables, du temps et de la température d'extraction, du rapport de l'échantillon au solvant ainsi que de la composition chimique et des caractéristiques physiques des échantillons. La solubilité des composés phénoliques dépend de la nature chimique de l'échantillon végétal, ainsi que de la polarité des solvants utilisés. Les matières végétales peuvent contenir des composés phénoliques allant de simples (par exemple des acides phénoliques, des anthocyanes) à des substances hautement polymérisées (par exemple les tanins) en des quantités différentes.

De plus, les composés phénoliques peuvent également être associés à d'autres composants végétaux tels que les hydrates de carbone et les protéines. Par conséquent, il n'existe pas de procédure d'extraction universelle appropriée pour l'extraction de tous les composés phénoliques végétaux. Selon le système de solvant utilisé pendant l'exaction, un mélange de composés phénoliques solubles dans le solvant sera extrait des matières végétales. Il peut également contenir certaines substances non-phénoliques telles que le sucre, les acides organiques et les graisses. Ainsi, des étapes supplémentaires peuvent être nécessaires pour supprimer ces composants indésirables. Des solvants, tels que le méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle, et leurs combinaisons ont été utilisés pour l'extraction de composés phénoliques à partir de matières végétales, souvent avec des proportions d'eau différentes. La sélection du bon solvant affecte la quantité et le taux de polyphénols extraits (Dai et Mumper, 2010).

1.9.4.6. Effet du couple température-temps

La température agit à la fois sur le solvant et sur le solide. Elle accroît la perméabilité des membranes cellulaires. L'augmentation de la température, diminue la viscosité du solvant et la tension de surface ; augmentant ainsi la solubilité et la diffusivité moléculaire. D'autre part, une dégradation thermique et oxydation des composés phénoliques peut avoir lieu selon la température et la durée de l'extraction. Par exemple, une température de 50 °C est définie par certains d'être la limite de dégradation des composés phénoliques (Cacace *et al.*, 2003), alors que pour d'autres, elle s'élève à 60 °C (Spigno *et al.*, 2007).

1.10. Les plans d'expériences

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles. Ils sont applicables à de nombreuses disciplines et à toutes les industries à partir du moment où l'on recherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt, y , et des variables, x_i . Il faut penser aux plans d'expériences si l'on s'intéresse à une fonction du type :

$$Y = f(X_i)$$

Avec les plans d'expériences on obtient le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences. Pour cela, il faut suivre des règles mathématiques et adopter une démarche rigoureuse. Il existe de nombreux plans d'expériences adaptés à tous les cas rencontrés par un expérimentateur. Les principes fondamentaux de cette science seront indiqués et les principaux plans seront passés en revue.

La compréhension de la méthode des plans d'expériences s'appuie sur deux notions essentielles, celle *d'espace expérimental* et celle de *modélisation mathématique* des grandeurs étudiées (Goupy, 1997).

1.10.1. Notion d'espace expérimental

Un expérimentateur qui lance une étude s'intéresse à une grandeur qu'il mesure à chaque essai. Cette grandeur s'appelle la *réponse*, c'est la grandeur d'intérêt. La valeur de cette grandeur dépend de plusieurs variables. Au lieu du terme «variable» on utilisera le mot *facteur*. La réponse dépend donc de un ou de plusieurs facteurs (Figure 1.12). La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée *niveau*. Lorsqu'on étudie l'influence d'un facteur, en général, on limite ses variations entre deux bornes. La borne inférieure est le niveau bas. La borne supérieure est le niveau haut (Goupy, 2006).

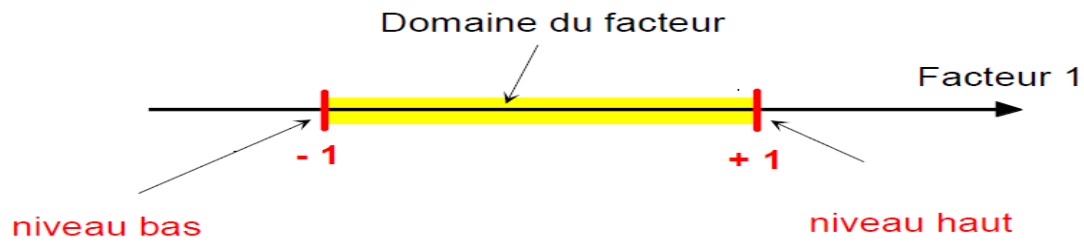


Figure 1.12: Le niveau bas du facteur est noté par - 1 et le niveau haut par +1. Le domaine de variation du facteur est constitué de toutes les valeurs comprises entre le niveau bas et le niveau haut.

L'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut, s'appelle le domaine de variation du facteur ou plus simplement le *domaine* du facteur. On a l'habitude de noter le niveau bas par -1 et le niveau haut par $+1$.

S'il y a un second facteur, il est représenté, lui aussi, par un axe gradué et orienté. On définit, comme pour le premier facteur, son niveau haut, son niveau bas et son domaine de variation. Ce second axe est disposé orthogonalement au premier. On obtient ainsi un repère cartésien qui définit un espace euclidien à deux dimensions. Cet espace est appelé *l'espace expérimental* (Figure 1.13).

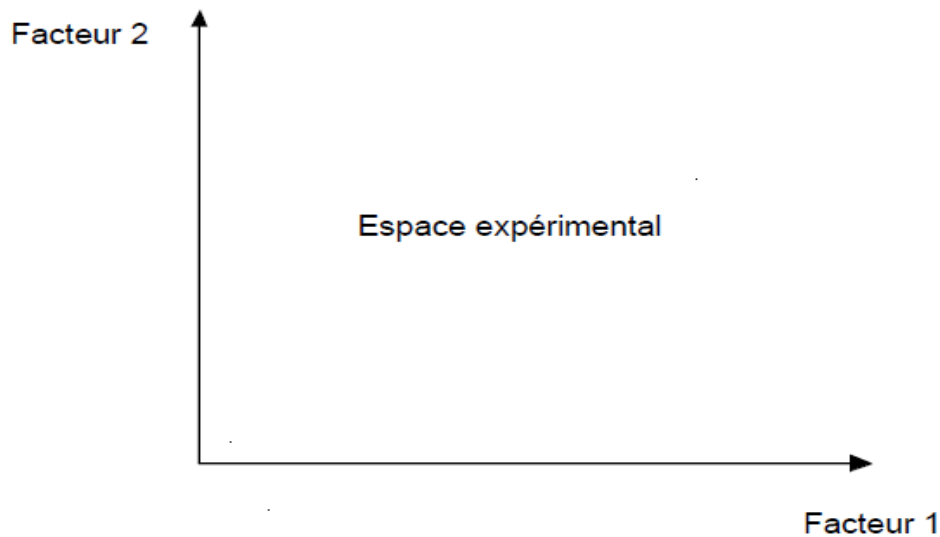


Figure 1.13 : Chaque facteur est représenté par un axe gradué et orienté. Les axes des facteurs sont orthogonaux entre eux. L'espace ainsi défini est l'espace expérimental.

Le niveau x_1 du facteur 1 et le niveau x_2 du facteur 2 peuvent être considérés comme les coordonnées d'un point de l'espace expérimental (Figure 1.14). Une expérience donnée est

alors représentée par un point dans ce système d'axes. Un plan d'expériences est représenté par un ensemble de points expérimentaux.

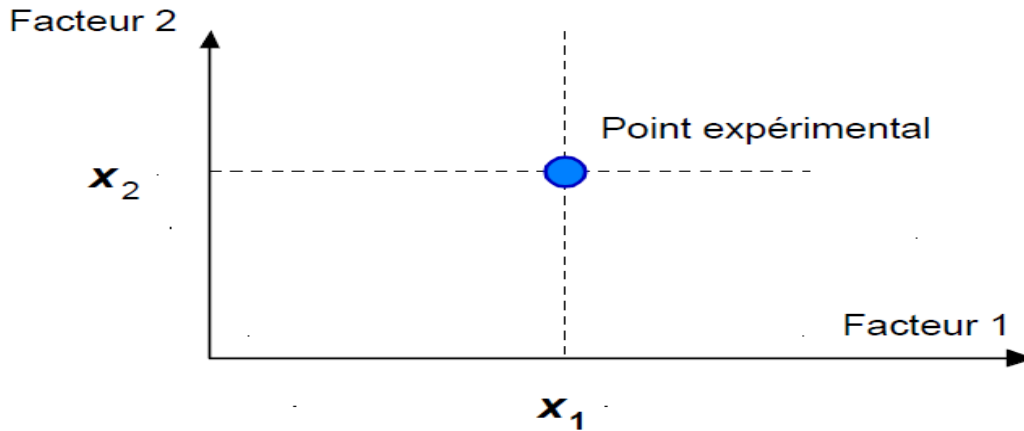


Figure 1.14 : Dans l'espace expérimental, les niveaux des facteurs définissent des points expérimentaux.

Le regroupement des domaines des facteurs définit le «*domaine d'étude*». Ce domaine d'étude est la zone de l'espace expérimental choisie par l'expérimentateur pour faire ses essais. Une étude, c'est-à-dire plusieurs expériences bien définies, est représentée par des points répartis dans le domaine d'étude (Figure 1.15). Cette façon de représenter une expérimentation par des points dans un espace cartésien est une représentation géométrique de l'étude.

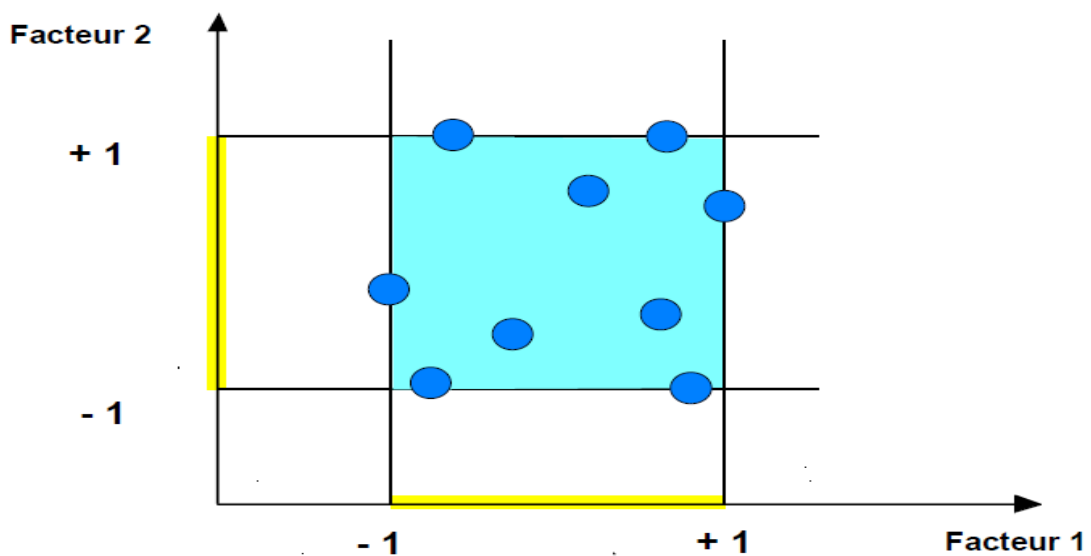


Figure 1.15 : Les points expérimentaux sont disposés dans le domaine d'étude défini par l'expérimentateur.

1.10.2. Notion de surface de réponse

Les niveaux x_i représentent les coordonnées d'un point expérimental et y est la valeur de la réponse en ce point. On définit un axe orthogonal à l'espace expérimental et on l'attribue à la réponse. La représentation géométrique du plan d'expériences et de la réponse nécessite un espace ayant une dimension de plus que l'espace expérimental. Un plan à deux facteurs utilise un espace à trois dimensions pour être représenté : une dimension pour la réponse, deux dimensions pour les facteurs.

A chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. A l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localisent sur une surface appelée la surface de réponse (Figure 1.16).

Le nombre et l'emplacement des points d'expériences est le problème fondamental des plans d'expériences. On cherche à obtenir la meilleure précision possible sur la surface de réponse tout en limitant le nombre d'expériences (Goupy, 2006).

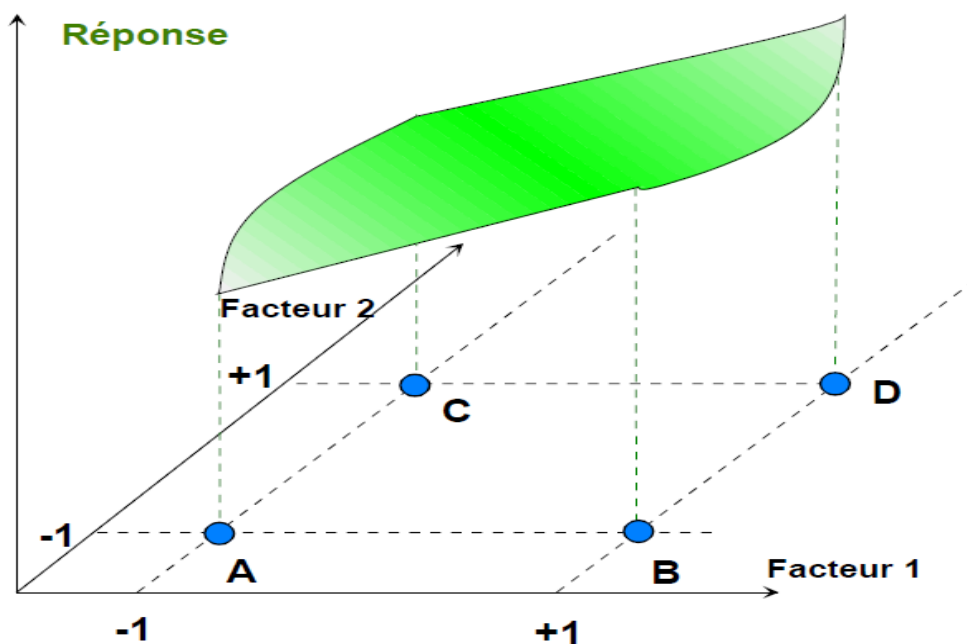


Figure 1.16 : Les réponses associées aux points du domaine d'étude forment la surface de réponse. Les quelques réponses mesurées aux points du plan d'expériences permettent de calculer l'équation de la surface de réponses.

1.10.3. Notion de modélisation mathématique

On choisit a priori une fonction mathématique qui relie la réponse aux facteurs. Cette fonction est généralement sous forme d'un polynôme de degré plus ou moins élevé

$$Y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \dots + \sum a_{ii} x_i^2 + a_{ij\dots z} x_i x_j \dots x_z$$

Y est la réponse ou la grandeur d'intérêt. Elle est mesurée au cours de l'expérimentation et elle est obtenue avec une précision donnée.

x_i représente le niveau attribué au facteur i par l'expérimentateur pour réaliser un essai. Cette valeur est parfaitement connue. On suppose même que ce niveau est déterminé sans erreur (hypothèse classique de la régression).

a_0, a_i, a_{ij}, a_{ii} sont les coefficients du modèle mathématique adopté a priori. Ils ne sont pas connus et doivent être calculés à partir des résultats des expériences.

L'intérêt de modéliser la réponse par un polynôme est de pouvoir calculer ensuite toutes les réponses du domaine d'étude sans être obligé de faire les expériences. Ce modèle est appelé "*modèle postulé*" ou "*modèle a priori*".

1.10.4. Le modèle de l'expérimentateur

Deux compléments doivent être apportés au modèle précédemment décrit. Le premier complément est le "*manque d'ajustement*". Cette expression traduit le fait que le modèle a priori est fort probablement différent du modèle réel qui régit le phénomène étudié. Il y a un écart entre ces deux modèles. Cet écart est le manque d'ajustement (*lack of fit* en anglais) (Hadjseyd, 2017). Le second complément est la prise en compte de la nature aléatoire de la réponse. En effet, si l'on mesure plusieurs fois une réponse en un même point expérimental, on n'obtient pas exactement le même résultat. Les résultats sont dispersés. Les dispersions ainsi constatées sont appelées erreurs expérimentales. Ces deux écarts, manque d'ajustement et erreur expérimentale, sont souvent réunis dans un seul écart, notée e . Le modèle utilisé par l'expérimentateur s'écrit alors :

$$Y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \dots + \sum a_{ii} x_i^2 + a_{ij\dots z} x_i x_j \dots x_z + e$$

1.10.5. Plans factoriels complets à deux niveaux

Ces plans possèdent un nombre de niveaux limité à deux pour chaque facteur. Toutes les combinaisons de niveaux sont effectuées au cours de l'expérimentation. Ces plans peuvent être utilisés indistinctement pour les variables continues et pour les variables discrètes. Pour deux facteurs, le domaine d'étude est un carré (Figure 1.17). Le modèle mathématique postulé est un modèle du premier degré par rapport à chaque facteur :

$$Y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_{12}x_1x_2 + e$$

y est la réponse ;

x_i représente le niveau attribué au facteur i ;

a_0 est la valeur de la réponse au centre du domaine d'étude ;

a_1 est l'effet (ou effet principal) du facteur 1 ;

a_2 est l'effet (ou effet principal) du facteur 2 ;

a_{12} est l'interaction entre les facteurs 1 et 2 ;

e est l'écart.

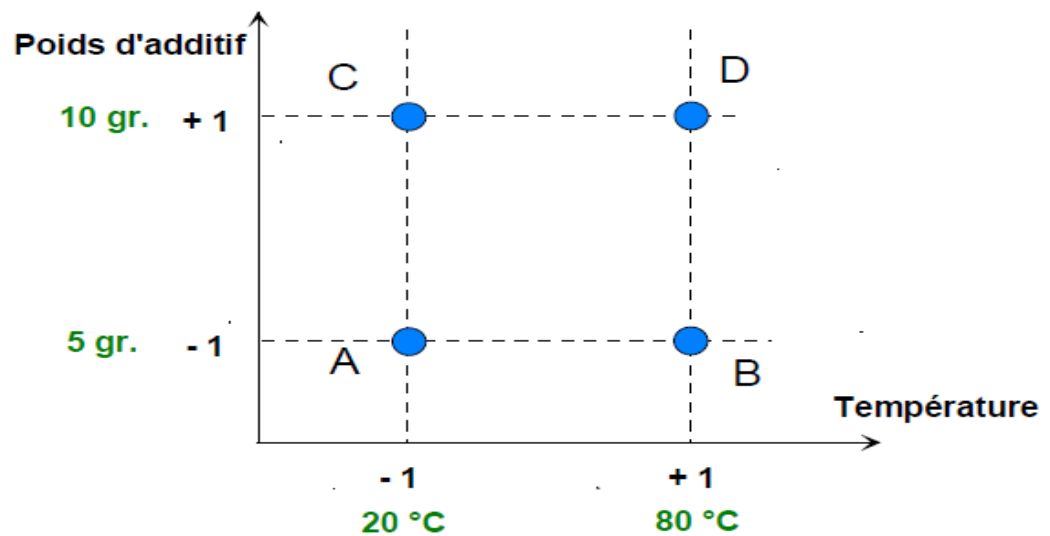


Figure I.17: Les meilleurs emplacements des points expérimentaux sont les sommets du domaine d'étude lorsque le modèle postulé est du premier degré

On démontre que les meilleurs emplacements des points d'expériences sont situés aux sommets du domaine d'étude.

1.10.6. Plans de Box-Behnken

Box et Behnken ont proposés en 1960 ces plans qui permettent d'établir directement des modèles du second degré. Tous les facteurs ont trois niveaux : -1, 0 et +1. Ces plans sont faciles à mettre en œuvre et possèdent la propriété de séquentialité. On peut entreprendre l'étude des K premiers facteurs en se réservant la possibilité d'en rajouter de nouveau sans perdre les résultats des essais déjà effectués (Goupy, 2001; Mason, 2003).

Le plus connu des plans de Box-Behnken est celui qui permet d'étudier trois facteurs. Les points expérimentaux sont au milieu des arêtes de chacun des côtés du cube.

Ce plan comporte douze essais auxquels on peut ajouter un (ou plusieurs) point(s) central (au x) (Feinberg, 1996; Dean, 1999).

Généralement, la réalisation d'un plan d'expérience exige une préparation soignée et s'effectue en respectant les étapes suivantes (Goupy, 1997).

- Description de l'étude ;
- Définition des objectifs de l'étude ;
- Choix des réponses ;
- Etablissement de la liste des facteurs influents ;
- Choix du domaine de variation des facteurs ;
- Etablir la liste de l'ensemble des contraintes si possible ;
- Choix et construction du plan d'expériences ;
- Expérience aux bornes du domaine d'étude ;
- Eviter les confusions d'effet en recherchant l'orthogonalité entre des facteurs ;
- Utiliser les logiciels de construction de plans d'expériences quand cela est possible ;

L'application des plans d'expérience pour l'optimisation des méthodes permettra non seulement de trouver les niveaux de facteurs qui répondront le plus adéquatement au problème analytique rencontré, mais Il fournira également un outil pour obtenir l'optimisation robuste de la méthode analytique.

CHAPITRE 2 :

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Chapitre 2: MATÉRIELS ET MÉTHODES

Ce chapitre présentera les matériels et méthodes adoptés pour l'extraction et le dosage des flavonoïdes et des polyphénols à partir de *Cystoseira amantacea stricta*. Les différents procédés utilisés dans le cadre de cette thèse : extraction (solide-liquide), étude de l'effet des quatre facteurs de dosage (concentration du méthanol X1, Ratio (solvant /échantillon) X2, température de dosage X3 et temps de dosage X4) sur le taux des polyphénols et des flavonoïdes par la méthode de surface de réponse seront détaillés, l'analyse statistique et la modélisation mathématique sera abordée.

2.1. Site d'étude

Les macroalgues de *C. amantacea var stricta* ont été récoltées au printemps (mi-avril) à partir de la surface rocheuse exposée (intertidale) (pendant la marée basse) au site de Kristel (35°50' 40 N/ 0°28' 59 O) situé à l'est de la cote oranaise.

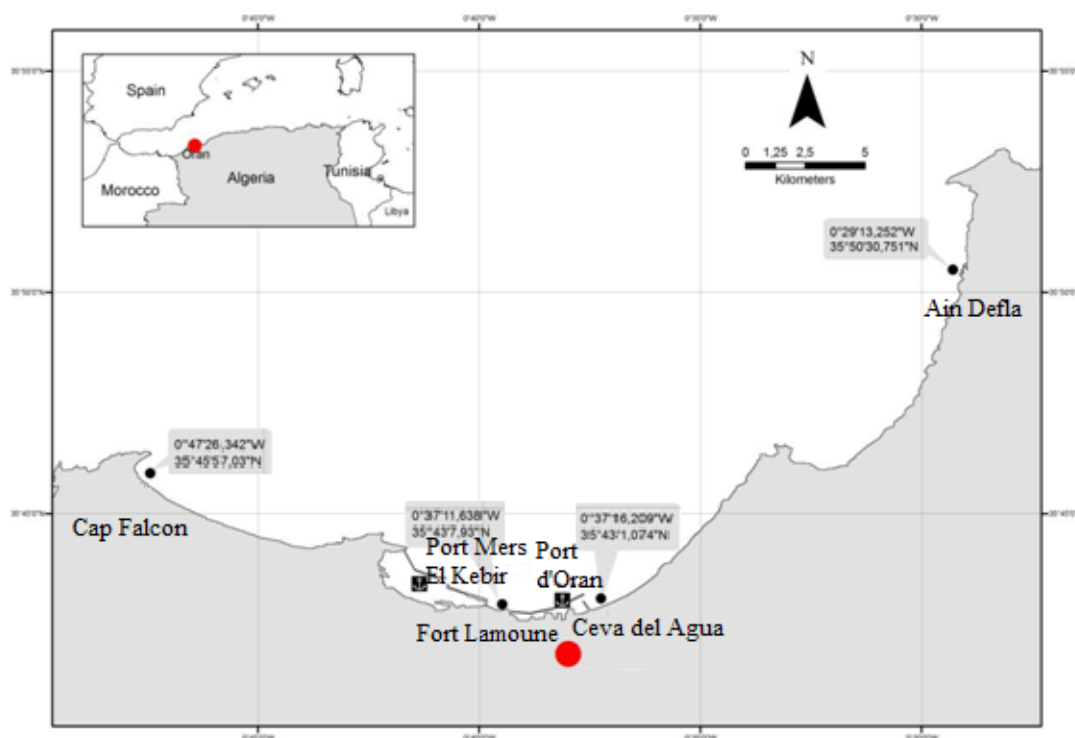


Figure 2.1. : Zones d'échantillonnage de *C. amantacea var stricta*

2.2. Matériels végétal

Les échantillons de macroalgues de *C. amontacea var stricta* ont été récoltés au printemps (mi-avril) à partir de la surface rocheuse exposée (intertidale) (pendant la marée basse) au site de Kristel (35°50' 40 N/ 0°28' 59 O) situé à l'est de la cote oranaise. De l'eau fraîche a été utilisée pour laver abondamment et éliminer les épiphytes, les microorganismes, sels et d'autres matières suspendues aux macroalgues, ensuite, les thalles séchés à l'aire libre de *C. amontacea var stricta* ont été broyés par un mixeur électrique et conservés à l'ambre dans la température de 20°C.

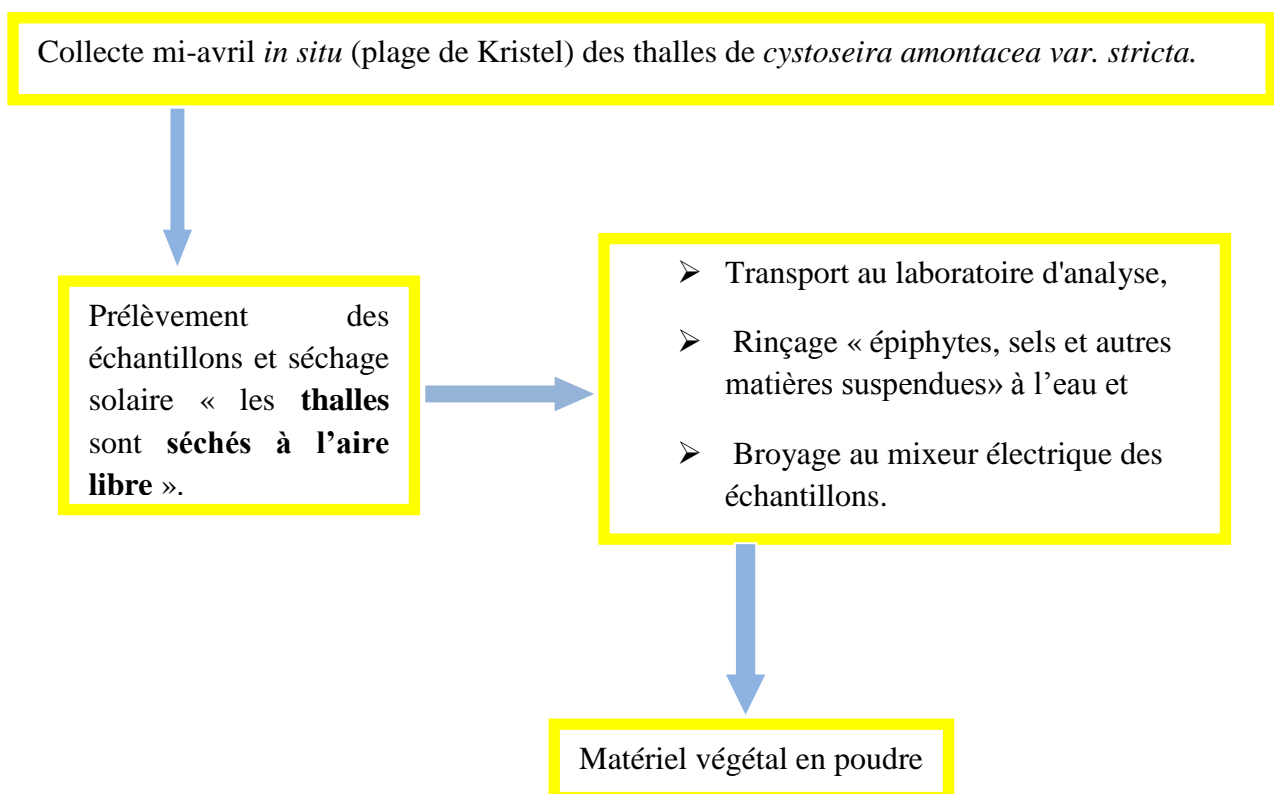


Figure 2.2 : Schéma du traitement des échantillons de *Cystoseira amentacea var. stricta*.

2.3. Procédure de dosage

Le méthanol est fréquemment utilisé pour l'extraction des métabolites secondaires des macroalgues (Chew *et al.*, 2008; Vinayak, 2011; Budhiyanti, 2012). Pour extraire le maximum de composés phénoliques à partir d'algues marines, un solvant de polarité optimal

est requis (Rajauria, 2012). Dans notre étude, l'échantillon réduit en poudre est premièrement soumis à une étape de macération pendant 24 heures avec du méthanol à 100%. En effet, un gramme d'échantillon algal sous forme de poudre a été macéré dans du méthanol à 100% pendant 24 heures avec une légère agitation. Ensuite, la solution obtenue a été filtrée par du papier Whatman N°1 et conservée dans un réfrigérateur à 4°C.

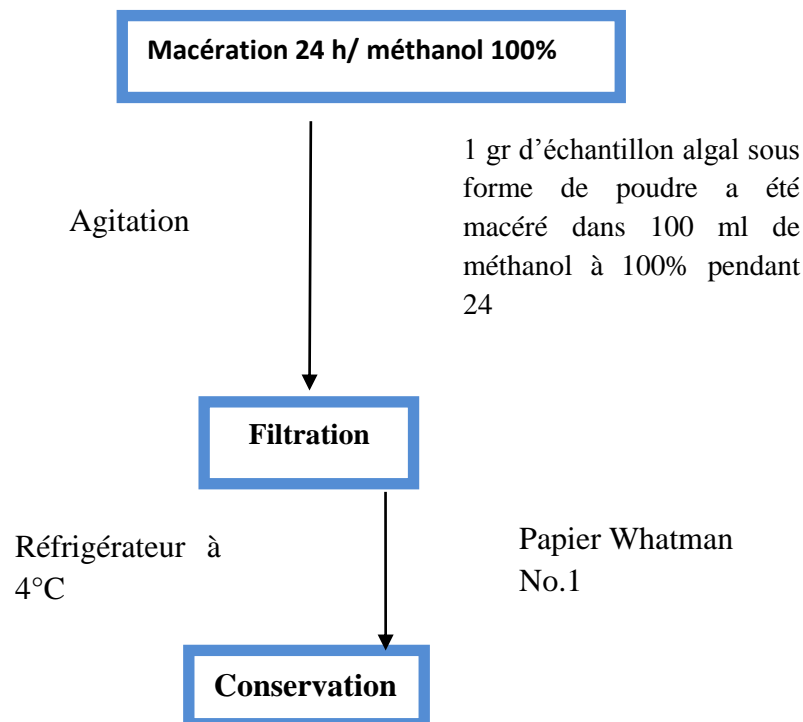


Figure 2.3: Schéma Échantillonnage, mesures et analyses

2.4. Contenu total en polyphénols (TPC)

Le contenu en polyphénol totaux a été déterminé selon la méthode de Wong *et al.* (2006) modifiée. Une solution de 200µl de l'extrait (0.2mg/ml méthanol) et 1 ml de réactif de Folin–Ciocalteu (1/10 in H₂O) ont été mélangées à l'aide d'un vortex. La solution a été incubée pendant 4 min à l'ombre et dans une température de 20°C à fin de permettre au Folin–Ciocalteu de réagir avec les polyphénols de l'échantillon, ensuite, 800 µl de 1 N carbonate de sodium (Na₂CO₃) dans 7.5% H₂O a été ajouté, puis, la préparation a été soumise à une légère agitation par vortex.

La solution a été incubée dans une température de 20°C et à l'ombre pendant 10 min et l'absorbance du standard versus échantillon a été mesurée en triplet à 765nm par un photo-

spectromètre de laboratoire. Enfin, les résultats des dosages de polyphénols totaux sont exprimés

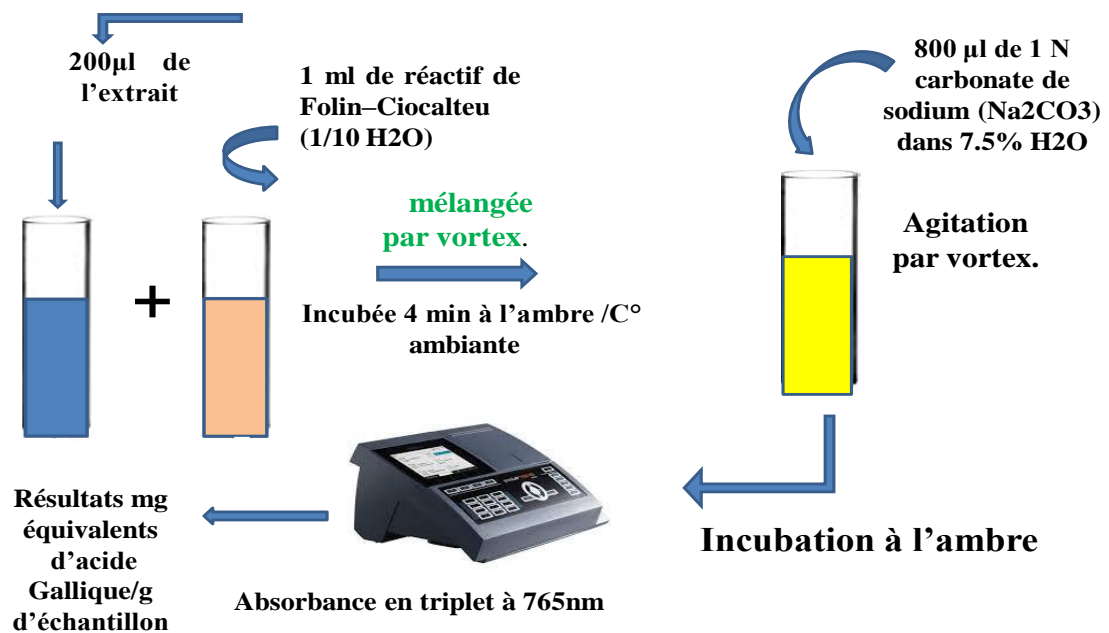


Figure 2.4 : Schéma de la procédure de dosage des polyphénols selon Wong *et al.* (2006) modifiée.

2.5. Contenu total en flavonoïdes (TFC).

La méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) décrite par Djeridane *et al.* (2006) a été utilisée avec quelques modifications pour déterminer le contenu en flavonoïdes totaux (TFC). Un ml de l'extrait a été ajouté à un volume équivalent de trichlorure d'aluminium AlCl₃ (2% Méthanol) puis la solution a été bien mélangée en utilisant un vortex. Ensuite le mélange a été incubé à une température de 20°C à l'ombre pendant 10 min sous une légère agitation.

L'absorbance au blanc contre l'échantillon a été enregistré en triplet à 340 nm par un photomètre. Une courbe de calibration a été utilisée pour le dosage des différents échantillons par la Quercitine, les résultats ont été donnés en milligramme de quercetin équivalents/g.

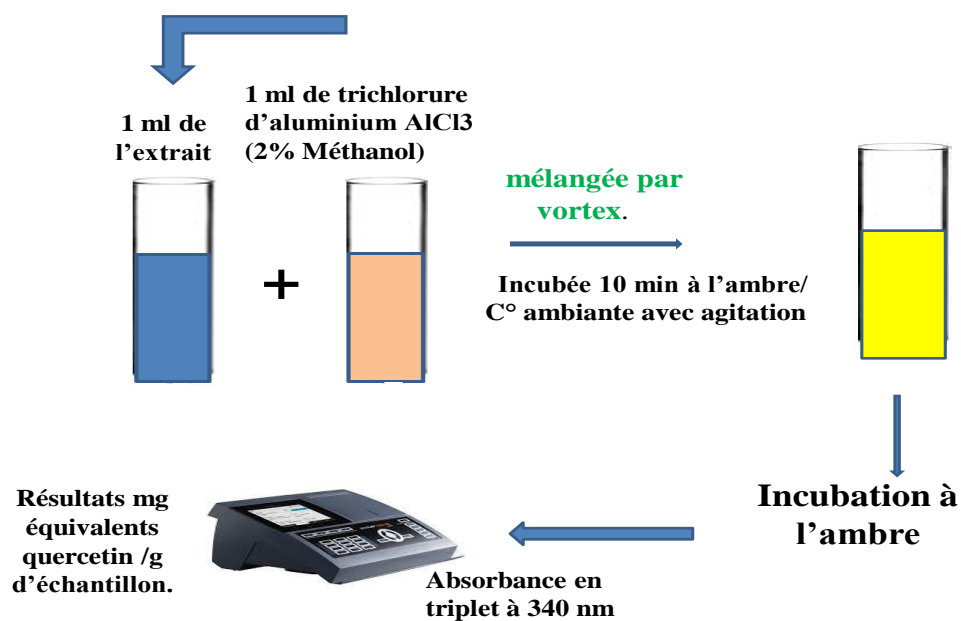


Figure 2.5 : Schéma de la procédure de dosage des flavonoïdes selon Djeridane *et al.* (2006) modifié

2.6. Analyses statistiques

La méthode de surface de réponse (RSM) a été utilisée pour déterminer les conditions optimales pour l'extraction de polyphénols totaux à partir d'échantillon de *Cystoseira amantacea var stricta*. La RSM a été réalisée par le logiciel JMP Statistical Discovery version 7.0.1.

Tableau 2.1.: Les valeurs codées et décodées des variables indépendantes dans la conception expérimentale

Concentration du méthanol % X1	Ratio Solvant /échantillon X2	Température (C°) X3	Temps min X4
20	20/100	20	30
50	50/100	40	90
80	80/100	60	150

La méthode Box Benken a été utilisée pour déterminer les effets de quatre facteurs indépendants (concentration du méthanol, ratio, température, et temps de dosage) sur la variable dépendante qui est le taux de polyphénol total (TPC).

Les codes utilisés dans l'analyse en RMS et les valeurs correspondantes des paramètres sont données dans le Tableau 2.1 et le Tableau 2.2.

Tableau 2.2 : La matrice Box-Behnken de la réponse du rendement en TPC de *C. amontacea var stricta*

Essais	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	50	50	40	90
2	50	50	60	30
3	20	80	40	90
4	80	20	40	90
5	50	50	20	150
6	50	50	20	30
7	80	80	40	90
8	50	50	60	150
9	20	20	40	90
10	20	50	40	150
11	50	80	60	90
12	50	20	20	90
13	50	50	20	90
14	20	50	40	30
15	80	50	40	30
16	50	50	40	90
17	80	50	40	150

18	50	20	60	90
19	50	80	40	150
20	50	20	40	30
21	80	50	20	90
22	20	50	20	90
23	20	50	60	90
24	80	50	60	90
25	50	20	40	150
26	50	80	40	30
27	50	50	40	90

L'effet linéaire, quadratiques et d'interaction des quatre variables considérées (concentration du méthanol, ratio, températures et temps) sur la variable de réponse ont été calculées. Leur signification a été évaluée par analyse de variance (ANOVA), significative à $\alpha= 0.05$ (Figure 2.6).

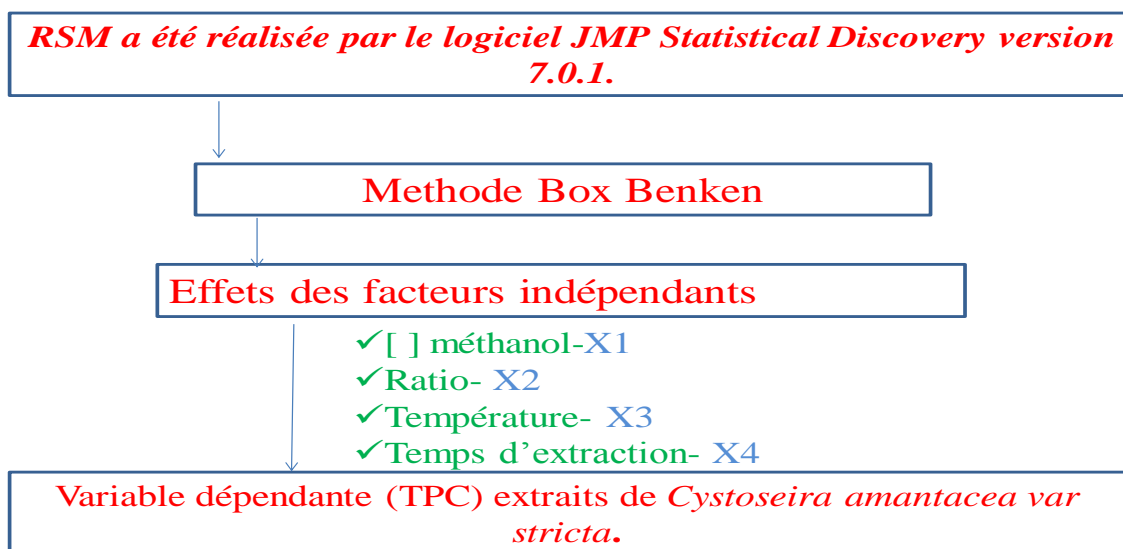


Figure 2.6: schéma de la RMS et Box Benken

Chaque surface de réponse a été obtenue en ajustant les données expérimentales à un modèle polynomial de second ordre selon l'équation suivante :

$$Y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \dots + \sum a_{ii} x_i^2 + a_{ij\dots z} x_i x_j \dots x_z$$

où Y est la variable de réponse dépendante, et a_0 est une constante, a_i , a_{ii} et a_{ij} sont respectivement les termes linéaire, quadratique et d'interaction, et X_i et X_j sont les variables indépendantes (Figure 2.7).

Les effets Linéaires, quadratiques et d'interactions des quatre variables considérées sur la variable de réponse ont été calculés.

Leurs significations ont été évaluées par analyse de variance (ANOVA), significative à $\alpha = 0.05$.

La surface de réponse a été obtenue en ajustant les données expérimentales à un modèle polynomial de second ordre selon l'équation suivante :

$$Y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \dots + \sum a_{ii} x_i^2 + a_{ij\dots z} x_i x_j \dots x_z$$

où Y est la variable de réponse dépendante
 X_i et X_j sont les variables indépendantes
 a_0 , est une constante

a_i , a_{ij} , a_{ii} sont respectivement les termes linéaire, quadratique et d'interaction

Fonction de désirabilité qui permet de prédire les valeurs optimales de chaque facteur avec la réponse mesurée (TPC/TFC)

Figure 2.7 : schéma de l'équation polynomiale, analyse statistique et désirabilité

Chapitre III :

Résultats et discussion

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Résultats et discussion des polyphénols

Les rendements en polyphénols totaux exprimé en mg d'équivalent d'acide gallique par g. d'extrait de matière sèche de, *C. amontacea var stricta* obtenu des 27 expérimentation, suggérer par le plan Box Behnken sont présentés dans le Tableau 3.1

Tableau 3.1.: La matrice Box-Behnken de la réponse du rendement en TPC de *C. amontacea var stricta*

Essais	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	TFP _p	TFP _{exp}
1	50	50	40	90	06,32	23,31
2	50	50	60	30	22,60	15,88
3	20	80	40	90	51,18	47,77
4	80	20	40	90	42,78	41,94
5	50	50	20	150	14,55	17,02
6	50	50	20	30	10,92	03,03
7	80	80	40	90	23,66	18,60
8	50	50	60	150	09,95	13,58
9	20	20	40	90	32,87	33,68
10	20	50	40	150	32,96	32,34
11	50	80	60	90	19,50	22,24
12	50	20	20	90	06,58	14,70
13	50	50	20	90	22,34	22,16
14	20	50	40	30	34,64	25,66
15	80	50	40	30	12,87	16,04

16	50	50	40	90	31,89	21,65
17	80	50	40	150	09,50	21,05
18	50	20	60	90	29,59	24,03
19	50	80	40	150	58,79	48,25
20	50	20	40	30	34,78	47,03
21	80	50	20	90	12,95	06,44
22	20	50	20	90	10,74	14,73
23	20	50	60	90	13,39	21,60
24	80	50	60	90	11,27	08,98
25	50	20	40	150	30,30	23,81
26	50	80	40	30	05,17	13,34
27	50	50	40	90	29,15	22,39

TFP_p : predicted value of TFP, **B_{exp}** : experimental value of TFP

D'après le Tableau 3.1, les meilleurs rendements de dosage de TPC ont été obtenus par trois expériences proposées par le plan d'expériences de Box-Behnken. Il s'agit des essais n°3, 19 et 20 avec un Taux de TPC de 47,77 ; 48,25 et 47,03 mg d'équivalents d'acide gallique/g, respectivement.

L'analyse par régression multiple (Tableau 3.2) a été appliquée sur les données expérimentales, la corrélation entre les facteurs de dosage (concentration de méthanol, le ratio liquide/solide, température et temps d'extraction) et la réponse a été mesurée (contenu en polyphénol totaux).

Tableau 3.2. : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur le TPC.

Terme	Estimation	Écart-type	Rapport t	Prob.> t
Constante	22,45	6,91	3,25	0,0088*
Méthanol(20,80)	-5,22	3,45	-1,51	0,161
Ratio(20,80)	-2,31	3,45	-0,67	0,518
Température(20,60)	2,35	3,45	0,68	0,518
Temps(30,150)	2,92	3,45	0,85	0,418
Méthanol* Ratio	-9,35	5,98	-1,56	0,149
Méthanol*Température	-1,08	5,98	-0,18	0,86
Ratio *Température	1,42	5,98	0,24	0,818
Méthanol*Temps	-0,42	5,98	-0,07	0,945
Ratio*Temps	14,53	5,98	2,43	0,0357*
Température*Temps	-4,07	5,98	-0,68	0,512
Méthanol*Méthanol	1,8	5,185	0,35	0,736
Ratio * Ratio	10,38	5,18	2	0,073
Température*Température	-11,25	5,18	-2,17	0,055
Temps*Temps	0,32	5,18	0,06	0,952

Les valeurs de p servent à vérifier la significativité de chaque coefficient et donne ainsi une information sur le profil des interactions entre les paramètres analysés.

Selon les réponses obtenues pour chaque essai du plan d'expérience (Tableau 3.2), la meilleure équation de régression du modèle mathématique polynomial expliquant le taux de polyphénol total en fonction des quatre facteurs est la suivante :

$$\text{TPC} = 22.45 - 5.22 X_1 - 2.31 X_2 + 2.35 X_3 + 2.92 X_4 - 9.35 X_1X_2 - 1.08 X_1X_3 + 1.41 X_2X_3 - 0.42 X_1X_4 - 14.52 X_2X_4 - 4.07 X_3X_4 + 1.8 X_1^2 + 10.38 X_2^2 - 11.26 X_3^2 + 0.32 X_4^2.$$

L'analyse de variance (ANOVA) a été réalisée pour vérifier la conformité du modèle suggéré et d'identifier les facteurs qui influencent significativement le taux de TPC.

Les résultats des analyses des variances des paramètres de dosage sont listés dans le Tableau 3.3. L'obtention d'un coefficient de corrélation ($R^2 = 0,72$) pour nos expérimentations sur le taux de polyphénols totaux signifie que le modèle proposé explique 72 % de la variabilité du taux de TPC. Le F-test a été utilisé pour vérifier la significativité statistique de l'équation de régression du modèle (Garcia-Castello *et al.*, 2015).

Tableau 3.3: Analyse de variance de TPC ANOVA

Source	Degré(s) de liberté	Somme des	Carré moyen	Rapport F	Prob. > F
Modèle	16	3749,626	234,352	1,634	$p=0,217$
Résidus	10	1434,26	143,426		
Total	26	5183,886			
R^2	0.72				

3.1.1. L'effet des variables d'extraction sur le taux de polyphénol totaux (TPC)

3.1.1.1. Effet du solvant (méthanol)

Dans notre étude le solvant n'a pas d'effet significatif ($p = 0,161$) sur le taux de polyphénol (Tableau 3.2). Néanmoins, ce facteur agit indirectement sur le TPC à travers le ratio.

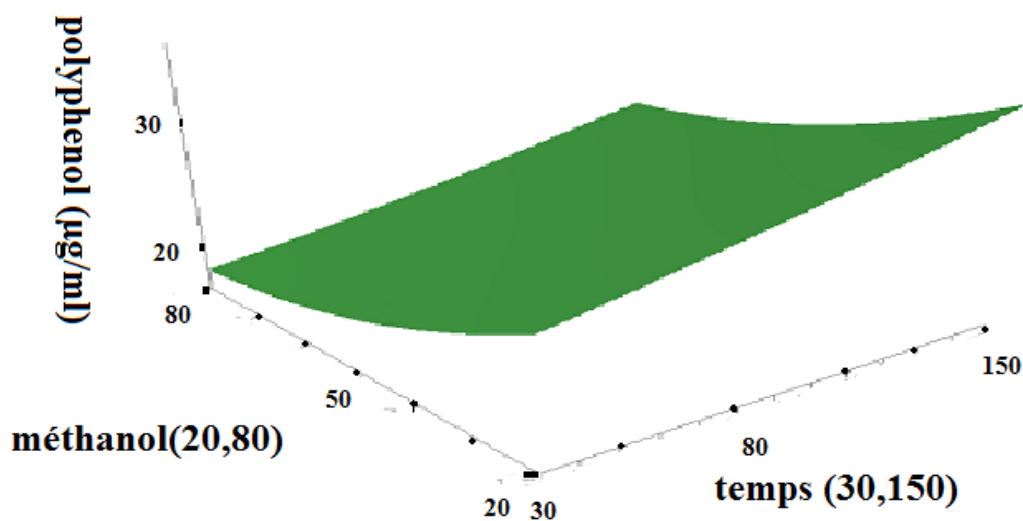


Figure 3.1: Effet de la concentration du méthanol et du temps d'extraction sur le TPC

La figure 3.1 montre que le taux maximal de polyphénols est obtenu avec du méthanol à 20%. Rajauria *et al.* (2012) a testé l'effet de différentes concentrations de méthanol (20, 40, 60 and 80%) sur le rendement en polyphénols d'une algue brune *Himanthalia Elongata*, il a observé que 60% de méthanol est une concentration optimale pour le dosage d'un maximum de polyphénol à partir d'algues brunes.

D'un autre côté, Chew *et al.* (2008) avait comparé l'effet de trois concentrations différentes de méthanol (20%, 50% and 100% v/v) pour sélectionner le meilleur solvant d'extraction de métabolite secondaire de trois espèces de macroalgues brunes *Padina antillarum*, *Caulerpa racemosa*, et *Kappaphycus alvarezzi*, il a observé que le méthanol aqueux à 50% était le plus efficace alors que le méthanol à 100% était le moins efficace.

Dans notre étude l'obtention d'un meilleur rendement de polyphénol à partir de 20% de méthanol pourrait s'expliquer par le fait que le temps prolongé d'extraction avait permis de récupérer un maximum de polyphénol qui a favorisée un transfert de masse considérable (Hilary, 2015; Garcia-Castello, 2015; Vaji, 2015).

3.1.1.2. Effet du ratio

L'effet d'interaction du ratio avec le temps d'extraction est positif et statistiquement significatif ($p= 0.0357$) (Tableau 3.2).

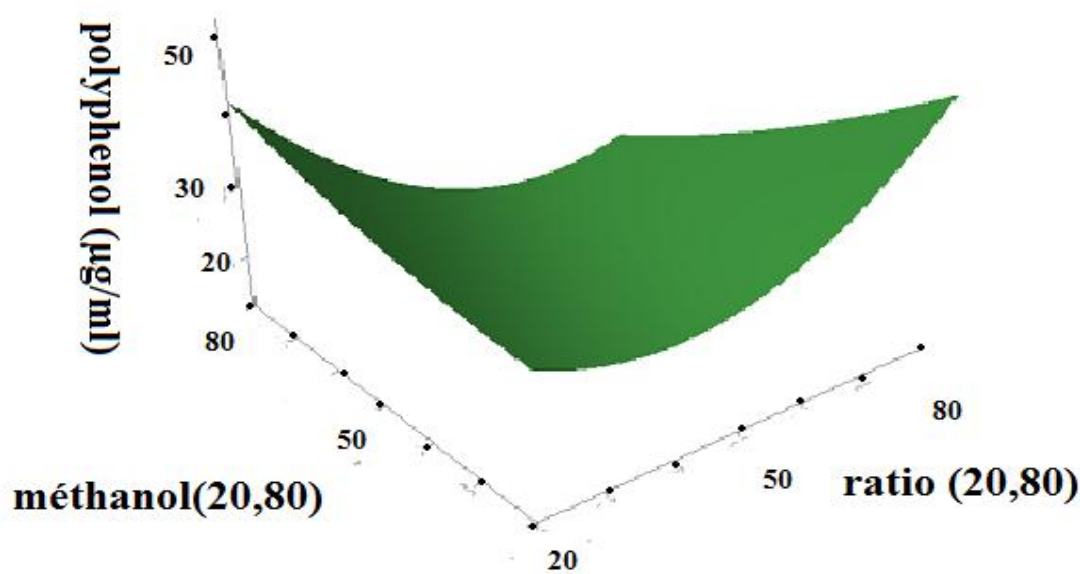


Figure 3.2 : Effet du ratio et de la concentration du méthanol sur le TPC

Le taux de TPC est maximal pour une valeur de ratio de 80 (Figure 3.2). En effet, l'extraction des composés phénoliques à partir de matériel végétal peut être influencée par des facteurs tels que le ratio ou le type de solvant aussi bien que la taille des particules de l'échantillon. L'importance de la quantité de solvants consommée pour chaque expérience doit être recherchée, d'un autre côté, il est important d'éviter l'effet de saturation afin d'avoir une meilleure optimisation (Pinelo, 2006). Un ratio élevé peut avoir un effet bénéfique en augmentant le rendement en polyphénols extraits (Cacace, 2003 ; Pinelo, 2005), cependant, un équilibre entre le coût et l'importance de la quantité de solvants consommée pour chaque

expérience doit être recherché, d'un autre côté, il est important d'éviter l'effet de saturation afin d'avoir une meilleure optimisation (Pinelo, 2006).

3.1.1.3. Effet de la température

La température n'a pas d'effet significatif ($p= 0.518$) (Tableau 3.2). La valeur maximale de TPC est obtenue avec une température de dosage de 41°C (Figure 3.3).

Approximativement, la même température d'extraction a donné un meilleur rendement en polyphénols à partir de fruit de citron *Citrus hystrix* (Chan, 2009). Par ailleurs, une température de 100°C était nécessaire pour les graines de l'aréquier *areca catechu*, 65°C pour les feuilles de la plante médicinale de la famille des apiacées *Centella asiatica et Orthosiphon stamineus* de la famille des lamiacées (Chew, 2011), 90°C pour *Moringa oleifera* de la famille des monotypiques (Naeem, 2012).

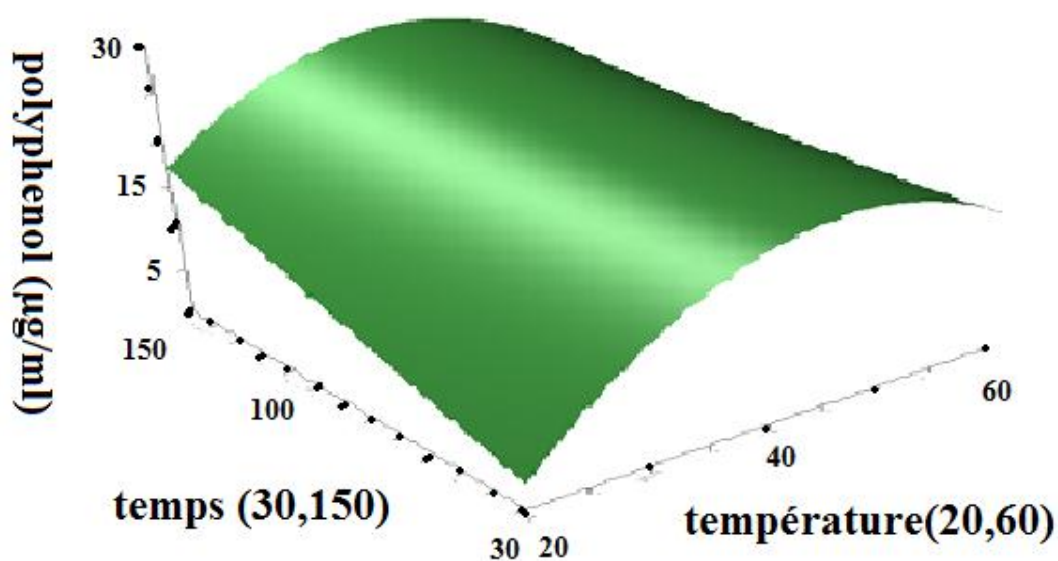


Figure 3.3 : Effet de la température et du temps d'extraction sur le TPC

L'augmentation de la température de dosage pourrait augmenter la solubilité des TPC car elle améliore la solubilité et le transfert de masse. De plus, la viscosité et la tension de surface augmentent, ce qui peut favoriser le contact entre le solvant et le soluté. Par ailleurs, certains composés phénoliques (anthocyanines) sont facilement dégradés et oxydés par les

températures élevées (Jin Dai, 2010), donc les extractions conventionnelles sont généralement conduites à des températures se rangeant entre 20 et 50°C (Jackman, 1987).

3.1.1.4. Effet du temps

150 minutes était nécessaires pour l'obtention d'un maximum de polyphénol Figure 3.4.

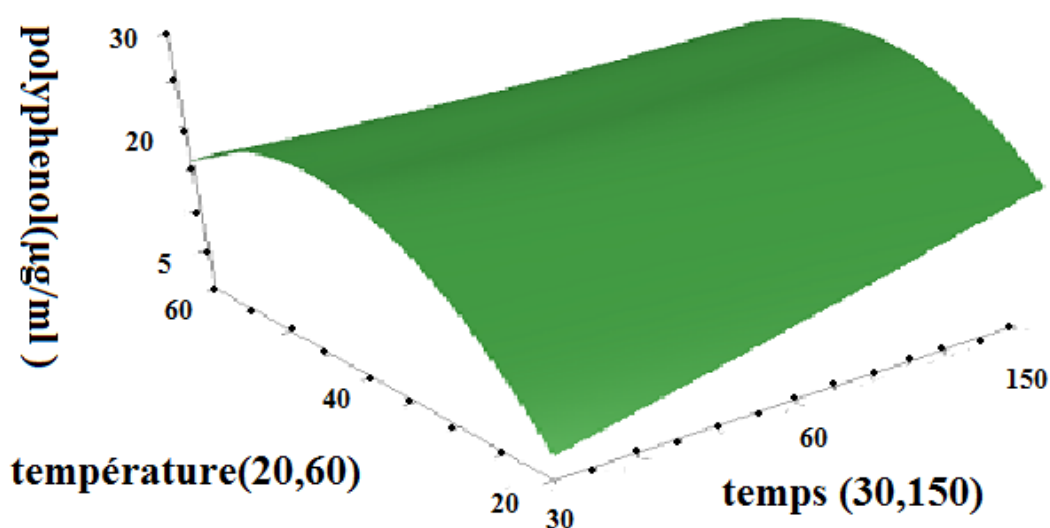


Figure 3.4: Effet du temps et de la température d'extraction sur le TPC

L'effet d'interaction du temps de dosage avec le ratio solvant/échantillon est positif et statistiquement significatif ($p= 0.0357$) (Tableau 3.2). Dans la bibliographie, ce paramètre peut être aussi court de l'ordre de quelques minutes ou bien prendre des proportions importantes avoisinant les 24 heures (Hismath, 2011).

Le prolongement du temps d'extraction au-delà 180 min (270, 360 and 450 min) cause d'importantes pertes en TPC, Dent *et al.* (2013) avait recommandé une durée d'extraction ne dépassant pas les 3 heures pour l'extraction de TPC de feuilles de *Salvia officinalis*.

Plusieurs auteurs avaient attesté que plus le temps d'extraction est long, plus le contenu en polyphénol des échantillons obtenus est faible (Bouterfas *et al.*, 2014). Cela pourrait être due à la perte des polyphénols par oxydation qui provoque la polymérisation des polyphénols en composés insolubles (Naczka *et al.*, 2006 ; Chirinos *et al.*, 2007).

3. 1.2. Validation du model

L'objectif de cette étude était d'optimiser les paramètres de dosage des polyphénols à partir d'extraits d'algue brune *C. amontacea var stricta*. Les conditions optimales obtenues de l'approche de fonction de désirabilité étaient ; une concentration de méthanol à 20%, un ratio liquide/solide de 80, une température d'extraction de 40.69°C, et un temps de 150 minutes.

Un bon coefficient de régression a été généré par le logiciel et qui est de 0,72 donc un degré de corrélation élevé entre les valeurs observées et prévues souligne un accord raisonnable du modèle avec les résultats expérimentaux, ce qui signifie que 72% des résultats peuvent être expliqués par le modèle. Cependant, les résultats prédits (65.98 mg de équivalents d'acide gallique/g) ont été différent par rapport aux résultats expérimentaux (3.66 mg équivalents d'acide gallique/g). En effet, comme signalé par Liyana-Pathirana et Shahidi (2005), l'exploration et l'optimisation des réponses et des facteurs indépendant peut aboutir à des échecs sauf si, le coefficient de corrélation est satisfaisant, dans notre étude la valeur de p était de 0,217 (Tableau II.4), ce qui indique une bonne adéquation de notre modèle pour cette étude (Liyana-Pathirana et Shahidi, 2005 ; Wang *et al.*, 2008).

3.2. Résultats et discussion des flavonoïdes

Les rendements en flavonoïdes totaux exprimé en mg équivalents Quercetin par gramme d'extrait de matière sèche de *C. amontacea var stricta* obtenu des 27 expérimentations suggérées par le plan Box Behnken sont présentés dans le Tableau 3.4

Tableau 3.4 : La matrice Box-Behnken de la réponse du rendement en TFC de *C. amontacea var stricta*

Essais	X ₁	X ₂	X ₃ C°	X ₄ min	TFC _p	TFC _{exp}
1	50	50	40	90	10,12	10,61
2	50	50	20	150	9,91	08,43
3	50	50	60	30	04,18	05,54
4	20	80	40	90	12,81	13,79
5	80	20	40	90	18,08	16,98
6	50	50	20	30	09,84	09,47
7	80	80	40	90	5,19	03,81
8	50	50	60	150	03,65	03,89
9	20	20	40	90	12,47	13,74
10	20	50	40	150	07,54	07,75
11	50	80	60	90	05,75	04,37
12	50	80	20	90	07,83	06,96
13	50	20	20	90	17,44	19,35
14	20	50	40	30	10,54	11,12
15	80	50	40	30	06,77	06,55
16	50	50	40	90	09,84	09,90
17	80	50	40	150	09,31	08,71

18	50	20	60	90	08,14	08,99
19	50	80	40	150	04,46	06,53
20	50	20	40	30	10,96	09,02
21	80	50	20	90	13,51	15,77
22	20	50	20	90	12,34	11,43
23	20	50	60	90	08,55	06,43
24	80	50	60	90	05,38	06,43
25	50	20	40	150	12,88	12,44
26	50	80	40	30	06,84	07,42
27	50	50	40	90	09,97	09,42

TFC_p : predicted value of TFC, **TFC_{exp}** : experimental value of TFC

D'après le Tableau 3.4, les meilleurs rendements de dosage ont été obtenus par les deux expériences proposées par le plan d'expériences de Box-Behnken. Il s'agit des essais n°5 et 13 avec un Taux de TFC de 18,08 et 17,44 mg équivalents Quercetin par g respectivement.

L'analyse par régression multiple a été appliquée sur les données expérimentales, la corrélation entre les facteurs d'extraction (concentration de méthanol, le ratio liquide/solide, température et temps d'extraction) et la réponse mesurée (contenu en flavonoïdes totaux).

Tableau 3.5: Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur le TFC.

Terme	Estimation	Écart-type	Rapport t	Prob.> t
Constante	9,98	1,11	9,03	<,0001*
Méthanol (20,80)	-0,5	0,55	-0,91	0,3861
Ratio (20, 80)	-3,14	0,55	-5,68	0,0002*
Température (20,60)	-2,98	0,55	-5,39	0,0003*
Temps (30,150)	-0,11	0,55	-0,21	0,8405
Méthanol*ratio	-3,3	0,96	-3,45	0,0062*
Méthanol*Température	-1,09	0,96	-1,13	0,2835
Ratio*Température	1,94	0,96	2,03	0,0699
Méthanol* Temps	1,38	0,96	1,44	0,1793
Ratio* Temps	-1,078	0,96	-1,13	0,2866
Température* Temps	-0,15	0,96	-0,16	0,8766
Méthanol*Méthanol	0,95	0,83	1,15	0,2767
ratio*ratio	1,07	0,83	1,28	0,2279

Température*Température	-0,98	0,83	-1,18	0,2656
Temps* Temps	-2,25	0,83	-2,72	0,0217*

Les valeurs de *p* servent à vérifier la significativité de chaque coefficient et donne ainsi une information sur le profil des interactions entre les paramètres analysés (Burlot, 2016).

Selon les réponses obtenues pour chaque essai du plan d'expérience (Tableau 3.5), la meilleure équation de régression du modèle mathématique polynomial expliquant le taux de flavonoïdes totaux en fonction des quatre facteurs est la suivante :

$$Y_{(TFC)} = 9,97 - 0,5X_1 - 3,13 X_2 - 2,98 X_3 - 0,11 X_4 - 3,30 X_1X_2 - 1,08 X_1X_3 + 1,94 X_2X_3 + 1,38 X_1X_4 - 1,07 X_2X_4 - 0,15 X_3X_4 + 0,95 X_1^2 + 1,06 X_2^2 - 0,97 X_3^2 - 2,25 X_4^2.$$

Où Y est la réponse (le contenu en flavonoïdes totaux), les variables indépendantes sont X₁ (la concentration du méthanol), X₂(le ratio liquide/solide), X₃(la température d'extraction) et X₄ (le temps d'extraction).

L'analyse de variance (ANOVA) a été réalisée pour vérifier la conformité du modèle suggéré et d'identifier les facteurs qui influencent significativement le taux de TFC (Tableau 3.6). Les résultats des analyses des variances des paramètres d'extraction sont listés dans le Tableau 3.6. Tout d'abord, le fort coefficient de corrélation ($R^2 = 0,91$) indique que le modèle proposé explique 91 % de la variabilité du taux de TFC.

Tableau 3.6 : Analyse de variance de TFC (ANOVA)

Source	Degré(s) de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	Rapport P
Modèle	16	0,569	0,035	6,2609	0,0028*
Résiduel	10	0,057	0,006		
Total	26	0,626			
R² = 0.91					

3.2.1. L'effet des variables d'extraction sur le taux de flavonoïdes totaux

La meilleure méthode de visualisation des effets des variables indépendantes sur les variables dépendantes est de tracer une courbe de surface de réponse. Ceci est réalisé en variant deux facteurs tout en gardant la valeur des deux autres facteurs constante et au point central (Wani *et al.*, 2015).

3.2.1.1. Effet du solvant (méthanol)

L'effet de l'interaction du méthanol avec le ratio est statistiquement très significatif et est négatif ($p=0.0062$) comme observé dans le Tableau 3.5. Le taux le plus élevé de TFC (23.80 mg of équivalents Quercetin par g) a été obtenu avec une concentration de 80% Figure 3.5. On observe que la valeur de TFC augmente avec la diminution de la polarité du solvant de 0% à 80% méthanol, le taux de TFC augmente avec l'augmentation de la concentration du méthanol.

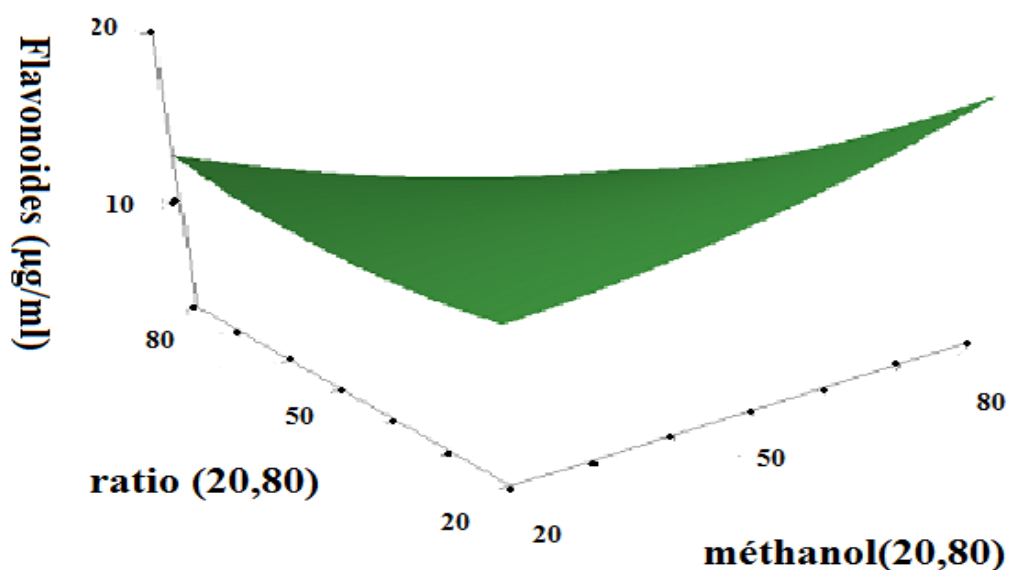


Figure 3.5 : Effet de la concentration du méthanol et du ratio sur le TFC.

Dans l'étude de Rajauria *et al.* (2012), sur l'algue brune *Himanthalia Elongata* il a été reportée que les extraits méthanolique à 60% ont exhibés d'une manière significative ($p < 0.05$) la plus haute valeur de TFC exprime en mg équivalents quercetin /g. Butnariu et Coradini (2012) travaillant sur les fleurs de *Calendula officinalis*, ont observé que le meilleur

rendement en flavonoïdes était obtenu avec du méthanol à 80%. D'un autre côté, le méthanol aqueux à 62.5% a été utilisé pour l'extraction des flavonoïdes à partir de différents types de fruits et de légumes ainsi que le thé vert et noir (Mattila *et al.*, 2000). De plus, le même système de solvant (méthanol de concentration entre 50–80%) a été utilisé pour l'extraction des sous-groupes de flavonoïdes (Tsao et Deng, 2004). Ceci pourrait être expliqué par le fait que le méthanol aqueux est capable de détruire les membranes cellulaires et de récupérer et stabiliser quelques sous-groupes de polyphénols tels que les flavonoïdes. Il est important de souligner que, ce système de solvant reste polaire donc il est capable de solubiliser les flavonoïdes et les acides phénoliques (Vaji, 2015).

3.2.1.2. Effet du ratio

L'effet linéaire du ratio est négatif et statistiquement hautement significatif ($p= 0.0002$) (Tableau 3.5). Le taux de TFC était maximal quand le ratio était de 20 (Figure 3.6). Généralement, le taux de TFC augmente quand le ratio augmente (volume du solvant par rapport au soluté) du au fait que, plus la quantité du solvant pénétrant la cellule est importante plus la quantité des flavonoïdes se diffusant dans ce solvant est grande (Shan *et al.*, 2012).

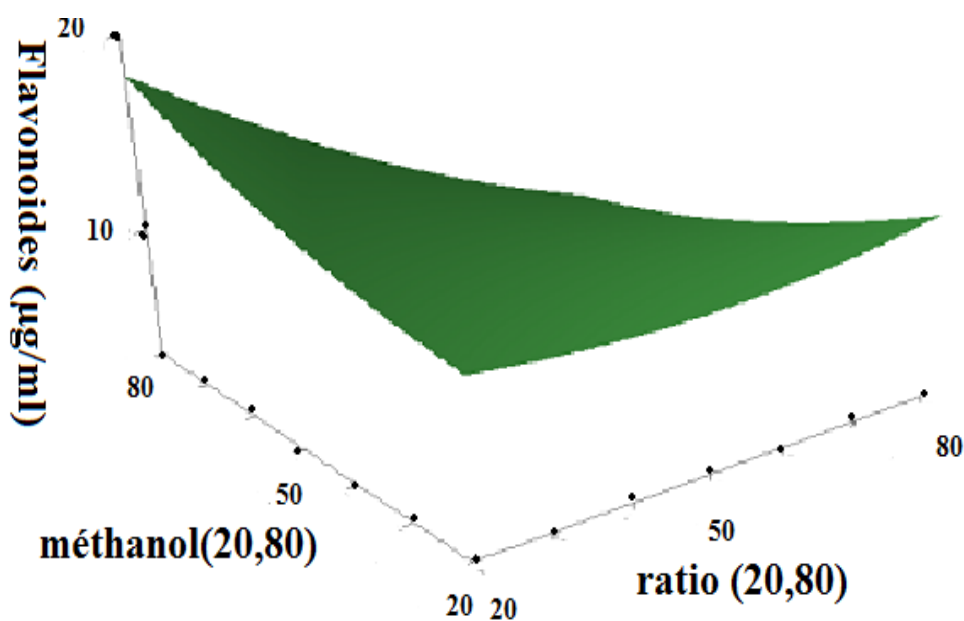


Figure 3.6 : Effet du ratio et de la concentration du méthanol sur le TFC

La quantité relativement importante de TFC obtenue avec un ratio faible, donc une part minime du solvant dans le ratio, pourrait être expliquée par l'effet conjugué à une longue période de macération (Figure 3.2).

3.2.1.3. Effet de la température

De la même manière que le ratio, l'effet linéaire de la température était négatif et statistiquement hautement significatif ($p= 0.0003$) (Tableau 3.5). La valeur maximale de TFC a été obtenue avec une température d'extraction de 20°C (Figure 3.7). Bouterfas *et al.* (2014) avait obtenu un maximum de rendement de flavonoïdes à partir des feuilles du marrube blanc (*Marrubium vulgare* L) en utilisant une température d'extraction de 20°C, ce qui est en accord avec notre étude puisque c'est à cette température que le taux de TFC était optimal. En effet, il est rapporté que les températures d'extraction dépassant 25°C peuvent réduire le taux de TFC extrait. Cependant, le paramètre de la température d'extraction doit être rigoureusement ajusté car il est possible que ces molécules subissent une dégradation thermique surtout les sous-groupes de flavonoïdes tels que les groupes hydroxyles (Davidov-Pardo *et al.*, 2011; Biesaga et Pyrzyńska 2013). De plus, un chauffage modéré manifeste un avantage pour le ramollissement des tissus végétaux et pour réduire l'intégrité des membranes cellulaires et de permettre ainsi de récupérer les molécules liées à ces structures (Juntachote *et al.*, 2006; Spigno *et al.*, 2007).

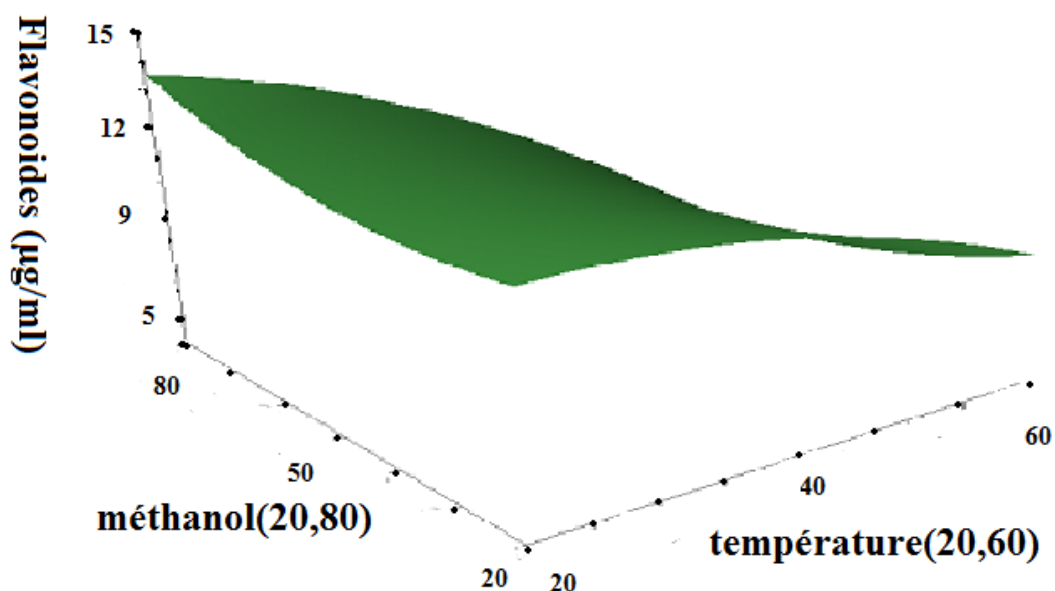


Figure 3.7 : Effet de la température de dosage et de la concentration du méthanol sur le TFC

3.2.1.4. Effet du temps

Dans le présent travail, le facteur temps a montré un effet quadratique négatif et statistiquement significatif ($p= 0.0217$) (Tableau 3.5). Le taux de TFC maximal a été obtenu pour une période d'extraction de 123.29 min (Figure 3.8).

Dans d'autres études, trois heures était nécessaire pour obtenir un meilleur rendement en flavonoïdes à partir de feuilles de callicarpe *Callicarpa nudiflora* (Mohammedi et Atik, 2011) et de certaines variétés de thym *thymus vulgaris* (Zhekova et Pavlov, 2012).

D'un autre côté, dans l'étude de Liu *et al.* (2010), sur les feuilles de *Gynura medica* une plante à fleur de la famille des astéracées, 30 minutes était nécessaire pour obtenir une quantité maximale de flavonoïdes.

Il est connu qu'une période d'extraction prolongée permet au solvant et au soluté d'être le plus longtemps en contact et que ce long contact favorise davantage de transfert de masse (Hilary, 2015).

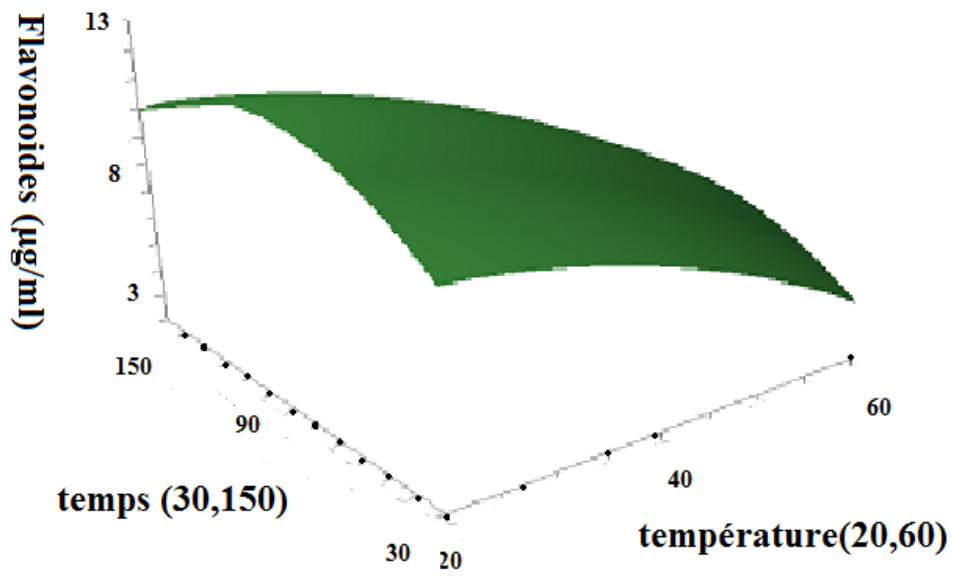


Figure 3.8 : Effet du temps et de la température de dosage sur le TFC

3.2.2. Validation du model

L'objectif de cette étude était d'optimiser les paramètres l'extraction de flavonoïdes à partir d'extraits d'algue brune *C. amontacea var stricta*. Les conditions optimales obtenues de l'approche de fonction de désirabilité étaient ; une concentration de méthanol à 80%, un ratio liquide/solide de 20, une température d'extraction de 20°C, et un temps d'extraction de 123.29 mn.

Un bon coefficient de régression a été généré par le logiciel et qui est de 0.91, donc un degré de corrélation élevé entre les valeurs observées et prévues et qui souligne un accord raisonnable du modèle avec les résultats expérimentaux, en d'autres termes cela signifie que 91% des résultats peuvent être expliqué par le modèle. Quoique, les résultats prédits (23.80 mg de Quercetine equivalents/g) ont été différent par rapport aux résultats expérimentaux (4.98 mg de équivalents Quercetine /g). Dans notre étude la valeur de p était de 0.003 (Tableau 3.5), ce qui indique que notre modèle est adéquat (Liyana-Pathirana et Shahidi, 2005 ; wang *et al.*, 2008).

Conclusion générale

Dans cette étude, la méthodologie de la surface de réponse a été utilisée pour l'optimisation de l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes selon quatre paramètres (concentration du méthanol, ratio solvant/échantillon, température et temps d'extraction), à partir d'extraits d'algue brune *Cystoseira amontacea var stricta*. Le modèle polynomial de second degré développé dans cette étude a montré une valeur de p non significative ($p=0,217$). Cependant, un bon coefficient de régression R^2 a été généré par le logiciel et qui est de 0,72 pour les polyphénols. Concernant les flavonoïdes nous avons enregistré une valeur de p très significative 0,003* et un bon coefficient de régression R^2 qui est de 0,91.

Les conditions optimales pour l'extraction des polyphénols selon la fonction de désirabilité étaient ; une concentration de méthanol à 20%, un ratio de 80, une température d'extraction de 40°C et un temps d'extraction de 150 minutes. Pour les flavonoïdes, une concentration de méthanol de 80%, un ratio de 20, une température d'extraction de 20°C, et un temps d'extraction de 123.29 mn.

D'après les résultats obtenus par la méthode de surface de réponse, le taux de flavonoïdes à montrer une bonne corrélation (91%) comparé à celui des polyphénols (0,72). De ce fait, d'autres ajustements sont requis pour affiner nos recherches et pour améliorer la corrélation entre les valeurs théoriques et les valeurs expérimentales des polyphénols. D'un autre côté, il serait intéressant en perspective de tester d'autres facteurs et techniques d'extraction telles que; la MAE (l'extraction assistée par microondes); UAE (l'extraction assisté par ultrason-microondes) ; l'extraction fluide supercritique (SFE).

REFERENCES

Abou El-Hassan, M. A. I., Touw, D. J., Wilhelm, A. J., Bast, A., Van Der Vijgh, W. J. F. (2000). Stability of monoHER in an aqueous formulation for i.v. administration. *Inter. J. Pharm.*, 211 (1-2): 51-56.

Ainane, T. (2011). Valorisation de la biomasse algale du Maroc : Potentialités pharmacologiques et Applications environnementales, cas des algues brunes *Cystoseira tamariscifolia* et *Bifurcaria bifurcata*. Thèse de Doctorat en chimie Analytique, Université Hassan II- Casablanca, Maroc.

Agardh, C. (1820). Species algarum rite cognitae, cum synonymis, differentiis specificis descriptionibus succinctis : officina Berlingiana., 1(1):168.

Alcaraz, L., Blanco, S., Puig, O., Tomas, F., Ferretti, F. (2000). Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Theo. Biol.*, (205): 231-240.

Amado, R.I., Franco, D., Sanchez, M., Zapata, C., Vazquez, J.A. (2014). Optimisation of antioxidant extraction from *Solanum tuberosum* potato peel waste by surface response methodology. *Food Chem.*, (165): 290–299.

Amico, V., Piatelli, M., Cunsolo, F., Recupero, M. and Ruberto, G. (1990). Etraprenyltoluquinols as chemotaxonomic markers in the genus *Cystoseira*: *C. barbarula* and *C. barbata*. *Gazz. Chim. Ital.*, (12): 9–12.

Arockia Babu, M., Shakya, N., Prathipati, P., Kaskhedikar, S. G. Saxena, A. K. (2002). Development of 3D-QSAR models for 5-Lipoxygenase antagonists: chalcones. *Bioorg. & Med. Chem.*, 10 (12): 4035-4041.

Athukorala, Y., Lee, K.W., Kim, S.K. and Jeon, Y.J. (2007). Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. *Bioresour. Technol.*, (98): 1711-1716.

Ballesteros, E. (1990a). Structure and dynamics of the community of *Cystoseira zosteroides* (Turner) C. Agardh (Fucales, Phaeophyceae) in the Northwestern Mediterranean. *Scientia Marina*, (54): 217–299.

Ballesteros, E. (1990b). Structure and dynamics of the *Cystoseira caespitosa* Sauvageau (Fucales, Phaeophyceae) community in the North-Western Mediterranean. *Scientia Marina.*,(54) : 155–168.

Ballesteros, E. (1992). Els vegetals i la zonació litoral: espècies, comunitats i factors que influeixen en la seva distribució. Institut d'Estudis Catalans.

Ballesteros, E., Sala, E., Garrabou, J., Zabala, M. (1998). Community structure and frond size distribution of a deep water stand of *Cystoseira spinosa* (Phaeophyta) in the Northwestern Mediterranean. *European Journal of Phycology.*,(33): 121–128.

Ballesteros, E., Garrabou, J., Hereu, B., Zabala, M., Cebrian, E., Sala, E. (2009). Deepwater stands of *Cystoseira zosteroides* C. Agardh (Fucales, Ochrophyta) in the Northwestern Mediterranean: insights into assemblage structure and population dynamics. *Estuarine, Coastal and Shelf Science.*, (82):477–484.

Balogh-Hergovich, E., Speier, G.(2001). Kinetics and Mechanism of the Base-Catalyzed Oxygenation of Flavonol in DMSO-H₂O Solution. *J. Org. Chem.*, 66 (24): 7974-7978.

Banaigs, B., Francisco, C., Gonzalez, E. and Fenical, W. (1983). Diterpenoid metabolites from the marine alga *Cystoseira elegans*. *Tetrahedron.*, (39): 629–638.

Barhacs, L., Kaizer, J. Speier, G (2000). Kinetics and Mechanism of the oxygenation of potassium flavonolate. Evidence for an Electron Transfer Mechanism. *J. Org. Chem.*, 65 (11): 3449-3452.

Bas, D. and Boyaci, I. H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering.*, (78) : 836–845.

Basile, A., Giordano, S., Lopez Saez, J.A. Cobianchi, B.C.(1999). Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry.*,2 (8): 1419-1482.

Bellan-Santini, D (1964).Influence de la pollution sur quelques peuplements superficiels de substrat rocheux. In: CIESMM, Symposium sur la Pollution Marine par les Microorganismes et les Produits Pétroliers, Monaco, pp. 127–131.

Belmokhtar, M. (2012). *Cystoseira amentacea* v. *stricta* : indicateur de la qualité des eaux côtières de l'ouest algérien. Thèse de magistère, Université d'Oran Es-Senia, Algerie.

Benavente-García, O., Castillo, J., Del Baño, M. J. (2001), Lorente, J. Improved water solubility of neohesperidin dihydrochalcone in Sweetener Blends. *J. Agric. Food Chem.*, 49 (1) : 189- 191.

Ben Maiz, N. (1984). Contribution à la distribution, à l'écologie et à la systématique des algues marines benthiques de Tunisie. D.E.A Ecologie méditerranéenne, Université d'Aix-Marseille III, 65p.

Biard J. F. (2004). "Les médicaments de la mer: l'actualité", Pathologie Biologie, Vol 52, pp 1-3.

Biesaga, M. and Pyrzynska, K. (2013). Stability of Bioactive Polyphenols from Honey during Different Extraction Methods. *Food Chemistry*, (136): 46-54.

Bok, S.-H., Jeong, T.-S., Lee, S.-K., Kim, J.-R., Moon, S.-S., Choi, M.-S., Hyun, B.- H., Lee, C.-H., Choi, Y.-K. (2001). Flavanone derivatives and composition for preventing or treating blood lipid level-related diseases comprising same. US 20010006978A1.

Bonina, F., Lanza, M., Montenegro, L., Puglisi, C., Tomaino, A., Trombetta, D., Castelli, F., Saija, A. (1996). Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage. *Int. J. Pharm.*, 145 (1-2): 87-94.

Boudouresque, C.F. (1971a). Contribution à l'étude phytosociologique des peuplements algaux des côtes varoises. *Vegetatio, Netherl.*, (22) : 83-184.

Boudouresque, C.F. (1971b). Recherches de bionomie analytique, structurale et expérimentale sur les peuplements benthiques sciaphiles de Méditerranée Occidentale. (Fraction algale): la sous-strate sciaphile des peuplements des grandes *Cystoseira* de mode battu. Bulletin du Musée d'Histoire Naturelle de Marseille, Fr., (31) : 141-151.

Bouterfas, K., Mehdadi, Z., Benmansour, D., Meghit, B. K., Bouterfas, M., Latreche, A. (2014). Optimization of Extraction Conditions of Some Phenolic Compounds from White Horehound (*Marrubium vulgare L.*) Leaves. *International Journal of Organic Chemistry*, (4): 292-308.

Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11) :317-333.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3e édition revue, Paris,

Budhiyanti, S. A., Raharjo, S., Marseno, D.W. and Lelana, Y.B. (2012). Antioxidant activity of brown algae *Sargassum* species extract from the coastline of Java island. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences.*, (7): 337-346.

Burda, S., Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, 49 (6): 2774-2779.

Butnariu, M. and Coradini, C.Z. (2012). Evaluation of Biologically Active Compounds from *Calendula officinalis* Flowers Using Spectrophotometry. *Chemistry Central Journal.*, (6) : 35-42.

Cabioc'h, J., Floch, J-Y., Le Toquin, A., Boudouresque, C., Meinesz, A., Verlaque, M. (2006). Guide des algues des mers d'Europe, manche, atlantique, méditerranée, Les guides du naturaliste, Ed. Delachaux et Niestle, p272.

Cacace, J.E., Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *J. Food Eng.*, (59): 379-389.

Cai, Y.Z., Sun, M., Xing, J., Luo, Q. and Corke H. (2004). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medical plants. *Life Sci.*, (78): 2872-2888.

Calias, P., Galanopoulos, T., Maxwell, M., Khayat, A., Graves, D., Antoniadis, H., d'Alarcao, M. (1996). Synthesis of inositol 2-phosphate-quercetin conjugates. *Carbohydrate Res.*, (292): 83-90.

Cavazza, C. (2003). Antioxidant composition comprising propionyl L-carnitine and a flavonoid against thrombosis and atherosclerosis. US2003206895.

Chalabi, A., Semroud, R., Grimes, S. (2002). Plan d'Action Stratégique pour la Conservation de la Diversité Biologique en Région Méditerranéenne CAR/ASP : PAS BIO, 187p.

Charlton, A. J., Baxter, N. J., Khan, M. L., Moir, A. J. G., Haslam, E., Davies, A. P., Williamson, M. P. (2002). Polyphenol/Peptide Binding and Precipitation. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (6): 1593-1601.

Chbani, A., Mawlawi, H., Etahiri, S (2011). Activité antibactérienne des extraits d'une algue brune *Padina pavonica* de la côte méditerranéenne au Liban. *Phytothérapie.*, (9) : 283-286.

Chemat, F. (2011). Eco-extraction du végétal procédés innovants et solvants alternatifs. Dunod, Paris.

Cheminée, A. (2012). Ecological functions, transformations and management of infralittoral rocky habitats from the North-western Mediterranean: the case of fish (Teleostei) nursery habitats. Université de Nice Sophia-Antipolis, Nice.

Cheminée, A., Sala, E., Pastor, J et al. (2013). Nursery value of *Cystoseira* forests for Mediterranean rocky reef fishes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.*,(442): 70–79.

Chew, Y. L., Lim, Y. Y., Omar, M. and Khoo, K. S. (2008). Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT.*, (41): 1067–1072.

Chi, Y. S., Jong, H. G., Son, K. H., Chang, H. W., Kang, S. S., Kim, H. P.(2001). Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: Cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochem. Pharmacol.*, 62 (9): 1185-1191.

Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R. and Larondelle, Y. (2007). Optimisation of Extraction Conditions of Antioxidant Phenolic Compounds from Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) Tubers. *Journal of Separation and Purification Technology.*, (55): 217-225.

Cinelli, F.(1969). Primo contributo alla conoscenza delle vegetazione algale bentonica del litorale di Livorno. *Pubb. Staz. Zool. Napoli, Ital.*, (37): 545-566.

Cissé, M.(2010). Couplage de procédés membranaires pour la production d'extraits anthocyaniques : application à l'*Hibiscus sabdariffa*. *Thèse de doctorat*, Montpellier Supagro, France.

Coleman, M.A., Brawley S.H. (2005a). Are life history characteristics good predictors of genetic diversity and structure? A case study of the intertidal alga *Fucus spiralis* (Heterokontophyta, Phaeophyceae). *Journal of Phycology*, (41) :753–762.

Coleman, M.A, Brawley, S.H. (2005b). Spatial and temporal variability in dispersal and population genetic structure of a rockpool alga. *Marine Ecology Progress Series*, (300): 63–77.

Collin, S. and Crouzet, J. (2011). Polyphénols et procédés. *TEC&DOC-Lavoisier*.

Combaut, G., Francisco, C., Piovetti, L., Gonzales, E., Teste, G. and Codomier, L. (1980). Acyclic diterpenes in *Cystoseira* (Phaeophyceae) from the Mediterranean coast. *Bull. Soc. Chim. Belg.*, (89): 1063–1067.

Cormaci, M., Furnari, G., Catra, M., Alongi, G., Giaccone, G. (2012). Flora marina bentonica del Mediterraneo: Phaeophyceae. *Bollettino dell'Accademia Gioenia di Scienze Naturali di Catania*, 45(2):508.

Cornard, J. P., Merlin, J. C. (2002a). Complexes of aluminium(III) with isoquercitrin: spectroscopic characterization and quantum chemical calculations. *Polyhedron*, 21 (27-28): 2801.

Cornard, J. P., Merlin, J. C. (2002b). Spectroscopic and structural study of complexes of quercetin with Al(III). *J. Inorg. Biochem.*, 92, (1): 19.

Dahmani, H. (2014). Étude du pouvoir antimicrobien des extraits bruts d'algues *Cystoseira stricta* de la côte ouest algérienne (plage de Madrid). Mémoire de Master. Université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen.

Dai, J. and Mumper, R.J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, (15): 7313-7352.

Davidov-Pardo, G., Arozarena, M.R.I. and Marin-Arroyo, M.R. (2011). Stability of Polyphenolic Extracts from Grape Seeds after Thermal Treatments. *European Food Research and Technology.*, (232) : 211-220.

Dean, A., Voss, D (1999). Design and analysis of experiments, Springer, New York.

Delepine, C., Boudouresque, C.F., Fradaorestano, C., Noailles, M.C., Asensia, A.(1987). Algues et autres végétaux marins. Fiche FAO d'identification des espèces pour le besoin de la pêche, Révision Méditerranée et mer noire, zone de pêche 37. Volume 1. Végétaux et invertébré.

Dent, M., Dragovi-Uzelac, V., Peni, M., Brncic, M., Bosiljkov, T. and Levaj, B. (2013). The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. *Food Technology and Biotechnology.*, (51): 84-91.

Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A., Capasso, F.(1999). Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.*, 65 (4): 337-353.

Djeridane, A., Yous, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.*, (97): 654-660.

Draisma, S.G.A., Ballesteros, E., Rousseau, F., Thibaut, T. (2010). Dna Sequence Data Demonstrate the Polyphyly of the Genus *Cystoseira* and Other Sargassaceae Genera (phaeophyceae) 1. *Journal of Phycology.*, (46) : 1329–1345.

El Hajj, Y., Louka, N., Nguyen, C., Maroun, R.G. (2012). Low Cost Process for Phenolic Compounds Extraction from Cabernet Sauvignon Grapes (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon). Optimization by Response Surface Methodology. *Food Nutr Sci.*, (3): 89–103.

Fargeix, D. (2000). Etude des mécanismes d'oxydation des flavonoïdes en relation avec leur activité antioxydante. Effets anti- et pro-oxydants dans l'inhibition de la peroxydation lipidique par les flavonoïdes. Université Claude Bernard- Lyon 1, Lyon, France.

Feinberg, M.(1996). Optimisation de la réponse, La validation des méthodes d'analyse – Une approche chimiométrique de l'assurance qualité du laboratoire, Masson, Paris, France.

Feldmann, J.(1961). Note sur les algues marines de la Galite (Tunisie). Rapp. P.V.Réun. Commiss.Explor. Sci. Médit., Monaco., 16 (2): 503-508.

Ficarra, R., Tommasini, S., Raneri, D., Calabro, M. L., Di Bella, M. R., Rustichelli, C., Gamberini, M. C., Ficarra, P. (2002). Study of flavonoids/[beta]-cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-ray investigation. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 29 (6): 1005-1014.

Formica, J. V., Regelson, W.(1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food & Chem. Toxicol.*, 33 (12): 1061-1080.

Friedman, M., Jurgens, H. S. (2000). Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 48 (6): 2101-2110.

Friedman, M. (2007). Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Molecular nutrition & food research.*, 51(1): 116-134.

Funk, G. (1927). *Die Algenvegetation des Golfs von Neapel: nach neueren ökologischen Untersuchungen.* Stazione Zoologica di Napoli.

Garcia-Castello, E.M., Rodriguez-Lopez, A.D, Mayor, L, Ballesteros, R. Conidi, C. Cassano, A. (2015). Optimization of conventional and ultrasound assisted extraction of flavonoids from grapefruit (*Citrus paradisi* L.) solid wastes. *LWT - Food Science and Technology.*,(64): 1114-1122.

Giaccone, G., Alessi M.C., Toccaceli M. (1985). Flora e vegetazione marina dell'isoladi Ustica. Boll.Accad. Gioenia Sci. *Nat. Catania, Ital.*,(18): 326.

Giaccone G, Alongi G, Pizzuto F, Cossu A.V.L. (1994). La Vegetazione marina bentonicafotofila del Mediterraneo: 2.: Infralitorale e Circalitorale: proposte di aggiornamento. *Bollettino dell'Accademia Gioenia di scienze naturali.*,(27):111–157.

Gómez-Garreta, A., Barceló, M.C., Gallardo, T.(2001). Flora Phycologica Iberica Vol. 1. Fucales. Université de Murcia.

Gordon, M. H.(1996). Dietary antioxidants in disease prevention. *Natural Product Reports.*, 13(4): 265-273.

Goupy, J. (1997). plans d'expériences, Techniques de l'ingénieur, PE230.

Goupy, J., Creighton, L.(2001). Introduction aux plans d'expériences, Dunod, Paris, France.

Grimes, S. (2005). Projet régional pour le développement d'aires protégées marines et côtières dans la région méditerranéenne (Projet Med MPA) : Plan de gestion de l'aire marine du Parc National d'El Kala (Wilaya d'El Tarf), 148p.

Goupy, J. (2006). Introductions aux plans d'expériences, Dunod, Paris.

Guern, M. (1962). Embryologie de quelques espèces du genre *Cystoseira* Agardh 1821(Fucales). *Vie et Milieu, Serie A Biologie Marine.*,(13): 649–679.

Harborne, J. (1989). Methods in Plant Biochemistry. Academic Press:., Vol. 1 Plant Phenolics.

Havsteen, B. H.(2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. & Ther.*, 96 (2-3): 67-202.

Hilary, Y., Baldosano, H.Y., Castillo, B.G., Elloran, D.H., Bacani, F.T. (2015). Effect of Particle Size Solvent and Extraction Time on Tannin Extract from *Spondias purpurea* Bark Through Soxhlet Extraction. In Proceedings of the DLSU Research Congress, Vol. 3, De La Salle University, Manila, Philippines March 2-4.

Hismath, I., Wan Aida, W.M. and Ho, C.W.(2011). Optimization of Extraction Conditions for Phenolic Compounds from Neem (*Azadirachta indica*) Leaves. *International Food Research Journal.*,(18): 931-939.

Jackman, R.L., Yada, R.Y., Tung, M.A., Speers, R. A. (1987). Anthocyanins as food colorants - a review. *J. Food Biochem.*, (11): 201-247.

Jayaprakasha, G.K., Singh, R.P. and Sakariah, K.K. (2001). Antioxidant Activity of Grape Seed (*Vitis vinifera*) Extracts on Peroxidation Models in Vitro. *Food Chemistry.*, (73) : 285-290.

Juntachote, T., Berghofer, E., Bauer, F. and Siebenhandl, S. (2006). The Application of Response Surface Methodology to the Production of Phenolic Extracts of Lemon Grass, Galangal, Holy Basil and Rosemary. *International Journal of Food Science and Technology.*, (41): 121-133.

Kawas, H.K. (2010). Utilisation des macrophytes pour l'évaluation du stress environnemental au niveau de la côte Oranaise : Etude préliminaire. Mémoire de Magister. Université Es Sénia, Oran, Algérie, 81p.

Ktari, L. (2000). 'Recherche de composés actifs dans les algues marines : propriétés pharmacologiques simulation de cycle biologique de l'algue et de la biosynthèse d'un métabolite'', Thèse Doctorat, Université de Paris VI, Paris, France.

Labarbe, B., Cheynier, V., Brossaud, F., Souquet, J.M., Moutounet, M.(1999). Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *J. Agric. Food Chem.*, (47): 2719-2723.

Lalou, A. (1995). Mise au point d'un procédé d'extraction des hémicelluloses à partir d'un substrat végétal ligno-cellulosique: application au cas des coques de tournesol.

Lattanzio, V. and Quideau, S.(2014). Recent Advances in Polyphenol Research, *John Wiley & Sons.*

Latufa, Y. (2016). Fonctionnalisation de biopolymères extraits de macroalgues pour encapsuler des principes actifs hydrophobes. Médecine humaine et pathologie. Université de la Réunion. France.

Le Nest, G., Caille, O., Woudstra, M., Roche, S., Guerlesquin, F., Lexa, D.(2004). Zn polyphenol chelation: complexes with quercetin, (+)-catechin, and derivatives: I optical and NMR studies. *Inorg. Chim. Acta.*, 357 (3): 775-784.

Levine, H.G.(1984). The use of seaweeds for monitoring coastal waters, 189-210. In *:Algae as ecological indicators*. L.E. Shubert (Ed.). Academic Press (Londres) 434 p.

Leybros, J. and Frémeaux, P.(1990). Extraction solide-liquide. Aspects théoriques. *Techniques de l'Ingénieur J. 1*, 077.

Liu, H., Du, X., Yuan, Q., Zhu, L. (2009).Optimisation of enzyme assisted extraction of silybin from the seeds of *Silybum marianum* by Box–Behnken experimental design. *Phytochem. Anal.*, (20): 475–483.

Liu, W., Yu, Y., Yang, R., Wan, C., Xu, B. and Cao, S. (2010).Optimization of Total Flavonoid Compound Extraction from *Gynura medica* Leaf Using Response Surface Methodology and Chemical Composition Analysis. *International Journal of Molecular Sciences.*,(11): 4750-4763.

Liyana-Pathirana, C., Shahidi, F. (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chem.*, (93): 47–56.

Luthria, D.L.(2008). Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. *Food Chemistry.*, 107(2): 745–752.

Makris, D. P., Rossiter, J. T. (2002). An investigation on structural aspects influencing product formation in enzymic and chemical oxidation of quercetin and related flavonols. *Food Chem.*, 77 (2):177-185.

Manach, C., Regeat, F., Texier, O., Agullo, G., Demigne, C., Remesy, C.(1996). Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutr. Res.*,16 (3): 517-544.

Mangialajo L, Chiantore M, Susini ML et al. (2012).Zonation patterns and interspecific relationships of fucoids in microtidal environments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.*, (412): 72–80.

Mantas, A., Deretey, E., Ferretti, F. H., Estrada, M. R., Csizmadia, I. G.(2000). Structural analysis of flavonoids with anti-HIV activity. *J. Molec. Struct., Theochem.*, 504 (1-3): 171.

Mason R.L. (2003) Statistical design and analysis of experiments, Wiley, New Jersey.

Markham, K. R (1982).*Techniques of flavonoids identification*, Academic press, London, UK.

Martini, A., Katerere, D. R., Eloff, J. N.(2004). Seven flavonoids with antibacterial activity isolated from *Combretum erythrophyllum*. *J. Ethnopharmacol.*, 93 (2-3): 207-212.

- Matsubara, K., Ishihara, K., Mizushina, Y., Mori, M., Nakajima, N. (2004).** Anti-angiogenic activity of quercetin and its derivatives. *Lett. Drug Design & Discov.*, (1): 329-333.
- Mattila, P. Astola, J, and Kumpulainen, J. (2000).** Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode-array and electro-array detections, *J. Agric. Food Chem.*, (48): 5834.
- Mazza, G. (1998).** Functional foods: biochemical and processing aspects, *CRC Press*.
- Merghem, R. (2009).** *Elements de biochimie végétale*. Edition Bahaeddine ISBN: 978-9961-948-71-2 Algérie.
- Meinesz, A. Blanfuné, A. Chancollon O et al. (2013).** Côtes méditerranéennes françaises :inventaire et impacts des aménagements gagnés sur la mer. Université de Nice SophiaAntipolis, Nice.
- Merken, H. M. and Beecher, G. R. (2000).** Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 48(3) : 577-599.
- Metivier, R.P., Francis, F.J., Clydesdale, F.M.(1980).** Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *J. Food Sci.*, (45): 1099-1100.
- Mhadhebi, L., Laroche-Clary, A., Robert, J. and Bouraoui, A. (2011).**Antioxidant, anti-inflammatory, and antiproliferativeactivities of organic fractions from the Mediterranean brown seaweed *Cystoseira sedoides*.*Can. J. Physiol. Pharmacol.*, (89): 911–921.
- Mochizuki, M., Yamazaki, S.-i., Kano, K., Ikeda, T. (2002).** Kinetic analysis and mechanistic aspectsof autoxidation of catechins. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - General Subjects*, 1569,(1-3): 35-44.
- Mohammedi, Z. and Atik, F. (2011).** Impact of Solvent Extraction Type on Total Polyphenols Content and BiologicalActivityfrom *Tamarix aphylla*(L.) Karst. *International Journal of Pharma and Bio Sciences.*, (2):609-615.
- Molinier, R (1960).**Etude des biocénoses marines du Cap Corse. *Plant Ecology.*,(9): 217–312.

Mompon, B., Lemaire, B., Mengal, P., Surbled, M. (1996).In *Extraction des polyphénols: du laboratoire à la production industrielle*, Polyphenols, Bordeaux, 15-18 juillet, Bordeaux, France.

Nacz, M. and Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.*, 41(5): 1523-1542.

Naeem, S., Ali, M. and Mahmood, A. (2012). Optimization of Extraction Conditions for the Extraction of Phenolic Compounds from *Moringa oleifera* Leaves. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences.*, (25): 535-541.

Omrane, A. (2009). Mise en place d'un système de suivi macrophytobenthique au niveau de l'île de Jalta: Contribution dans le cadre du projet de l'Aire Protégée Marine et Côtière de l'Archipel de Jalta. Projet de fin d'Etude du Cycle Ingénieur. Institut National Agronomique. Tunisie, 63 p.

Ouali, K., Trea, F., Toumi, L., Bairi, A., Maurel, D., Guellati, M. A. (2007). L'héspéridine, un antioxydant flavonoïde qui diminue le stress oxydatif et prévient les malformations fœtales au cours du diabète gestationnel expérimental. *Phytother.*, 5 (4): 204-209.

Papenfuss, G.F. (1968). A history, catalogue, and bibliography of Red Sea benthic algae.,(17):1-118.

Paul VJ, Fenical W (1987) Natural products chemistry and chemical defence in tropical marine algae of the phylum chlorophyta. *Bioorganism Mar Chem* (1): 1-29.

Peres, J.M., Picard, J. (1964). Nouveau manuel de bionomie benthique en Mer Méditerranée. *Recueil des Travaux de la Station Marine d'Endoume.*, (31) : 137.

Pérès, J.M. (1967). The mediterranean benthos. *Oceanography and Marine Biology: an annual review*, 5.

Pérez-Jiménez J., Saura-Calixto, F. (2006). Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Res Int.*, (39):791-800

Pignatti, S. (1962). Associazioni di alghe marine sulla costa veneziana. *Memorie del Reale Istituto Veneto di Scienze, Lettere ed Arti.*,(32): 134.

Pinedo, S., Garcia, M., Satta, M.P., de Torres, M., Ballesteros, E. (2007). Rocky-shore communities as indicators of water quality: a case study in the Northwestern Mediterranean. *Marine Pollution Bulletin.*,(55) : 126–135.

Pinelo M., Rubilar M., Jerez M., Sineiro J., Núñez M.J.(2005).Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *J. Agric. Food Chem.*, (53): 2111–2117

Pinelo, M., Arnous, A., Meyer, A.S. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends FoodSci. Technol.*, (17): 579-590.

Poirot, R.(2007). Méthodologie pour le passage en continu d'extraction de soluté à partir de matière végétale. *Thèse de doctorat*, L'institut national polytechnique de Toulouse, France.

Pompeu, D.R., Silva, E.M., Rogez, H. (2009). Optimization of solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using response surface methodology. *Bioresour. Technol.*, (100): 6076–6082.

Popa, V., Dumitru, M., Volf, I. and Anghel, N. (2008). Lignin and polyphenols as allelochemicals. *Industrial Crops and Products.*, 27(2): 144-149.

Price, J.H., John, D.M., Lawson, G.W., John, D.M. (1978). Seaweeds of the Western Coast of Tropical Africa and Adjacent Islands: A Critical Assessment: II, Phaeophyta. *Bulletin British Museum Natural History (Botany).*,(6) : 87–182.

Pulley, G. (1936). Solubility of naringin in water. *Ind. & Engin. Chem.*, 8 (5): 360.

Rajauria, G., Jaiswal, A.K., Abu-Ghannam, N., Gupta, S. (2012). Antimicrobial, Antioxidant and Free Radical-Scavenging Capacity of Brown Seaweed *Himantalia Elongata* from Western Coast of Ireland. *Journal of Food Biochemistry.*,(37): 322–335.

Ramos-Tejada, M. M., Duran, J. D. G., Ontiveros-Ortega, A. (2002). Espinosa-Jimenez, M., Perea-Carpio, R., Chibowski, E. Investigation of alumina/(+)-catechin system properties.

Part I: a study of the system by FTIR-UV-Vis spectroscopy. *Colloids & Surfaces B: Biointerfaces.*, 24 (3-4): 297-308.

Rastian, Z., Mehranian, M., Vahabzadeh, F., Sartavi, K. (2007).Antioxidant activity of brown algae *Sargassum vulgare* and *Sargassum angustifolium*. *J. Aquat. Food Prod. Technol.*, 16(2):17-26.

Relini, G., Giaccone, G. (2009). Priority habitats according to the SPA/BIO protocol (Barcelona Convention) present in Italy. Identification sheets. *Biology Marine Méditerranée*, 372.

Richerd, S., Couvet, D., Valéro, M. (1993). Evolution of the alternation of haploid and diploid phases in life cycles. II. Maintenance of the haplo-diplontic cycle. *Journal of Evolutionary Biology.*, (6): 263–280.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. (1996). Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free. Radic. Biol. Med.*, 20 (7):933-956.

Rinehart, K.L. (1992). Secondary metabolites from marine organisms. *Ciba. Found. Symp.*, (171) :236-249.

Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 51(10): 2866-2887.

Robvieux, P. (2013). Conservation des populations de *Cystoseira* en régions Provence-Alpes-Côte-d'Azur et Corse. Thèse de doctorat, Université de Nice-Sophia Antipolis - UFR Sciences. France.

Rull Lluç, J., Gómez Garreta, A. (1989). Distribución de las algas epífitas sobre los ejemplares de *Cystoseira mediterranea* Sauv. In: *Annales del Jardín Botánico de Madrid.*, 99–106.

Sabeena Farvin, K. H., et Jacobsen, C. (2013). « Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast ». *Food Chemistry* 138 (2–3) : 1670-81.

Sadik, C. D., Sies, H., Schewe, T. (2003). Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure activity relations and mode of action. *Biochem. Pharm.*, 65 (5): 773-781.

Saidman, E., Yurquina, A., Rudyk, R., Molina, M. A. A., Ferretti, F. H. (2002). A theoretical and experimental study on the solubility, dissolution rate, structure and dipolar moment of flavone in ethanol. *J. Molec. Struct. Theochem.*, 585 (1-3): 1-13.

Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., Luisa Pellegrino, M., Tita, B., Messina, C., Bonina, F.P., Rocco, C., Nicolosi, G., Castelli, F.(2003). 'In vitro' antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters. *Eur. J. Pharm. &Biopharm.*, 56 (2): 167-174.

Sales, M., Ballesteros, E. (2009). Shallow *Cystoseira* (Fucales: Ochrophyta) assemblages thriving in sheltered areas from Menorca (NW Mediterranean): Relationships with environmental factors and anthropogenic pressures. *Estuarine, Coastal and Shelf Science.*, (84): 476–482

Sauvageau, C. (1912). A propos de *Cystoseira* de Banyuls et de Guétary. *Bull. Stat.Biol. Arcachon, Fr.*, (14): 133-566.

Schneider, C.W., Lane, C.E. (2007). Notes on the marine algae of the Bermudas. 8. Further additions to the flora, including *Griffithsia aestivana* sp. nov. (Ceramiaceae, Rhodophyta) and an update on the alien *Cystoseira compressa* (Sargassaceae, Heterokontophyta). *Botanica Marina.*, (50): 128–140.

Seridi, H., Ruitton, S., Boudouresque, C.F. (2007). Is it possible to calibrate the pollution level of the region of Algiers (Mediterranean Sea) by exploiting marine macrophytes? *C. R. Biologies.*, (33): 606–614.

Shan, B., Xie, J. H., Zhu, J. H. and Peng, Y. (2012). Ethanol modified supercritical carbon dioxide extraction of flavonoids from *Momordica charantia* L. and its antioxidant activity. *Food and Bioproducts Processing.*, (90): 579–587.

Shi, J., Nawaz, H., Pohorly, J., Mittal, G., Kakuda, Y., Jiang, Y. (2005). Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods-engineering and technology. *Food Rev. Int.*, (21): 139-166.

Shi, X., Zheng, Z., Li, J., Xiao, Z., Qi, W., Zhang, A., Wu, Q., Fang, Y. (2015). Curcumin inhibits -induced microglial inflammatory responses in vitro: Involvement of ERK1/2 and p38 signaling pathways. *Neurosci. Lett.*, (594): 105–110.

Silva, P.C., Basson, P.W., Moe, R.L. (1996). *Catalogue of the benthic marine algae of the Indian Ocean*. University of California Press.

SMIT, A. J. (2004). Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products, *Journal of applied Pycology.*,(16) : 254-262.

Smith, G., Thomsen, S., Markham, K., Andary, C., Cardon, D. (2000). The photostabilities of naturally occurring 5-hydroxyflavones, flavonols, their glycosides and their aluminium complexes. *J. Photochem. & photobiol A: Chemistry.*, (136): 87-91.

Spigno, G., Tramelli, L. and De Faveri, D.M. (2007). Effects of Extraction Time, Temperature and Solvent on Concentration and Antioxidant Activity of Grape Marc Phenolics. *Journal of Food Engineering.*, (81): 200- 208.

Stewart, J., Kellett, N. et Castro, D.(2003). The central nervous system and cardiovascular effects of levobupivacaine and ropivacaine in healthy volunteers. *Anesth.Analg.*, (97) :412-416.

Susini, M.L., Thibaut, T., Meinesz, A., Forcioli, D. (2007). A preliminary study of genetic diversity in *Cystoseira amentacea* (C. Agardh) Bory var. *stricta* Montagne (Fucales, Phaeophyceae) using random amplified polymorphic DNA. *Journal Information.*, (46):406–411.

Taskin, E., Jahn, R., Öztürk, M., Furnari, G., Cormaci, M.(2012).Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea Turkey. *African Journal of Biotechnology.*,6(24): 2746-2751.

Thibaut, T., Pinedo, S., Torras, X., Ballesteros, E. (2005). Long-term decline of the populations of Fucales (*Cystoseira* spp. and *Sargassum* spp.) in the Alberes coast(France, North-western Mediterranean). *Marine Pollution Bulletin.*, (50): 1472–1489.

Thuret G (1854). Recherches sur le zoospores des algues et les anthéridies des cryptogames

Tommasini, S., Raneri, D., Ficarra, R., Calabro, M. L., Stancanelli, R., Ficarra, P. (2004). Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with [beta]- cyclodextrin. *J. Pharm. & Biomed. Analysis.*, 35 (2):379-387.

- Tierney, M.S., Smyth, T.J., Rai, D.K., Soler-Vila, A., Croft, A.K., Brunton, N. (2013).** Enrichment of polyphenol contents and antioxidant activities of Irish brown macroalgae using food-friendly techniques based on polarity and molecular size. *Food Chem.*, (139): 753–761.
- Tremblin, G., Coudret, A., Baghdadli, A. (1986).** Photosynthèse apparente et installation chez deux cystoseires méditerranéennes: *Cystoseira stricta* et *Cystoseira crinita* (Phéophycées Fucales)., effets de la lumière, de la température et de la salinité. *Cryptogamie. Algologie.*, (7): 291–300.
- Tringali, C. (1997).** Bioactive metabolites from marine alga. *Current Organic Chemistry*, 1(4) : 375-394.
- Triveni, R., Shamala, T. R. and Rastogi, N. K. (2001).** Optimised production and utilization of exopolysaccharide from *Agrobacterium radiobacter*. *Process Biochemistry.*, (36): 787–795.
- Tsao, R., Deng, Z.Y. (2004).** Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *J. Chromatogr. B.*, (812): 85–99.
- Ungar, Y., Osundahunsi, O. F., Shimoni, E. (2003).** Thermal stability of genistein and daidzein and its effect on their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (15): 4394-4399.
- Vairappan, C.S., Daitoh, M., Suzuki, M., Abe, T. and Masuda, M. (2001).** Antibacterial halogenated metabolites from the Malaysian *Laurencia* species. *Phytochemistry.*, (58) : 291–297.
- Van Acker, S. A. B. E., Van Den Berg, D. j., Tromp, M. N. J. L., Griffioen D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J. F., Bast, A. (1996).** 7-Monohydroxyethylrutoside protects against chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity when administered only once per week, *Free Radic. Biol. Med.*, 20 (3): 331-342.
- Vajica., U.J., Milanovic, J G., Zivkovi, J., Savikinb, K., Godevac, D., Miloradovic, Z., Bugarski, B., Mihailovic-Stanojevi, N. (2015).** Optimization of extraction of stinging nettle leaf phenolic compounds using response surface methodology, *Industrial Crops and Products.*, (74): 912–917.
- Verlaque, M. (1975).** Compte rendus de la première mission effectuée, sur la façade maritime du parc régional cors, par l'équipe photosociologie benthique marine de luminy. 17-22 février 1975. Document ronéotypé par le service ofsset. *Université Aix Marseille II. Paris.* P.64.

Verlaque, M. (1987). Contribution à l'étude du phytobenthos d'un écosystème photophilethermophile marin en Méditerranée Occidentale. *Thèse de doctorat, Université d'Aix-Marseille*, 11, 389.

Vinayak, R.C., Sabu, A.S. and Chatterji, A. (2011). Bioprospecting of a few brownseaweeds for their cytotoxic and antioxidant activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, (7): 1 – 9.

Voirin, B. (1983). UV spectral differentiation of 5-hydroxy- and 5-hydroxy-3-methoxyflavones with mono-(4'), di-(3',4') or tri-(3',4',5')-substituted B rings. *Phytochemistry*, 22 (10): 2107- 2145.

Walle, T., Vincent, T. S., Walle, U. K. (2003), Evidence of covalent binding of the dietary flavonoid quercetin to DNA and protein in human intestinal and hepatic cells. *Biochem Pharm.*, 65 (10): 1603-1610.

Walle, T.(2004). Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic. Biol. & Med.*, 36 (7):829-837.

Wang, L., Yang, B., Du, X., Yi, C. (2008). Optimization of supercritical fluid extraction of flavonoids from *Pueraria lobata*. *Food Chemistry*, (108): 737–741.

Wani, S.M., Jan, N.T., Wani, A., Ahmad, M., Masoodi, F.A., Gani, A. (2015). Optimization of antioxidant activity and total polyphenols of dried apricot fruit extracts (*Prunus armeniaca L.*) using response surface methodology. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, (16):119-126.

Watanabe, K., Niimura, K., Miyagawa, J.(1993). Esculetin derivatives and method for manufacture thereof, use thereof, and pharmaceutical composition., EP 0654479A2,.

Watanabe, K., Niimura, K., Esculetin, K.U.(1994a). Derivatives and pharmaceutical composition. EP 0 614 896 A1.

Watanabe, K., Niimura, K., Yamazaki, T. Maruoka.E. (1994b). Esculetin derivatives, method for manufacture thereof, and pharmaceutical composition., EP 0 719 770 A1.

Wollgast, J., Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res. Inter.*, (33): 423-447.

Wong, P-F, Tan, L-J, Nawi, H, AbuBakar, S. (2006) Proteomics of the RedAlga, Gracilaria Changii (Gracilariales, Rhodophyta). *J Phycol.*, (42):113–120.

Xu, G., Ye, X., Chen, J., & Liu, D. (2007). Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, (55): 330-335.

Yu L., Haley S., Perret J., Harris M., Wilson J., Qian M.(2002).Free radical scavenging properties of wheat extracts. *J. Agric. Food Chem.*, (50): 1619–1624

Zaragoza, M.C., Lopez, D., Saiz, M.P., Poquet, M., Perez, J., Puig-Parellada, P.,Marmol, F., Simonetti, P.,Gardana, C., Lerat, Y. et al., (2008). Toxicity and antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of two *Fucus vesiculosus* extracts. *J.Agric. Food Chem.*, (56): 7773–7780.

Zhekova, G. and Pavlov, D. (2012). Influence of different factors on Tannins and Flavonoids extraction of some Thyme varieties representatives of Thymol, Geraniol and Citral chemotype. *Agricultural Science and Technology.*, (4): 148-153.

Zhai, H., Maibach, H. (2002). Skin antioxidants. *Cosmetics & Toiletries.*,(117): 28-32.

Zhang, K., Yang, E.-B., Tang, W.-Y., Wong, K. P., Mack, P. (1997). Inhibition of glutathione reductase by plant polyphenols. *Biochem. Pharm.*, 54 (9): 1047-1053.

Zhao, J., Ma, M., Wang, S., Li, S., Cao, P., Yang, Y., Lu, Y., Shi, J., Xu, N., Fan, X., He, L. (2005). Bromophenols coupled with derivatives of amino acids and nucleosides from the red alga *Rhodomela confervoides*. *J. Nat. Prod.*, (68): 691–694.

Zhao, S., Liu, J.Y., Chen, S.Y., Shi, L.L., Liu, Y.J. and Ma, C. (2011). Antioxidant Potential of Polyphenols and Tannins from Burs of *Castanea mollissima* Blume. *Molecules.*, (16): 8590-8600.

Zhu, Z., Li, C., Li, N-Q. (2002). Electrochemical studies of quercetin interacting with DNA. *Microchem. J.*, 71 (1): 57-63.

Zhu, X., Mang, Y., Xie, J., Wang, P., Su, W. (2011). Response surface optimization of mechanochemicalassistedextraction of flavonoids and terpenetrilactonesfrom Ginkgo leaves. *Ind. Crop. Prod.*, (34): 1041–1052.

Zitouni, H. (2015). Valorisation nutritionnelle d'algues marines du littoral Algérienchez le ruminant via des méthodes chimiques, biologiques et moléculaires. Thèse de doctorat. Université des Frères Mentouri Constantine. Algerie.

Zubia., Mayalen., Robledo, D. et Freile-Pelegrin, Y. (2007). «Antioxidant Activities in Tropical Marine Macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico». *Journal of Applied Phycology*19 (5): 449-58.

Annexe

Optimization of Extraction Conditions of Total Flavonoid Content from *Cystoseira. amentacea* var. *Stricta* Using Response Surface Methodology

Samir Fellous¹, Abd el Halim Boussaa², Mohamed Yacine Benzaoui³, Riad Djellouli⁴, Youcef Amar¹,

¹Laboratory of hydrobiology and pollution, University of Sidi Bel Abbes, Djillali Liabes, 22000, Algeria

²Department of cellular and molecular biology, University of abbes laghrour khanchela .40000, Algeria

³«Reseau de surveillance environnementale» Laboratory, Sciences faculty, Oran University, 31000, Algeria.

⁴Department of environment, University of Sidi Bel Abbes, Djillali Liabes, 22000, Algeria

Received: September 19, 2017

Accepted: December 12, 2017

ABSTRACT

This work was focused on the optimization of extraction conditions for total flavonoid content (TFC), from brown marine macroalgae *Cystoseira. amentacea* var. *Stricta* using response surface methodology (RSM). Methanol, an aqueous organic solvent were used, with different concentrations (20%, 50%, 80%, v/v), liquid to solid ratio (1/5, 2.5/5, 4/5), temperatures (20°C, 40°C, 60°C), extraction times (30 - 150 min). Results showed that the optimal value of total flavonoids (23.80 mg of quercetin equivalents/g) from *C. amentacea* var. *Stricta* was obtained with 80% aqueous methanol, liquid to solid ratio (1/5) at 20°C for 123.29 min. Fitting experimental data and prediction of the response was done with a second-order equation model which produced a good fit: $R^2 = 0.91$ for TFC.

KEYWORDS: Macroalgae, *Cystoseira. amentacea* var. *Stricta*, Total flavonoid content, Response surface methodology

1. INTRODUCTION

Among the class of polyphenols, flavonoids are the most important, their chelating and antioxidant properties, have a valuable health effects, this class of polyphenol contribute greatly to the plants antioxidant capacity [24]. They proceed by free radical scavenging, or blocking the generation of hypervalent metal forms, or by preventing lipid peroxidation [36].

Marine seaweeds can produce a large range of secondary metabolites with wide spectrum of pharmaceutical and biological propriety such as anticancer, anticoagulant, antioxidant, antibacterial and antiviral activities [32] [3]. *Cystoseira* is a genus of brown seaweed, in Algeria, it consist mainly of *Cystoseira amentacea* var. *Stricta*, a Fucophyceae algae endemic to the Mediterranean, which is subordinate to the infralittoral fringe (level 0 to 0.5 m deep) [6]. The presence of many molecules such as steroids, terpenoids, and alkaloids have been reported by authors in different species of genus *Cystoseira*, a Mediterranean brown algae, however, little research on pharmacological properties has been done [13][4] [2] [21].

The one-factor-at-a-time method is commonly used for optimization of the extraction processes, nevertheless this approach is time-consuming, expensive and cannot predict optimal conditions in addition to the fact that, it underestimate interactions between factors [1].

RSM a statistical and mathematical tools, are usually used for optimization of extraction parameters, in which response depends on different independent factors [23]. Response surface methodology, generate a mathematical model in a statistical way [5], after processing the quantitative data from an experimental model to create a second order polynomial equation [30].

In the present work, RSM was used to optimize four extraction parameters for TFC, of brown marine macroalgae *C. amentacea* var. *Stricta* harvested from the western coastline of Algeria.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Plant materials

The samples of *C. amentaceae* var *stricta* were collected in spring (april) from an exposed intertidal rocky shore (during low tide) at Ain Defla site (35°50' 40 N/ 0°28' 59 O) located on the east of Oran (a coastal town in west of Algeria). Epiphytes, microorganisms, salts, and other suspended materials were removed from fresh samples with fresh water and air dried, then, the dried thalli of *C. amentaceae* var *stricta* were grinded by an electric grinder, and kept in a dark place at room temperature.

2.2. Extraction procedure

Methanol is frequently used for the extraction of secondary metabolite from seaweeds [12] [33] [9]. In order to extract most of the components from seaweed, a solvent with optimum polarity is required [24]. In our study, the grounded sample was submitted to extraction with 100% methanol. Approximately one gram of algal material was extracted in 100 ml of solvent and allowed to agitation during 24h with a rotary shaker. The filtered extract (Whatman no.1 filter paper) was kept at 4°C.

2.3. Total Flavonoid Content (TFC).

The Aluminum chloride (AlCl₃) method described by Djeridane *et al.* [16] was used to determine total flavonoid content (TFC) with some modification. About one ml of extract was added to the same volume of AlCl₃ (2% Methanol) and well mixed using a vortex. The solution was incubated at room temperature in the dark, for 10 min under shaking. The absorbance of the blank against standard and samples was recorded in triplicates at 430 nm with a spectrophotometer. The standard curve was calibrated by Quercetin. The results were showed as miligram of quercetin equivalents/g

2.4. Experimental design

For the extraction optimization of TFC from *C. amontaceae var stricta* sample, Response Surface Methodology was used. It is reported that the yield of total polyphenol and total flavonoids content is affected by numerous parameters [28] [31] [19] [38] [27], it is difficult to identify all the parameters influencing the response, then, factors with an important effects should be selected, [26].

A Box Behnken design was used in this study, with four independent factors coded at three levels (-1, 0 and +1): methanol concentration (X₁), liquid/solid ratio (X₂) temperature (X₃) and time (X₄). The chosen coded and decoded levels for the independent variables are shown in **Table 1**:

Table 1: coded and decoded independent factors

Independent variables	Symbols	Levels		
		-1	0	1
Methanol	X ₁	20	50	80
Ratio	X ₂	1/5	2.5/5	4/5
Temperature	X ₃	20	40	60
Time	X ₄	30	90	150

The number of selected experiments determined by RSM was a total of 27 sets and was performed to determine significant factors for the extraction of TFC.

The general second order polynomial model was:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j}^4 \beta_{ij} X_i X_j$$

The regression coefficients are β_0 , β_i , β_{ij} and β_{ii} are for intercept, linearity, and interaction square terms, respectively, Y was the dependent response, X_i, X_iX_j and X_i² represented the coded levels of linear, interaction and quadratic terms of independent factors, respectively.

2.5. Statistical analysis

For statistical analysis of quantitative data, ANOVA using a significant difference test (Fisher's least) at 5%.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Drawing response surface plots of the design is the best way to show the effect of the independent variables on the dependent variables. This can be done by varying two factors and keeping constant the two others at the central point [35].

3.1. Fitting the models

The total flavonoid content dry matter extract of *C. amontaceae var stricta* obtained from the 27 sets are shown in **Table 2**. Experimental set of data were subjected to multiple regression analysis, the correlation between extraction factors (methanol, liquid/solid ratio, extraction time and temperature) and measured response (total flavonoid content) fitted the second-order multivariate equation.

Table 2: TFC experimental design.

Run	X ₁ (%)	X ₂	X ₃ (C°)	X ₄ (min)	TFC _{exp}	TFC _p
1	50	2.5/5	40	90	10,61	10,12
2	50	2.5/5	20	150	08,43	09,91
3	50	2.5/5	60	30	05,54	04,18
4	20	4/5	40	90	13,79	12,81
5	80	1/5	40	90	16,98	18,08
6	50	2.5/5	20	30	09,47	09,84
7	80	4/5	40	90	03,81	05,19
8	50	2.5/5	60	150	03,89	03,65
9	20	1/5	40	90	13,74	12,47
10	20	2.5/5	40	150	07,75	07,54
11	50	4/5	60	90	04,37	05,75
12	50	4/5	20	90	06,96	07,83
13	50	1/5	20	90	19,35	17,44
14	20	2.5/5	40	30	11,12	10,54
15	80	2.5/5	40	30	06,55	06,77
16	50	2.5/5	40	90	09,90	09,84
17	80	2.5/5	40	150	08,71	09,31
18	50	1/5	60	90	08,99	08,14
19	50	4/5	40	150	06,53	04,46
20	50	1/5	40	30	09,02	10,96
21	80	2.5/5	20	90	15,77	13,51
22	20	2.5/5	20	90	11,43	12,34
23	20	2.5/5	60	90	06,43	08,55
24	80	2.5/5	60	90	06,43	05,38
25	50	1/5	40	150	12,44	12,88
26	50	4/5	40	30	07,42	06,84
27	50	2.5/5	40	90	09,42	09,97

TFC_p : predicted value of TFC, TFC_{exp} : experimental value of TFC

To investigate the models adequacy and identify the significant factors, ANOVA was executed. The response and tested variables relationship are exhibited in the equation below:

$$Y_{(TFC)} = 0,471 - 0,02X_1 - 0,124 X_2 - 0,117 X_3 - 0,005 X_4 - 0,130 X_1X_2 - 0,043 X_1X_3 + 0,077 X_2X_3 + 0,055 X_1X_4 - 0,043 X_2X_4 - 0,006 X_3X_4 + 0,038 X_1^2 + 0,042 X_2^2 - 0,039 X_3^2 - 0,089 X_4^2.$$

Where X₁ (methanol concentration), X₂ (liquid/material ratio), X₃ (temperature) and X₄ (time) are the independent variables and Y₁ (the total flavonoid content) is the response;

Table 3: Analysis of variance ANOVA

Responses	Source	Degree of freedom	Sum of squares	Mean square	F- value	p-Value
TFC	Model	16	0,569	0,035	6,2609	0,0028*
	Residual	10	0,057	0,006		
	Total	26	0,626			

R²= 0.91

3.2. Effect of extraction process on total flavonoid content

Phenolic compounds Isolation, identification, and quantification are influenced by extraction which is an important step in these processes [11]. The most frequently used methodes to prepare plant extracts are solvent extractions, as it is more efficient, easy to use and has large applications, the type of solvents with varying polarities, sample ratio, temperature and extraction time in addition to the physical and chemical characteristics of the samples have a great impact on the yield of extraction [14].

Tableau 4: Regression coefficients of the fitted polynomial equations for TFC

Terme	Estimation	Écart-type	Rapport t	Prob.> t
Constante	9,98	1,11	9,03	<,0001*
Methanol(20,80)	-0,5	0,55	-0,91	0,3861
Solvent/sample(1/5, 4/5)	-3,14	0,55	-5,68	0,0002*
Temperature(20,60)	-2,98	0,55	-5,39	0,0003*
Time(30,150)	-0,11	0,55	-0,21	0,8405
Methanol*Solvent/sample	-3,3	0,96	-3,45	0,0062*

Methanol*Temperature	-1,09	0,96	-1,13	0,2835
Solvent/sample*Temperature	1,94	0,96	2,03	0,0699
Methanol*Time	1,38	0,96	1,44	0,1793
Solvent/sample*Time	-1,078	0,96	-1,13	0,2866
Temperature*Time	-0,15	0,96	-0,16	0,8766
Methanol*Methanol	0,95	0,83	1,15	0,2767
Solvent/sample*Solvent/sample	1,07	0,83	1,28	0,2279
Temperature*Temperature	-0,98	0,83	-1,18	0,2656
Time*Time	-2,25	0,83	-2,72	0,0217*

The interaction effect of methanol with sample ratio was statistically significant and negative ($p = 0.0062$) as shown in table 4. The highest value of TFC (23.80 mg of quercetin equivalents/g) was obtained with methanol concentration of 80% **Figure 1(A)**. As the polarity of methanol decreased from 0% to 80% the value of TFC increased. In the study of Rajauria *et al.* [24], a highest value of flavonoid expressed in mg quercetin equivalents/g was obtained with 60% methanol concentration which exhibited a significant p value ($p < 0.05$). By contrast, the best concentration for *Calendula officinalis* flowers was obtained with 80% of aqueous methanol [10].

The linear effect of sample ratio was statistically significant and negative with $p = 0.0002$ (Table 4). Extraction of TFC, as shown in Figure 1(B), was maximal when sample ratio was at 1/5. Normally, the rate of TFC augments with the raise of sample ratio, because more solvent can penetrate cells allowing a large amount of flavonoids to diffuse into the solvent under the higher solvent to sample ratio condition [25]. The high value of TFC obtained with a relatively low sample ratio, may be due to the conjugated effect of long extraction time as shown in Figure 1(B).

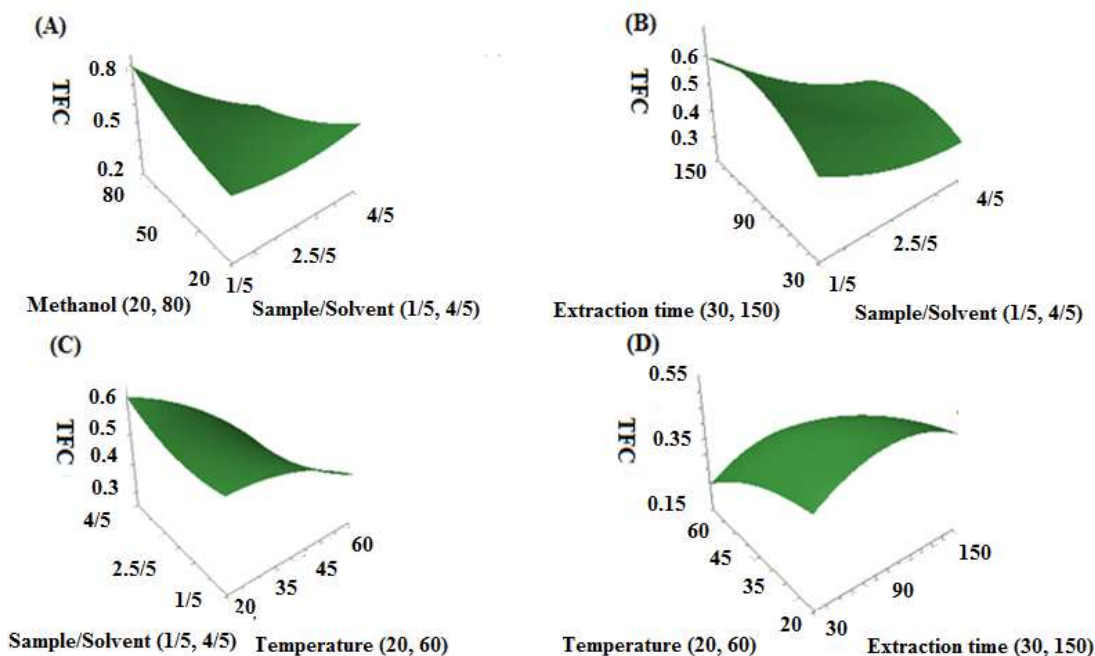


Fig 1: The RSM plots rschowing the effects of (A) methanol concentration and solvent to material ratio (B) Extraction time and solvent to material ratio (C) temperature and solvent to sample ratio (D) temperature and extraction time of TFC from *C. amontaceae var stricta*.

The linear effect of temperature was statistically significant and negative, ($p = 0.0003$) as presented in Table 4. The maximum value of TFC was obtained with temperature of 20°C Figure 1(C). In the investigation of Bouterfas K *et al.* [8], on secondary metabolites from leaves of *Marrubium vulgare* L. (white Horehound), the

optimal value of TFC was obtained with temperature of 20°C. It is reported that, an important diminution of TFC can be caused by extraction temperature higher than 25°C, then it is recommended to adjust temperature during extraction process to avoid thermal degradation of flavonoid derivatives, mainly hydroxyl groups [15] [7]. Furthermore, cell wall integrity are weakened and plant tissues are softened by mild heating which enhance the release of phenolic compounds [18] [29].

In the present work, the quadratic effect of extraction time was statistically significant and negative with *p* value equal to= 0.0217 (Table 4). The optimum extraction time of TFC in our study was with 123.29 min as shown in Figure 1(D). In other studies, the best extraction time for TFC from some thyme varieties and *Callicarpa nudiflora* leaves was three hours [22] [37]. In the work of Liu *et al.*, [19], on *Gynura medica* leaves, the most suitable extraction time of TFC was 30 min. It's well known that, prolonged extraction time allows the solvent and solute to be in contact during a longer time which favors the mass transfer [17].

3.3. Validation of the model

The aim of this work was the extraction optimization of parameters of flavonoid content from *C. amontaceae var stricta*. The desirability function procedure suggested the following optimal conditions: 80% of methanol concentration, 1/5 of solvent/sample ratio, 20°C of temperature and 123.29 min of time for TFC. A good R² value of 0.91 for TFC was obtained which means that, 0.91% can be explained by this model. However, the predicted results (23.80 mg of quercetin equivalents/g) were different to the experimental value (4.98 mg of quercetin equivalents /g). In fact, as reported by Liyana-Pathirana and Shahidi [20], optimisation and exploration of a fitted response surface may generate misleading or poor results, unless the design displays a good fit, hence, it is very important to check the model adequacy. In our study, the *p*-value of the model was 0.003 (Table 3), indicating a significant model fitness [20] [34].

4. CONCLUSION

The methanolic extract of *Cystoseira amentacea var. Stricta*, was analysed for its total flavonoid content following 27 different sets of four independent factors: methanol, solvent/material ratio, extraction time and extraction temperature. The optimum condition of these different factors was obtained using RSM. The second-order polynomial model proposed for *Cystoseira amentacea var. Stricta* extract exhibited a good R² value of 0.91 of total flavonoid content.

The present study is not exhaustive therefore, other experimental conditions may be tested as well as, the nature and the number of extraction procedures (ultrasound extractions, ultrafiltration, flash distillation, supercritical fluid). Also, other extraction solvents (ethanol, acetone, ethyl acetate and acetic acid etc.), will be taken into account in our future works.

5. REFERENCES

1. Amado, R.I., Franco, D., Sanchez, M., Zapata, C., Vazquez, J.A., 2014. Optimisation of antioxidant extraction from *Solanum tuberosum* potato peel waste by surface response methodology. *Food Chem.*, (165): 290–299.
2. Amico, V., Piatelli, M., Cunsolo, F., Recupero, M. and Ruberto, G., 1990. Etraprenyltoluquinols as chemotaxonomic markers in the genus *Cystoseira*: *C. barbarula* and *C. barbata*. *Gazz. Chim. Ital.*, (12): 9–12.
3. Athukorala, Y., Lee, K.W., Kim, S.K. and Jeon, Y.J., 2007. Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. *Bioresour. Technol.*, (98): 1711–1716.
4. Banaigs, B., Francisco, C., Gonzalez, E. and Fenical, W., 1983. Diterpenoid metabolites from the marine alga *Cystoseira elegans*. *Tetrahedron.*, (39): 629–638.
5. Bas, D. and Boyaci, I. H., 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering.*, (78) : 836–845.
6. Belmokhtar, M., 2012. *Cystoseira amentacea v. stricta* : indicateur de la qualité des eaux côtières de l'ouest algérien. Master's Thesis, Université d'Oran Es-Senia, Algeria.
7. Biesaga, M. and Pyrzyńska, K., 2013. Stability of Bioactive Polyphenols from Honey during Different Extraction Methods. *Food Chemistry.*, (136): 46–54.

8. Bouterfas, K., Mehdadi, Z., Benmansour, D., Meghit, B. K., Bouterfas, M., Latreche, A., 2014. Optimization of Extraction Conditions of Some Phenolic Compounds from White Horehound (*Marrubium vulgare L.*) Leaves. *International Journal of Organic Chemistry.*, (4): 292-308.
9. Budhiyanti, S. A., Raharjo, S., Marseno, D.W. and Lelana, Y.B., 2012. Antioxidant activity of brown algae *Sargassum species* extract from the coastline of java island. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences.*, (7): 337-346.
10. Butnariu, M. and Coradini, C.Z., 2012. Evaluation of Biologically Active Compounds from *Calendula officinalis* Flowers Using Spectrophotometry. *Chemistry Central Journal.*, (6) : 35-42.
11. Cacace, J.E., Mazza, G., 2003. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *J. Food Eng.*, (59): 379–389.
12. Chew, Y. L., Lim, Y. Y., Omar, M. and Khoo, K. S., 2008. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT.*, (41): 1067–1072.
13. Combaut, G., Francisco, C., Pioveti, L., Gonzales, E., Teste, G. and Codomier, L., 1980. Acyclic diterpenes in *Cystoseira* (Pheophyceae) from the Mediterranean coast. *Bull. Soc. Chim. Belg.*, (89): 1063–1067.
14. Dai, J. and Mumper, R.J., 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules.*, (15): 7313-7352.
15. Davidov-Pardo, G., Arozarena, M.R.I. and Marin-Arroyo, M.R., 2011. Stability of Polyphenolic Extracts from Grape Seeds after Thermal Treatments. *European Food Research and Technology.*, (232) : 211-220.
16. Djeridane, A., Yous, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.*, (97): 654-660.
17. Hilary, Y., Baldosano, H.Y., Castillo, B.G., Elloran, D.H., Bacani, F.T., 2015. Effect of Particle Size, Solvent and Extraction Time on Tannin Extract from *Spondias purpurea* Bark Through Soxhlet Extraction. In Proceedings of the DLSU Research Congress, Vol. 3, De La Salle University, Manila, Philippines March 2-4, 2015.
18. Juntachote, T., Berghofer, E., Bauer, F. and Siebenhandl, S., 2006. The Application of Response Surface Methodology to the Production of Phenolic Extracts of Lemon Grass, Galangal, Holy Basil and Rosemary. *International Journal of Food Science and Technology.*, (41): 121-133.
19. Liu, H., Du, X., Yuan, Q., Zhu, L., 2009. Optimisation of enzyme assisted extraction of silybin from the seeds of *Silybum marianum* by Box–Behnken experimental design. *Phytochem. Anal.*, (20): 475–483.
20. Liyana-Pathirana, C., Shahidi, F., 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chem.*, (93): 47–56.
21. Mhadhebi, L., Laroche-Clary, A., Robert, J. and Bouraoui, A., 2011. Antioxidant, anti-inflammatory, and antiproliferative activities of organic fractions from the Mediterranean brown seaweed *Cystoseira sedoides*. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, (89): 911–921.
22. Mohammedi, Z. and Atik, F., 2011. Impact of Solvent Extraction Type on Total Polyphenols Content and Biological Activity from *Tamarix aphylla* (L.) Karst. *International Journal of Pharma and Bio Sciences.*, (2): 609-615.
23. Pompeu, D.R., Silva, E.M., Rogez, H., 2009. Optimization of solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using response surface methodology. *Bioresour. Technol.*, (100): 6076–6082.
24. Rajauria, G., Jaiswal, A.K., Abu-Ghannam, N., Gupta, S., 2012. Antimicrobial, Antioxidant and Free Radical-Scavenging Capacity of Brown Seaweed *Himanthalia Elongata* from Western Coast of Ireland. *Journal of Food Biochemistry.*, (37): 322–335.
25. Shan, B., Xie, J. H., Zhu, J. H. and Peng, Y., 2012. Ethanol modified supercritical carbon dioxide extraction of flavonoids from *Momordica charantia L.* and its antioxidant activity. *Food and Bioproducts Processing.*, (90): 579–587.

26. Sheng, Z.L., Li, J.C., Li, Y.H., 2011. Optimization of forsythoside extraction from *Forsythia suspensa* by Box–Behnken design. *Afr. J. Biotechnol.*, (10): 11728–11737.
27. Sheng, Z.L., Wan, P.F., Dong, C.L., Li, Y.H., 2013. Optimization of total flavonoids content extracted from *Flos Populi* using response surface methodology. *Industrial Crops and Products.*, (43): 778– 786.
28. Silva, E., Rogez, H., Larondelle, Y., 2007. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Sep. Purif. Technol.*, (55): 381–387.
29. Spigno, G., Tramelli, L. and De Faveri, D.M., 2007. Effects of Extraction Time, Temperature and Solvent on Concentration and Antioxidant Activity of Grape Marc Phenolics. *Journal of Food Engineering.*, (81): 200–208.
30. Triveni, R., Shamala, T. R. and Rastogi, N. K., 2001. Optimised production and utilization of exopolysaccharide from *Agrobacterium radiobacter*. *Process Biochemistry.*, (36): 787–795.
31. Turkmén, N., Velioglu, Y. S., Sari, F., Polat, G., 2007. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules.*, (12): 484-496.
32. Vairappan, C.S., Daitoh, M., Suzuki, M., Abe, T. and Masuda, M., 2001. Antibacterial halogenated metabolites from the Malaysian *Laurencia* species. *Phytochemistry.*, (58) : 291–297
33. Vinayak, R.C., Sabu, A.S., and Chatterji, A., 2011. Bioprospecting of a few brown seaweeds for their cytotoxic and antioxidant activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.*, (7): 1 – 9.
34. Wang, L., Yang, B., Du, X., Yi, C., 2008. Optimisation of supercritical fluid extraction of flavonoids from *Pueraria lobata*. *Food Chemistry.*, (108): 737–741.
35. Wani, S.M., Jan, N.T., Wani, A., Ahmad, M., Masoodi, F.A., Gani, A., 2015. Optimization of antioxidant activity and total polyphenols of dried apricot fruit extracts (*Prunus armeniaca L.*) using response surface methodology. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences.*, (16): 119-126.
36. Zaragoza, M.C., Lopez, D., Saiz, M.P., Poquet, M., Perez, J., Puig-Parellada, P., Marmol, F., Simonetti, P., Gardana, C., Lerat, Y. *et al.*, 2008. Toxicity and antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of two *Fucus vesiculosus* extracts. *J. Agric. Food Chem.*, (56): 7773–7780.
37. Zhekova, G. and Pavlov, D., 2012. Influence of different factors on Tannins and Flavonoids extraction of some Thyme varieties representatives of Thymol, Geraniol and Citral chemotype. *Agricultural Science and Technology.*, (4): 148-153.
38. Zhu, X., Mang, Y., Xie, J., Wang, P., Su, W., 2011. Response surface optimization of mechanochemical-assisted extraction of flavonoids and terpene trilactones from Ginkgo leaves. *Ind. Crop. Prod.*, (34): 1041–1052.