

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun–Tiaret
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique
dans le cadre de l'arrêté ministériel n° 1275.

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

Mme. CHAIB Cherifa

Mme. YAA Sarra

Thème

Extraits d'algues vertes pour son utilisation
dans les films alimentaires en tant qu'agent
antimicrobien

Soutenu publiquement le : 3juillet 2024.

Jury:

Président: Mr. YEZLI. W

Encadrant : Mr. BOUSSOUM M.O

Co-encadrant : Mme. LARIBI H

Examineur : Mr. ALINEHARI. A

Membres de Startup : Mr. NEGADI.M

Mr. AZZAOULM

Grade

MCA, U. Tiaret

Pr. U. Tiaret

Pr. U. Blida

MCA, U. Tiaret

MCA, U. Tiaret

MCA, U. Tiaret

Année universitaire 2023-2024

Remerciement

Avant tout, Je remercie ALLAH le tout puissant, le Miséricordieux, de nous avoir donné le courage, la force, la santé et la persistance et de nous avoir permis de Finaliser ce travail.

*Au terme de ce travail, je tiens à remercier notre encadreur **Pr. BOUSSOUM M.O**, qui nous a fait l'honneur de nous diriger et de nous guider au long de la réalisation tout le long de ce travail.*

*Nos remerciements s'adressent aussi à notre co-encadrante **Pr LARJBI H** pour ça conseille et orientation tout au long de ce travail.*

*Aux membres de jury, Monsieur **ALINEHARI Abdelkader** et **YEZLI Wassim** merci d'avoir accepté l'évaluation et l'enrichissement de ce travail, vous nous donnez la encore l'occasion de bénéficier de vos connaissances scientifiques. Votre présence et vos remarques nous honorent, nous vous exprimons notre profond respect.*

*Nos remerciements s'étendent à tout le personnel du laboratoire d'écologie animale et végétale et microbiologie de notre université en particulier monsieur **MAAROUF** et dames **WAHIBA, KHANSAA, ZAHIRA, EL HAJA** et **FOUZIA** pour leur accueil et précieux conseils.*

*Nos remerciements s'étendent à l'ensemble des enseignants de notre spécialité microbiologie appliquée particulièrement monsieur **LAREDJ Hocine, BENBAGUARA Morad** et madame **MIHOUB Fatima***

*En fin, nous tiens à remercier toutes les personnes qui nos transmis des informations et qui nos donné un avis critique sur notre mémoire, et tous qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail en particulier **YAA Ihyes, NASRI Yacine, CHAIB Khaled** et **DJAOUIDE Khaldia**.*

عن طلحة بن عبید الله، رضي الله عنه، قال: قال رسول الله، صلى الله عليه وسلم: "من أُولي معروفًا، فليذكره، فمن ذكره فقد

شكره، ومن كتبه فقد كفره". (رواه الطبراني، وحسنه الألباني)

Dédicace

Je dédie ce travail à ma famille, dont l'amour et le soutien m'ont permis de devenir la personne que je suis aujourd'hui.

À mon père, pour ses efforts inlassables et son soutien constant.

À ma mère, pour ses encouragements et son écoute.

À mes frères et ma sœur, pour leur soutien dans ma recherche.

*Je remercie également mes oncles, Monsieur **YAA Ahmed** et Monsieur **NASRI Yacine**, pour leur reconnaissance.*

Je dédie ce travail à mon encadrant et co-encadrant pour leur précieuse guidance.

*À ma binôme, Mademoiselle **CHAIB Cherifa**, pour son sérieux et sa ponctualité tout au long de notre parcours.*

*Enfin, je remercie tous mes amis pour leur soutien, en particulier **KHATIR Abdelhamid**, pour son aide précieuse durant ce projet..*

Sarra

Dédicace

À mes très chers et adorables parents

Je vous dédie cet humble et modeste travail qui n'a pu avoir le jour qu'à votre affection, votre persévérance et vos sacrifices colossaux,

Aucune langue et aucun terme ne pourra exprimer mon profond amour, ma plus grande reconnaissance ainsi que l'expression de mes chaleureuses sentiments.

Que dieu vous prodigue bonne santé et longue vie.

Que dieu vous bénisse et m'aide à vous honorer et à vous servir.

À ma chère binôme Sarra

Avec qui j'ai passé l'une des meilleures années durant mon cursus universitaire.

Je dis merci pour votre soutien et votre aide pendant cette période, merci pour vos encouragements, votre sympathie et votre amour.

Je tiens à te dire que tu es parmi les meilleures personnes que je les rencontre dans ma vie merci pour tout ma chérie.

À mes chers et adorables frères et sœurs

Hounaida ma sœur de cœur, mon acolyte, mon âme sœur je dis merci pour tout, Hadjer ma meilleure moitié, Sara la plus cool, benchaib, ahmed et mohamed.

À mes amis (es) et collègues

En particulier ma chère et aimable amie AYA, c'est l'amitié au vrai sens du mot, tu resteras éternellement gravée dans ma mémoire, merci pour ton amour cordial et ton appui moral.

A Kacem merci d'avoir toujours été à l'écoute, d'avoir toujours su me soutenir.

A mes camarades de la promotion de microbiologie appliquée (Djaouida, hamide, fadoua, amaria et nour).

CHERIFA

LISTE DES ABRÉVIATIONS

B. subtilis : *Bacillus subtilis*

C. albicans : *Candida albicans*

CG-MS : Chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse.

DHA : Acide docosahexaénoïque

DOP : Di-octyl-phtalate

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

E. coli : *Escherichia coli*

EAG : Equivalent Acide Gallique

EPA : Acide eicosapentaénoïque

F : Formulation

FB : Film biologique

G- : Gram négatif

G+ : Gram positif

HSE : Huile de soja époxydée

I % : Pourcentage d'inhibition

IC 50 : Concentration inhibitrice médiane.

IR-ATR : *Infrarouge Attenuated Total Reflectance*

LPS : lipopolysaccharides

MH : Mueller Hinton.

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

SAB : *Sabouraud*.

SM : Solution mère

VIT C : Vitamine C.

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I

| | |
|---|---|
| <i>Figure I. 1: Laminaria digitata, exemple de thalle</i> | 5 |
| <i>Figure I. 2 : Macro-algue (Daude, 2021)</i> | 6 |
| <i>Figure I. 3: Schéma de la Classification simplifiée des algues (par nous-même)</i> | 7 |
| <i>Figure I. 4: Strure du phénol</i> | 9 |

CHAPITRE II

| | |
|---|----|
| <i>Figure II. 1: Etapes de préparation de l'échantillon (prise par nous-même)</i> | 16 |
| <i>Figure II. 2: Organigramme récapitulatif de la démarche expérimentale</i> | 20 |
| <i>Figure II. 3 : Dispositif expérimental d'extraction par soxhlet (prise par nous-même)</i> | 21 |
| <i>Figure II. 4 : Rota vapeur (prise par nous-mêmes)</i> | 22 |
| <i>Figure II. 5: Dispositif expérimental d'extraction par hydrodistillation (prise par nous-mêmes)</i> | 23 |
| <i>Figure II. 6: Schéma récapitulatif de macération</i> | 23 |
| <i>Figure II. 7: Forme libre et réduite du DPPH</i> | 26 |
| <i>Figure II. 8: Spectroscopie ATR</i> | 27 |
| <i>Figure II. 9: Appareil de GC-MS</i> | 28 |
| <i>Figure II. 10: Schéma récapitulatif de la méthode de diffusion par disques/ puits de l'extrait brut d'algue vert</i> | 31 |
| <i>Figure II. 11: Schéma récapitulatif de la méthode de diffusion par disques/ puits de film biologique</i> | 35 |

CHAPITRE III

| | |
|---|----|
| <i>Figure III. 1: Rendements d'extraction par soxhlet</i> | 37 |
| <i>Figure III. 2: Rendement d'extraction par d'hydrodistillation</i> | 39 |
| <i>Figure III. 3: Teneurs des polyphénols (mg EAG/g)</i> | 41 |
| <i>Figure III. 4 : a- Pourcentage d'inhibition du DPPH par l'acide ascorbique</i> | 42 |
| <i>Figure III. 5 : b- Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations</i> | 42 |
| <i>Figure III. 6: Valeurs d'IC50 des extraits testés et du standard (acide ascorbique)</i> | 43 |
| <i>Figure III. 7 : Spectre IR d'algues vert <i>Caulerpa prolifera</i></i> | 44 |
| <i>Figure III. 8 : Chromatogrammes des différents extraits</i> | 47 |
| <i>Figure III. 9: Zones d'inhibition de l'extrait méthanoïque à 70 % déterminée</i> : | 48 |
| <i>Figure III. 10: Effet antimicrobien de l'extrait méthanoïque à 70 % sur les souches étudiées Par la méthode des puits, disques</i> | 49 |
| <i>Figure III. 11: Zones d'inhibition de l'huile déterminées par la méthode des puits</i> | 51 |
| <i>Figure III. 12: Effet antimicrobien de l'huile sur les souches étudiées par la méthode des puits</i> | 51 |

| | |
|--|-----------|
| <i>Figure III. 13: Zones d'inhibition de l'Agent Antimicrobienne Synthétique par la méthode des disques.....</i> | <i>53</i> |
| <i>Figure III. 14: Effet antimicrobien de l'agent synthétique sur les souches étudiées par la méthode des disques.</i> | <i>53</i> |
| <i>Figure III. 15: Zones d'inhibition de film biologique déterminée :</i> | <i>55</i> |
| <i>Figure III. 16: Effet antimicrobien de film biologique sur les souches étudiées par la méthode des disques, puits.</i> | <i>55</i> |

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I

| | |
|---|----|
| <i>Tableau I. 1: Matières plastiques utilisées dans le domaine de l’emballage (Boussoum, 2012).</i> | 13 |
|---|----|

CHAPITRE II

| | |
|---|----|
| <i>Tableau II. 1: Caractérisations d’algue verts <i>Caulerpa prolifera</i>.</i> | 17 |
| <i>Tableau II. 2: Matériel et produits utilisés.</i> | 18 |
| <i>Tableau II. 3 : Différents procédés d’extraction.</i> | 24 |
| <i>Tableau II. 4: Résine et additifs utilisés</i> | 32 |
| <i>Tableau II. 5: Formulations réalisées (les teneurs sont exprimées en grammes pour 100 de PVC).</i> | 33 |

CHAPITRE III

| | |
|---|----|
| <i>Tableau III. 1: Rendement d’extraction par les différents solvants utilisés.</i> | 38 |
| <i>Tableau III. 2 : Criblage phytochimique.</i> | 40 |
| <i>Tableau III. 3 : Groupements fonctionnels des bandes caractéristiques d’algue.</i> | 45 |
| <i>Tableau III. 4: Effet inhibiteur de l’extrait méthanoïque à 70 %.</i> | 48 |
| <i>Tableau III. 5: Effet inhibiteur de l’huile.</i> | 50 |
| <i>Tableau III. 6: Effet inhibiteur de l’agent synthétique.</i> | 52 |
| <i>Tableau III. 7: Effet inhibiteur du film biologique.</i> | 54 |

LISTE DES ANNEXES

| | |
|--|----|
| <i>Annexe A 1 : Composition des différents milieux de culture utilisés</i> | 71 |
| <i>Annexe A 2 : Préparation des milieux de cultures</i> | 72 |
| <i>Annexe A 3: Standardisation des souches</i> | 72 |
| <i>Annexe A 4: Extraits d'algue verte Caulerpa prolifera</i> | 73 |
| <i>Annexe A 5: Préparation des films par polymérisation</i> | 73 |
| <i>Annexe A 6: Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique</i> | 74 |

TABLE DE MATIÈRES

| | |
|-----------------------------|-----|
| Liste des abréviations..... | i |
| Liste des figures..... | ii |
| Liste des tableaux..... | iii |
| Liste des annexes..... | iv |
| INTRODUCTION..... | 1 |

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

| | |
|---|----|
| I.1. Algues marines | 5 |
| I.1.1. Définition des algues marines..... | 5 |
| I.1.2. Classification des algues marines | 6 |
| I.1.3. Caractérisations générales sur les algues vertes | 7 |
| I.1.4. Constituant essentiel des algues vertes | 8 |
| I.1.4.1. Polysaccharides | 8 |
| I.1.4.2. Composés phénoliques | 9 |
| I.1.4.3. Pigments | 9 |
| I.1.4.4. Acides aminés et protéines | 9 |
| I.1.4.5. Lipides | 10 |
| I.1.4.6. Vitamines et minéraux | 10 |
| I.1.5. Activités biologiques des algues vertes | 10 |
| I.1.5. 1. Activité antioxydante..... | 10 |
| I.1.5. 2. Activité antibactérienne | 11 |
| I.1.5. 3. Activité antifongique | 11 |
| I.1.6. Principe utilisation des algues vertes..... | 11 |
| I.1.6. 1. Utilisation dans l'alimentation..... | 11 |
| I.1.6. 2. Utilisation la fabrication des produits de santé et de bien-être..... | 12 |
| I.1.6. 3. Utilisation en agriculture | 12 |
| I.2. Films alimentaires..... | 12 |
| I.2.1. Notions sur les emballages plastiques | 12 |
| I.2.2. Définition des matières plastiques | 13 |
| I.2.3. Composition des matières plastiques..... | 14 |
| I.2.3.1. Additifs | 14 |
| I.2.3.2. Adjuvants | 14 |

CHAPITRE II : METHODOLOGIE EXPERIMENTALE

| | |
|--|----|
| II.1. Objectifs de travail | 16 |
| II.2. Lieu et période de travail..... | 16 |
| II.3. Matériel et produits utilisés | 16 |
| II.3.1. Matière végétale | 16 |
| II.3.2. Identification de l'algue verte <i>Caulerpa prolifera</i> | 17 |
| II.3.3. Matériel biologique | 17 |
| II.3.4. Matériel et produits utilisés | 18 |
| II.4. Méthodologie expérimentale..... | 20 |
| II.4.1. Protocole expérimental..... | 20 |
| II.4.2. Préparation d'extrait d'algue | 21 |
| II.4.2.1. Procédés d'extraction | 21 |
| II.4.2.1.1. Extraction par Soxhlet..... | 21 |
| II.4.2.1.1.1. Détermination du rendement d'extraction par soxhlet | 22 |
| II.4.2.1.2. Extraction par hydrodistillation..... | 22 |
| II.4.2.1.3. Extraction par macération | 23 |
| II.4.3. Détermination du rendement d'extraction | 24 |
| II.4.4. Test phytochimique (screening phytochimique) | 24 |
| ➤ phénols..... | 24 |
| ➤ Flavonoïdes | 24 |
| ➤ Tanins | 25 |
| ➤ Saponosides | 25 |
| ➤ Acides aminés..... | 25 |
| II.4.5. Dosages des composés phénoliques | 25 |
| II.4.5.1. Dosages des polyphénols totaux | 25 |
| II.4.6. Evaluation de l'activité antioxydante d'extrait d'algue verte | 25 |
| II.4.6.1. Principe de la méthode DPPH..... | 25 |
| II.4.6.2. Mode opératoire | 26 |
| II.4.6.3. Détermination IC50..... | 27 |
| II.4.7. Techniques d'analyses utilisées..... | 27 |
| II.4.7.1. Spectroscopie Infrarouge (ATR) | 27 |
| II.4.7.2. Chromatographie gazeuse couplée à spectrométrie de masse (CG/ MS)..... | 28 |
| II.4.8. Evaluation de l'activité antimicrobienne d'extrait d'algue verte | 29 |
| II.4.8.1. Activité antibactérienne..... | 29 |

| | |
|--|----|
| II.4.8.1.1. Antibiogrammes | 29 |
| II.4.8.2. Activité antifongique | 32 |
| II.4.9. Préparation des films par polymérisation | 32 |
| II.4.9.1. Produits utilisés | 32 |
| II.4.9.2. Préparation des films | 32 |
| II.4.9.3. Évaluation de l'activité antimicrobienne de film | 33 |
| II.4.9.3.1. Activité antibactérienne | 33 |
| II.4.9.3.2. Activité antifongique | 34 |

CHAPITRE III : RESULTAS ET DISCUSSION

| | |
|--|----|
| III.1. Rendement d'extraction | 37 |
| III.1.1. Procédé de soxhlet ; | 37 |
| III.1.2. Procédé de macération | 38 |
| III.1.3. Procédé d'hydrodistillation | 39 |
| III.2. Test phytochimique (screening phytochimique) | 40 |
| III.3. Dosage des polyphénols totaux | 41 |
| III.4. Évaluation de l'activité antioxydante | 41 |
| III. 5. Techniques d'analyses | 44 |
| III.5.1. Spectroscopie Infrarouge (ATR) | 44 |
| III.5.2. Chromatographie gazeuse couplée à spectrométrie de masse (CG/ MS) | 45 |
| | 47 |
| III.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne | 47 |
| III.6.1. Activité antimicrobienne du l'extrait méthanoïque à 70 % | 47 |
| III.6.2. Activité antimicrobienne de l'huile végétale | 50 |
| III.6.3. Activité antimicrobienne de l'agent synthétiques | 52 |
| III.6.4. Activité antimicrobienne de Film Biologique (FB) | 54 |
| CONCLUSION | 58 |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 61 |
| ANNEXES | 71 |
| Résumé | 75 |
| Abstract | 76 |
| ملخص | 77 |
| I. Présentation du projet | 81 |
| II. Aspects innovants | 81 |
| II.1. Déterminer le problème rencontré par le client | 81 |

| | |
|--|----|
| II.2. La valeur proposée selon les critères suivants | 82 |
| III. Plan financier | 82 |
| III.1. Structure des coûts | 82 |
| III.2. Coûts fixes de projet | 83 |
| III.3. Source des revenus..... | 84 |

INTRODUCTION

Ces dernières années, avec le développement économique, les gens sont devenus plus attentifs à la sécurité et à la qualité des aliments à l'échelle mondiale. Donc la sécurité alimentaire est devenue une préoccupation internationale de plus en plus importante, car les aliments peuvent être des milieux adéquats pour la multiplication de certains microorganismes pathogènes qui le rendent nocifs pour la santé du consommateur que ce soit l'être humain ou l'animal (**Ma et al., 2017**).

La recherche scientifique sur l'évaluation des risques microbiologiques vise à améliorer nos systèmes de contrôle alimentaire, à promouvoir la production d'aliments plus sains, à réduire l'incidence des maladies d'origine alimentaire et à faciliter le commerce alimentaire national et international (Hammoudi et al., 2020).

Selon **Han (2005)**, l'emballage joue un rôle crucial dans la préservation de la qualité des produits alimentaires tout au long de leur parcours de transport, de stockage et de consommation éventuelle.

Cependant les matériaux d'emballage ont pour objectif de promouvoir ce qu'ils protègent et de préserver ce qu'ils vendent, en créant une barrière inerte entre l'aliment et l'environnement extérieur. Toutefois, de nombreuses substances involontairement ou intentionnellement ajoutées aux emballages peuvent migrer vers l'aliment, ce qui peut avoir un impact sur les caractéristiques mécaniques du plastique et entraîner des modifications des denrées alimentaires, ce qui peut être néfaste pour la santé dans certaines situations (**Baloul, 2018**).

Aujourd'hui, l'usage des produits naturels provenant des végétaux est en plein essor en raison des effets secondaires des composés synthétiques qui peuvent être préjudiciables à la santé humaine. Leur utilisation dans divers domaines industriels peut entraîner des conséquences mutagènes, cancérigènes et toxiques sur la santé humaine, ainsi qu'une augmentation du niveau de pollution dans la nature. Ainsi, les industriels ont commencé à réfléchir à la réduction de leurs utilisations, à l'utilisation des composés naturels des plantes et à l'évaluation de différentes méthodes d'extraction pertinentes (**Mnayer, 2014**).

Une attention particulière a été accordée aux films bioactifs antibactériens en raison de leur capacité à retarder la prolifération microbienne dans les aliments et à diminuer le risque de contamination superficielle par des micro-organismes pathogènes. On considère les films actifs comme des véhicules performants pour une grande diversité d'additifs, tels que les antioxydants, les agents antifongiques et les antibactériens. Par conséquent, il est possible que ces matériaux contribuent de manière positive à l'amélioration de la qualité des aliments en ce

qui concerne les produits d'emballage et de stockage, en prolongeant la durée de conservation et en réduisant la prolifération microbienne du produit (**Hammoudi et al., 2020**).

Ces matières naturelles dépendent des enjeux économique et environnementaux, de la nécessité de développement de nouveaux produits et des changements dans les modes de consommation (**Hammoudi et al., 2020**).

À l'heure actuelle, les recherches se concentrent sur des approches alternatives pour diminuer l'usage d'additifs chimiques dans l'industrie alimentaire, en raison des dangers qu'ils représentent pour la santé des consommateurs. Dans ce contexte, l'emploi des extraits d'algues vertes, en tant que sources potentielles de molécules naturelles et bioactives dans l'élaboration des films alimentaires, cette dernière montre une grande efficacité en tant qu'agents antibactériens, antifongiques, antioxydants et même en tant qu'agent plastifiant.

Les algues peuvent jouer un rôle essentiel dans la préservation de l'environnement et la protection de la santé publique de diverses manières. En contrôlant leur prolifération, nous pouvons atténuer les risques associés à leur décomposition, notamment la libération de gaz toxiques comme le sulfure d'hydrogène. De plus, en exploitant les algues de manière productive, nous pouvons transformer un problème environnemental en une opportunité de développement durable (**Pillard, 2016**).

En effet, les algues sont considérées comme une ressource très prometteuse dans le domaine de la chimie verte et de la fabrication de biomatériaux. Elles incluent la production de bioplastiques, de biocarburants, d'engrais naturels, de produits cosmétiques et bien d'autres encore. Les recherches et le développement dans ce domaine sont en constante progression pour exploiter pleinement le potentiel des algues et développer des procédés de production plus efficaces et durables (**Fontanille et Gnanou, 2014**).

Les objectifs principaux de cette étude sont :

- Élimination de l'accumulation excessive de déchets marins (algues vertes) et leurs valorisations.
- Synthèse des biofilms alimentaires à partir d'extrait d'algue verte.
- Détermination des teneurs en diverses substances bioactifs des extraits d'algue verte
- Évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante des extraits ainsi leurs caractérisations par Les techniques d'analyses, à savoir, , l'*Infrarouge* (ATR) et la chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse (CG/SM).

Pour mener à bien cette étude, nous avons structuré ce mémoire en trois chapitres :

Le premier chapitre consiste en une étude bibliographique dans laquelle nous avons présenté des généralités sur les algues marines en particulier les algues vertes, leurs différentes

compositions, leurs diverses activités biologiques (antioxydantes, antimicrobiennes). Puis nous nous sommes intéressés à l'importance de leurs applications dans différents secteurs industriels. Et même nous avons présenté des généralités sur l'emballage plastique et sa composition.

Le deuxième chapitre est consacré à la valorisation des extraits d'algue verte *caulerpa prolifera* extraites par différentes techniques d'extraction dont les propriétés biologiques ne sont pas entièrement connues. Leurs compositions chimiques, leurs activités antioxydantes et antimicrobiennes ont été étudiées.

Le troisième chapitre présente les principaux résultats et leurs discussions. Enfin, ce présent mémoire se terminera par une conclusion et des recommandations pour assurer une suite à ce travail.

Chapitre I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Algues marines

Les océans et les mers représentent près des trois-quarts de la surface du globe et l'environnement marin est un écosystème unique en raison de la diversité des organismes qu'il abrite. Parmi ces organismes, les algues font preuve d'une incroyable richesse. Elles sont des végétaux beaucoup moins connus que les plantes terrestres et beaucoup plus difficiles à appréhender. Elles occupent en grande partie les milieux aquatiques, en particulier marins et sous-marins et constituent un ensemble d'organismes extrêmement divers qu'il est très difficile de présenter de manière simplifiée (Lakhdar, 2018).

I.1.1. Définition des algues marines

Les algues sont des végétaux chlorophylliens aquatiques ou des lieux humides, n'ayant ni feuilles, ni racines, ni vaisseaux, ni fleurs, ni graines, tels que les fucus ou la spirogyre.

Les algues sont des organismes aquatiques et constituent un maillon essentiel de la chaîne alimentaire au niveau des mers et des océans. Elles se retrouvent dans les eaux salées, mais également en eau douce pour certaines espèces : dans les lacs, mares et ruisseaux. Les algues sont rares en milieu aérien et requièrent alors de l'humidité. Elles sont autotrophes et capables de produire de l'énergie via la réalisation de la photosynthèse (Daude, 2021).

On ne parle pas de feuilles chez les algues mais de thalles, qui correspondent au corps végétatif non différencié de l'algue. Le thalle peut être de taille très variable : quelques micromètres pour les plus petits, ceux des algues unicellulaires, et jusqu'à plusieurs mètres de longueur pour les plus longs (Figure I). Certaines algues possèdent également des flotteurs afin de rester à la surface et d'être à la lumière du soleil (Daude, 2021).



Figure I. 1: Laminaria digitata, exemple de thalle

Les algues ont des couleurs de thalle très variées, dues à la présence ou non de pigments. On distingue ainsi trois grandes familles d'algues : rouges, vertes et brunes, qui malgré leurs différences de couleur, possèdent toutes de la chlorophylle. Les macro-algues sont des algues qui sont les plus connues et les plus étudiées jusqu'à maintenant. Elles possèdent à leur base des crampons leur permettant de se fixer sur un support. Les crampons sont surmontés d'un pédoncule de longueur variable, le stipe. Elles absorbent leurs nutriments via leur thalle, qui est au contact de l'eau. L'algue se termine par une fronde qui peut se présenter sous forme de filaments, cordons ou lanières **Figure I.2) (Daude, 2021).**

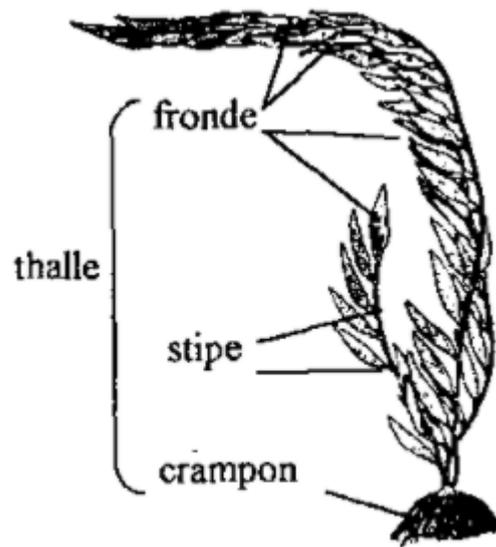


Figure I. 2 : Macro-algue (Daude, 2021).

Cependant, les recherches s'orientent désormais également vers les microalgues, qui sont tellement variées qu'il n'en existe pas vraiment de modèle type : elles peuvent être procaryotes ou eucaryotes, pluri ou unicellulaires et sont capables de former des biofilms. Ce sont des organismes fonctionnant grâce à leur cellule unique. Leur taille se compte en micromètres et la plupart sont adaptées à la flottaison voire à la nage grâce à un ou plusieurs flagelles **(Daude, 2021).**

I.1.2. Classification des algues marines

Les algues sont classées en groupes **(figure I. 3)**, seul un groupe est procaryote (cyanobactéries), les autres algues étant eucaryotes **(Daude, 2021):**

- Les algues bleues, (cyanobactéries) appartiennent au règne des Eubacteria et sont des procaryotes ;

- Les algues vertes, appartiennent à l'ensemble des Chlorophytae, peuvent être marines, d'eau douces ou encore aériennes ;
- Les algues rouges ou Rhodophytes, sont le taxon frère des Chlorophytae ;
- Les Euglénophyceae, sont des algues unicellulaires flagellées incolores ;
- Les Cryptophytae, sont des unicellulaires flagellés incolores aux plastes rouges ou bleus ;
- Les Haptophytae, sont des algues unicellulaires caractérisées par un organe particulier, l'haptonème ;
- Les algues brunes ou Phaeophyceae, dont les plus connues sont les algues brun-dorées ou Ochrophytae ;
- Les diatomées, sont des algues unicellulaires avec coque externe en silice et sont retrouvées dans tous les milieux aquatiques ;
- Les dinophytae, sont des algues unicellulaires souvent biflagellées.

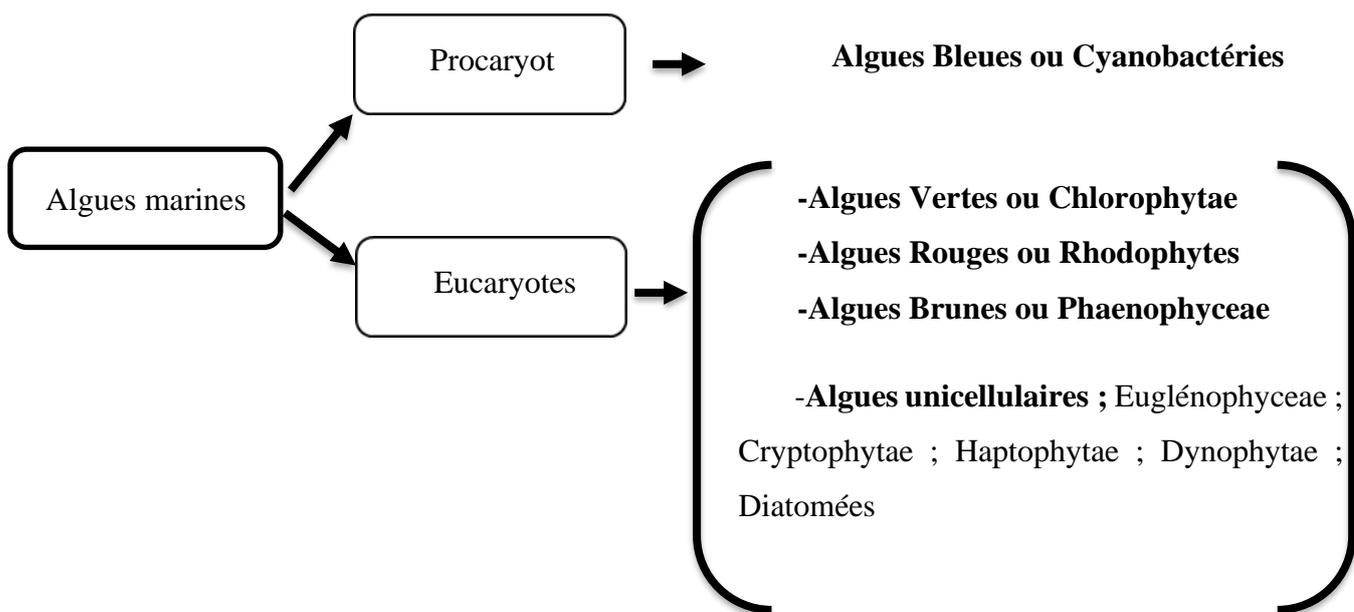


Figure I. 3: Schéma de la Classification simplifiée des algues (par nous-même)

La classification des algues est très complexe du fait de la grande variabilité des végétaux qui la composent. La manière la plus commune de faire référence aux algues étant de séparer les grandes familles des algues rouges, vertes, brunes ou bleues et les algues unicellulaires (Floc'h et Leclerc, 2010) (Figure I.3).

I.1.3. Caractérisations générales sur les algues vertes

Les algues vertes sont un ensemble d'algues dont les pigments essentiels à la photosynthèse sont les chlorophylles a et b. Les plastes de ces algues sont colorés en vert par ces pigments, auxquels des caroténoïdes sont quelquefois associés (Zehlila, 2017).

Elles regroupent des organismes variés n'appartenant pas à un même groupe évolutif. Elles sont présentes en majorité dans les eaux douces et dans les mers et les océans cependant quelques espèces peuvent être retrouvées sur terre. Les algues vertes sont très riches en calcium et en protéines, possèdent un pouvoir nutritionnel élevé en plus de la présence de vitamines et d'antioxydants. Elles possèdent aussi un pouvoir gélifiant important aussi elles jouent un rôle important dans l'oxygénation des eaux, favorisant ainsi la vie animale (**Garon-Lardiere, 2004**).

I.1.4. Constituant essentiel des algues vertes

Pour survivre, elles produisent une variété de substances naturelles, bénéfiques et présentant des avantages potentiels et multiples. Ce sont des protéines, des peptides, des acides aminés, des acides gras, des stérols, des polysaccharides, des oligosaccharides, des composés phénoliques, des pigments photosynthétiques, des vitamines et des sels minéraux qui ont une large application dans les industries de l'alimentation humaine et animale et autres domaines (**Satpati et Pal, 2011**).

C'est dans ce contexte, que plusieurs études ont porté sur l'identification et l'analyse des composés des algues vertes (**Hentati et al., 2020**).

I.1.4.1. Polysaccharides

Les algues, et particulièrement les macro-algues, constituent la plus grande source d'hydrocolloïdes d'origine naturelle. Les hydrocolloïdes, ou phycocolloïdes, sont des polysaccharides, sulfatés ou non, capables de former des textures de type gel. Ils servent de composés structurant pour les algues, et sont présents dans les parois de leurs cellules. Ils donnent une certaine forme, tenue et élasticité au thalle (**Pereira, 2018**).

Ces composés sont très intéressants dans les domaines pharmaceutique, agro-alimentaire ou encore cosmétiques, où ils sont utilisés en tant qu'agent texturant ou en tant que principe actif (**Jesumani et al., 2019**).

▪ Ulvanes

Les ulvanes sont des polysaccharides présents chez les algues vertes (Chlorophyta) qui sont formés d'un assemblage de sucres comme le rhamnose, la xylose, le glucose, le mannose, le galactose et des acides uroniques. Ces monosaccharides vont former des sous-unités de disaccharidiques, les acides ulvanobiuroniques.

Les ulvanes sont capables de former des gels en présence d'ions divalents comme Ca^{2+} ou Zn^{2+} . Les gels formés sont plus faibles, moins solides et texturants, que ceux issus des agars par exemple. Les ulvanes possèdent également des propriétés anti-oxydantes et hydratantes, et sont utilisés dans le domaine de la cosmétique (**Daude, 2021**).

I.1.4.2. Composés phénoliques

Les phénols et composés phénoliques comme leur nom l'indique, contiennent dans leur formule chimique au moins un phénol, un alcool aromatique, et les polyphénols en contiennent au moins deux (**Figure I.4**).

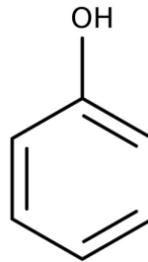


Figure I. 4: Structure du phénol

Les composés phénoliques sont également présents chez les algues, mais sont différents de ceux présents chez les plantes terrestres, et ne suivent pas les mêmes voies de synthèse. Ces composés sont des métabolites secondaires, généralement situés dans les couches externes du cortex du thalle (Shibata et al., 2004), essentiellement utilisés pour la défense de algues et leur résistance face à l'environnement, afin de lutter contre le stress oxydatif ou les effets cytotoxiques dû aux UV ou encore en tant qu'anti-viraux et anti-fongiques, les plus importants et les plus étudiés, de ces composés phénoliques sont les phlorotannins (**Catarino et al., 2017**).

Les autres composés phénoliques que nous pouvons trouver chez les algues seront par exemple des bromophénols ou des flavonoïdes, ils se retrouveront plutôt chez les algues vertes (**Hentati et al., 2020**).

I.1.4.3. Pigments

Toutes algues possèdent des pigments, dont les différentes combinaisons déterminent leur couleur : les chlorophylles, les caroténoïdes (carotènes et xanthophylles) et les phycobilines.

Les chlorophylles sont des pigments spécifiques des algues vertes, sont liposolubles, et jouent le rôle principal dans la photosynthèse (**Hentati et al., 2020**).

I.1.4.4. Acides aminés et protéines

Les protéines jouent un rôle structural important, ils ont une influence sur de nombreux processus biochimiques tels que le transport des ions et de l'oxygène, l'adhésion cellulaire et les réponses immunitaires (**Bourgougnon et Gervois, 2021**).

Les algues sont de très bonnes sources d'acides aminés et de protéines. En fonction des espèces, le pourcentage en poids sec de protéines peut monter jusqu'à 47%. Les algues vertes ont tendance à présenter des concentrations protéiques plus élevées que les algues brunes (**Daude, 2021**). De nombreuses algues peuvent être utilisées comme source de protéines

végétales pour l'alimentation humaine et animal, elles ont donc une grande qualité nutritionnelle (**Bourgougnon et Gervois, 2021**).

I.1.4.5. Lipides

Les macro-algues ont une faible teneur en lipides de 1 à 3% de la matière sèche, au contraire de certaines espèces microscopiques qui sont riches en lipides jusqu'à 40% de leur poids (Becker, 2003). Cependant, en termes de qualité, les lipides d'algues ont un pourcentage élevé d'acides gras essentiels, parmi ces lipides sont présents des acides gras polyinsaturés comme les acides gras essentiels : l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) ou l'acide α -linoléique. Certains acides gras, notamment les acides gras "oméga-3" et "oméga-6", dits "essentiels", ne peuvent être synthétisés en quantité suffisante par l'organisme des mammifères et doivent être apportés par l'alimentation. Les algues peuvent être une source intéressante d'acides gras essentiels, par exemple sous forme de compléments alimentaires (**Tanniou, 2014**).

I.1.4.6. Vitamines et minéraux

La composition des algues en vitamines varie en fonction de l'espèce d'algues, le stade de croissance, la zone géographique, et de divers paramètres abiotiques tels que la salinité, la saisonnalité, la disponibilité de la lumière et la température de l'eau (**Bourgougnon et Gervois, 2021**). Les algues sont des sources de nombreuses vitamines, dont des vitamines liposolubles : A, B, C, D, E, K. Elles font d'ailleurs partie des rares végétaux à posséder de la vitamine B12 (**Jesumani et al., 2019; MacArtain et al., 2008**).

Les minéraux et éléments traces sont donc présents à des concentrations notables chez les algues : du sodium, du potassium, du calcium, du fer, du zinc, du manganèse, du cuivre... (**MacArtain et al., 2008**). Ces taux de concentration vont varier en fonction de l'espèce d'algue mais également de son milieu de vie et/ou de culture (**Hentati et al., 2020**).

I.1.5. Activités biologiques des algues vertes

I.1.5. 1. Activité antioxydante

Les réactions biochimiques qui prennent place dans la cellule sont la force qui assure la continuité de vie cellulaire. Cependant, beaucoup de ces réactions génèrent des atomes ou molécules dites les radicaux libres qui possèdent des électrons non appariés ce qui les confère une grande réactivité chimique et une haute instabilité (**Carocho et Ferreira, 2013**). La génération des radicaux libres est stimulée par deux types de facteurs, des facteurs endogènes naturels comme les peroxysomes, la mitochondrie... et d'autres exogènes tels que le stress, l'exposition à la fumée, les rayonnements UV...etc (**Lobo et al., 2010**).

Les antioxydants synthétiques généralement utilisés pour prévenir ces dommages comme le butylhydroxyanisole, le butylhydroxytoluène, le butylhydroquinone tertiaire, et le gallate de propyle sont sous réglementation stricte dans la plupart des pays, en raison de leurs effets secondaires et des risques potentiels sur la santé humaine (**Zehlila, 2017**).

(**Leila et Said, 2023**) ont rapporté que les cellules des algues possèdent une défense antioxydante très efficace grâce à leur teneur de substances antioxydants comprennent les pigments photosynthétiques et les composés phénoliques. Ces antioxydants diminuent ou arrête l'action des radicaux libres, soit en inhibant leur production ou bien en limitant leur propagation en agissant comme des piègeurs pour stabiliser les radicaux (**Favier, 2003**).

I.1.5. 2. Activité antibactérienne

Les algues vertes synthétisent une grande variété de métabolites secondaires chimiquement actifs, qui sont utilisées pour la défense contre les autres organismes prédateurs ou colonisateurs. Ces métabolites actifs sont produits par plusieurs types de macroalgues et microalgues marines et présentent des propriétés antibactériennes efficaces dans le domaine thérapeutique (**FARID et al., 2012**).

Les extraits cellulaires et les composants actifs de diverses algues sont révélés d'avoir une activité antibactérienne contre les bactéries Gram positives et Gram négatives (**Lima-Filho et al., 2002**).

I.1.5. 3. Activité antifongique

Les algues marines sont rapportées comme des sources riche en molécules inhabituels avec des diverses propriétés biologiques ; Plusieurs d'autres activités biologiques ont été associée aux algues tel que l'activité antiparasitaire, anti-inflammatoire, anticancéreuse et antivirale (**Leila et Said, 2023**).

I.1.6. Principe utilisation des algues vertes

I.1.6. 1. Utilisation dans l'alimentation

La principale utilisation des algues dans le monde concerne le domaine alimentaire, ce dernier représente en effet environ 75% de leur utilisation (**Faller, 2011**). Elles jouent un rôle important en fournissant des gélifiants comme les carraghénanes et les alginates. En effet, les extraits d'algues accompagnent notre quotidien comme additifs texturants (gélifiants, épaississants, stabilisants) utilisés entre autres dans les crèmes, les flans, les soupes et les charcuteries (**Lakhdar, 2018**).

Traditionnellement, dans de nombreuses régions côtières notamment en Europe du Nord, les animaux de fermes ont été habitués à se nourrir des algues. Actuellement, plusieurs

compagnies produisent des aliments pour bétail incluant des farines d'algues, ce qui permet un apport d'oligo-éléments entraînant une meilleure production laitière et une laine ovine de bonne qualité (Chopin et Whalen, 1993).

I.1.6. 2. Utilisation la fabrication des produits de santé et de bien-être

Les métabolites dérivés d'algues ont été répertoriés comme actifs dans les soins anti-âges de la peau, amincissant, antioxydant, photoprotecteur et hydratant (Lakhdar, 2018).

En médecine traditionnelle, on utilise les bains d'algue dans le traitement de rhumatisme ou certaines affections de l'appareil locomoteur (Ainane, 2011). Les déchets industriels de l'algue vert ont été employés pour la fabrication d'un savon antifongique utilisé pour le traitement des infections superficielles cutanées à levures (Lakhdar, 2018).

I.1.6. 3. Utilisation en agriculture

En agriculture, les algues sont principalement utilisées comme engrais ou comme ingrédient dans la fabrication d'aliments pour le bétail, elles sont transformées en poudre, extraits liquides ou microbilles et sont épandues sur les terres. Elles permettent de retenir l'eau dans le sol, d'améliorer sa texture, de maintenir et d'enrichir le sol par des traces de métaux (Cu, Co, Zn, Mn, Fe, N), de fournir des éléments essentiels aux plantes, d'améliorer la germination, d'augmenter le rendement et d'assurer une défense contre certains pathogènes des cultures. Les algues calcaires, ont été utilisées pour préparer des amendements agricoles qui fertilisent en y apportant des oligoéléments (Lakhdar, 2018).

I.2. Films alimentaires

I.2.1. Notions sur les emballages plastiques

L'emballage est un « assemblage de matériaux destinés à protéger le produit, le transporter, le stocker, le vendre et le consommer » ainsi qu'un « moyen de garantir la sécurité de la distribution du produit jusqu'au consommateur final dans de bonnes conditions et à un coût minimum. L'emballage doit contribuer à la conservation du produit ; c'est-à-dire maintenir le plus longtemps possible son plus haut degré de qualité, en agissant pour ralentir ou supprimer les effets des mécanismes physico-chimiques ou microbiologiques d'altération.

Pour cela, il doit préserver les différentes qualités du produit jusqu'à sa consommation, qualités hygiéniques (non-toxicité), nutritionnelles (valeur énergétique, teneur en vitamines, acides gras insaturés, etc.), organoleptiques (goût, odeur, couleur, texture) et technologiques (aptitude à la transformation). L'emballage a une fonction « marketing », il a aussi une fonction

économique et commerciale. L’emballage informe le consommateur sur la composition du produit, les précautions d’emploi, la marque et sa conformité à la réglementation (**Boussoum, 2012**). Le tableau I.1 donne une idée sur quelques matières utilisées dans le domaine de l’emballage.

Tableau I. 1: Matières plastiques utilisées dans le domaine de l’emballage (**Boussoum, 2012**).

| Polymères | Symboles | Applications | Formules |
|-------------------------------|--|---|--|
| Polyéthylène | PEBD (Basse densité) PEHD (Haute densité) | - Sacs de grande contenance farine, sucre... - Corps creux : bouteilles de lait pasteurisé, flacons souples pour pharmacie. - Films, sacs, sachets pour poissons et viandes surgelés... | -[CH ₂ -CH ₂] _n - |
| Polypropylène | PP | - Film d’aspect orienté dit OPP pour produits alimentaires : biscuits, purée, chips - Enveloppement des fleurs. | -[CH ₂ -CH] _n - CH ₃ |
| Polychlorure de Vinyle | PVC | - Corps creux : bouteilles alimentaires (eaux minérales, huiles...) - Films étirables domestiques pour viande, légumes, fromages. | -[CH ₂ -CH] _n - Cl |
| Polyvinylidène chloré | PVDC | - Complexe papier pour produits sensibles à l’humidité (biscuit). - Complexe pour viande, fromage. | Cl -[CH ₂ -C] _n - Cl |
| Polystyrène | PS | - Pots pour produits laitiers. - Bi-orienté (OPS) pour les barquettes transparentes. | -[CH ₂ -CH] _n - |
| Pellicule cellulosique | | Applications essentielles : substituée au PP bi-orienté pour film (biscuit, confiseries, pâtes alimentaires) | |

I.2.2. Définition des matières plastiques

Le terme « plastique » décrit une grande variété de composés organiques obtenus par synthèse chimique. Produites essentiellement à partir du pétrole, les matières plastiques sont l’un des symboles du 20^{ème} siècle, d’où la bakélite (1909) est le plus ancien plastique entièrement synthétique. La matière plastique est composée principalement de polymère, qui a la propriété de s’émettre en forme facilement par moulage, extrusion, coulage après un chauffage modéré (100-300 °C) (**Harper, 2000**).

I.2.3. Composition des matières plastiques

I.2.3.1. Additifs

Ils occupent plus de 10 % dans la composition du produit fini. Ils sont des charges sous forme d'éléments fragmentaires, de poudres ou liquide, qui modifient une propriété de la matière à laquelle on l'ajoute (tenue aux chocs, résistance aux UV, comportement au feu...).
Peuvent être également utilisés pour diminuer le coût des matrices en résine (**Harper, 2000**) :

- ✓ **Plastifiants** : sont des solvants lourds, qui incorporés au polymère de base, modifient sa structure.
- ✓ **Charges et renforts** : sont utilisés en grande quantité dans le polymère pour diminuer son coût et augmenter la résistance mécanique du produit fini.
- ✓ **Agents gonflants** : sont utilisés pour conférer une structure cellulaire -allégée au matériau après sa mise en forme.

I.2.3.2. Adjuvants

Les adjuvants entrent pour moins de 10 % dans la composition du produit fini, parfois moins de 1 % (**Harper, 2000**).

- ✓ **Colorants et les pigments** : les colorants solubles sont introduits dans le polymère, les colorants insolubles sont mis sous forme de dispersion au moment de la transformation de la matière plastique.
- ✓ **Lubrifiants** : sont destinés à faciliter la mise en œuvre de la matière, ils réduisent le frottement entre la matière et l'acier de l'outillage. Ils sont utilisés entre 1 à 2 % de la matière d'œuvre.
- ✓ **Stabilisants** : sont destinés à ralentir ou retarder une transformation de la matière.
Exemple : coloration aux ultraviolets.
- ✓ **Fongicides** : sont destinés à empêcher l'attaque des polymères par des organismes vivants.

Chapitre II :

Méthodologie expérimentale

Ce premier chapitre regroupe le matériel et les méthodes mis en œuvre au cours des expériences réalisées.

II.1. Objectifs de travail

Les objectifs principaux de notre étude sont :

- Synthèse des biofilms alimentaires à partir d'extrait d'algue verte.
- Détermination des teneurs en diverses substances bioactifs des extraits d'algue verte
- Evaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante des extraits ainsi leurs caractérisations par Les techniques d'analyses, à savoir, l'ATR et la CG/MS.

II.2. Lieu et période de travail

Cette étude a été réalisée au sein des laboratoires de l'écologie végétale, de biochimie et de microbiologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université Ibn Khaldoun de Tiaret, durant une période s'étalant du 04 février au 23 mai 2024.

II.3. Matériel et produits utilisés

II.3.1. Matière végétale

L'algue verte *Caulerpa prolifera* a été récolté dans la plage de Sidi Marouane à Ténès (Chlef) à trois moments différents : le 24/11/2023, 14/02/2024 et le 03/03/2024.

Afin d'éliminer toutes les impuretés présentes, l'algue a été triée (**Figure II.1. A**), puis séchée à l'air libre et à l'abri de la lumière durant 48 à 72 heures (**Figure II.1. B**), ensuite l'échantillon est broyé dans un broyeur électrique et conservé à l'abri de l'humidité jusqu'à son utilisation (**Figure II.1. C et D**).

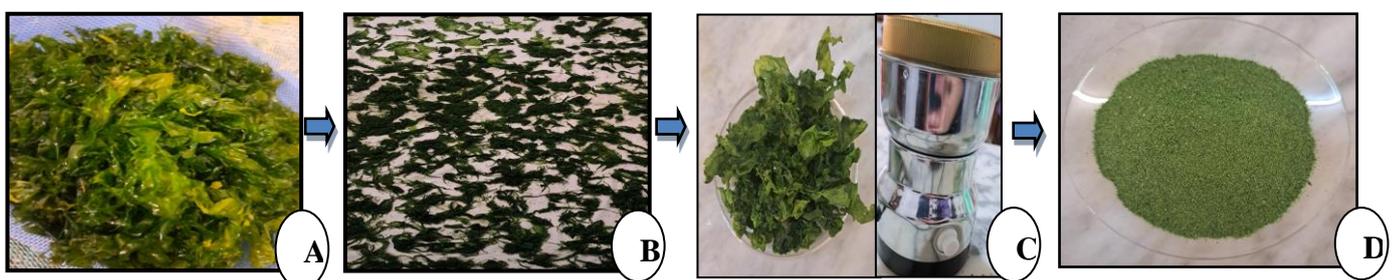


Figure II. 1: Etapes de préparation de l'échantillon (prise par nous-même).

A : Rinçage de l'algue *Caulerpa prolifera* par l'eau, **B** : Séchage de l'algue à l'air libre et à l'abri de la Lumière, **C** : Broyage de l'algue, **D** : L'algue *Caulerpa prolifera* en poudre.

II.3.2. Identification de l'algue verte *Caulerpa prolifera*

L'espèce *caulerpa prolifera* a été identifiée grâce au programme numérique **Algaebase** et à l'application **PlantNet**. Nous avons pris en considération la couleur, la longueur du thalle et des parties aériennes, ainsi que le mode de fixation pour cette détermination (**tableau II.1**).

Tableau II. 1: Caractérisations d'algue verts *Caulerpa prolifera*.

| Nom Latin | <i>Caulerpa prolifera</i> |
|---|---|
| Classification (Benabdallah, 2012) | Régné : Plantae Division : Chlorophyta Classe : Chlorophyceae Ordre : Bryopsidales Famille : Caulerpaceae Genre : Caulerpa Espèce : <i>Caulerpa prolifera</i> |
| Habitat (Rushdi, 2020) | <i>Caulerpa prolifera</i> présente partout dans le monde, généralement dans les habitats marins tropicaux et subtropicaux d'eau peu profonde. |
| Morphologie (Rushdi, 2020) | Le thalle est composé d'un stolon horizontal relié par des rhizoïdes incolores, reliant des frondes photosynthétiques dressées (assimilateurs) de morphologie diverse, notamment des structures spongieuses, filiformes, pennées, en forme de lame et vésiculaires. |

II.3.3. Matériel biologique

Afin d'évaluer leurs activités antibactériennes et antifongiques, l'extrait d'algue verte ainsi préparé a été testé sur :

- Deux bactéries gram + : *Staphylococcus aureus* (ATCC43300), *Bacillus subtilis* (ATCC6633).

-Deux bactéries gram ⁻ : *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027).

-Deux levures : *Candida albicans* (ATCC 10237) (M3) et *Candida albicans* (ATCC10231) (CA2).

Tous les germes utilisés pour ces tests sont des souches répertoriées (collection de l’Institut Pasteur de Paris (CIP) et de l’Américan Type Culture Collection (ATCC)), conservés par congélation dans le glycérol, ont été fournis par le laboratoire de microbiologie au niveau de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie -Tiaret.

II.3.4. Matériel et produits utilisés

Les différentes verreries, appareillage, réactifs et milieux de culture utilisés dans notre travail sont mentionnés dans le (tableau II.2).

Tableau II. 2: Matériel et produits utilisés.

| Appareillage | Verreries |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> - Soxhlet (BEHR LABOR- TECHNIK) - Rota-vapeur (HEIDOLPH) - Agitateur (VELP SCIENTIFIQUE) - Ultrason (Bandelin sonorex TK52) - Etuve (MEMMERT) - Balance analytique (KERN 440-45N) - Agitateur à plaque chauffante (IKA RCT Basic) -Bain marie (MEMMERT) -Réfrigérateur (BAUKNECHT) -Agitateur vortex (VELP SCIENTIFICA) -Autoclave (WOLF) -Incubateur (MEMMERT) -Stérilisateur (HERAEUS INSTRUMENTS) -Spectrophotomètre UV-V (JENWAY 7205) -Bec Bunsen -Perforatrice | <ul style="list-style-type: none"> -Béchers -Eprouvettes graduées -Pipettes graduées -Tubes à essai -Erlenmeyer -Entonnoir -Verre de montre -Flacons en verres -Pipettes pasteur - Fioles jaugées - Ballons - Ampoule à décanter - Boîtes de Petri en verre |
| Produits utilisés | Autres |
| <ul style="list-style-type: none"> - Chloroforme - Ethanol - Méthanol - Dichlorométhane | <ul style="list-style-type: none"> - Barreau magnétique -Spatule -Pipeteur -Pissette -Papier filtre -Pince en métal |

| | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">- Hexane- Acétone- Acide chloridrique (HCl)- Réactif du follin-ciocalteu- Bicarbonate de sodium- Tri chlorure d'aluminium (AlCl₃)- Hydroxyde de sodium (NaOH)- Nitrite de sodium (NaNO₂)- Eau distillée- Acide acétique glacial- Acide Formique- Vanilline- Acide sulfurique- Pastille de l'eau de javel- Eau physiologie | <ul style="list-style-type: none">-Anse de platine-Boîtes pétries-Micropipette-Seringue-Ecouvillon |
|---|--|

A noter que la composition des milieux de cultures est donnée dans **l'annexe A1**.

II.4. Méthodologie expérimentale

II.4.1. Protocole expérimental

Les différentes étapes de l'étude d'extraction, physicochimique et microbiologique sont résumées dans (figure II.2).

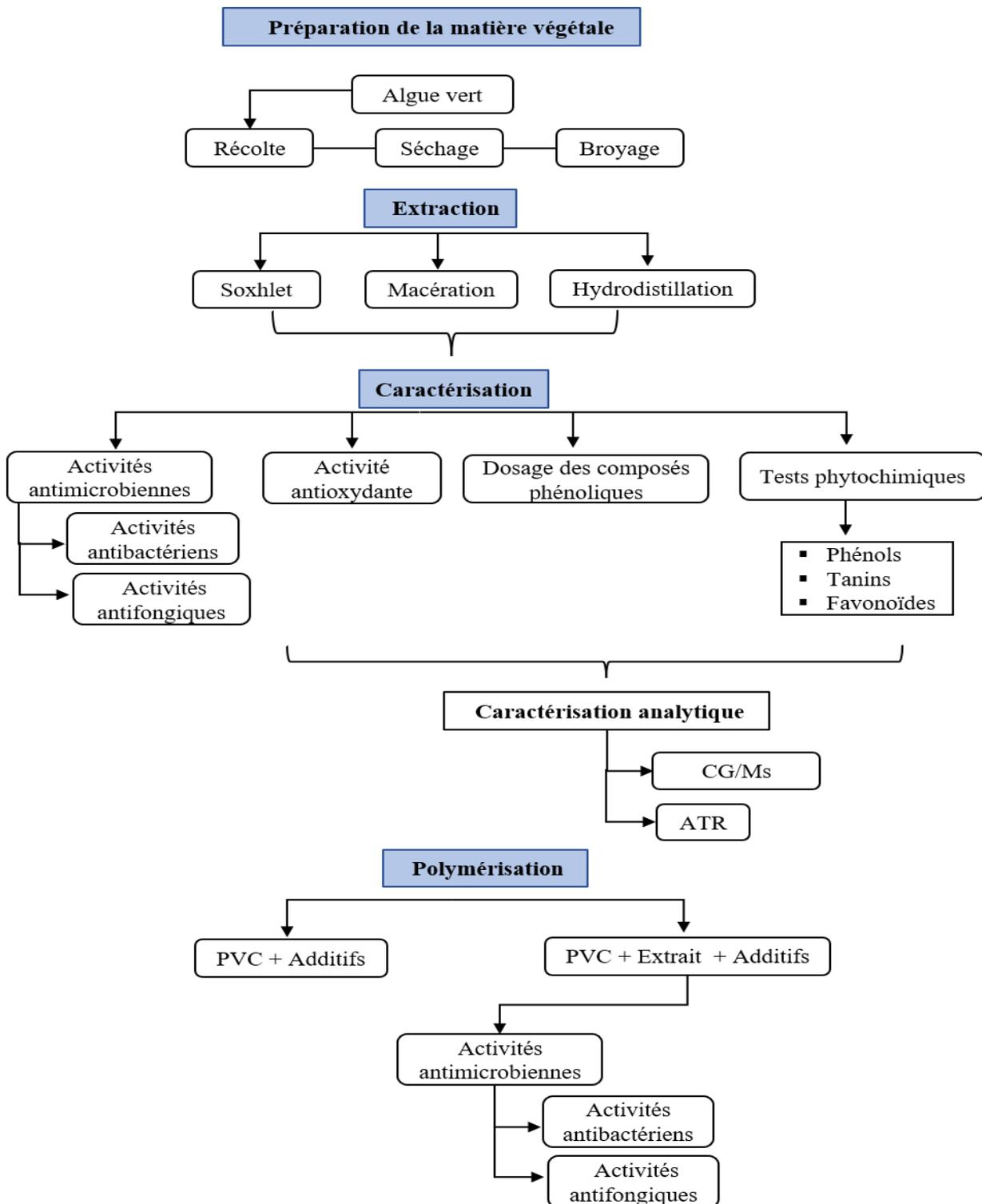


Figure II. 2: Organigramme récapitulatif de la démarche expérimentale.

II.4.2. Préparation d'extrait d'algue

II.4.2.1. Procédés d'extraction

Trois procédés d'extraction ont été utilisés :

II.4.2.1.1. Extraction par Soxhlet

L'extraction par Soxhlet est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première. Dans cette étude, l'extraction par Soxhlet a été utilisée pour extraire l'extrait d'algue vert (**Penchev, 2010**).

Le schéma d'un appareil Soxhlet est représenté dans la (**Figure II. 3**), il est composé d'un corps en verre, dans lequel est placée une cartouche en cellulose, d'un tube siphon et d'un tube de distillation. Dans le montage, l'extraction est placée sur un ballon contenant le solvant d'extraction. Le ballon est chauffé afin de pouvoir faire bouillir son contenu. La cartouche contenant le solide (algue verte) à extraire est insérée dans l'extracteur, au-dessus duquel est placé un réfrigérant servant à liquéfier les vapeurs du solvant (**Penchev, 2010**).

Le ballon étant chauffé, le liquide est amené à l'ébullition, les vapeurs du solvant passent par le tube de distillation en rentrant dans le réfrigérant pour être liquéfiées. Ensuite, le condensat retombe dans le corps de l'extracteur sur la cartouche, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'au niveau du sommet du tube-siphon, suivi par retour dans le ballon du liquide de l'extracteur accompagné de substances extraites. Ainsi le solvant dans le ballon s'enrichit progressivement en composants solubles. L'extraction continue jusqu'à l'épuisement de la matière solide chargée dans la cartouche (**Penchev, 2010**).



Figure II. 3 : Dispositif expérimental d'extraction par soxhlet (prise par nous-même).

La séparation du solvant de l'extrait est faite à l'aide d'un rota vapeur (**Figure II.4**). Dans cet appareil, on réalise une évaporation sous vide en utilisant une pompe à vide avec une vanne de contrôle. Pendant l'évaporation, le ballon est mis en rotation et plongé dans un bain liquide chauffé. L'appareil est muni d'un réfrigérant avec un ballon-collecteur de condensat. La rotation du ballon crée une surface d'échange plus grande et renouvelée permettant donc d'effectuer une évaporation rapide (**Penchev, 2010**).



Figure II. 4 : Rota vapeur (prise par nous-mêmes).

II.4.2.1.1. Détermination du rendement d'extraction par soxhlet

La détermination du rendement de l'extrait sec est réalisée en appliquant la formule suivante (**vuong et al., 2013**), exprimé en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse de l'algue fraîche.

$$\text{Rd (\%)} = (\text{P1}-\text{P2}/\text{P3}) \times 100$$

P1 : poids du ballon après évaporation

P2 : poids du ballon vide

P3 : poids de la matière sèche algale

II.4.2.1.2. Extraction par hydrodistillation

Dans le processus d'hydrodistillation, les matières végétales initialement collectées sont chargées dans le compartiment du distillateur. Ensuite, la quantité adéquate d'eau ou de règles spécifiques est ajoutée au récipient, suivie soit d'une ébullition, soit d'une interposition de vapeur directe sur le matériel végétal directement et le processus se déroule après liquéfaction des vapeurs dans un condenseur. Cette introduction de menstruations bouillies conduit à des facteurs importants pour éliminer les composés bioactifs des tissus végétaux. Après avoir condensé le mélange de matière végétale et de solvant dans le condenseur, les huiles essentielles

et les phytoconstituants sont collectés dans la chambre de séparation. Le processus d'hydrodistillation dépend du temps du matériel végétal traité (Prusty, 2022).



Figure II. 5: Dispositif expérimental d'extraction par hydrodistillation (prise par nous-mêmes).

II.4.2.1.3. Extraction par macération

La macération est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs (figure II.6). Cette méthode peut être réalisée à température ambiante ou en utilisant une chaleur (Lagnika, 2005).

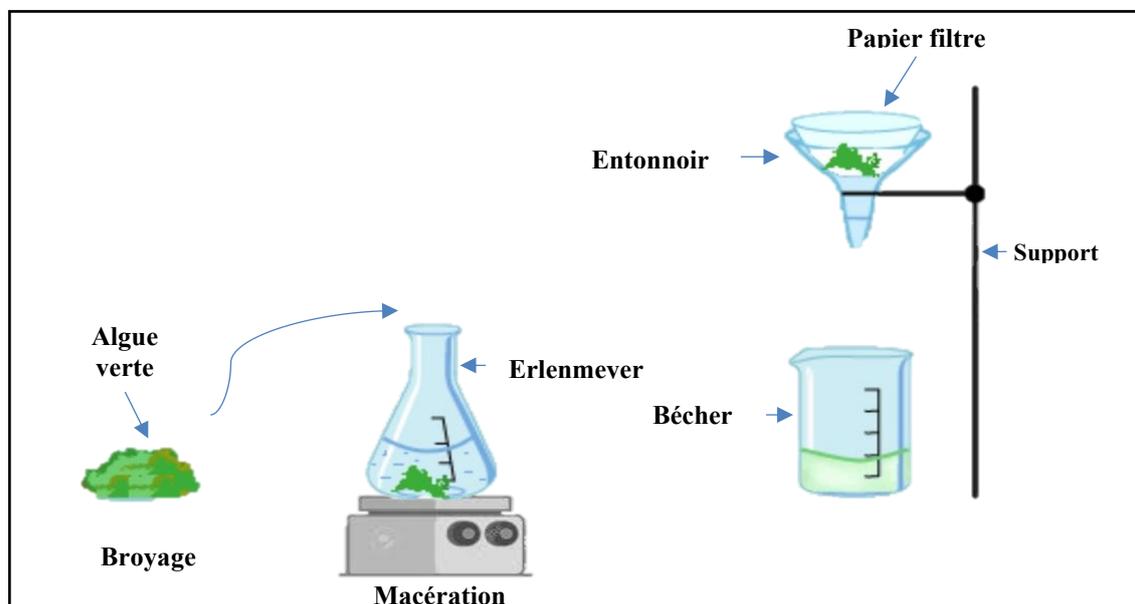


Figure II. 6: Schéma récapitulatif de macération.

Le tableau II.3 illustre les procédés, quantités et les conditions d'extraction.

Tableau II. 3 : Différents procédés d'extraction.

| Procédés d'extraction | Quantité d'échantillon | Volume de solvant | Solvant utilisé | Température |
|-----------------------|------------------------|-------------------|-----------------|-------------|
| Soxhlet | 15 g | 150 ml | Chloroforme | 61°C |
| | | | Dichlorométhane | 40°C |
| | | | Hexane | 69°C |
| | | | Acétone | 56°C |
| Hydrodistillation | 15 g | 300 ml | Eau | 100°C |
| Macération à chaud | 10 g | 100 ml | Méthanol 70% | 65°C |
| | | | Méthanol 50% | |
| | | | Méthanol 30% | |
| | | | Méthanol 90% | |
| | | | Éthanol 90 % | 79°C |

II.4.3. Détermination du rendement d'extraction

C'est le rapport entre la masse de l'extrait obtenu après l'évaporation du solvant et la masse de la matière végétale sèche (**Boudjema et al., 2022**). Est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rd (\%)} = (\text{M}_{\text{ext}} / \text{M}_{\text{mvs}}) \times 100$$

Où ; Rd : Rendement (%), M_{ext} : Masse de l'extrait sec (g), M_{mvs} : Masse de la matière végétale sèche (g).

II.4.4. Test phytochimique (screening phytochimique)

Ce test permet une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation en utilisant des réactifs spécifiques (**Boudjema et al., 2022**).

➤ phénols

25 μ l FeCl₃ (2%) est ajouté à 0.5 ml de l'extrait dilué. La présence des phénols est indiquée par l'apparition de couleur bleu ou vert (**Hussen et Al Ali, 2015**).

➤ Flavonoïdes

0,5 ml de chaque extrait a été mélangé avec un volume de 0,2 ml de la solution de NaOH à 10 %. La présence des flavonoïdes est indiquée par la formation d'une couleur rouge brique (**Madike et al., 2017**).

➤ **Tanins**

2 ml de l'extrait dilué est mélangé avec 100 μ l de FeCl₃ (1%). L'apparition d'une coloration bleu-vert (tanins galliques), vert foncé (tanins cathéchiqes) (**EL-Haoud et al., 2018**).

➤ **Saponosides**

10 ml de l'extrait total aqueux ont été versés dans un tube à essai ; agité pendant 15 s a été laissé au repos durant 15 min. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides (**Bammou et al., 2015**).

➤ **Acides aminés**

50 μ l d'extrait dilué est mélangé avec 1 ml ninhydrine (0.1%) préparée dans l'éthanol. Le mélange est chauffé dans le bain marie. La présence des aminoacides est indiquée par l'apparition d'une couleur violette (**Harborne, 1998**).

II.4.5. Dosages des composés phénoliques

II.4.5.1. Dosages des polyphénols totaux

Selon la procédure définie par (**Mujic et al., 2009**), la méthode du réactif de Folin-Ciocalteu a été utilisée pour estimer la teneur totale en composés phénoliques. Des concentrations variables (0.5 ml) de chaque extrait ont été mélangées avec 2.5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué à 1/10 dans l'eau) et 1 ml de solution de carbonate de sodium (20%). Le mélange a ensuite été incubé à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 30 min. L'absorbance de la solution obtenue a été mesurée à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Visible (JENWAY, UV-7205). Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalent acide gallique (EAG) par gramme d'extrait (mg EAG/g).

II.4.6. Evaluation de l'activité antioxydante d'extrait d'algue verte

II.4.6.1. Principe de la méthode DPPH

Le DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable qui absorbe à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires, le DPPH de couleur violette se réduit en 2,2 Diphényl-1-picryl hydrazine de couleur jaune (**figure II.7**) (**Maataoui et al., 2006**).

L'absorbance mesurée à 517 nm serve à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (Parejo *et al.*, 2002).

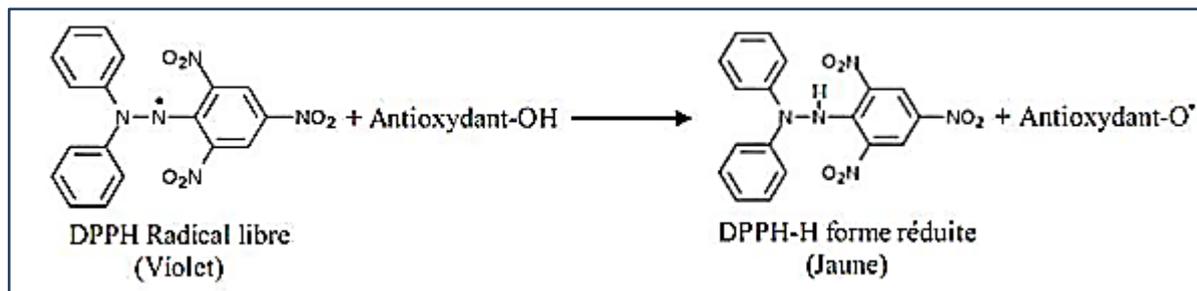


Figure II. 7: Forme libre et réduite du DPPH.

II.4.6.2. Mode opératoire

L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par (Benariba *et al.*, 2013).

- Préparation du DPPH à la concentration de 0,025 mg /ml dans du méthanol,
- Préparation des extraits dans l'eau distillée à différentes concentrations (20, 40, 60, 80, 100, 200 et 250 mg/ml) ;
- A 1950 µl de la solution du DPPH on ajoute 50 µl pour chaque extrait à différentes concentrations ;
- Préparation du tube blanc pour chaque concentration : 1950 µl du méthanol et 50 µl de chaque extrait correspondant ;
- Préparation du tube contrôle négatif : 50µl du méthanol avec 1950 µl de la solution du DPPH,
- Le tube blanc renferme 2 ml du méthanol,
- Incubation 30 min à température ambiante et à l'obscurité,
- Mesure de l'absorbance à 517 nm.

L'acide ascorbique utilisé comme contrôle positif est testé selon le même mode opératoire à différentes concentrations. Les tests sont réalisés en triplicata.

- **Expression des résultats**

Le calcul des pourcentages d'inhibition se fait par la formule suivante :

$$I \% = ((Ac - At) / Ac) \times 100$$

Ac : absorbance du contrôle négatif

At : absorbance de l'extrait

II.4.6.3. Détermination IC50

La valeur IC50 est la concentration qui assure la réduction de 50% du DPPH, déterminée graphiquement pour chaque extrait à partir de la courbe du pourcentage de réduction en fonction de la concentration (Samartha et al., 2008).

II.4.7. Techniques d'analyses utilisées

II.4.7.1. Spectroscopie Infrarouge (ATR)

Cette technique a été utilisée dans le but d'identifier et de quantifier les espèces contenues dans l'algue verte. Pour se faire, on s'est basé sur les conditions opératoires optimales déterminées par M.O. Boussoum, pour l'analyse du plastifiant à savoir : le type d'injection à adopter, le choix de l'étalon ainsi que la détermination du solvant d'extraction.

Cette technique a été utilisée dans le but d'effectuer une étude qualitative en identifiant les groupements fonctionnels de notre algue. A noter que la poudre de notre échantillon est analysée directement.

Le spectromètre utilisé est de marque **SMART, TR Nicolet 6700 FT-IR** relié à un ordinateur avec lequel les différents traitements informatiques ont été réalisés. Les conditions opératoires sont :

- Résolution : 2 cm^{-1}
- Nombre de scans : 40
- Domaine de fréquence ($4000\text{-}650 \text{ cm}^{-1}$)



Figure II. 8: Spectroscopie ATR

II.4.7.2. Chromatographie gazeuse couplée à spectrométrie de masse (GC/ MS)

L'analyse GC-MS (**figure II .9**) est réalisée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse de type PERKIN ELMER CLARUS 680, couplé à un spectromètre de masse de type PERKIN ELMER CLARUS SQ8, un ensemble piloté par le logiciel Turbo Mass v.6.1 et disposant d'une base de données NIST MS Search 2.0 de 2011.

Avant injection, les échantillons sont dérivés afin de faciliter la détection de tous les composés présents. Pour cela, 2 mg d'extractibles sont solubilisés avec 50 µl de BSTFA (un agent de silylation) dans un pilulier de 2 ml. Cette préparation est placée pendant 120 min, pilulier fermé, dans une étuve à 70 °C, pour permettre la réaction de l'agent de dérivation sur les extractibles. Le pilulier est ensuite ouvert pour laisser s'évaporer le BSTFA. 1 ml d'acétate d'éthyle est enfin ajouté dans le pilulier pour solubiliser les extractibles silylés, puis 1 µl de cette dernière solution est injectée en mode splitless dans la GC, via un injecteur chauffé à 250 °C.

La séparation chromatographique est réalisée avec une phase stationnaire DB-5MS (diméthyl-/ diphényl-polysiloxane 95%/5% ; longueur : 30 m ; diamètre interne : 0.25 mm ; épaisseur du film : 0.25 µm) avec un programme de température de four de 40 min, comprenant un palier de 2 min à 80 °C, une montée à 10 °C.min⁻¹ jusqu'à 190 °C, une montée à 15°C.min⁻¹ jusqu'à 280 °C, température maintenue ensuite pendant 10 min et enfin un dernier palier à 300 °C atteint à 10 °C.min⁻¹ et maintenu 14 min et une phase mobile constituée d'Hélium à 1 ml/min.

Après séparation, les composés sont envoyés dans le spectromètre de masse via une ligne de transfert thermostatée à 250 °C puis ionisés à 70eV.



Figure II. 9: Appareil de GC-MS

II.4.8. Evaluation de l'activité antimicrobienne d'extrait d'algue verte

II.4.8.1. Activité antibactérienne

Afin de déterminer l'efficacité antibactérienne de l'extrait d'algue verte contre les germes pathogènes, nous avons utilisé (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Bacillus subtilis* (ATCC6633) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027)). Ces bactéries sont connues pour contaminer les denrées alimentaires et être à l'origine de diverses infections.

II.4.8.1.1. Antibiogrammes

Dans cette étude, une méthode de diffusion en gélose a été utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne de *caulerpa prolifera* et celle d'un agent antimicrobien synthétique. Cette méthode est basée sur le fait qu'un antibiotique déposé sur une gélose ensemencée va diffuser suivant un gradient de concentration (**Djamel Eddine, 2010**).

➤ Milieu de culture

Le milieu standardisé utilisé est le milieu de Mueller-Hinton. Couler 25ml de gélose dans une boîte de pétri de 90cm de diamètre.

➤ Inoculum

Standardiser les inocula à 0.5 Mac Farland 10^8 bactéries par ml, elle doit présenter une D.O. de 0,08 à 0,13 dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 625nm.

➤ Ensemencement

Par écouvillonnage, tremper l'écouvillon dans la suspension et l'essorer sur les bords. Ensemencer la boîte en frottant délicatement l'écouvillon sur la gélose. Tourner la boîte de façon à croiser les stries Le séchage est inutile.

➤ Disques / puits

Dépôt de 25 μ L de l'extrait dans les disques, reposer 10 min, puis placer dans les boîtes qui contiennent la gélose et la suspension bactérienne.

Ajouter 25 μ L d'extrait dans chaque puit des boîtes de pétri.

Les tests sont répétés trois fois.

➤ Incubation

Mettre les boîtes dans un incubateur à 37 °C pendant 24 h.

➤ Lecture

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque et chaque puit à l'aide d'un pied à coulisse. Les résultats sont exprimés par le diamètre

de la zone d'inhibition et peuvent être symbolisés par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis d'HE et d'extraits (**Ponce et al., 2003**).

- Non sensible (-) ou résistant : diamètre < 8 mm
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 et 14 mm
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 et 19 mm
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm

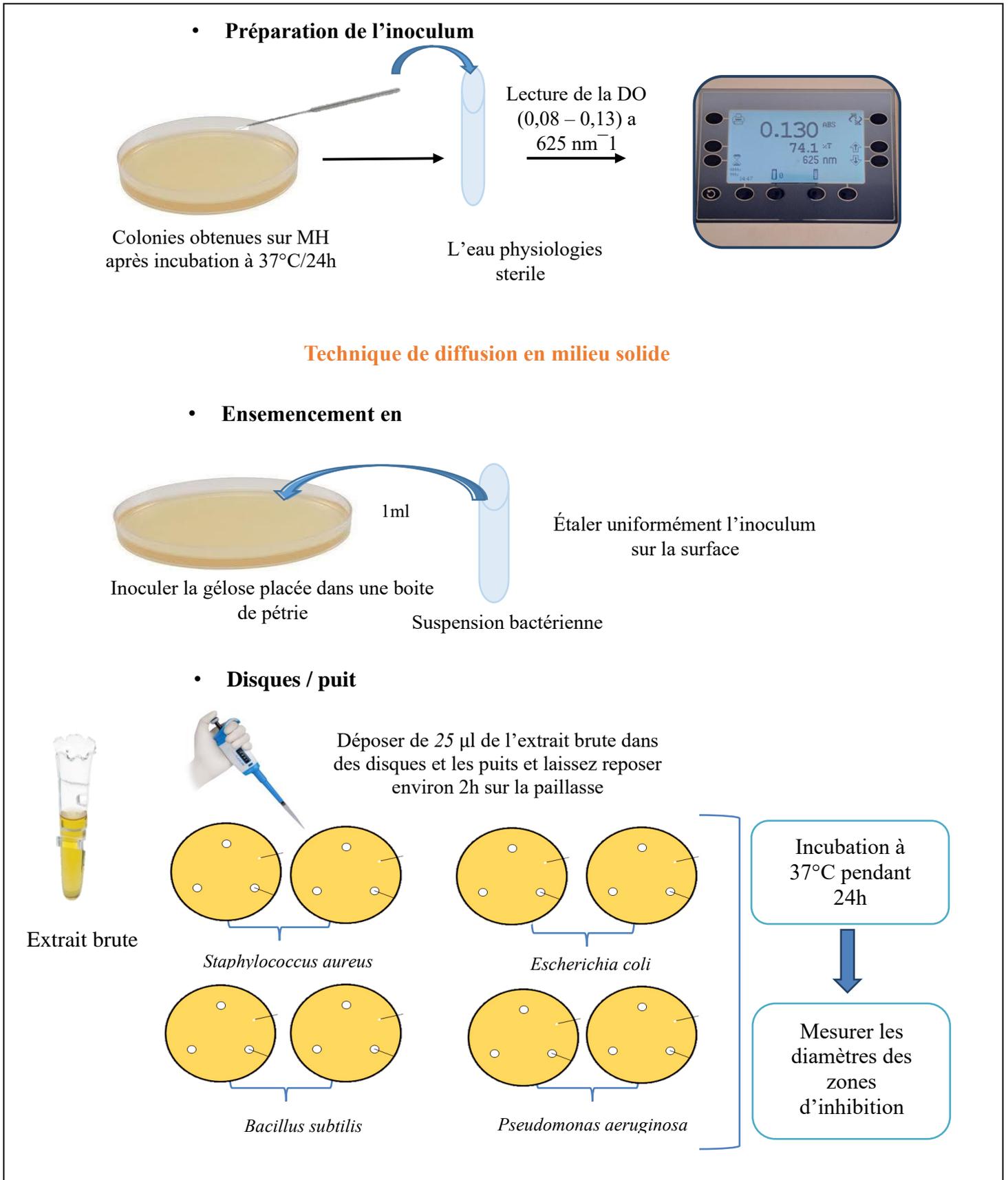


Figure II. 10: Schéma récapitulatif de la méthode de diffusion par disques/ puits de l'extrait brut d'algue vert.

II.4.8.2. Activité antifongique

➤ Levures

A noter que les mêmes étapes ont été faites avec un changement de germes utilisés par des levures (*Candida albicans* ATCC 10231 (CA2), *Candida albicans* ATCC 10237 (M3)), et de milieu de culture par Sabouraud gélose (SAB).

II.4.9. Préparation des films par polymérisation

II.4.9.1. Produits utilisés

Les produits utilisés dans le cadre de cette étude sont présentés dans le **tableau II 1**.

Tableau II. 4: Résine et additifs utilisés

| Produit | Nature | Formule chimique | Aspect | Fournisseur | Nom commercial |
|-------------------------|------------------------|------------------------------|-------------------------|--|-----------------|
| Résine | Polychlorure de vinyle | $-(CH_2-CHCl)_n-$ | Poudre blanche | CIRES du Portugal | PVC |
| Plastifiant | Di-octyl phtalate | $C_6H_4 [COO(CH_2)_7CH_3]_2$ | Liquide huileux limpide | Société Générale des Plastifiants de Tunisie (SGP) | DOP |
| Lubrifiant | Acide stéarique | $CH_3(CH_2)_{16}COOH$ | Ecailles blanches | SO.G.I.S.SPA (Italie) | Stéarine J05 |
| Stabilisants thermiques | Complexe Ca, Zn | / | Poudre Blanche | IACN (Italie) | REAPAK BCV/3037 |

II.4.9.2. Préparation des films

La résine et les additifs (**Tableau II.4**) sont mélangés dans le méthanol qui est par la suite éliminé par évaporation dans une étuve à 60 °C (**Boussoum, 2012**).

Le mélange ainsi obtenu, parfaitement homogène, est introduit dans un mélangeur à deux cylindres rotatifs, chauffés à 135°C pendant 15 à 20 minutes (**Boussoum, 2012**).

Le mélange gélifié est ensuite placé entre deux plateaux (presse de table FONTIJNE) à 170°C sous une pression de 300 KN pendant 5 minutes afin d'obtenir l'épaisseur désirée (2,0 0,1) mm (**Boussoum, 2012**).

Tableau II. 5: Formulations réalisées (les teneurs sont exprimées en grammes pour 100 de PVC).

| | F1 | F2 | F3 | F4 |
|-----------------------|------|------|-------|-------|
| PVS | 100 | 100 | 100 | 100 |
| DOP | 40 | 40 | 0 | 0 |
| HSE | 10 | 10 | 10 | 0 |
| Complexe Ca, Zn | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Acide stearique | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Agent antimicrobienne | 1.89 | 0 | 0 | 0 |
| Extrait d'algue vert | 0 | 1.89 | 41.89 | 51.89 |

II.4.9. 3. Évaluation de l'activité antimicrobienne de film

II.4.9.3.1. Activité antibactérienne

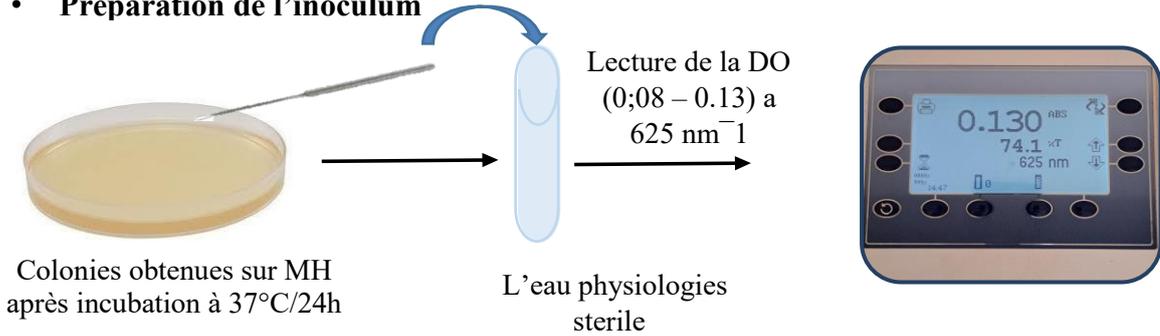
L'effet antibactérien des échantillons a été déterminé en utilisant la méthode de diffusion sur disque et la méthode des puits. Pour la méthode de diffusion sur disque, le film a été découpé en disques de 16 mm de diamètre à l'aide d'une perforatrice et déposé sur des milieux de culture gélosés Mueller-Hinton préalablementensemencés en surface avec un inoculum bactérien de 10^8 à 10^{10} UFC. L'effet antibactérien a été testé sur deux bactéries Gram-positives, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633, ainsi que sur deux bactéries Gram-négatives, *Escherichia coli* ATCC 8739 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Pour la méthode des puits, un puits de 8 mm de diamètre a été réalisé dans la gélose ensemencée avec une micropipette. Un volume de 86 μ L de FB, correspondant à la quantité de FB présente dans la surface du film testé (16 mm), a été introduit dans chaque puits. Les boîtes de gélose ont été incubées à 37 ± 1 °C pendant 24 heures. Le diamètre des zones d'inhibition autour des disques de film et des puits a été mesuré avec un pied à coulisse numérique (IHM). Chaque expérience a été réalisée en triplicat pour chaque film (Baghi et al., 2023).

II.4.9.3.2. Activité antifongique**➤ Levures**

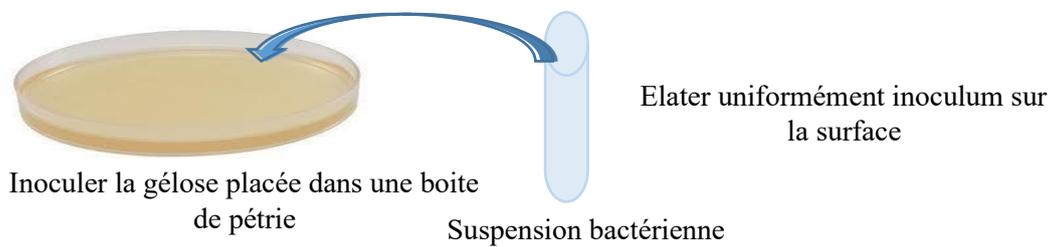
A noter que les mêmes étapes ont été faites avec un changement de germes utilisés par des levures (*Candida albicans* ATCC 10231 (CA2), *Candida albicans* ATCC 10237 (M3)), et de milieu de culture par Sabouraud gélose (SAB).

• Préparation de l'inoculum



Technique de diffusion en milieu solide

• Ensemencement en surface



• Préparation des films

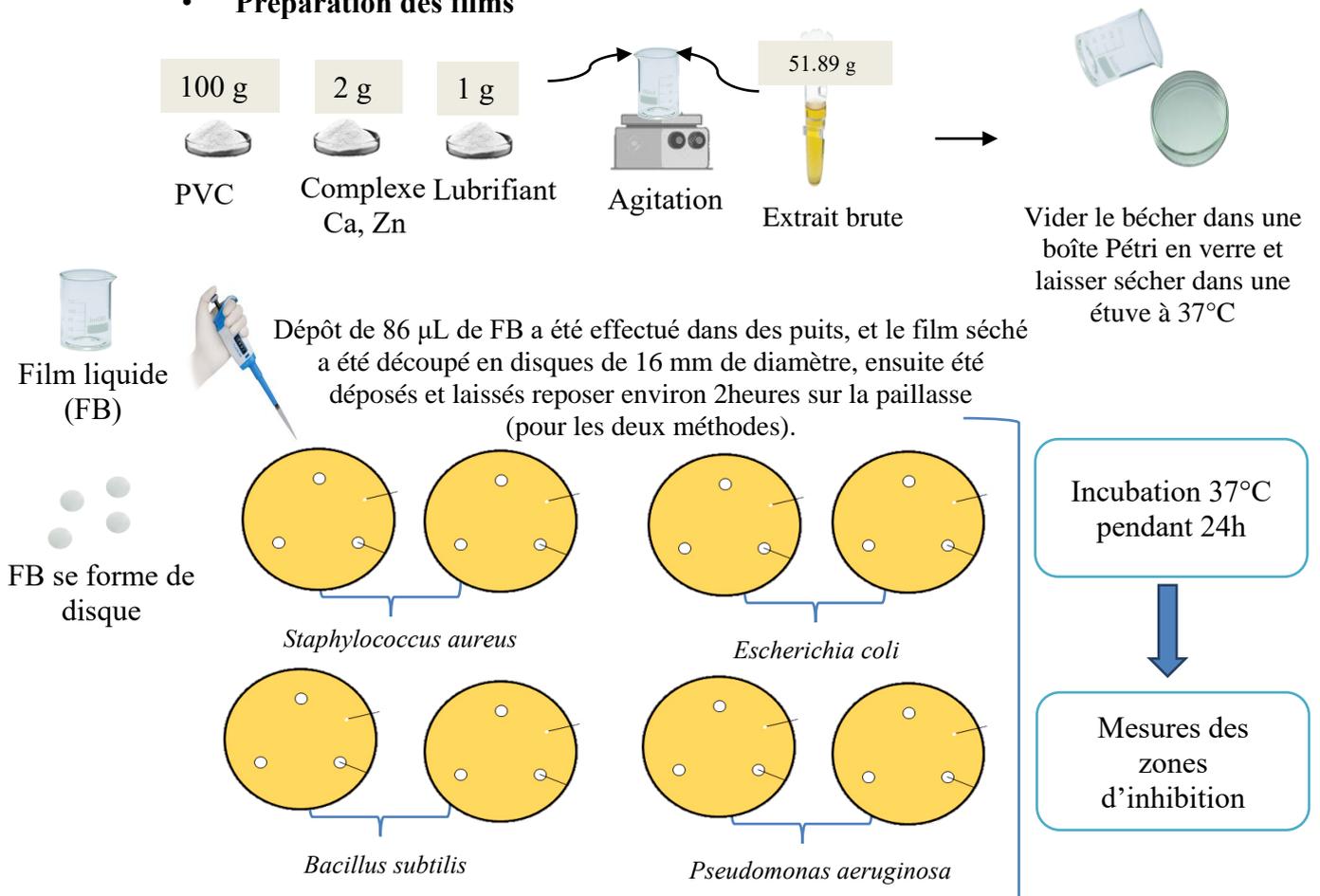


Figure II. 11: Schéma récapitulatif de la méthode de diffusion par disques/ puits de film biologique.

Chapitre III

RESULTAS ET DISCUSSION

Dans ce chapitre, nous sommes intéressés à la caractérisation des extraits de l'algue verte *Caulerpa prolifera*. Nous avons également effectué une étude comparative des solvants et des procédés d'extraction des extractibles dans le but de déterminer les conditions opératoires requises pour une extraction maximale des polyphénols. Enfin, l'identification des composés présents dans les extractibles sont effectués, et ce en se basant sur différentes méthodes d'analyse, à savoir, l'*Infrarouge* (ATR) et la chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse (CG/SM).

III.1. Rendement d'extraction

III.1.1. Procédé de soxhlet ;

Les rendements d'extraction par le procédé de soxhlet obtenus pour chaque solvant utilisé, à savoir, l'acétone, le chloroforme, l'hexane et le dichlorométhane sont représentés dans la figures III.1 sachant que pour chaque solvant, la température d'extraction appliquée correspond à sa température d'ébullition.

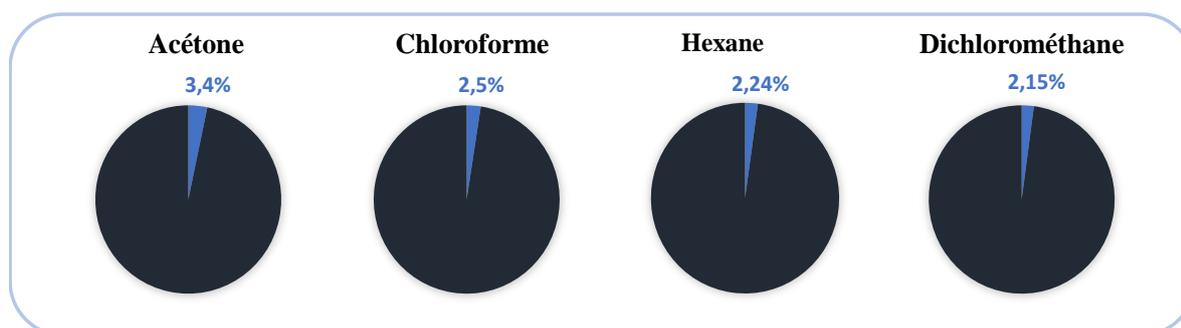


Figure III. 1: Rendements d'extraction par soxhlet

Il ressort à travers l'observation des rendements d'extraction, de la **figure III.1** que l'acétone donne le meilleur rendement d'extraction qui est de l'ordre de 3,4% alors que le chloroforme, l'hexane et le dichlorométhane donnent des rendements moyens qui se maintient dans une fourchette de 2.5 à 2.15%. Ces valeurs dévoilent un léger gradient décroissant de solvant à un autre. L'acétone est responsable d'un pouvoir extracteur élevé par rapport à d'autres solvants et permet une meilleure extraction, ce qui témoigne que le rendement d'extraction chimique varie en fonction du type de solvant, qui fluctue en fonction de la polarité, du pH, du temps et de la température d'extraction, ainsi que de la composition chimique de l'échantillon (Rico, 2011).

De plus, l'étude de **Safari et al., 2015** montre que l'acétone est un solvant très efficace et constitue le meilleur choix pour l'extraction des composés des tissus végétaux. Par ailleurs, d'après les travaux de **Tian 2009**, les solvants apolaires sont recommandés pour récupérer les acides aminés de haut poids moléculaire.

Par contre, les travaux conduits par **Khettaoui, 2016 ; Arham, 2016** ont trouvé des rendements d'extraction par l'acétone, respectivement, de 13,2 % et de 14,32%. Ces différences peuvent être expliquées par l'influence de l'espèce d'algue étudiée, les conditions expérimentales d'extraction (la température ; la granulométrie de la matrice et etc...), la saison de la récolte et le climat de la région (**Arham, 2016**).

III.1.2. Procédé de macération

Les résultats de l'extraction par la méthode de macération avec les différents solvants utilisés avec des concentrations différentes, à savoir, eau/méthanol (70 :30 ; v/v), eau/méthanol (50 : 50 ; v/v), eau/méthanol (30 : 70 ; v/v), eau/méthanol (10 : 90 ; v/v) et eau/éthanol (10 : 90 ; v/v), sont présentés dans le (**Tableau III.1**).

A noter que la variation de la concentration de mélange eau/éthanol n'a pas été faite à cause de manque de réactif.

Tableau III. 1: Rendement d'extraction par les différents solvants utilisés.

| Solvants Utilisés | Rendement (%) |
|---------------------|---------------|
| Eau/ méthanol (30%) | 26,4 |
| Eau/ méthanol (50%) | 18,2 |
| Eau/ méthanol (70%) | 29,8 |
| Eau/ méthanol (90%) | 29,4 |
| Eau/ éthanol (90%) | 16,1 |

Il ressort à travers l'observation des rendements d'extraction, dans le **tableau III. 1** qu'eau/ méthanol (70%) donne le meilleur rendement d'extraction qui est de l'ordre de 29,8 % alors qu'eau/ méthanol (30%), eau/ méthanol (50%) et l'eau/ méthanol (90%) donnent des rendements moyens qui se maintient dans une fourchette de 18,2 à 29,4%. De plus eau/ éthanol (90%) avec une valeur de 16,1%. Ces valeurs dévoilent un léger gradient

décroissant de solvant à un autre. Ces résultats sont en concordance avec ceux trouvés par (Ben Abdallah et al., 2020) dont ils ont confirmé que le méthanol et l'éthanol restent les meilleurs solvants pour l'extraction des composés phénoliques en raison de leur polarité et de leur bonne solubilité pour ces composés. Il convient de souligner que la sélection de ces solvants a été effectuée en se basant sur les conclusions de diverses études antérieures démontrant une augmentation significative du rendement d'extraction lors de l'utilisation d'éthanol aqueux ou de méthanol aqueux par rapport aux solvants organiques purs (**Kherraf, 2018; Chaouche, 2014**), Il a justifié ce phénomène en expliquant que la présence d'eau perturbe les parois cellulaires, ce qui facilite la pénétration profonde dans la matrice cellulaire. Par conséquent, le solvant sera en contact avec une plus grande quantité de soluté, favorisant ainsi un rendement d'extraction optimal.

III.1.3. Procédé d'hydrodistillation

Le rendement en huile végétale obtenu dans le cadre de notre étude est de 0,6% de matière sèche (**figure III.2**) est très faible en comparaison avec le résultat reporté par **Boubekri, 2012** dont l'espèce étudiée est de *Ulva lactuca* (10.76%). Cette différence peut être expliquée par la méthode de récolte qui peut modifier la teneur en lipides. Il est donc nécessaire d'étudier attentivement le moment de la récolte afin d'obtenir une concentration élevée en lipides. De plus, les molécules de la plante sont également sensibles à la conservation, tout comme les lipides. Il est donc possible que la réduction de la teneur en lipides soit due à une mauvaise conservation. Ainsi, les teneurs en lipides varient selon les espèces, la localisation géographique, la saison, la température, la salinité, l'intensité lumineuse, ainsi que l'interaction entre ces facteurs, et enfin la méthode d'extraction utilisée (**Angèle, 2022**)

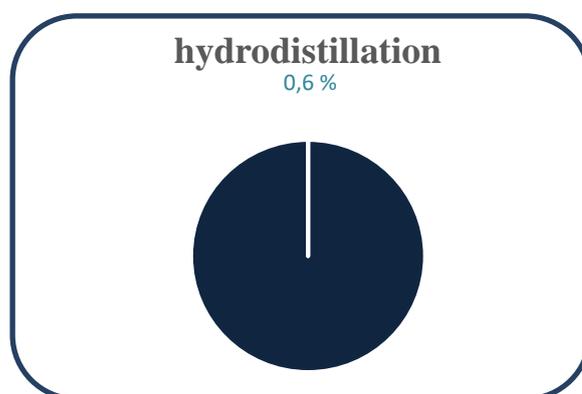
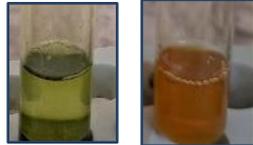
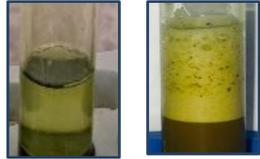
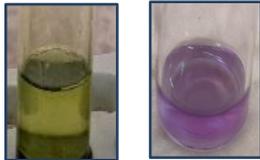


Figure III. 2: Rendement d'extraction par d'hydrodistillation

III.2. Test phytochimique (screening phytochimique)

Les résultats des tests phytochimiques effectués sur l'extrait d'algue verte *caulerpa prolifera* sont représentés dans le **tableau III.2**.

Tableau III. 2 : Criblage phytochimique.

| Substances testées | Résultats | Observation |
|--------------------|-----------|---|
| Phénols | + |  |
| Flavonoïdes | + |  |
| Tanins | - |  |
| Saponosides | + |  |
| Acides aminés | + |  |

Les analyses phytochimiques d'extrait d'algue verte *caulerpa prolifera* ont révélé la présence de phénols, de saponosides, de flavonoïdes et des acides aminés, tandis que les dérivés tels que les tanins ont donné des résultats négatifs. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Amsler and Fairhead, 2005** qui ont mis en évidence que les algues brunes et vertes contiennent une variété de composés phénoliques qui contribuent à leur résistance environnementale et **López et al., 2011 ; Yaich et al., 2011** ont montré que les flavonoïdes, les saponosides et les acides aminés sont principalement présents dans les algues vertes, rouges et

brunes. De même, les tanins sont plus communément associés aux plantes terrestres et moins aux algues marines, comme le démontrent les travaux de Kirke *et al.*, 2019.

III.3. Dosage des polyphénols totaux

Les résultats obtenus sont représentés dans l'histogramme ci-déçus

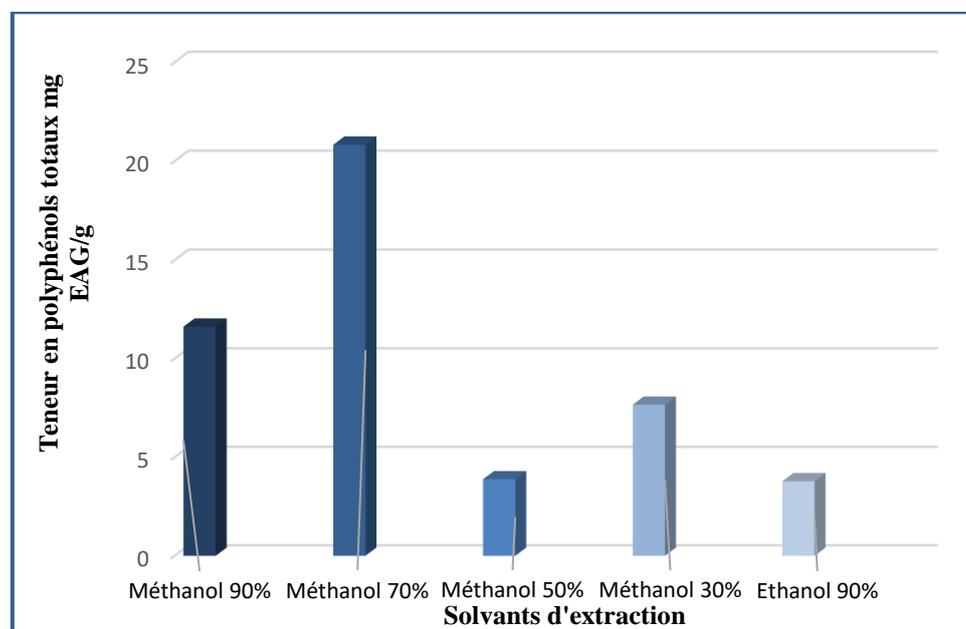


Figure III. 3: Teneurs des polyphénols (mg EAG/g)

D'après les résultats illustrés sur la **figure III.3**, les extraits de *Caulerpa prolifera* montrent des teneurs variables en polyphénols totaux **Figure III.3**. L'extrait méthanoïque à 70% présente la teneur la plus élevée, avec une concentration moyenne de $20,83 \pm 0,82$ mg EAG/g, tandis que celles de 90%, 30% et 50% montrent des rendements plus faibles, avec des valeurs respectives de $11,63 \pm 1,49$ mg EAG/g, $7,66 \pm 0,53$ mg EAG/g et $3,88 \pm 0,05$ mg EAG/g ; par contre l'extrait éthanoïque à 90% présente une teneur extrêmement faible de $3,78 \pm 1,8$ mg EAG/g, ces résultats sont en concordance avec ceux trouvés par Ben Abdallah *et al.*, 2020.

III.4. Évaluation de l'activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant des différents extraits de l'algue verte *Caulerpa prolifera* est évalué par le test du piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).

Les résultats de l'effet antiradicalaire de la vitamine C et des différents extraits d'algue verte *Caulerpa prolifera* sur le DPPH sont représentés dans **Figure III 4**.

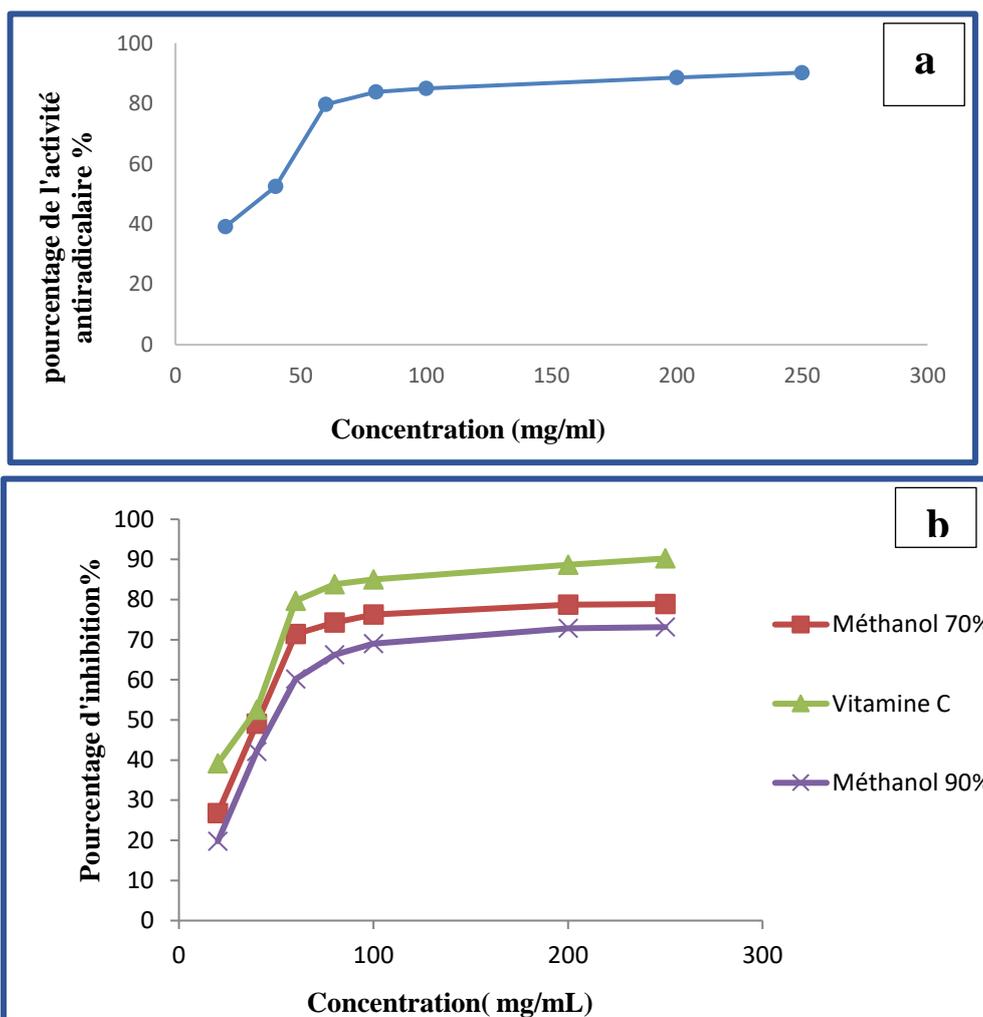


Figure III. 4 : a- Pourcentage d'inhibition du DPPH par l'acide ascorbique

Figure III. 5 : b- Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations.

Conformément aux données de la **figure III.4** et **III.5**, il est observé que plus la concentration de l'extrait augmente, plus le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente, entraînant ainsi une augmentation de l'activité anti-radicalaire.

Il ressort que le taux d'inhibition des radicaux libres des extraits d'algue est inférieur à celui de l'acide ascorbique, utilisé comme référence, pour toutes les concentrations utilisées ce qui est en accord avec les résultats de études antérieures de **Yedri et al., 2018** . À une concentration de 250 mg/mL, le taux d'inhibition de DPPH est de 78,89 % pour l'extrait méthanoïque à 70%, tandis que l'extrait méthanoïque à 90% est de 73,123 %. Ces pourcentages correspondent à une inhibition totale du DPPH, ce qui se traduit par un changement complet de couleur du violet au jaune pâle.

Pour comparer le pouvoir anti-radicalaire des extraits obtenues, nous avons calculé l'IC50. A noter que plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande (**Boudjema et al., 2022**). Les valeurs d'IC50 sont représentées dans **Figure III. 6**.

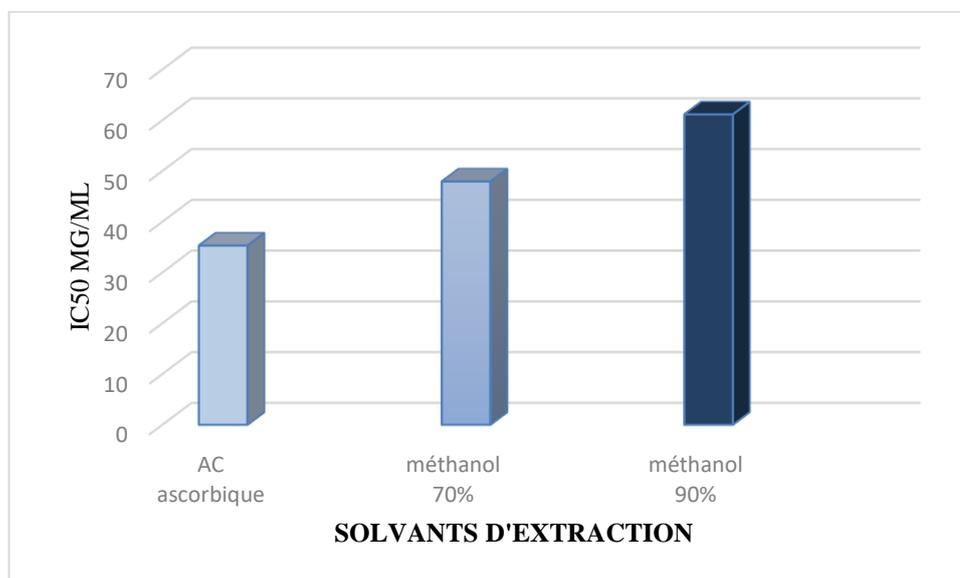


Figure III. 6: Valeurs d'IC50 des extraits testés et du standard (acide ascorbique).

D'après les résultats présentés dans la **figure III.6**, l'IC50 obtenue pour l'acide ascorbique est de 35,29mg/ml, utilisé comme molécule de référence, est inférieure à celles des autres extraits. La fraction méthanoïque (70%) a une activité scavenger du radical DPPH très puissante, un peu plus proche de celle enregistrée pour l'acide ascorbique.

D'après les résultats sus-cités ; il est clair que les différents extraits d'algue verte *Caulerpa prolifera* sont capables de piéger les radicaux libres DPPH de manière concentration-dépendante.

Nous avons également constaté que l'extrait méthanoïque (70%) est le plus actif, avec un taux d'inhibition maximal de l'ordre de 78,89%. La même fraction a enregistré la concentration la plus élevée en composé phénoliques, cela peut être lié à sa forte teneur en polyphénols qui peuvent servir comme donneurs d'électrons dans le milieu comme le montre l'étude de **Benariba et al., 2013**. De plus, les travaux de **Tiouane et al., 2018** pour l'extrait hydro-méthanoïque sur l'espèce *Padina pavonica* ont trouvé un pourcentage d'inhibition de 46,03% , ainsi par rapport à celle trouvée par **Kardache et al., 2016** pour l'algues marines vertes *Ulva lactuca* avec un pourcentage de 6,28% sur une concentration testée de 10 mg/mL.

Concernant la valeur d'IC50 de l'extrait méthanoïque (70%) est supérieur à celle du standard, néanmoins ce résultat reste satisfaisant. Ces valeurs sont différentes de celles signalées par **Chilla et al., 2018**, qui ont travaillé sur une autre espèce où ils ont trouvé une

valeur d'IC50 de l'ordre de 80,70 mg/mL, cette différence du pouvoir antioxydant est en forte corrélation avec la composition chimique des algues.

A travers ces résultats, notre espèce présente un pourcentage d'inhibition et une valeur d'IC50 plus important que les résultats cités, qui sont dues probablement à l'effet de l'espèce ainsi que des conditions climatiques et régionales du site d'échantillonnage, ce qui peut influencer l'activité antiradicalaire **Kardache et al., 2016**.

III. 5. Techniques d'analyses

III.5.1. Spectroscopie Infrarouge (ATR)

La spectroscopie ATR est réalisée dans le but d'effectuer une caractérisation qualitative et semi quantitative de la poudre de l'algue Ainsi, on a pu :

- Identifier les groupements fonctionnels constituant les espèces étudiées.
- Observer les modifications spectrales en fonction de la concentration des groupements fonctionnels dans les échantillons.

Généralement, on n'opère pas par interprétation directe des différentes bandes du spectre, mais par comparaison avec des spectres de référence des produits connus, en se basant toute fois sur quelques bandes caractéristiques que présente le spectre de l'échantillon à identifier. La **figures III.7** représente le spectre infrarouge de l'échantillon étudié et le **tableau III.3** regroupe les principales bandes caractéristiques de ce dernier d'après la littérature (**Galez,2011**).

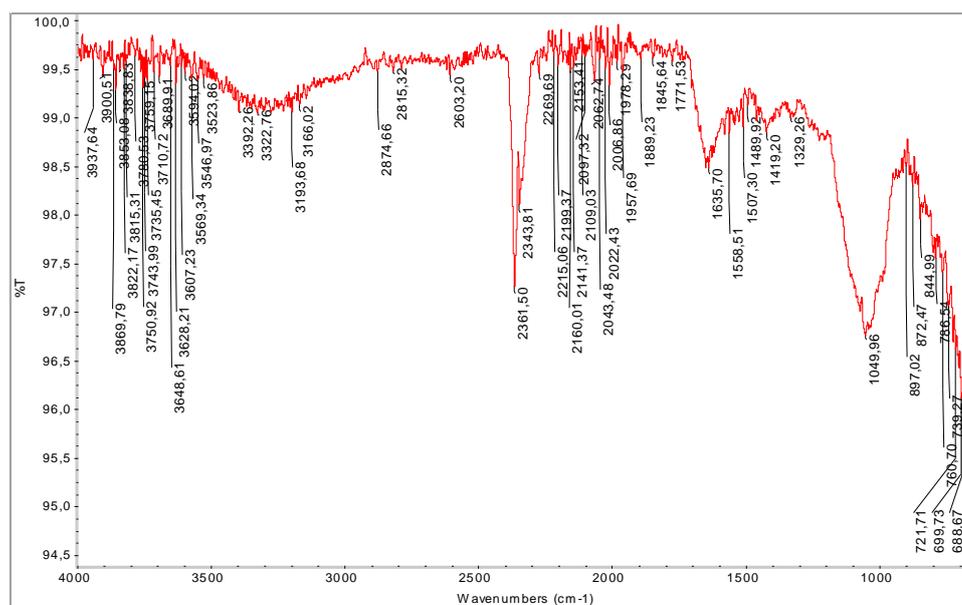


Figure III. 7 : Spectre IR d'algues vert *Caulerpa prolifera*.

Tableau III. 3 : Groupements fonctionnels des bandes caractéristiques d'algue.

| Nomre d'onde cm ⁻¹ | Groupement caractéristique |
|---|--|
| 3322,76- 3392,26 – 3523,86 – 3546,97 – 3594,02 – 3607,23 – 3628,21 – 3648,61 – 3689,91 | Vibration d'élongation O-H, N- H (amine), C=C-H, ≡C-H. |
| 2815,32 – 2874,66 – 3193,02 | Vibration d'élongation C-H (alcane, alcène), C-H, =C-H. |
| 2215,06 – 2269,69 – 2343,81 – 2361,50 | Vibration d'élongation C ≡ C (Alcyne) |
| 1771,53 | Vibration d'élongation C = O (ester) |
| 1600 - 1680 | Vibration d'élongation C= C (Acène) |
| 1000- 1300 | Vibration d'élongation C-O (Ester) |

Le spectre enregistré pour notre échantillon montre une série de bandes caractéristiques qui regroupent l'hydrogène, le carbone, l'oxygène et l'azote, ce qui montre leurs richesses en termes de matière organique, ce qui permet de dire que ce dernier présente le même profil similaire en composition que les produits naturels qui sont riches en éléments C, H, O, N dont la composition ne varie (et très peu) qu'en fonction des conditions de stockage.

III.5.2. Chromatographie gazeuse couplée à spectrométrie de masse (CG/ MS)

Nous avons cherché les conditions opératoires optimales pour l'analyse des antioxydants en nous basant sur la mesure des temps de rétention pour augmenter la sensibilité et la spécificité du système chromatographique choisi. De plus, nous avons effectué une analyse quantitative et qualitative par CG/MS de quinze échantillons issus de différents procédés d'extraction avec différents solvants. Les échantillons ayant subi l'extraction sont :

(Échantillon extrait par hexane, échantillon extrait par hexane suivi d'acétone, échantillon extrait par dichlorométhane, échantillon extrait par dichlorométhane suivi d'acétone, échantillon extrait par chloroforme, échantillon extrait par chloroforme suivi d'acétone, échantillon issue de résidu, échantillon issue de résidu suivi d'acétone, échantillon extrait par macération (eau/ méthanol 90%) et échantillon extrait par l'acétone)

L'analyse est basée sur une comparaison des pics et de temps de rétention des solutions standards avec les échantillons analysés ; pour calculer la concentration et le rendement d'extraction des antioxydants présent dans notre algue.

D'après les chromatogrammes, la présence des pics, montre la présence des antioxydants phénoliques, leur quantité dépend de la taille des pics.

Les résultats obtenus par l'analyse CG/MS de l'extraction des antioxydants sont présentés dans la figure III.8.

En exploitant les résultats de la **figure III.8**, on remarque l'apparition de plusieurs pics qui sont :

- Le premier pic correspond au pic de solvant d'extraction
- Les autres pics représentent les différents antioxydants présents dans les solutions analysées,

En se basant sur une étude comparative des temps de rétention existant dans la littérature et dans d'autres travaux déjà munis dans ce sens, cette technique nous a permis d'identifier plusieurs composés phénoliques tels que Pentaerythritol tetrakis(3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl) -propionate (Irganox 1010) (t_R à 13,39 min) et Tris (2,4-ditert-butylphenyl) - phosphite (Irgafos 168) (t_R à 15,31 et t_R à 16,03 min).

L'exploitation détaillée de cette figure sera entamée ultérieurement afin de faire une estimation quantitative des différents antioxydants présents dans les échantillons ; cela n'est pas fait car nous n'avons pas récupéré leurs fragmentation par la SM.

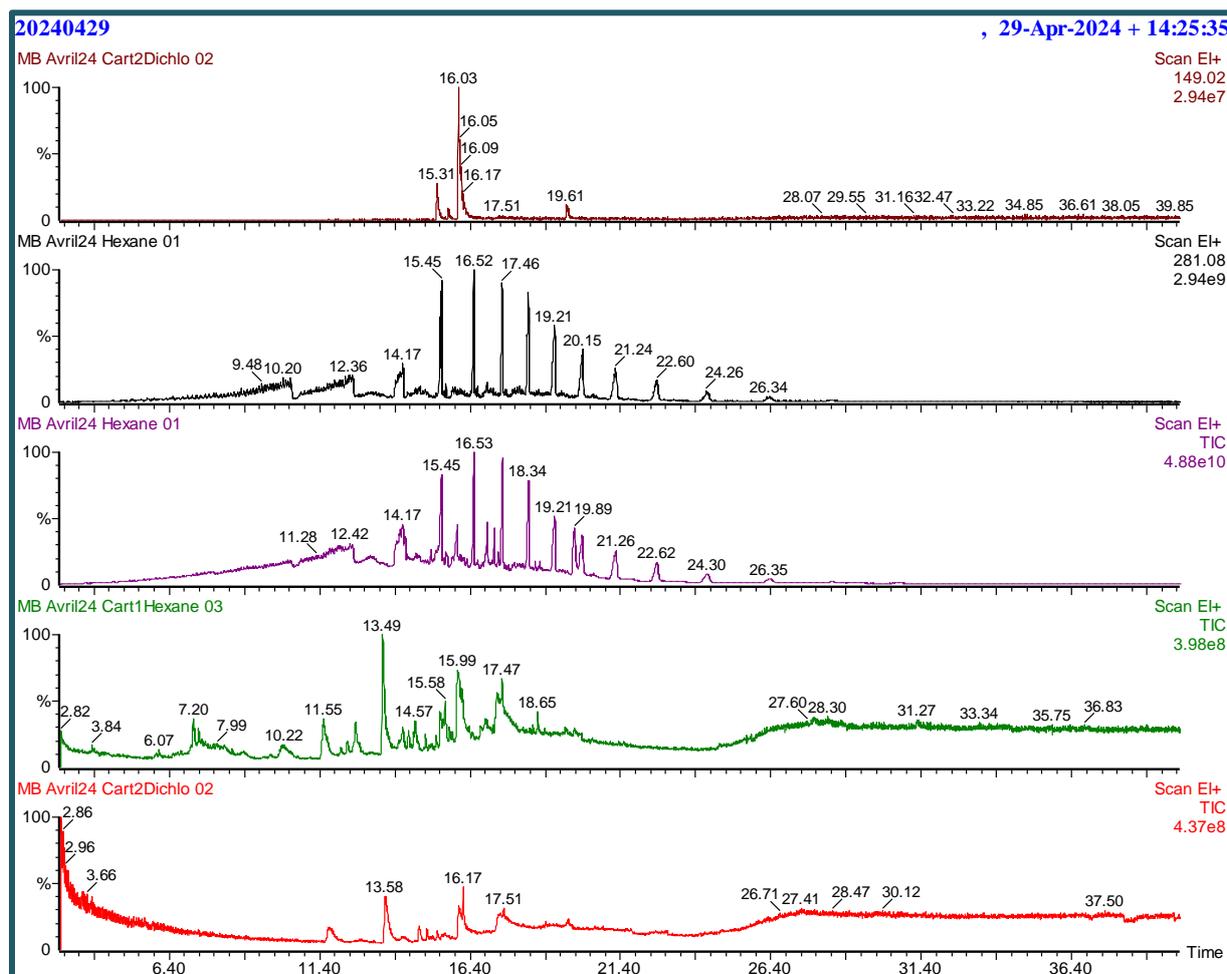


Figure III. 8 : Chromatogrammes des différents extraits

III.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Pour évaluer l'activité antimicrobienne de l'extrait de l'algue verte *Caulerpa prolifera*, nous avons sélectionné un extrait méthanoïque à 70 % obtenu par macération. Ce choix repose sur la capacité du méthanol à extraire une quantité élevée de composés phénoliques, reconnus pour leurs propriétés antimicrobiennes. De plus, nous avons évalué l'activité antimicrobienne de la matière grasse obtenue par hydro distillation.

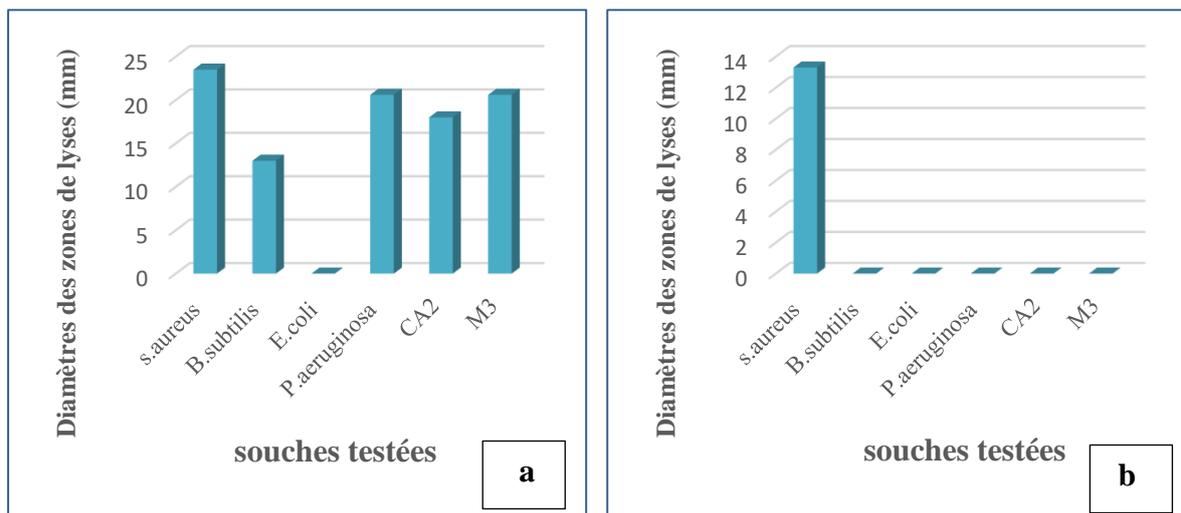
III.6.1. Activité antimicrobienne du l'extrait méthanoïque à 70 %

Les résultats de l'effet antimicrobienne du l'extrait méthanoïque à 70 % ont été évalués sur les souches (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, CA2 et M3) sont présentés dans le tableau III.4 et illustrées dans la figure III.9 et III.10.

Tableau III. 4: Effet inhibiteur de l'extrait méthanoïque à 70 %.

| Espèces | Gram | Méthode de disques | Méthode de puits |
|-------------------------------|---------|--------------------|------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | Négatif | - | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | - | +++ |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Positif | + | +++ |
| <i>Bacillus subtilis</i> | | - | + |
| CA2 | / | - | ++ |
| M3 | | - | +++ |

Non sensible (-) ou résistant : diamètre < 8 mm, sensible (+) : diamètre compris entre 9 et 14 mm, très sensible (++) : diamètre compris entre 15 et 19 mm, extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

**Figure III. 9:** Zones d'inhibition de l'extrait méthanoïque à 70 % déterminée :

a- Par la méthode des puits

b- Par la méthode des disques

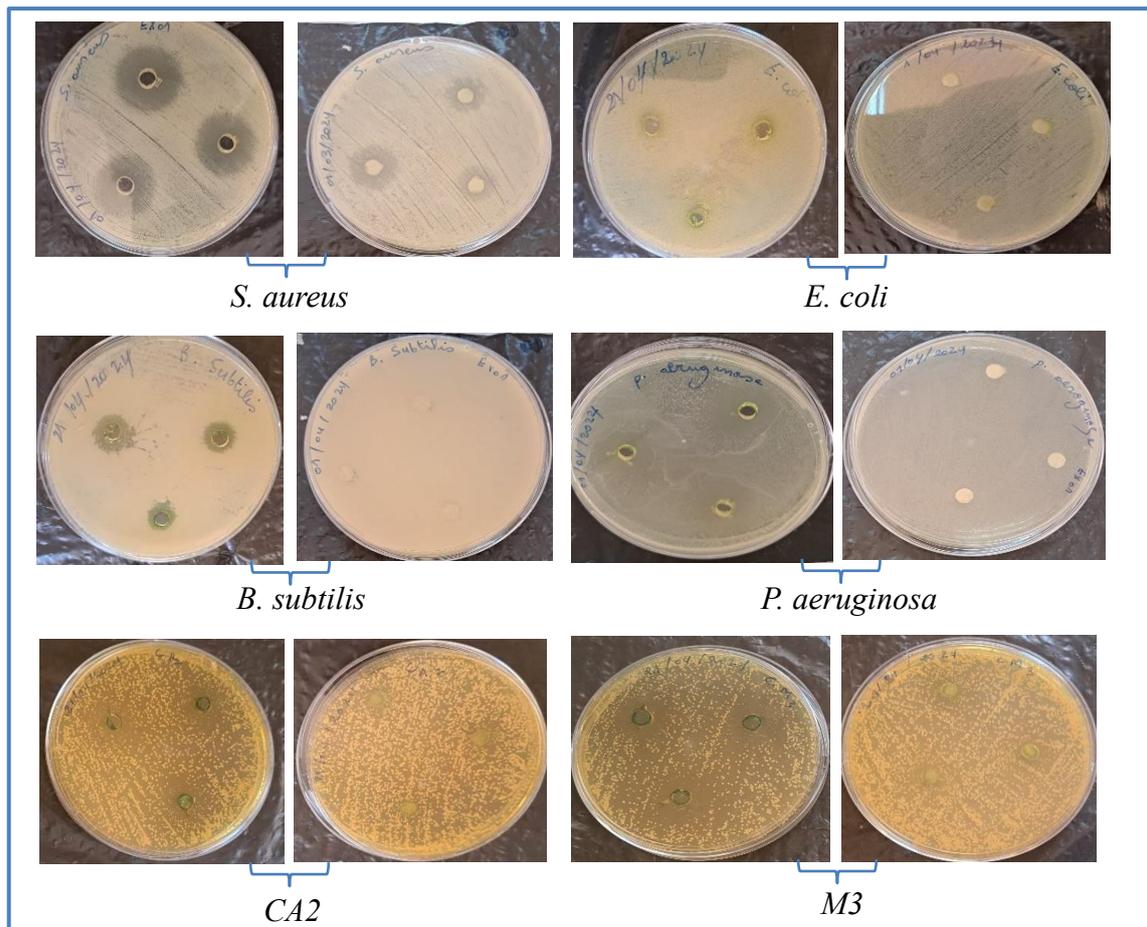


Figure III. 10: Effet antimicrobien de l'extrait méthanoïque à 70 % sur les souches étudiées Par la méthode des puits, disques

Les résultats obtenus à partir de l'extrait méthanoïque à 70 % montrent un effet inhibiteur sur *S. aureus* (ATCC 43300), avec une zone d'inhibition maximale de 13,3 mm selon la méthode des disques. En revanche, aucune zone d'inhibition n'a été observée pour les autres souches testées. On constate, *S. aureus* s'est révélé sensible, tandis que les autres souches (*B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, CA2, M3) ont montré une résistance.

Selon FARID *et al.*, 2012, les extraits d'algues vertes *Enteromorpha Linz*, *Enteromorpha intestinalis* et *Ulva lactuca* présentaient un diamètre d'inhibition supérieur à 10mm contre *S. aureus*. De plus, l'extrait de *Bifurcaria bifurcata* a montré un diamètre d'inhibition de 17 mm contre *S. aureus*, ainsi que des diamètres d'inhibition de 13 mm contre *Bacillus subtilis*. Les résultats obtenus pour *S. aureus* sont inférieurs à ceux obtenus dans notre étude pour l'algue verte *Caulerpa prolifera*. Cependant, les autres souches testées n'ont montré aucun résultat, ce qui peut être lié à la saison de la récolte, aux différentes étapes de croissance d'algue, à la nature des métabolites produits, ainsi qu'à la stabilité, à la solubilité et à la capacité de contact avec le milieu (Rushdi, 2020; Bae *et al.*, 1993).

La méthode des puits révèle une zone d'inhibition maximale de 23,5 mm pour *S. aureus* (ATCC 43300), 20,6 mm pour *P. aeruginosa* (ATCC 9027) et *C. albicans* (ATCC 10237) (M3), 18 mm pour *C. albicans* (ATCC 10231) (CA2), et 13 mm pour *B. subtilis* (ATCC 6633). Aucune zone d'inhibition n'a été observée pour *E. coli* (ATCC 8739), indiquant une sensibilité générale des souches testées à l'extrait, sauf pour *E. coli*.

Selon **Bhagavathy et al., 2011** l'extrait méthanoïque d'algue verte *Chlorococcum humicola* présentait un diamètre d'inhibition de 11 mm pour *S. aureus*, de 9 mm pour *B. subtilis*, de 8 mm pour *E. coli*, et aucune inhibition pour *P. aeruginosa*. Ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus pour *Caulerpa prolifera*, probablement en raison de la concentration différente de composés lipophiles et phénoliques **Luesch et al., 2000**. En plus, les bactéries Gram-négatives sont généralement moins sensibles que les bactéries Gram-positives en raison de la composition chimique de leur paroi cellulaire. Les lipopolysaccharides (LPS) présents dans la paroi des bactéries Gram-négatives empêchent la pénétration des molécules antimicrobiennes (**Kumaran et al., 2010**).

III.6.2. Activité antimicrobienne de l'huile végétale

Les résultats de l'effet antimicrobien de la matière grasse ont été évalués sur les souches (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, CA2 et M3). Ces résultats sont présentés dans le **tableau III. 5** et illustrés dans la **figure.III.11** et **III. 12**.

Tableau III. 5: Effet inhibiteur de l'huile.

| Espèces | Gram | Méthode des puits |
|-------------------------------|---------|-------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | Négatif | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | | - |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Positif | - |
| <i>Candida albicans</i> (CA2) | | +++ |
| <i>Candida albicans</i> (M3) | | +++ |

Non sensible (-) ou résistant : diamètre < 8 mm, sensible (+) : diamètre compris entre 9 et 14 mm, très sensible (++) : diamètre compris entre 15 et 19 mm, extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

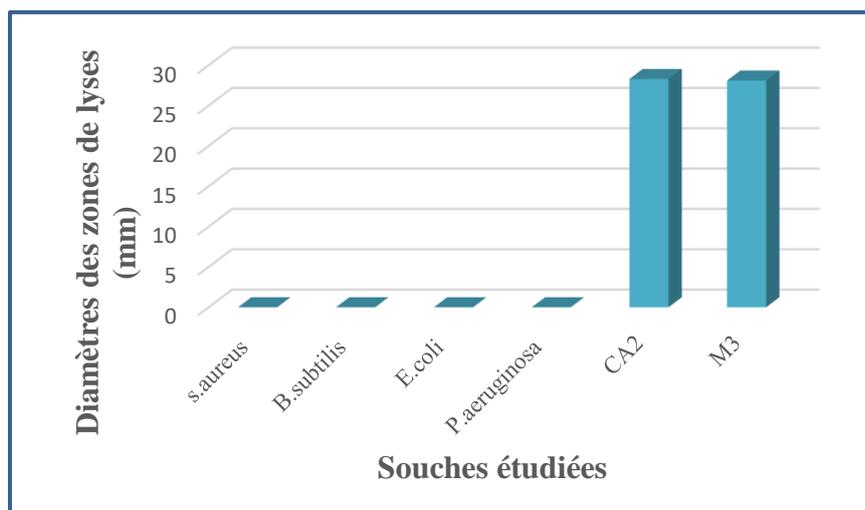


Figure III. 11: Zones d'inhibition de l'huile déterminées par la méthode des puits.

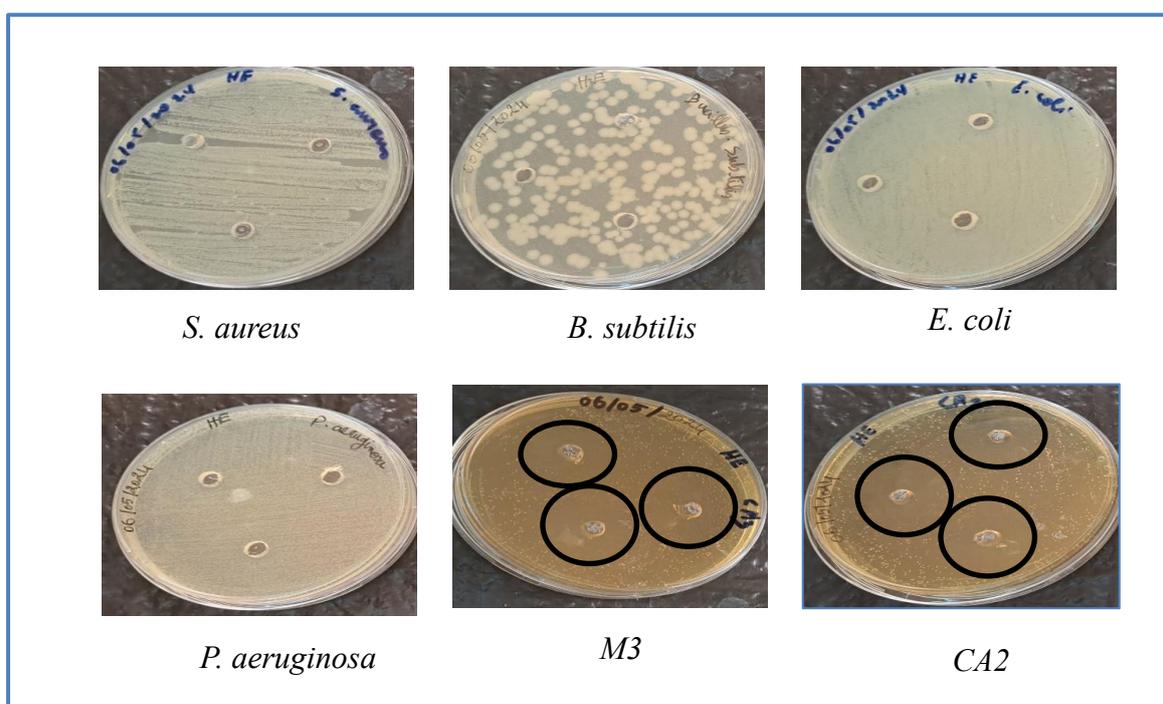


Figure III. 12: Effet antimicrobien de l'huile sur les souches étudiées par la méthode des puits.

Les résultats de notre expérimentation avec la matière grasse montrent une absence d'effet sur les bactéries, tandis qu'une réaction significative est observée chez les levures, avec des zones d'inhibition de 28,3 mm pour CA2 et de 28,1 mm pour M3. Ces résultats démontrent la sensibilité des levures à la substance testée, contrairement aux bactéries qui y sont résistantes.

Selon **Boubekri, 2012**, les extraits lipidiques d'algue verte *Ulva lactuca* présentaient des diamètres d'inhibition de 13 mm contre *S. aureus*, 12 mm contre *P. aeruginosa* et 10 mm

contre *E. coli*, tandis qu'aucune zone d'inhibition n'a été observée pour les levures. En revanche, notre étude sur l'algue verte *Caulerpa prolifera* montre des résultats différents. Cela peut être dû à la composition chimique de la matière grasse de *Caulerpa prolifera*, qui contient des composés, spécifiquement efficaces contre les levures en perturbant leurs membranes cellulaires. Ces composés ne sont pas nécessairement efficaces contre les bactéries, qui ont des parois cellulaires et des mécanismes biologiques différents. De plus, la concentration des composés actifs pourrait être suffisante pour affecter les levures mais insuffisante pour les bactéries. Enfin, les conditions expérimentales et la sensibilité des pathogènes testés peuvent également influencer ces résultats (Burt, 2004; Nazzaro et al., 2013; Ponce et al., 2003).

III.6.3. Activité antimicrobienne de l'agent synthétiques

Les résultats de l'effet antimicrobien de l'agent antimicrobien synthétique ont été évalués sur les souches (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, CA2 et M3). Ces résultats sont présentés dans le **tableau III. 6** et illustrés par la **figure III. 13** et **III. 14**.

Tableau III. 6: Effet inhibiteur de l'agent synthétique.

| Espèces | Gram | Méthode de disques |
|-------------------------------|---------|--------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | Négatif | + |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | +++ |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Positif | +++ |
| <i>Bacillus subtilis</i> | | +++ |
| <i>Candida albicans</i> (CA2) | | +++ |
| <i>Candida albicans</i> (M3) | | +++ |

Non sensible (-) ou résistant : diamètre < 8 mm, sensible (+) : diamètre compris entre 9 et 14 mm, très sensible (++) : diamètre compris entre 15 et 19 mm, extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

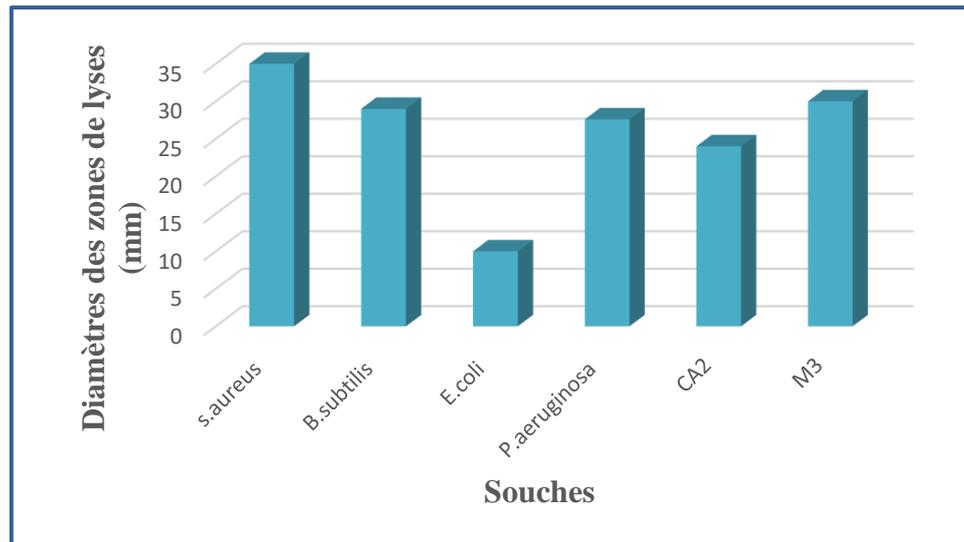


Figure III. 13: Zones d'inhibition de l'Agent Antimicrobienne Synthétique par la méthode des disques.

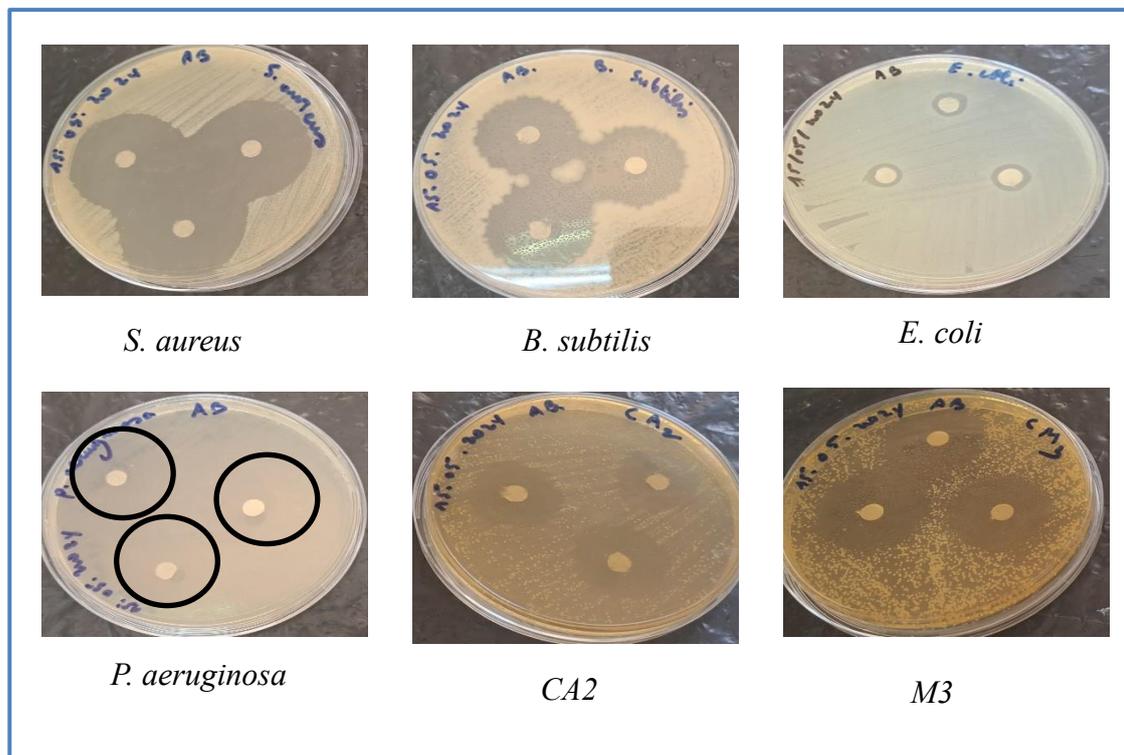


Figure III. 14: Effet antimicrobien de l'agent synthétique sur les souches étudiées par la méthode des disques.

Les résultats obtenus à partir de l'agent antimicrobien synthétique démontrent un effet inhibiteur significatif sur diverses souches. Pour *S. aureus*, une zone d'inhibition maximale de 35 mm a été observée, suivie de 30 mm pour *M3*, 29 mm pour *B. subtilis*, 27.2 mm pour *P. aeruginosa* et 24 mm pour *CA2*. Bien que l'effet soit moindre, une inhibition de 10 mm a

également été constatée pour *E. coli*. Ces résultats témoignent d'une sensibilité générale des souches testées à l'agent antimicrobien synthétique.

L'extrait de *Caulerpa prolifera*, à 70 % de méthanol, révèle une activité antimicrobienne naturelle, bien que ses résultats se révèlent inférieurs à ceux de l'agent antimicrobien synthétique. Cette diminution de l'efficacité peut être attribuée à la présence de divers composés dans les extraits bruts, notamment les alcaloïdes, les tanins et les flavonoïdes. Ces composés peuvent interagir de manière complexe, influençant ainsi l'activité antimicrobienne globale. De plus, la diversité et la concentration des composés dans l'extrait peuvent varier, nécessitant potentiellement des concentrations élevées pour obtenir des résultats significatifs (Ganfon et al., 2019).

III.6.4. Activité antimicrobienne de Film Biologique (FB)

Le film antimicrobien bio a été testé pour son efficacité contre différentes souches (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, CA2 et M3). Les résultats de ces tests sont présentés dans le **tableau III.7** et illustrés par la **figure III.15** et **III. 16**.

Tableau III. 7: Effet inhibiteur du film biologique.

| Espèces | Gram | Méthode de disques | Méthode de puits |
|-------------------------------|---------|--------------------|------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | Négatif | - | + |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | - | +++ |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Positif | - | +++ |
| <i>Bacillus subtilis</i> | | - | +++ |
| <i>Candida albicans</i> (CA2) | / | - | +++ |
| <i>Candida albicans</i> (M3) | | - | +++ |

Non sensible (-) ou résistant : diamètre < 8 mm, sensible (+) : diamètre compris entre 9 et 14 mm, très sensible (++) : diamètre compris entre 15 et 19 mm, extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

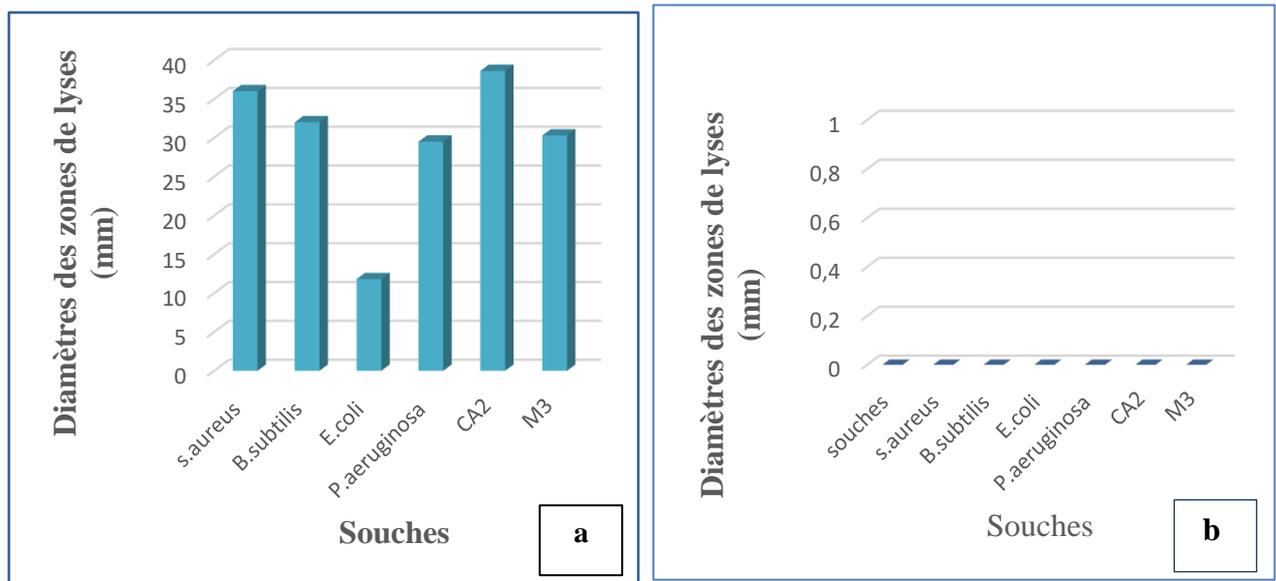


Figure III. 15: Zones d'inhibition de film biologique déterminée :

a-Par la méthode des puits.

b-Par la méthode des disques.

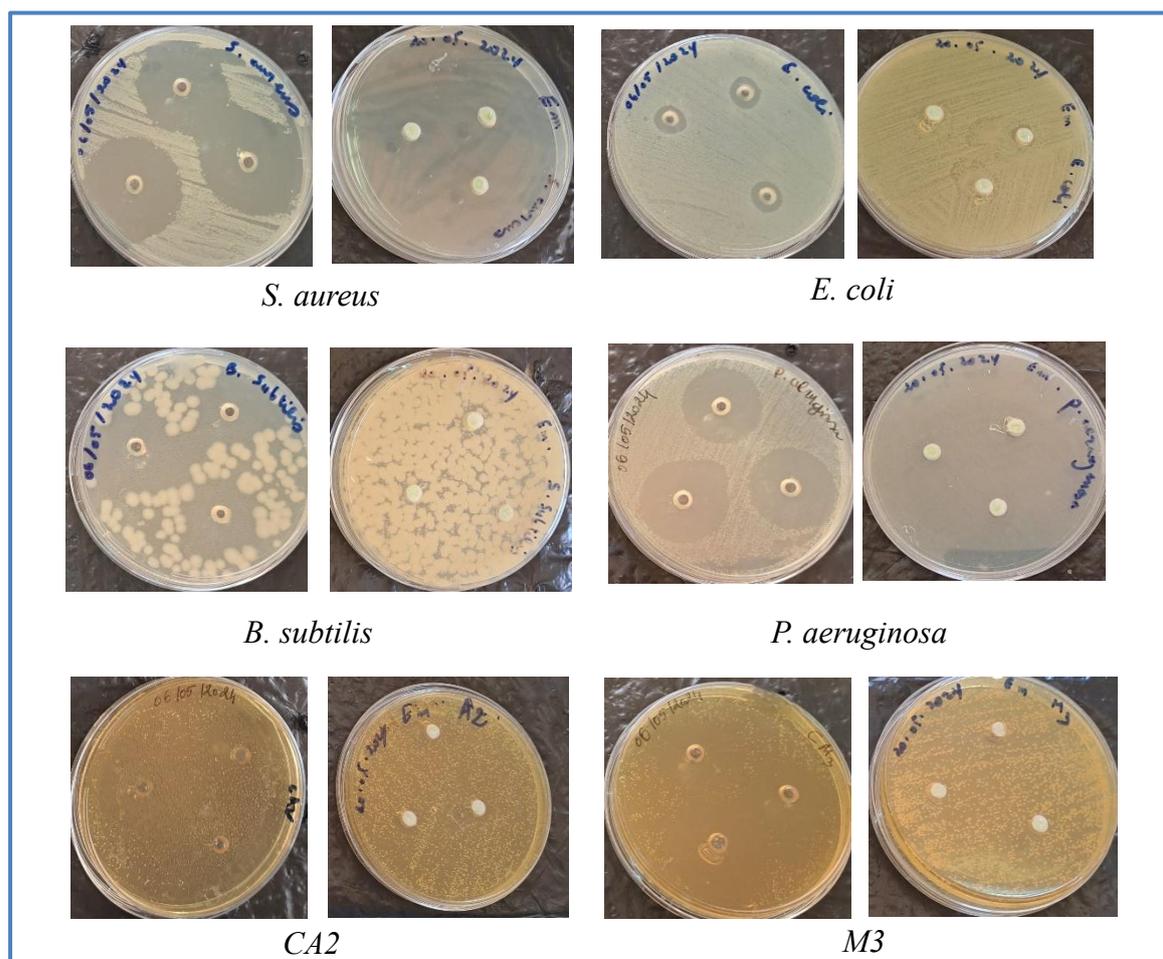


Figure III. 16: Effet antimicrobien de film biologique sur les souches étudiées par la méthode des disques, puits.

Les résultats obtenus à partir de notre emballage biologique démontrent un effet inhibiteur significatif sur diverses souches. En particulier, une zone d'inhibition maximale de 38,8 mm a été observée pour CA2, suivie de 36 mm pour *S. aureus*, 32 mm pour *B. subtilis*, 30 mm pour M3, 29,5 mm pour *P. aeruginosa* et 11,8 mm pour *E. coli*. Ces résultats, obtenus selon la méthode des puits, indiquent une sensibilité générale des souches testées aux agents antimicrobiens biologiques contenus dans l'emballage.

En revanche, selon la méthode des disques, aucune zone d'inhibition n'a été observée. Plusieurs raisons pourraient expliquer ces résultats divergents, notamment le temps de diffusion et de contact entre les bactéries et les agents antimicrobiens présents dans l'emballage. De plus, la méthode de diffusion utilisée par les disques pourrait ne pas assurer une concentration adéquate des agents antimicrobiens au niveau du point de contact avec les bactéries.

CONCLUSION

Les algues vertes demeurent toujours une source fiable de principes actifs connus pour leurs différentes propriétés biologiques. Leur utilisation est en constante augmentation, en raison de la toxicité et des effets secondaires indésirables des molécules de synthèse. Dans ce cadre, nous avons étudié le criblage phytochimique de quelques groupes chimiques, la quantification des composés phénoliques, les activités antioxydantes et antimicrobiennes et même analyser une algue verte. Il s'agit de *Caulerpa prolifera* ; ces paramètres visent à évaluer l'extrait et produire avec ce dernier un film alimentaire actifs.

Les résultats obtenus après différentes techniques extractions nous ont permis de calculer le rendement de différents extraits, les huiles végétales ont été extraites par hydrodistillation qui nous a donné un rendement de 0,6% tandis que les extraits bruts ont été obtenus par soxhlet et macération, cette dernière a donné un meilleur rendement de 29,8% par rapport aux autres techniques. Le screening phytochimique réalisé à l'aide de tests spécifiques, a permis de caractériser les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins et les acides aminés. Les résultats obtenus lors de ces différents tests mettent en évidence la diversité des substances actives présentes dans cette algue, confirmant ainsi leur valeur phytochimique et soulignant également la justification de leur valorisation.

Le dosage quantitatif des principales classes de métabolites secondaires a permis d'enregistrer une teneur élevée en polyphénols totaux de (20,83±0,82 mg EAG/g extrait brute) donc *Caulerpa prolifera* a montré une quantité très importante en métabolites secondaires qui peuvent être à l'origine de propriétés thérapeutiques importantes et une utilisation répondue dans plusieurs domaines.

Concernant l'activité antioxydante, nous soulignons la capacité de l'extrait de l'algue étudiée à réduire le DPPH, le pourcentage le plus marquant (78,888%) est enregistré avec la concentration de l'extrait de 250 mg/ml avec une faible valeur d'IC50 à 47,93 mg/ml par rapport à l'acide ascorbique, le standard. Ces résultats sont intéressants et font de *Caulerpa prolifera* une source naturelle en antioxydants très prometteuses.

Les extraits bruts préparés par macération et soxhlet sont ensuite caractérisés par infrarouge et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse montrant ces principales bandes caractéristiques, à la suite un film alimentaire été préparé à partir du PVC et notre extrait d'algue qui a remplacé différents additifs et adjuvants synthétisés en particulier agents antimicrobiens qui est l'objectif de notre étude.

Le remplacement de l'agent antimicrobien chimique par l'extrait d'algue verte *Caulerpa prolifera* a été prouvé en effectuant une activité antimicrobienne de l'extrait brut, l'huile

végétale obtenue, l'agent antimicrobien synthétique et enfin de notre film alimentaire actif. D'après les résultats de cette activité aucune activité antibactérien de notre huile végétale n'est constatée contre les quatre bactéries testées : (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*). Ce résultat doit être pris avec modération et des tests supplémentaires doivent être envisagés, par contre l'activité antifongique de cette huile est positive sur les deux levures testées : (*C. albicans* M3 et *C. albicans* CA2). Par ailleurs, l'étude de l'activité antimicrobien de l'extrait brut, agent antimicrobien synthétique et notre film alimentaire indique un effet bactéricide et fongicide contre les quatre bactéries testées de cette étude et les deux levures. Cet effet antimicrobien évalué par des zones d'inhibition considérables, bien que les zones d'inhibition de agents chimique soient élevées par rapport les autres échantillons testés ; c'est différents tests d'activités réalisés montrent que l'extrait étudié renferme probablement un mélange de substances ayant large spectre d'activités. De ce fait, une purification des substances contenus dans notre extrait d'algue s'avère nécessaire.

Les résultats initiaux sont prometteurs et font de l'algue verte locale étudiée une source naturelle extrêmement intéressante qui peut être exploitée à des fins industriels important.

Afin d'approfondir ce travail de recherche nous proposons les perspectives suivantes :

- ✚ L'utilisation d'autres solvants organiques pour extraire le maximum de composants chimiques.
- ✚ Approfondir l'analyse phytochimique et chromatographique pour isoler et identifier les molécules actives de cette algue.
- ✚ L'évaluation de l'activité antioxydante par d'autres méthodes in vitro : ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) et ABTS• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique).
- ✚ L'étude in vivo de l'effet de cette algue sur le stress oxydatif en mesurant l'activité d'enzymes antioxydantes : Catalase, Superoxyde dismutase....
- ✚ Etude d'autres activités biologiques ; comme antidiabétique et de l'activité anti-inflammatoire in vivo des molécules bioactives en étudiant la toxicité.
- ✚ Détermination de mécanisme des molécules bioactives et leur mode d'action.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A.Kardache, Y. Khoualdi.(2016).** Etude des activités antioxydante, antibactérienne et antifongique d'extraits d'algues marines d'origine Algérienne. Université des Frères Mentouri Constantine.<https://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/biblio/mmf/2016/129>.
- Ainane, T. (2011).** Valorisation de la biomasse algale du Maroc: Potentialités pharmacologiques et Applications environnementales, cas des algues brunes *Cystoseira tamariscifolia* et *Bifurcaria bifurcata* [Phdthesis, Faculté des Sciences Ben M'sik Université Hassan II Casablanca]. <https://theses.hal.science/tel-00637002>
- Amsler, C., & Fairhead, V. (2005).** Defensive and Sensory Chemical Ecology of Brown Algae. *Advances in Botanical Research - ADVAN BOTAN RES*, 43, 1-91. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(05\)43001-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(05)43001-3)
- Angèle, R. H. (2022).** EXTRACTION D'HUILE D'ALGUES ET VALORISATION PAR TRANSFORMATION EN BIOCARBURANT.
- Arham. (2016).** View of ANALYSIS OF BIOACTIVE COMPOUNDS OF *Caulerpa racemosa*, *Sargassum* sp. AND *Gracillaria verrucosa* USING DIFFERENT SOLVENTS. <https://journals.utm.my/jurnalteknologi/article/view/8146/4919>
- Bae, H. D., McAllister, T. A., Yanke, J., Cheng, K.-J., & Muir, A. D. (1993).** Effects of Condensed Tannins on Endoglucanase Activity and Filter Paper Digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(7), 2132. <https://doi.org/10.1128/aem.59.7.2132-2138.1993>
- Baghi, F., Ghnimi, S., Dumas, E., & Gharsallaoui, A. (2023).** Development of a multilayer biodegradable active packaging based on nano emulsions, for the bio preservation of food. *MATEC Web of Conferences*, 379, 05008. <https://doi.org/10.1051/matecconf/202337905008>

- Baloul, H. (2018).** Etude de la contamination des aliments-simulants gras par les constituants de leurs emballages plastiques [Thesis].
<http://repository.enp.edu.dz/jspui/handle/123456789/1130>
- Bammou, M., Daoudi, A., Slimani, I., Najem, M., Bouiamrine, E. H., Ibijbijen, J., & Nassiri, L. (2015).** Valorisation du lentisque «*Pistacia lentiscus* L.»: Étude ethnobotanique, Screening phytochimique et pouvoir antibactérien. *Journal of Applied Biosciences*, 86, 7966-7975. <https://doi.org/10.4314/jab.v86i1.4>
- Becker, W. (2003).** Microalgae in Human and Animal Nutrition. In A. Richmond (Éd.), *Handbook of Microalgal Culture* (1^{re} éd., p. 312-351). Wiley.
<https://doi.org/10.1002/9780470995280.ch18>
- Ben Abdallah, R., Jribi, I., Kolsi, B., & Belghith, E. K. (2020).** CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE D'ECHANTILLONS D'ALGUES MARINES TUNISIENNES PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF SAMPLE MARINE TUNISIAN ALGAE.
- Benabdallah, B. B. (2012).** FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE THESE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN SCIENCES FILIERE : AGRONOMIE OPTION : ALGOLOGIE.
- Benariba, N., Djaziri, R., Bellakhdar, W., Belkacem, N., Kadiata, M., Malaisse, W. J., & Sener, A. (2013b).** Phytochemical screening and free radical scavenging activity of *Citrullus colocynthis* seeds extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(1), 35-40. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60020-9](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60020-9)
- Bhagavathy, S., Sumathi, P., & Jancy Sherene Bell, I. (2011).** Green algae *Chlorococcum humicola*-a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(1), S1-S7. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60111-1](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60111-1)

- Boubekri, S. (2012).** Etude chimique de l'algue rouge *Gigartina pistillata* [Thesis, Université Blida 1]. <https://di.univ-blida.dz/jspui/handle/123456789/5634>
- Boudjema, K., Temmimi, K., Azine, K., Hali, L., Fazouane, F., & Nahoui, N. E. H. (2022).** Screening phytochimique et activités biologiques d'extrait méthanolique obtenu à partir de la plante *Melissa officinalis* L. *Journal of Advanced Research in Science and Technology*, 8(1), 1-10.
- Bourgougnon, N., & Gervois, A. (2021).** Les algues marines : Biologie, écologie et utilisation. Editions Ellipses.
- Boussoum, M. O. (2012).** Etude de méthodes de traitement pour diminuer la migration à partir des emballages en PVC [Thesis]. <http://repository.enp.edu.dz/jspui/handle/123456789/652>
- Burt, S. (2004).** Essential oils : Their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013).** A review on antioxidants, prooxidants and related controversy : Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
- Catarino, M., Silva, A., & Cardoso, S. (2017).** Fucaceae : A Source of Bioactive Phlorotannins. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1327. <https://doi.org/10.3390/ijms18061327>
- Chaouche, T. M. (2014).** Contribution À L'Étude Des Activités Antioxydantes et Antimicrobiennes Des Extraits De Quelques Plantes Médicinales.

- Chopin, T., & Whalen, E. (1993).** A new and rapid method for carrageenan identification by FT IR diffuse reflectance spectroscopy directly on dried, ground algal material. *Carbohydrate Research*, 246(1), 51-59. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(93\)84023-Y](https://doi.org/10.1016/0008-6215(93)84023-Y)
- Daude, L. (2021).** L'utilisation des algues en pharmacie et parapharmacie.
- EL-Haoud, H., Boufellous, M., Berrani, A., HindTazougart, & Bengueddour, R. (2018). SCREENING PHYTOCHIMIQUE D'UNE PLANTE MEDICINALE : *Mentha Spicata* L.
- Faller, H. (2011).** Les applications et la toxicité des algues marines = Applications and toxicity of marine algae [Limoges]. <http://aurore.unilim.fr/ori-oai-search/notice/view/unilim-ori-41783>
- FARID, Y., Chennaoui, M., Assobhei, O., & Etahiri, S. (2012).** SCREENING DES ALGUES MARINES D'OUALIDIA A LA RECHERCHE D'ACTIVITES ANTIMICROBIENNE ET ANTI-INFLAMMATOIRE. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* Vol 6, N°2, p : 192-209, 6.
- Favier, A. (2003).** Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique.
- Fontanille, M., & Gnanou, Y. (2014).** Chimie et physico-chimie des polymères (3e éd). Dunod.
- Galez, P. (2011).** Mesure physiques annecy- MPh2 SE3 ME3- Techniques spectroscopiques d'analyse/ Spectrométrie Infrarouge, 37P.
- Ganfou, H., Houvohehou, J.-P., Assanhou, A. G., Bankole, H. S., & Gbenou, J. (2019).** Activité antibactérienne de l'extrait éthanolique et des fractions de *Anogeissus leiocarpa* (DC) Guill. Et Perr. (Combretaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 13(2), Article 2. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v13i2.6>
- Garon-Lardiere, S. (2004).** Etude structurale des polysaccharides parietaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales).

- Hammoudi, N., Ziani Cherif, H., Borsali, F., Benmansour, K., & Meghezzi, A. (2020).** Preparation of active antimicrobial and antifungal alginate-montmorillonite/lemon essential oil nanocomposite films. *Materials Technology*, 35(7), 383-394. <https://doi.org/10.1080/10667857.2019.1685292>
- Harborne, A. J. (1998).** *Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* (3rd edition). Springer.
- Harper, C. A. (Éd.). (2000).** *Modern plastics handbook*. McGraw-Hill.
- Hentati, F., Tounsi, L., Djomdi, D., Pierre, G., Delattre, C., Ursu, A. V., Fendri, I., Abdelkafi, S., & Michaud, P. (2020).** Bioactive Polysaccharides from Seaweeds. *Molecules*, 25(14), 3152. <https://doi.org/10.3390/molecules25143152>
- Hussen, F., & Al Ali, A. (2015).** Preliminary Phytochemical Screening, Quantitative Estimation of Total Flavonoids, Total Phenols and Antioxidant Activity of *Ephedra alata* Decne. *J. Mater. Environ. Sci.* 6 (6) (2015) 1771-1778, 6, 1771-1778.
- Jesumani, V., Du, H., Aslam, M., Pei, P., & Huang, N. (2019).** Potential Use of Seaweed Bioactive Compounds in Skincare—A Review. *Marine Drugs*, 17(12), 688.
- Kherraf, A. (2018).** Caractérisation physicochimique et évaluation du potentiel antioxydant, antimicrobien et antiinflammatoire de la microalgue *Nannochloropsis gaditana*. [These de doctorat, Université Djillali Liabes faculté des sciences de la nature et de la vie Sidi bel Abbes].
- L.Chilla,Z.Sallah.(2018).**Activité antifongique et antioxydante des algues marines de la côte Bejaia. Université Bejaia. <https://www.univ-bejaia.dz/jspui/handle/123456789/412>
- Khettaoui, I. (2016).** Contribution à l'étude phytochimique et activité antibactérienne de l'algue verte *Caulerpa racemosa* de la côte-Mostaganémoise.
- Kirke, D. A., Rai, D. K., Smyth, T. J., & Stengel, D. B. (2019).** An assessment of temporal variation in the low molecular weight phlorotannin profiles in four intertidal brown macroalgae. *Algal Research*, 41, 101550. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101550>

- Kumaran, S., Deivasigamani, B., Alagappan, K., Sakthivel, M., & Karthikeyan, R. (2010).** Antibiotic resistant *Escherichia coli* strains from seafood and its susceptibility to seaweed extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3(12), 977-981.
- Lagnika, L. (2005).** Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises [These de doctorat, Université Louis Pasteur (Strasbourg)]
- Lakhdar, F. (2018).** Contribution à l'étude des potentialités antiproliférative et antibactérienne des algues brunes et rouges de la côte d'El Jadida pour une valorisation médicale et environnementale [These de doctorat, Nantes]. <https://theses.fr/2018NANT4037>
- Leila, M. M., et Said, M. B. (2023).** Etude de l'activité antimicrobienne des extraits d'une algue marine.
- Lima-Filho, J. V. M., Carvalho, A. F. F. U., Freitas, S. M., & Melo, V. M. M. (2002).** Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern brazilian coast. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(4). <https://doi.org/10.1590/S1517-83822002000400006>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010).** Free radicals, antioxidants and functional foods : Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118-126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- López, A., Rico, M., Rivero, A., & Suárez, M. suarez de tangil. (2011).** The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chemistry*, 125, 1104-1109. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.101>
- Luesch, H., Yoshida, W. Y., Moore, R. E., Paul, V. J., & Mooberry, S. L. (2000).** Isolation, structure determination, and biological activity of Lyngbyabellin A from the marine cyanobacterium *lyngbya majuscula*. *Journal of Natural Products*, 63(5), 611-615. <https://doi.org/10.1021/np990543q>

- Maataoui, S., Hmyene, A., & Hilali, S. (2006).** Activités anti-radicales d'extraits de jus de fruits du figuier de Barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*, 7.
- MacArtain, P., Gill, C. I. R., Brooks, M., Campbell, R., & Rowland, I. R. (2008).** Nutritional Value of Edible Seaweeds. *Nutrition Reviews*, 65(12), 535-543.
<https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2007.tb00278.x>
- Madike, L., Takaidza, S., & Pillay, M. (2017).** Preliminary Phytochemical Screening of Crude Extracts from the Leaves, Stems, and Roots of *Tulbaghia violacea*. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 9.
<https://doi.org/10.25258/phyto.v9i10.10453>
- Mnayer, D. (2014).** Eco-Extraction des huiles essentielles et des arômes alimentaires en vue d'une application comme agents antioxydants et antimicrobiens [Phdthesis, Université d'Avignon]. <https://theses.hal.science/tel-01271999>
- Mujic, I., Dudaš, S., Zivkovic, J., Tomin, J., Zekovic, Z., Alibabic, V., Jukić, H., & Šahinovic, R. (2009).** Determination of total phenolic compounds in cultivars of *Castanea Sativa* Mill. In *Acta Horticulturae* (Vol. 815, p. 68).
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.815.8>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Martino, L. D., Coppola, R., & Feo, V. D. (2013).** Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451.
<https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J., & Codina, C. (2002).** Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled mediterranean herbs and aromatic plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6882-6890.
<https://doi.org/10.1021/jf020540a>

- Penchev, P. I. (2010).** Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions [Phd]. <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00001338/>
- Pereira, L. (2018).** Seaweeds as Source of Bioactive Substances and Skin Care Therapy—Cosmeceuticals, Algoteraphy, and Thalassotherapy. *Cosmetics*, 5(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/cosmetics5040068>
- Pillard, S. (2016).** Mise au point sur les algues vertes : Risques environnementaux et valorisations en 2016. 92.
- Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C., & Roura, S. I. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT - Food Science and Technology*, 36(7), 679-684. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00088-4](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00088-4)
- Prusty, J. S. (2022).** 8—Peptides and polypeptides. In A. Kumar (Éd.), *Phytoconstituents and Antifungals* (p. 99-108). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91792-6.00005-4>
- Q. V. Vuong, S. Hirun, P. D. Roach, M. C. Bowyer, P. A. Phillips and C. J. Scarlett, (2013).** “Effect of Extraction Conditions on Total Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of *Carica papaya* Leaf Aqueous Extracts,” *Journal of Herbal Medicine*, Vol. 3, No. 3, pp. 104-111.
- Rico, M. (2011).** The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chemistry*. https://www.academia.edu/21635385/The_effects_of_solvents_on_the_phenolic_contents_and_antioxidant_activity_of_Stypocaulon_scoparium_algae_extracts
- Rushdi, M. I. (2020).** A review on the diversity, chemical and pharmacological potential of the green algae genus *Caulerpa*.

https://www.academia.edu/83476291/A_review_on_the_diversity_chemical_and_pharmacological_potential_of_the_green_algae_genus_Caulerpa

- Samartha, Dr. R., Samartha, M., Kumar, M., Sharma, A., & Kumar, M. (2008).** Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activity of certain radioprotective plant extracts. *Food Chemistry*, 106, 868-873. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.005>
- Satpati, G., & Pal, R. (2011).** Biochemical composition and lipid characterization of marine green alga *Ulva rigida*- a nutritional approach. *Journal of Algal biomass utilization*, 2.
- Shibata, T., Kawaguchi, S., Hama, Y., Inagaki, M., Yamaguchi, K., & Nakamura, T. (2004). Local and chemical distribution of phlorotannins in brown algae. *Journal of Applied Phycology*, 16(4), 291-296. <https://doi.org/10.1023/B:JAPH.0000047781.24993.0a>
- Tanniou, A. (2014).** Etude de la production de biomolécules d'intérêt (phlorotannins, pigments, lipides) d'algues brunes modèles par des approches combinées de profilage métabolique et d'écophysiologie [Phdthesis, Université de Bretagne occidentale - Brest].
- Tiouane, R., Bouzidi, S., & Mekircha, F. (Encadreur). (2018).** Etude de l'activité antioxydante in vitro des extraits bruts de l'algue brune : *Padina pavonica* [Thesis, Université de Jijel]. <http://dspace.univ-jijel.dz:8080/xmlui/handle/123456789/1333>
- Yaich, H., Garna, H., Besbes, S., Paquot, M., Blecker, C., & Attia, H. (2011).** Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. *Food Chemistry*, 128, 895-901. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.114>
- Yedri, A., Hebbache, A., et Salem, (2018).** Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des extraits du lichen *Parmelia caperata* (L.) Ach [Thesis, Université de Jijel].
- Zehlila, A. (2017).** Caractérisation structurale et fonctionnelle des métabolites de l'algue verte *Ulva Rigida* au moyen d'une approche protéomique.

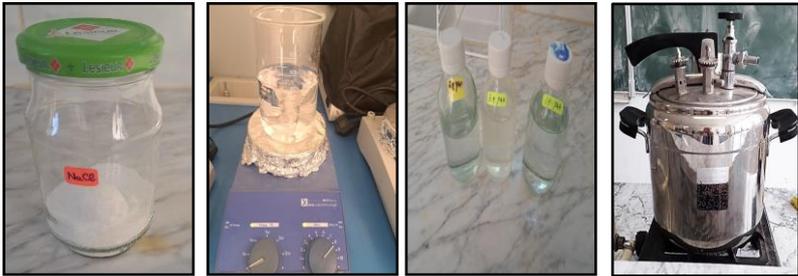
ANNEXES

Annexe A 1 : Composition des différents milieux de culture utilisés

| Milieux | Composition |
|-----------------------------|--|
| <p>Chapman</p> | <p>Extrait de viande1g Peptone caséine et de viande10g Chlorure de sodium5g D-mannitol10g Agar15g Rouge de phénol.....0.025g Eau distillé1000ml Ph final 7.4</p> |
| <p>MacConkey</p> | <p>Hydrolysate pancréatique de gélatine17g Hydrolysate pancréatique de caséine1.5g Hydrolysate pepsique de tissus animaux...1.5g Lactose10g Sel bélière1.5g Chlorure de sodium5g Rouge neuter0.03g Crystal violet0.001g Agar.....13.5g Eau distillé1000ml □ Ph 7.4</p> |
| <p>Muller Hinton</p> | <p>Extrait de viande.....03g Hydrolysate acide de caséine17,5g Amidon.....15g Agar16g Eau distillée.....1000ml PH final7,3</p> |

| | |
|-------------------------|--|
| Sabouraud | Pour 1 litre de milieu : Peptone de caséine5,00g Peptone de viande5,00g Glucose monohydraté20,00g Agar15,00g pH final à 25°C: 5,6 ± 0,2 |
| Gélose nutritive | Est obtenue par ajout, avant l'autoclavage de 20g d'agar agar au bouillon nutritif. |

Annexe A 2 : Préparation des milieux de cultures

| Préparation de milieu Muller Hinton | Préparation de l'eau physiologique |
|---|---|
| Eau distillé 1 litre Milieu Muller Hinton 38g | NaCl 3.2g Eau distillée 380ml |
|  <p>Photo 01 : Milieu Muller Hinton</p> |  <p>Photo 02 : Eau physiologie stérile</p> |

Annexe A 3: Standardisation des souches



Eau Physiologique + les souches



Spectrophotomètre UV-visible

Annexe A 4: Extraits d'algue verte *Caulerpa prolifera*



Extrait méthanoïques 70%



Matière grasse

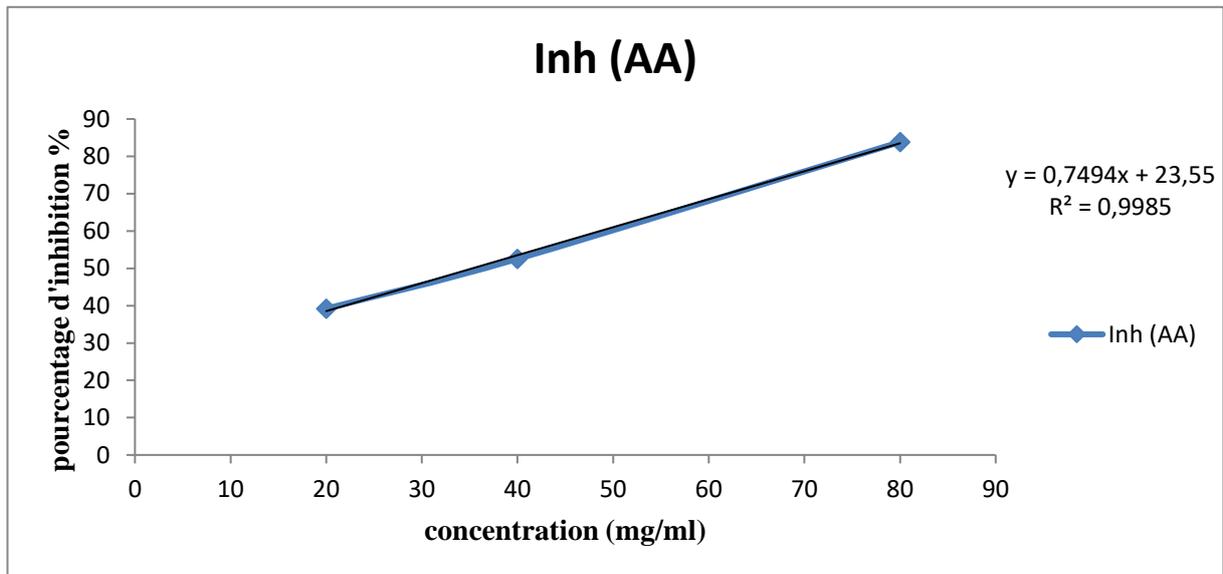
Annexe A 5: Préparation des films par polymérisation



Film synthétique



Biofilm

Annexe A 6: Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique

Résumé

Les algues vertes, *Caulerpa prolifera*, sont riches en métabolites bioactifs qui peuvent inhiber la croissance de certaines bactéries pathogènes et champignons. Cette étude vise à évaluer les extraits de *Caulerpa prolifera* pour élaborer un film alimentaire actif en PVC, remplaçant des additifs synthétiques, notamment les agents antimicrobiens.

Collectée sur la plage Sidi Marouane à Ténès (Chlef), cette algue a montré un rendement élevé en extrait brut (29,8%) et en polyphénols totaux ($20,83 \pm 0,82$ mg EAG/g d'extrait). L'extrait méthanolique (70%) a révélé de fortes propriétés antioxydantes avec un taux d'inhibition de 78,888% à 250 mg/ml et une IC50 de 47,93 mg/ml.

L'extrait a démontré des effets antimicrobiens contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, et *Pseudomonas aeruginosa*, mais pas contre *Escherichia coli*. Il a également montré une activité antifongique contre deux souches de *Candida albicans* : ATCC 10237 (M3) et ATCC 10231 (CA2). La CG/MS a permis d'identifier et de quantifier les antioxydants phénoliques présents dans les extraits de *Caulerpa prolifera*.

Mots clés : Algues, *Caulerpa prolifera*, composés phénoliques, activités antimicrobiennes, pouvoir antioxydant, ATR et CG/SM.

Abstract

Green algae, *Caulerpa prolifera*, are rich in bioactive metabolites that can inhibit the growth of certain pathogenic bacteria and fungi. This study aims to evaluate the extracts of *Caulerpa prolifera* for creating an active food packaging film using PVC, replacing synthetic additives.

Collected from Sidi Marouane beach in Ténès (Chlef), this algae showed a high yield of crude extract (29.8%) and total polyphenols (20.83±0.82 mg GAE/g extract). The methanolic extract (70%) exhibited strong antioxidant properties with an inhibition rate of 78.888% at 250 mg/ml and an IC₅₀ value of 47.93 mg/ml.

The extract demonstrated antimicrobial effects against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, and *Pseudomonas aeruginosa*, but not against *Escherichia coli*. It also showed antifungal activity against two strains of *Candida albicans*.

IR and GC-MS analyses helped identify the polyphenols present and obtain the necessary chromatograms.

Keywords : Algae, *Caulerpa prolifera*, phenolic compounds, antimicrobial activities, antioxidant capacity, IR and GC-MS.

ملخص

تُعد الطحالب الخضراء، *Caulerpa prolifera*، غنية بالمواد الأيضية الحيوية التي يمكن أن تُعيق نمو بعض البكتيريا الممرضة والفطريات. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم مستخلصات *Caulerpa prolifera* لاستخدامها في تصنيع فيلم غذائي نشط باستخدام الـ PVC، لتحل محل المواد المضافة الاصطناعية.

جمعت هذه الطحالب من شاطئ سيدي مروان في تينيس (الشلف)، وأظهرت نسبة عالية من المستخلص الخام (29.8%) ومحتوى عالٍ من إجمالي البوليفينولات (0.82 ± 20.83 ملغ/GAE من المستخلص). أظهر المستخلص الميثانولي (70%) خصائص مضادة للأكسدة قوية بنسبة تثبيط بلغت 78.888% عند تركيز 250 ملغ/مل وقيمة IC50 بلغت 47.93 ملغ/مل.

أظهر المستخلص تأثيرات مضادة للميكروبات ضد *Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa*، لكنه لم يظهر أي تأثير ضد *Escherichia coli*. كما أظهر نشاطاً مضاداً للفطريات ضد سلالتين من *Candida albicans*.

ساعدت تحليلات الأشعة تحت الحمراء (IR) وكروماتوغرافيا الغاز-مطياف الكتلة (GC-MS) في تحديد البوليفينولات الموجودة والحصول على الكروماتوغرامات الضرورية.

الكلمات المفتاحية: الطحالب، *Caulerpa prolifera*، المركبات الفينولية، الأنشطة المضادة للميكروبات، القدرة المضادة للأكسدة، الأشعة تحت الحمراء وكروماتوغرافيا الغاز-مطياف الكتلة.

TEMPLATE STARTUP

*Elaboration d'un emballage
actif antimicrobien*



Nom commerciale



Logo

Table des matières

| | |
|---|----|
| I. Présentation du projet | 81 |
| II. Aspects innovants..... | 81 |
| II.1. Déterminer le problème rencontré par le client..... | 81 |
| II.2. La valeur proposée selon les critères suivants..... | 82 |
| III. Plan financier..... | 82 |
| III.1. Structure des coûts..... | 82 |
| III.2. Coûts fixes de projet..... | 83 |
| III.3. Source des revenus..... | 84 |

I. Présentation du projet

Ce projet se concentre sur le développement d'emballages alimentaires innovants utilisant des additifs naturels extraits des algues vertes, en remplacement des additifs chimiques traditionnels. Ces emballages visent à améliorer la qualité et la conservation des aliments en créant une barrière efficace qui les protège de la contamination bactérienne, de l'oxydation et de la déshydratation, réduisant ainsi le gaspillage alimentaire et renforçant la sécurité alimentaire. De plus, cette initiative contribue à réduire la pollution marine en valorisant les algues vertes. En utilisant des composants naturels riches en nutriments et antioxydants, ces emballages garantissent une haute sécurité alimentaire et une meilleure protection de l'environnement, offrant ainsi une solution durable et performante pour l'industrie alimentaire.

✓ Idée de projet (solution proposée)

La solution établis est d'utiliser des additifs naturels issus des algues vertes dans les emballages alimentaires pour améliorer la conservation des aliments, renforcer leur sécurité, et réduire la pollution environnementale.

II. Aspects innovants

II.1. Déterminer le problème rencontré par le client

| | |
|---|--|
| Problème à résoudre | Améliorer la conservation et la sécurité des aliments tout en réduisant l'impact environnemental des emballages alimentaires traditionnels. |
| Donnés disponibles indiquant l'existence d'un problème identifié | <ul style="list-style-type: none"> -Des études montrent qu'il y'a eu une migration des additifs de l'emballage vers l'aliment qui cause des effets néfastes sur la santé de consommateurs ex : phtalates (des effets cancérogènes), Bisphénol A (féminise les garçons). - Des études montrent que les additifs antimicrobiens dans les films alimentaires peuvent être inefficaces dans des conditions extrêmes et peuvent présenter des risques potentiels pour la santé publique, notamment en raison de la migration de ces substances. -Les matériaux d'emballage synthétiques, souvent utilisés dans l'industrie alimentaire, posent des problèmes environnementaux importants en raison de leur non-biodégradabilité et de la pollution qu'ils engendrent. -Le cout élevé des additifs -Les emballages plastiques contaminent les produits alimentaires |

| | |
|--|--|
| <p>D'autres projets ciblant le même problème qui ont été mis en œuvre</p> | <p>-Élaborations des bioplastiques à partir des ressources naturelles, ex : PLA issu du maïs (source végétale). -Plusieurs recherches académiques explorent l'utilisation du chitosane, un biopolymère dérivé de la chitine (présent dans les coquilles de crustacés), pour créer des films d'emballage antimicrobiens et biodégradables. -Reducing the migration of additives from plasticized poly (vinyl chloride) migration. -Interactions between Poly (vinyl chloride) stabilised with oxidized sunflower oil and food simulants.</p> |
| <p>Buts de projet</p> | <p>L'élaboration d'un emballage biologique qui permet de :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Remplacement des additifs synthétiques (plastifiant, l'huile de soja hypooxydée, agents antimicrobiens synthétiques) par un additif naturel issu d'une source végétale peu exploitée. ▪ Offrir des alternatives plus sûres et naturelles aux additifs chimiques. ▪ Assurer la sécurité alimentaire et augmenter sa durée de conservation. |

II.2. La valeur proposée selon les critères suivants

| | |
|---|--|
| <p>Valeur innovante</p> | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Valorisation des déchets marins (algues vertes) ▪ Élimination de l'accumulation excessive de déchets marins sur les plages (régler un problème écologique). ▪ Synthèse des biofilms alimentaires |
| <p>Valeur personnalisée</p> | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Emballage alimentaire non toxique et en plus sécurisé ▪ Empêcher la prolifération des micro-organismes responsables de la détérioration. |
| <p>Rapport qualité Prix</p> | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Moins coûteux |
| <p>Valeur par conception</p> | <p style="text-align: center;">/</p> |
| <p>Valeur de haute Performance</p> | <p style="text-align: center;">/</p> |
| <p>Valeur de service complète</p> | <p style="text-align: center;">/</p> |

III. Plan financier

III.1. Structure des coûts

| | |
|---|----------|
| Frais d'établissement | 100 000. |
| Frais d'ouverture de compteurs (eaux gaz | 30 000 |
| Logiciels, formations | 30 000 |
| Dépôt marque, brevet, modèle | 100 000 |
| Droits d'entrées | 100 000 |
| Achat fonds de commerce ou parts | / |
| Droit au bail | 200 000 |
| Caution ou dépôt de garantie | 50 000 |
| Frais de dossier | 20 000 |
| Frais de notaire ou d'avocat | 500 000 |
| Enseigne et éléments de communication | 100 000 |
| Achat immobilier | / |
| Travaux et aménagements | 100 000 |
| Matériel | 200 000 |
| Matériel de bureau | 70 000 |
| Stock de matières et produits | 100 000 |
| Trésorerie de départ | 500 000 |

Somme :1.700.000.000**III.2. Coûts fixes de projet**

| | |
|-------------------|--------|
| Assurances | 20 000 |
|-------------------|--------|

| | |
|--|--------|
| | |
| Telephone, internet | 10 000 |
| Autres abonnements | / |
| Carburant, transports | 20 000 |
| Frais de déplacement et hébergement | 10 000 |
| Eau, électricité, gaz | / |
| Mutuelle | 10 000 |
| Fournituresdiverses | / |
| Entretien matériel et vêtements | 50 000 |
| Nettoyage des locaux | 10 000 |
| Budget publicité et communication | 50 000 |

Somme : 290 0000**III.3. Source des revenus**

| | |
|--------------------------------------|--|
| Apport personnel ou familial | / |
| Apports en nature (en valeur) | / |
| Prêt n°1 (nom de la banque) | Le Fonds National de Financement des Entreprises Emergentes (ASF) 5000000 |
| Autrefinancement (libellé) | Investissement à partir d'un entrepreneur 1 500 000 000 |

| Business Model Canvas | | | | |
|--|---|--|--|--|
| Designed for: | | Designed by: | | Date: |
| | | | | |
| Version: | | | | |
| Key Partners | Key Activities | Value Propositions | Customer Relationships | Clients |
| <ul style="list-style-type: none"> • Collecteurs d'algues vertes • Fournisseurs de technologies • Instituts de recherche • Fabricants d'emballages • Marques et distributeurs • Organisations environnementales | <ul style="list-style-type: none"> • Collecte des algues vertes • Séchage et prétraitement • Extraction et purification • Production à grande échelle du liquide • Marketing et vente • Service à la clientèle | <ul style="list-style-type: none"> • Valorisation d'une ressource renouvelable (algues vertes) • Eliminer l'accumulation de déchets marins • Biodégradabilité et compo stabilité • Assurer la fraîcheur et la qualité des produits • Remplacer les produits chimiques nocifs • Réduction des coûts par rapport aux emballages issus de ressources fossiles | <ul style="list-style-type: none"> • Directe • Supports techniques • Gestion des retours et des réclamations • Développement de relations et fidélisation | <ul style="list-style-type: none"> • Fabricants d'emballages (plastique, carton, etc.) • Entreprises de biens de consommation emballés • Industries agroalimentaires • Institutions et organismes environnementaux |
| | Key Resources | | Channels | |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Infrastructures de collecte, production et stockage. • Equipe(Spécialistes, ingénieurs et commerciaux) • Partenariats avec producteurs. • Capital et financements pour démarrer et croître | | <ul style="list-style-type: none"> • Distributeurs d'emballage • Store B2B en ligne • Publicité off-ligne et sur réseaux sociaux • Evènements et salons professionnels | |
| Cost Structure | | | Revenue Streams | |
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>FIXE :</u> <ul style="list-style-type: none"> • Administration (salaires, loyers) / Equipements de Fabrication ▪ <u>VARIABLE</u> <ul style="list-style-type: none"> • Matières premières (algues vertes, additifs) - Production • Marketing et promotion / Recherche et développement | | | <ul style="list-style-type: none"> • Vente directe du liquide à base d'algues vertes • Services à valeur ajoutée (conseils, formations) • Perception de royalties sur chaque unité d'emballage produite | |

