

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
المعهد الوطني لعلوم البحر و قهينة الساحل
Institut National des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



Mémoire de fin d'étude présenté en vue de l'obtention du diplôme
d'ingénieur en sciences de la mer et de l'aménagement du littoral
Option : Aquaculture

*Extraction et identification de certains pigments
caroténoïdes à partir
d'algues brunes*



Présenté par :

M^{lle} BOUKHERCHOUFA NASSIMA
M^{lle} TEBAKH FAZIA

Devant le jury :

M ^r REFES W.	(chargé de cours), ISMAL	Président
M ^{lle} AMROUCHE L.	(maître- assistante), ISMAL	Examinatrice
M ^{me} BACHARI-HOUMA F.	(chargée de cours), ISMAL	Examinatrice
M ^{me} AISSOU C.	(chargée de cours), ISMAL	Promotrice
M ^{lle} OULD AHMED N.	(chargée de cours), ISMAL	co-promotrice

Promotion 2005/2006

SOMMAIRE

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I. – LES ALGUES BRUNES

I.1. – Définition.....	1
I.2. – Morphologie	1
I.3. – Cytologie.....	2
I.4. – les espèces d'algues brunes choisies.....	3
I.4.1-Espèce 1 : <i>Cystoseira compressa</i>	3
A – Systématique.....	3
B - Morphologie.....	3
C -Biologie.....	4
D -Ecologie.....	4
I.4.2-Espèce 2 : <i>Cystoseira barbata</i>	5
A -Systématique.....	5
B -Morphologie.....	5
C -Biologie.....	6
D -Ecologie.....	6
I.4.3-Espèce 3 : <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	6
A -Systématique.....	6
B -Morphologie.....	6
C -Biologie.....	7
D -Ecologie.....	7
I.5. –Composition biochimique.....	8

CHAPITRE II. –LES CAROTENOIDES DANS LES ALGUES MARINES

II.1. – Généralités	9
II.2 – Classification	9
II.3. – Structure	11
II.4. - Biosynthèse	12
II.5 – Aspects physicochimiques.....	15

CHAPITRE III. – RÔLES ET UTILISATIONS

III.1 – Rôles des caroténoïdes	16
III.2. – Utilisations	17

CHAPITRE IV. – METHODES D'IDENTIFICATION DES CAROTENOIDES

IV.1– Chromatographie liquide à haute performance	21
IV.2 – Chromatographie d'adsorption sur colonne.....	21
IV.3 -Chromatographie sur couche mince.....	22
IV.3.1-CCM d'adsorption.....	22
IV.3.2-CCM de partage	23

DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES.

CHAPITRE I : MATERIEL VEGETAL.

I. 1.- Lieu d'étude	24
I.2. – Echantillonnage.....	24
I.3.- Préparation du matériel végétal.....	24

CHAPITRE II : LES TECHNIQUES ANALYTIQUES

II.1.- Détermination de taux d'humidité.....	25
II.2.- Analyse quantitative par Spectrophotométrie	25
II.2.1- Extraction des caroténoïdes par la méthode de Victor et col	25
II.2.2.- Dosage par Spectrophotométrie des caroténoïdes (représenté par le β -carotène)...	26
II.3.- Analyse qualitative spectrale.....	29
II.3.1- Identification des différents spectres.....	29
II.4.- Identification des caroténoïdes par séparation sur chromatographie sur couches Minces « CCM » (Analyse qualitative)	29
II.4.1- Séparation des caroténoïdes sur couches imprégnées par l'huile de paraffine.....	29
II.4.2-Couches non imprégnées.....	31

TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION.

- Résultats.....	33
- Discussion.....	44

CONCLUSION GENERALE

- Annexe
- Bibliographie

Introduction

générale

INTRODUCTION

Les algues marines sont la première manifestation de la vie sur notre globe avec les bactéries, il y'aurait quatre milliards d'années que la matière organique originelle se serait constituée et deux milliards d'années que l'algue procaryotes aurait pris naissance.

Les algues sont, soit microscopiques (unicellulaires), ou macroscopiques (pluricellulaires) ; parmi ces dernières, les algues brunes « les chromophytes », qui peuvent être définies comme toutes les autres algues, comme étant des thallophytes dépourvues de racines, tiges, feuilles et de fleurs. Elles sont pourvues de pigments assimilateurs qui sont les caroténoïdes.

Ces algues font l'objet de par le monde, de nombreuses utilisations alimentaires, cosmétiques et agricoles.

Les caroténoïdes à leur tour ont un intérêt technologique, nutritionnel, pharmaceutique et cosmétique, tel que le β - carotène qui possède la plus grande activité provitaminique (activité biologique) de tous les pigments connus de ce groupe [47].

La synthèse de ce dernier fut réalisée en 1950 par KARRER et al , seulement 4 ans plus tard, le β -carotène fut produit à l'échelle commerciale et utilisé comme pigment dans l'alimentation humaine et animale, et qui est devenu aujourd'hui l'un des caroténoïdes le plus important [49].

En France 60% de l'apport alimentaire en vitamine A est assuré par les caroténoïdes [50].

L'industrie d'extraction des colorants naturels, connaît depuis quelques années un développement technologique important, cette évolution est liée à une demande accrue de la part des industries alimentaires.

Des réserves ont été faites par le comité d'experts Européens (la CEE) sur la liste des additifs alimentaires établie par la FAO ATAMNA (1983), surtout dans le cas des colorants rouges de synthèse chimique. Les caroténoïdes constituent une classe importante parmi les colorants naturels.

En Algérie, l'extraction des colorants à l'échelle industrielle est inexistante, la recherche scientifique dans ce domaine est à l'état embryonnaire (BOUMEDINE ; 1991) ; c'est pourquoi notre étude a porté sur un essai d'extraction des pigments caroténoïdes (colorants naturels) à partir d'algues brunes marines

L'objectif de notre travail se base sur la maîtrise de la technique d'extraction des caroténoïdes à l'échelle de laboratoire, et leur identification précise et cela par la technique de « chromatographie sur couches minces » et par « spectrophotométrie ».

Première partie :

Etude bibliographique

Chapitre I : Les algues brunes : Fucophycées (phaeophycées)

I-1 / Définition :

Les algues brunes sont des algues pluricellulaires et macroscopiques à l'état adulte, qui constituent la classe des Fucophycées (Phæophycées) au sein de la division des chromophytes. (tableau 01 ; voir annexe 01). (BOUDOURESQUE et al ; 1992).

Ces chromophytes, groupe presque entièrement marin, dont il existe environ 1500 espèces dans le monde (RAVEN et al ; 2000), elles sont de couleur qui va du jaune doré jusqu'au brun, due à leur équipement pigmentaire qui est notamment des caroténoïdes (BOUDOURESQUE et al ; 1992).

Les algues brunes en Méditerranée sont en général de taille modeste (de l'ordre du cm), contrairement à celles de l'Atlantique et de la Manche, qui peuvent atteindre plusieurs mètres. Elles sont fréquentes au niveau de l'infra littoral.

I-2 / Morphologie des algues brunes :

Les algues brunes (Fucophycées) représentent un large éventail d'organisation depuis de simples formes filamenteuses, jusqu'à des formes complexes dites cladomiennes unies ou pluricellulaires.

-Thalles encroûtants : ex : *Ralfsia*, « *Aglaozonia* ».

-Thalles filamenteux ou d'allure filamenteuse : *Pilayella*, *Sphacelaria*, *Halopteris*
Cladostephus.

-Thalles cylindriques partiellement filamenteux : (présence caractéristique de poils colorés) : *Sporochmus*, *Arthrocladia*, *Carpomitra*, *Nereira*, *Cutleria multifida* et *C.Chilosa*.

-Thalles minces, comprimés ou foliacés-membraneux : *Cutleria adspersa*, *Zanardinia*, *Desmarestia*, *Taonia*, *Padina*, *Dilophus*, *Dictyota*, *Zonaria*, *Spatoglossum*, *Stypopodium*, *Dictyopteris*, *Punetaria*, *Petalonia*, *Asperococcus compressus*.

-Thalles mucilagineux ou creux : *Asperococcus bollosus*, *Colpomenia*, *Hydroclathrus*, *Castagnea*, *Scytosiphon*.

-Thalles épais, cylindriques ou comprimés : *Fucus*, *Cystoseira*, *Sargassum*, *Chorda*.

-Thalles épais, rubanés ou foliacés : *Phyllariopsis*, *Undaria*, *Laminaria*, *Seccorhiza*, *Dictyota*.

I-3 / Cytologie des algues brunes :

Les algues brunes sont constituées de une ou plusieurs cellules dont lesquelles se trouvent tous les constituants habituels des cellules végétales avec quelques inclusions cytoplasmiques propres à certaines algues.

-La paroi :

Elle est inerte, rigide, plus ou moins épaisse, de nature pectocellulosique (en plus de l'acide alginique), enrobée dans une substance interstitielle composée de mannane et de xylène, a un rôle de protection.

-La membrane cytoplasmique :

Elle est semi-perméable, permet la communication et les échanges nutritifs de la cellule avec son milieu.

-Le cytoplasme :

C'est une solution riche en eau, renferme beaucoup d'ARN, est le siège des réactions métaboliques.

-La mitochondrie :

Elle est en forme de sacs allongés à double membrane, dont la membrane interne forme des crêtes, responsable de la chaîne respiratoire oxydative.

-Les plastes :

Sont des organites de forme ovoïde (type neoplastidie homoplastidié) et de nature lipo-protéique, dont on distingue :

***Les chloroplastes :** Porteurs de pigments chlorophylliens et responsables de la photosynthèse.

***Les chromoplastes :** Porteurs de pigments surnuméraires (accessoires) qui sont les caroténoïdes (α -carotène, β -carotène, oxycarotène, fucoxanthine, lutéine,...).

-Le noyau :

Est entouré d'une membrane dont l'ADN se trouve dans le nucléoplasme .Il renferme 1 ou 2 nucléoles.

-Les vacuoles :

Elles maintiennent le milieu intérieur, gestion de l'eau, de sels minéraux et certains déchets.

-Les produits d'élaboration :

Ils sont issus de l'activité photosynthétique, sous forme liquide (en solution dans le suc vacuolaire comme la laminarine ou solide (globules de lipides), on remarque aussi l'absence d'amidon et la présence d'autres membranes alginates qui ont de nombreuses applications industrielles, en plus des corps physoïdes dans certains sont groupés (produits de métabolisme).

I-4 / Les espèces d'Algues brunes utilisées :

I-4-1 / Espèce 01 : Cystoseira Compressa. (Esper), Gerloff et Nizamuddin.

a/ Systématique:

- Embranchement : Chromophytes.
- Classe : Pheophycées ou Fucophycées.
- S /classe : phaeosporées isogenerates
- Ordre : Fucales.
- Famille : Cystoseiracées.
- Genre : Cystoseira.
- Espèce : Cystoseira compressa

b/ Morphologie:

C'est une espèce fixée au substrat, elle est non épineuse, présence de plusieurs axes courts et rayonnants (espèce cespiteuse) ; des rameaux primaires longs, lisses et aplatis à la base et des rameaux secondaires alternés.

On distingue une forme courte en mode battu, et une forme longue dont les rameaux portent des aérocytes en mode calme.

Il y a la présence de réceptacles terminaux compacts sur les rameaux, lisses, simples ou ramifiés, qui portent des conceptacles (organes reproducteurs).

C'est une algue de couleur brune jaunâtre presque dorée à brun foncé de 5 à 100 cm de haut.
(Figure 01)



Figure 01 : *Cystoseira compressa*

c/ Biologie:

C'est une algue autotrophe, présente toute l'année, sans période de repos dont le cycle de développement est monogénétique diploïde.

d/ Ecologie :

C'est une algue photophile qui forme de denses ceintures végétales de la surface jusqu'à 1,5 m de profondeur en stations abritées ou battues.

e/ Position géographique :

Elle est commune sur toutes les côtes Méditerranéennes, en Atlantique nord-est (du sud de l'Espagne aux Canaries), et en mer Noire. (BOUDOURESQUE et al ; 1992).

-En Algérie : Annaba, Alger, Cherchell, Tipaza, Sidi- fredj, Tamenfoust, Oran, Mersa El -Hadjadj, Bou- Ismail, El Mersa, Boudouaw (OULD AHMED ; 1994).

I-4-2/ Espèce 02 : Cystoseira barbata f. barbata. J. Agardh.**a/ Systématique**

- Embranchement: Chromophytes.
- Classe : Pheophycées ou Fucophycées.
- S/ classe : pheosporées isogenerates
- Ordre : Fucales.
- Famille : Cystoseiracées.
- Genre : Cystoseira.
- Espèce : Cystoseira barbata

b/ Morphologie:

C'est une algue souple non épineuse, fixée au substrat, avec la présence d'un seul axe principal dressé (thalle non cespiteux) à base discoïde et à apex lisse saillant, paraissant tronqué.

Il y a la présence de réceptacles terminaux compacts et lisses (5 à 6 mm de long), elle est de couleur brune foncée de 15 à 130 cm de haut (**Figure 02**).



Figure 02 : Cystoseira barbata

c/ Biologie:

Elle est présente toute l'année mais avec la chute des rameaux facultatifs en hivers (BOUDOURESQUE et al; 1992).

d/ Ecologie :

Elle est photophile dans les milieux saumâtres (baies peu profondes à tendance lagunaire, flaques et étangs littoraux, enceintes portuaires) (BOUDOURESQUE et al ; 1992).

e/ Position géographique :

On la trouve dans des stations abritées, de la surface jusqu'à 1 m de profondeur, elle est présente en Atlantique nord-est (Cadix), Méditerranée, mer Noire (BOUDOURESQUE et al, 1992).

-En Algérie :Skikda ,Cherchell ,Alger (OULD AHMED ;1994).

I-4-3/ Espèce 03 : Cystoseira tamariscifolia (Hudson) Papenfuss.**a/ Systématique :**

- Embranchement: Chromophytes.
- Classe : Pheophycées ou Fucophycées.
- S/classe : pheosporées isogenerates
- Ordre : Fucales.
- Famille : Cystoseiracées.
- Genre : Cystoseira.
- Espèce : Cystoseira tamariscifolia

b/ Morphologie:

C'est une algue pouvant atteindre jusqu'à 60 cm de hauteur, épineuse au toucher .Elle est de couleur brun ou olive avec des irisations bleuâtres quand elle est jeune (Figure 03).

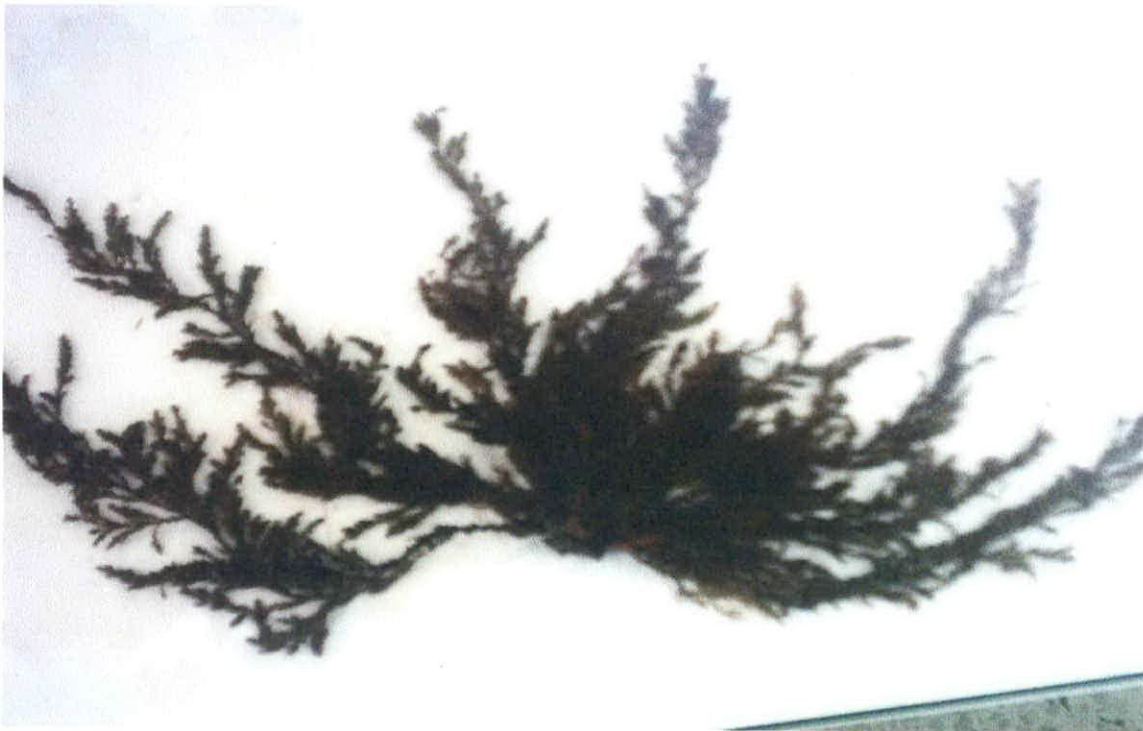


Figure 03 : *Cystoseira tamariscifolia*

c/ Biologie:

C'est une algue présente toute l'année. (BOUDOURESQUE et al ; 1992).

d/ Ecologie :

C'est une espèce vivant dans des biotopes photophiles superficiels de mode battu, trouvée dans l'étage infralittoral fixée sur substrat rocheux ou plus haut sur substrat dans des cuvettes profondes (BOUDOURESQUE et al ,1992).

e/ Position géographique :

On la trouve en Atlantique nord-est (des îles Britanniques à la Mauritanie) ; très localisée en Méditerranée (mer d'Alboran, Espagne, Afrique du Nord, Sicile).

-En Algérie : Annaba, Alger, Oran, Mersa El Hadjadj , Cherchell (OULD AHMED ;1994).

Cette espèce est très sensible aux pollutions de surface (détergents, hydrocarbures) et sa régression est toujours le signe d'une dégradation du milieu (BOUDOURESQUE et al ,1992).

I-5/ Composition biochimique des algues brunes :

Elles sont en général très riches en protéines (5-11% de la matière sèche), pauvres en lipides (1-5% de la matière sèche) mais présentent un taux en acide gras essentiels supérieur à celui des autres végétaux (JAROUSEAU ; 2006 in [8]).

La valeur nutritionnelle peut s'expliquer en grande partie en plus de protéines par la présence de fibres (laminarine : 33 à 61 %), les minéraux (36% de matière sèche : Iode), des teneurs intéressantes en vitamine C et E et des polyphénols (5-15% de matière sèche) (JAROUSSEAU ; 2006 in [8]).

L'amidon est toujours absent. (BOUDOURESQUE et al ; 1992, LARPENT et al ; 1997, RAVEN et al ; 2000).

En plus des chlorophylles a et c, les plastes des algues brunes contiennent encore divers caroténoïdes, en particulier une grande quantité de xanthophylles et carotènes qui donnent la couleur caractéristique des algues brunes (BOUDOURESQUE et al ; 1992, LARPENT et al ; 1997, RAVEN et al ; 2000).

Cette richesse en caroténoïdes a fait des algues brunes le meilleur végétal pour l'extraction des caroténoïdes.

Chapitre II : Les caroténoïdes dans les algues brunes.

II – 1 – Généralités :

Carotène, caroténoïdes, sont des mots dérivés de *Daucus carota*, le nom latin de la carotte dont le β - carotène fut extrait et isolé pour la première fois en 1831 (GHAZI et SAHRAOUI ; 2002).

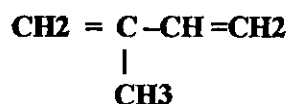
Les caroténoïdes sont appelés pigments photosynthétiques accessoires, leur rôle au niveau du tissu végétal est essentiellement l'absorption des photons lumineux, pour les transférer à la chlorophylle lors du processus photosynthétique. Près de 10 % des caroténoïdes et parmi eux, l' α - carotène, la cryptoxanthine et le β - carotène sont des précurseurs de la vitamine A (MOREAU et PRAT ; 2005 in [2]).

Les caroténoïdes sont largement répandus dans la nature, à l'origine de teintes brillantes : jaune, orange et rouge de nombreux fruits comestibles (oranges, citrons, pêches, abricots, fraises,...), de légumes (carottes, tomates, ... etc.), de champignons (girolle), de fleurs ; ils sont aussi présents dans les produits animaux ; jaune d'œufs, homard, langouste et poissons divers. (LINDEN et L'ORIENT. 1994).

Plus de 60 pigments caroténoïdes différents, ont été identifiés chez les algues (LIAAEN-JENSEN ; 1977,1979 in [46]), mais seulement 4 ou 5 sont présents dans toutes les classes d'algues.

Sur le plan chimique, les caroténoïdes à 40 atomes de carbones appartiennent à une grande classe chimique appelée : les terpènes, plus précisément dans le groupe des tetraterpènes qui est un système à double liaisons conjuguées avec des unités cycliques (parfois non cycliques) aux extrémités de la molécule (LOUISOT, 1974 in BOUMEDINE ; 1991).

Ces pigments, au nombre d'une centaine, dérivent d'un carbure fondamental, l'Isoprène :



II – 2 – Classification des caroténoïdes :

Ces hydrocarbures fortement insaturés, peuvent être plus ou moins oxygénés (PAOLO -ROVESTI ; 1976 in BENCHOUK et BENKHEROUF ; 1996), ce caractère a permis leur classement en deux grands groupes :

II – 2 – 1 – Les carotènes :

Sont des hydrocarbures polyéniques formés par de longues chaînes hydrophobes, sont associés à la chlorophylle dans les cellules vertes.

Ces carotènes peuvent être considérés comme la structure de base et tous les autres caroténoïdes en dérivent par cyclisation, déshydrogénation et oxydation. (NEWMAN ; 1972 in GHAZI et SAHRAOUI; 2005).

Le principal représentant de ce groupe est le β - carotène, son oxydation au niveau de la double liaison médiane donne naissance à deux molécules de rétinol (vitamine A) ; ce sont des provitamines A (ADRIAN et al 1981 in BENCHOUK et BENKHEROUF ; 1996). (Figure. 4).

Les principales provitamines A sont :

- β - carotène
- α - carotène
- delta- carotène
- γ - carotène
- Cryptoxanthine
- Citroxanthine
- Cryptocapsine

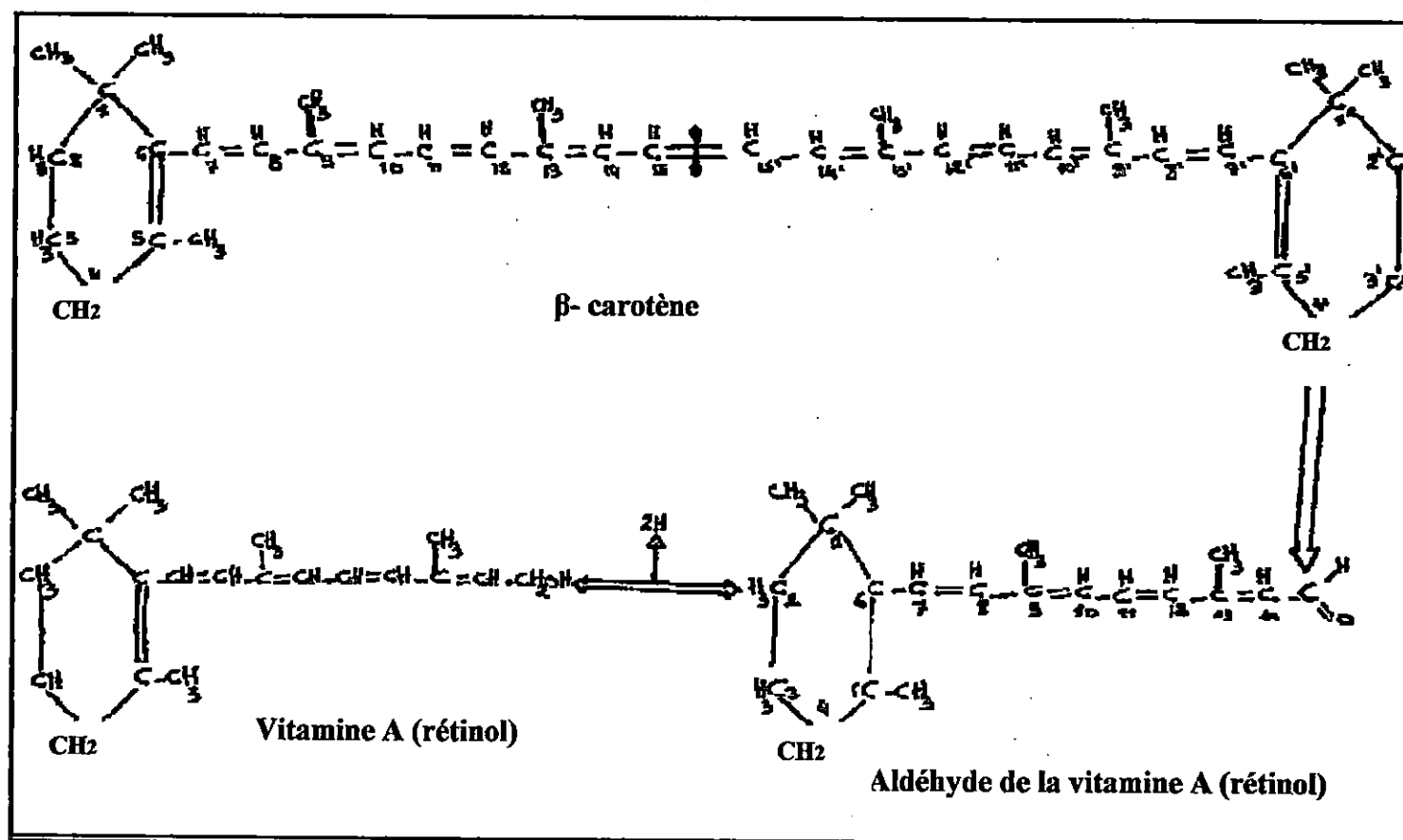


Figure 04 : Oxydation du β -carotène donnant naissance à 2 molécules de vitamine A (GARRET et GRISHAM; 2000)

III -2 – 2- Les xanthophylles :

Les xanthophylles sont un ensemble de pigments caroténoïdes oxygénés, portant des groupes hydroxylés. Elles sont dépourvues d'efficacité vitaminique A à l'exception de la cryptoxanthine (CAPON et al ; 1993 in GHAZI et SAHRAOUI ; 2005).

Ces xanthophylles sont initialement des produits d'hydroxylation des carotènes, possèdent des fonctions alcool ou cétone (c'est le cas de la zéaxanthine ou de la lutéine). Cette hydroxylation peut être suivie par une autre oxydation pour donner des époxydes ; c'est le cas de la capsanthine ou de l'astaxanthine.

Les feuilles et les fruits des plantes supérieures en renferment une large variété, la principale xanthophylle est la lutéine $C_{40}H_{56}O_2$, qui se trouve également dans le Jaune d'œuf.

Les feuilles renferment d'autres xanthophylles tel que la zéaxanthine ou la lycoxanthine (LASCOMBES ; 1975 in BOUMEDINE ; 1991).

Parmi les xanthophylles spéciales aux algues, il faut citer la fucoxanthine qui associée à la néofucoxanthine colore les phéoplastes.

Les xanthophylles les plus connues sont :

- Xanthophylle
- Zéaxanthine
- Lutéine
- Astaxanthine
- Violaxanthine
- Cryptoxanthine

II – 3 – Structure des caroténoïdes :

La famille des caroténoïdes est constituée de deux groupes :

Les hydrocarbures polyéniques et les caroténoïdes oxygénés (NEWMAN ; 1972 in BOUMEDINE ; 1991).

II – 3 – 1 – les caroténoïdes hydrocarburés :

Ce sont des composés considérés comme les précurseurs des autres caroténoïdes.

La structure de ce groupe est un système de 8 à 9 doubles liaisons conjuguées de formule générale $C_{40}H_{56}$.

Au fur et à mesure que ces doubles liaisons conjuguées sont saturées, le produit perd sa couleur. Ce groupe est très répandu aussi bien dans le règne végétal que dans le règne animal.

Le β - carotène constitue la majeure partie des mélanges de carotènes se trouvant dans le végétal (BRAVERMAN ; 1949 in BENCHOUK et BENKHEROUF ; 1996), et chez toutes les algues.

En plus des isomères de carotène, ce groupe renferme d'autres constituants tel que lycopène (tomate), citroxanthine (peau d'orange), etc (Figure 05).

II – 3 – 2 – les caroténoïdes oxygénés :

Les caroténoïdes oxygénés appelés aussi xanthophylles, possèdent de plus par rapport aux carotènes, des atomes d'oxygène (groupes cétoniques $-C=O$ et groupes hydroxyles $-C-OH$). (LIAAN-JENSEN et STOREBAKKEN; 1990 in GHAZI et SAHRAOUI ; 2005) (Figure 05).

Ce groupe est dérivé des caroténoïdes hydrocarburés, précédemment mentionnés, par oxydation.

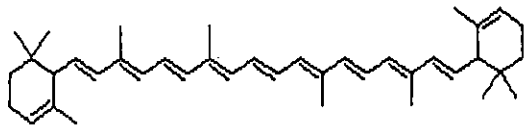
Ce groupe des caroténoïdes oxygénés compte plusieurs dérivés parmi lesquels, nous pouvons citer :

- les dérivés hydroxyles (lutéine, zéaxanthine).
- les dérivés acides (acide apo – 8' - caroténoïque)
- les dérivés hydroxylés et cétoniques (capsanthine)
- les dérivés cétoniques (cantaxanthine)

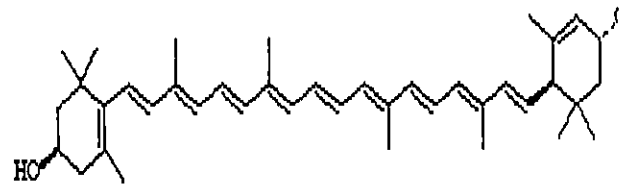
II – 4 – Biosynthèse des caroténoïdes :

Les caroténoïdes sont synthétisés par dimérisation « tête à tête » de deux molécules de pyrophosphate de géranyl géranyl (GGPP).

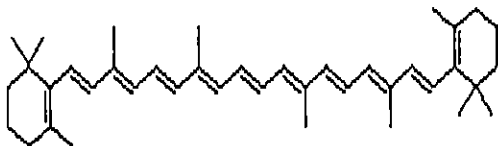
Ces composés sont très insaturés et le nombre élevé de double liaisons conjuguées leur confère une coloration rouge ou jaune franche ; il se forme de phytoène qui se transforme en carotène, par désaturation et cyclisation des extrémités. L'introduction des groupes oxygénés permet la formation des xanthophylles (MAZLIAK ; 1979 in DJABALI et HAMMOUCHE ; 1997). (Figure 06)



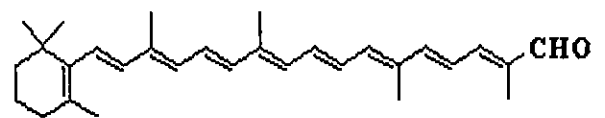
β -carotène



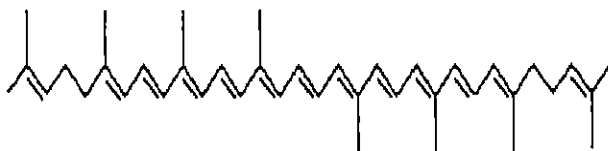
lutéine



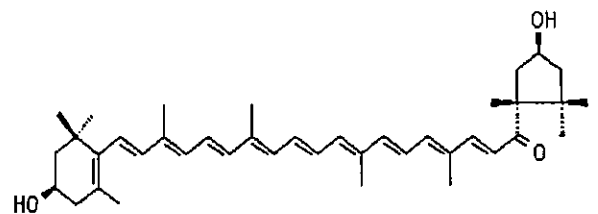
α -carotène



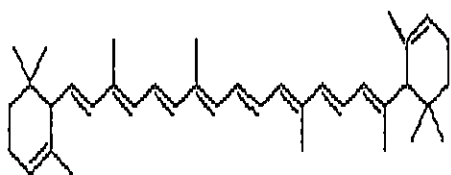
β - apo - 8' - caroténoïque



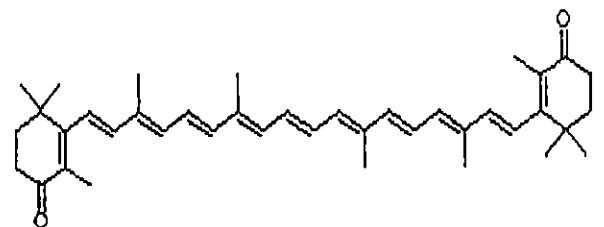
lycopène



capsanthine



γ -carotène



cantaxanthine

Figure 05 : Structure de quelques caroténoïdes (<http://www.food-info.net/fr/caro/occ.htm>).

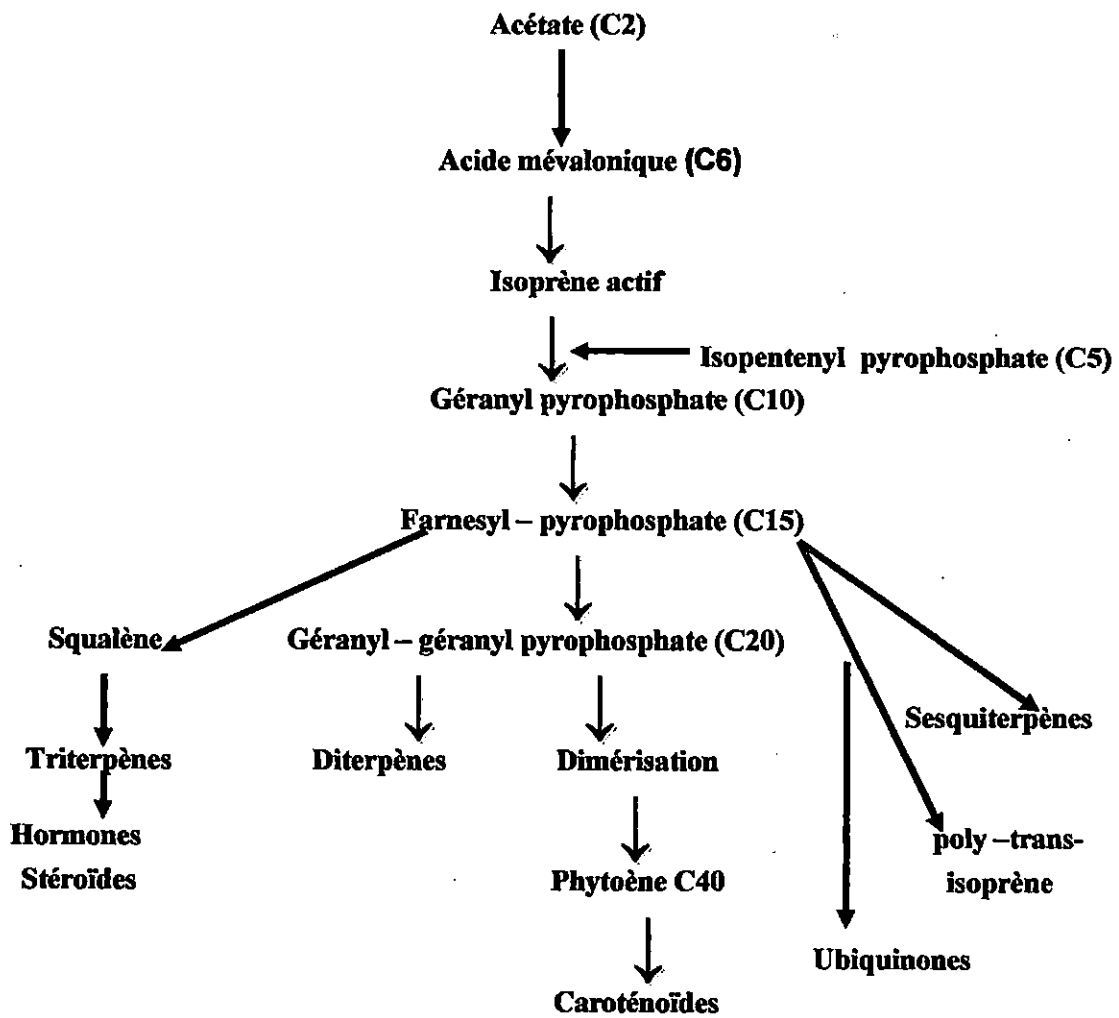


Figure 06 : Différentes étapes de biosynthèse des caroténoïdes (d'après Luisot ; 1984 in BOUMEDINE ; 1991).

II – 5 – Aspects physicochimiques des caroténoïdes :

Les pigments caroténoïdes sont instables à la température, à la lumière et à l'air. Les phénomènes de dégradation sont accélérés sous l'action de la température.

Cependant, leur intensité dépend largement du type de caroténoïdes et du milieu dans lequel se trouve le pigment. (BENCHOUK et BENKHEROUF ; 1996).

CABIBEL (1976) signale que le β -carotène cristallisé à l'air à la lumière et à 20°C pendant quatre semaines perd 25% de son absorbance maximale. Dans les mêmes conditions mais à 45°C et pendant six semaines, la perte de son absorbance maximale est totale. (BOUMEDINE ; 1991, BENCHOUK et BENKHEROUF ; 1996).

Les colorants naturels jaune à jaune orangé offrent en général une assez bonne stabilité thermique jusqu'aux environs de 80 à 100°C. (BENCHOUK et BENKHEROUF; 1996).

La résistance des caroténoïdes aux traitements thermiques diffère d'un type à un autre. Ainsi, lors des essais en cuisson – extrusion à des températures de 180 à 200 °C, la norbixine apparaît comme la plus résistante, suivie par la bixine viennent ensuite la cantaxanthine, le β -apo – 8'-caroténal et le β - carotène (BERSET et al ; 1984, BERSET et MARTY ; 1986 in BENCHOUK et BENKHEROUF ; 1996).

En solution ou en suspension dans les huiles et graisses non oxydés, les caroténoïdes sont stables. Cependant, l'oxydation de ces substances provoque la formation de peroxydes. (BOUMEDINE ; 1991, CHICHESTER et MMC .FETERS; 1972 in BENCHOUK et BENKHEROUF ; 1996).

Les phénomènes d'oxydation ne sont pas seuls responsables de la décoloration des caroténoïdes, dans la nature les caroténoïdes se trouve généralement sous la forme « trans », extraits et isolés de leur milieu naturel, soumis son protection à l'action de la lumière ou de la température, une stréomutation de la molécule se produit conduisant à l'apparition d'isomère « Cis ».

Cette isomérisation s'accompagne d'un affaiblissement de la couleur, et le maximum d'absorption du spectre se déplace vers les courtes longueurs d'onde (GROSS ; 1977 in BOUMEDINE ; 1991).

Le séchage de la matière végétale doit se faire à une température modérée (40 à 50 °c). Autrement dit, le séchage à forte température peut provoquer une perte notable de caroténoïdes : plus de 50% à partir de 100°c, de 80% à 95% à 140°c (BRADOCK et ESTERSON; 1974 in BENCHOUK et BENKHEROUF ; 1996).

Chapitre III : Rôles et utilisation.

III- 1 – Rôles de caroténoïdes :

Parmi la cinquantaine de caroténoïdes couramment présents dans l'alimentation, une vingtaine est trouvée dans le sang et les tissus humains (FAURE et al ; 1999 in GHAZI et SAHRAOUI ; 2005), parmi eux, citons le β - carotène, le lycopène, le β - cryptoxanthine, la zéaxanthine, la lutéine, la cantaxanthine et l'astaxanthine. (GHAZI et SAHRAOUI ; 2005).

III – 1 – 1 – Fonction biologique : Rôle nutritionnel :

Une des plus importantes fonctions physiologiques des caroténoïdes est leur action comme précurseurs de la vitamine A dans l'organisme animal (GROSS ; 1977 in BENCHOUK et BENKHEROUF ; 1996).

Parmi les caroténoïdes, provitamines A : α -carotène et le β - carotène, sont des vitamines essentielles pour l'alimentation humaine, elles jouissent des propriétés antioxydantes et anticancerigènes. (BENCHOUK et BENKHEROUF; 1996).

La vitamine A est essentielle pour la vision, la croissance et la reproduction ; elle est nécessaire au contrôle et à la différenciation des tissus épithéliaux (CHAUDHARY et al ; 1989 in GHAZI et SAHRAOUI ; 2005).

III- 1 – 2 – Fonction photosynthétique :

Depuis que les caroténoïdes ont été universellement trouvés dans les tissus photosynthétiques, trois importantes photofonctions ont été établies :

A/ - Photoprotection : contre la photosensibilisation :

Les pigments caroténoïdes jouent un rôle de photoprotection chez les végétaux. (KRINSKY ; 1978 in [46]). Lors d'une exposition prolongée à de fortes intensités lumineuses des plantes, le substrat caroténoïde va subir une oxydation et une régénération, ce qui va inhiber potentiellement les dommages cellulaires causés par cette lumière ; donc les caroténoïdes agissent comme des agents protecteurs. (BENCHOUK et BENKHEROUF ; 1996, GHAZI et SAHRAOUI ; 2005).

B/ - Photoréception :

Dans la photosynthèse, les pigments caroténoïdes absorbent l'énergie lumineuse, lorsque la chlorophylle est présente en faible quantité, puis transmettent à celle-ci l'énergie ainsi captée. (KATAYMA et al; 1971 in [46]) (GROSS; 1977 in BENCHOUK et BENKHEROUF; 1996).

C/ - Phototransmission :

Les pigments caroténoïdes participent aux transferts d'énergie chez les organismes photosynthétiques, par multiples interactions avec les donneurs et les accepteurs de cette énergie (COGDELL ; 1978 in [46]), on peut alors trouver des complexes de type caroténoporphyrynes (MOORE et GUST ; 1987 in [46]).

III - 2 - Utilisation des caroténoïdes :

Les pigments caroténoïdes sont largement utilisés dans l'industrie agro-alimentaire pour leur propriétés colorantes (additif et agent colorant), et également dans l'industrie cosmétique ou pharmaceutique pour leurs propriétés antioxydantes et leur capacité de photoprotection (ARNAUD MULLER ; 1997).

III- 2 - 1 - Classification :

Les divers caroténoïdes retenus par la législation Européenne sont répertoriés sous le numéro E 160 (KIGER ; 1964 in BOUMEDINE ; 1991), à laquelle correspond la provitamine A, les xanthophylles voisines étant numérotées E 161. (BOUMEDINE ; 1991, BENCHOUK et BENKHEROUF ; 1996).

III- 2 - 2 - Les caroténoïdes usuels :

Ils sont obtenus par extraction à partir de source naturelle ou par voie synthétique. (BOUMEDINE; 1991, BENCHOUK et BENKHEROUF; 1996).

A/ α - carotène :

Il se présente sous forme de prisme polyédrique brillant, pourpre foncé à reflets bleutés solubles dans l'éther de pétrole, le chloroforme, le sulfure de carbone, le benzène, le toluène, il est peu soluble dans les alcools et l'éther.

Son point de fusion est de 187°C à 188°C (BOUMEDINE; 1991), (FOUASSIN ; 1975 in BENCHOUK et al ; 1996).

B/ β - carotène:

C'est le carotène le plus abondant dans la nature, présentant les mêmes aspects et caractères de solubilité que l' α - carotène, mais, il est cristallisé en paillettes rhombiques rouges presque carrées. Il est moins soluble dans les solvants organiques, son point de fusion est de 190°C à 193°C. (BOUMEDINE ; 1991), (FOUASSIN ; 1975 in BENCHOUK et al ; 1996),

C/ γ - carotène et δ - carotène :

Se rencontre en faibles proportions par apport aux deux premiers. Ils sont d'un aspect identique, en prismes rouges. Leurs points de fusion sont respectivement de 178°C et de 172°C (BENCHOUK et BENKHEROUF ; 1996).

D / Carotène officinal:

C'est un mélange des isomères α et β , mais surtout riche en β - carotène, présenté sous forme de poudre cristalline rouge à reflets bleutés, il est soluble dans l'eau, légèrement soluble dans l'éthanol chaud et les huiles végétales.

L'extraction industrielle du carotène officinal, s'effectue à partir de la carotte (20 à 50mg/kg), de la luzerne (60 à 70 mg /kg) et surtout à partir de l'huile de palme (400 à 600 mg /kg).

Il sert, essentiellement à colorer les margarines et certains produits laitiers (BOUMEDINE ; 1991, BENCHOUK et BENKHEROUF ; 1996).

E/ β - apo - caroténal :

Il se présente en cristaux violets à éclat métallique, il est très soluble dans le sulfure de carbone, le chlorure de méthylène, le chloroforme, le benzène, soluble dans l'éther de pétrole, peu soluble dans l'alcool, le méthanol et dans les huiles végétales, son point de fusion est de 138°C à 139°C. (BENCHOUK et al ; 1996).

F/ Xanthophylles :

Ce sont des dérivés hydroxyliques ou cétoniques du carotène, parmi lesquels : flavoxantine, xanthophylline ou lutéine, zéaxanthine, etc

Ces alcools et cétones caroténoïdiques sont extrêmement abondants et dispersés dans la nature (BENCHOUK et al ; 1996).

III - 2 - 3 - Préparation des caroténoïdes commerciaux :

Les caroténoïdes commerciaux sont préparés par dissolution simultanée du caroténoïde et du palmitate d'ascorbyle dans un solvant comme le chloroforme, l'ensemble est mis dans une solution aqueuse d'un colloïde protecteur (exemple : la gélatine) ; suivie d'une distillation pour éliminer les solvants (BUNNEL ; 1958 in BOUMEDINE ; 1991), parmi ces préparations nous avons :

- Le β - carotène en poudre : hydrosoluble, donnant les dispersions aqueuses allant du jaune -orange à l'orangé rougâtre.
- Le β' - apo - caroténal : poudre grise brune, donnant des dispersions aqueuses rouge-orangés (BOUMEDINE ; 1991).

III - 2 - 4 - Utilisation des préparations de caroténoïdes hydrosolubles en industrie alimentaire:

D'abord, ces produits sont mis en solution dans 10 à 15 fois leur poids en eau, ensuite portés à une température de 80-90°C en agitation. Ils peuvent alors, être incorporés aux produits désirés (INSLER et SCHAUDELP ; 1958 in

BOUMEDINE ; 1991) ; soit directement aux aliments de consommation humaine ou indirectement à l'alimentation des animaux. (BENCHOUK et BENKHEROUF ; 1996).

Les colorants alimentaires, sont employés pour colorer divers aliments tels que : les boissons gazeuses, utilisés à raison de (20 à 100g pour 100 litres) ; aussi dans les fromages à raison de 4 à 20 g / tonnes et en produits de biscuiterie et pâtes alimentaires (à raison de 15 à 35 mg /kg de farine). (FOUASSIN ; 1975 in BENCHOUK et al ; 1996).

III- 2 – 5 – Utilisation dans le domaine pharmaceutique et cosmétologique :

Les caroténoïdes sont des molécules à double liaison, d'où leurs propriétés antioxydantes.

III- 2 – 5– 1 – Action antiradicalaire :

Certains caroténoïdes possèdent la capacité d'agir sur l'oxygène singulet (O₂) et de piéger les radicaux libres (molécules hautement activées), protégeant ainsi les lipides, les protéines et l'ADN des dommages radicalaires (FAURE et al ; 1999 in GHAZI et al ; 2005).

III – 2 –5– 2 – Action immuno-stimulante :

Le β -carotène principalement, mais aussi la canthaxanthine, peuvent faire augmenter de façon significative les défenses immunitaires naturelles (lymphocytes T4 et B) (GHAZI et SAHRAOUI; 2005).

La vitamine A est utilisée dans le traitement de la rougeole, le β -carotène dans celui du SIDA. Des propriétés immunostimulantes ont aussi été découvertes dans le lycopène [42], [43].

III – 2 –5– 3 – Action anticancerigène :

La stimulation du système immunitaire pourrait être associée à la prévention et l'inhibition de certains cancers (tumeurs de la vessie, de la bouche, des voies respiratoires, du sein, du Colon ...) (EDES et al; 1989, GRADELET; 1996 in GHAZI et SAHRAOUI ; 2005).

Le β - carotène inhibe le développement du cancer mais à des doses importantes [3].

Le lycopène est le seul caroténoïde protecteur du cancer de la prostate (BLOCK et al ; 1992, STEINLEIZ et POTTER ; 1993).

III – 2 – 5– 4 – Action sur les tissus épithéliaux :

La vitamine A participe à l'équilibre et au renouvellement des tissus épithéliaux (cicatrisation et affections dermatologiques) [42].

III – 2 –5 – 5 – Action sur la vision :

La lutéine et la zéaxanthine se trouve dans la macula (tache jaune de l'œil) et la protège de la dégénérescence de l'œil intervenant avec l'âge. Grâce à leur propriété anti-oxydante, les caroténoïdes protègent le cristallin.

Le β -carotène agit en synergie avec d'autres anti-oxydants comme les vitamines C et E, les effets bénéfiques sont ainsi augmentés [42], [43].

III – 2 – 5 – 6 – Action anti- vieillissement :

Le β -carotène et d'autres caroténoïdes comme le lycopène sont de puissants lipoprotecteurs ; protègent du « rancissement », qui intervient dans le vieillissement et les maladies dégénératives associées (cancer, dégénérescence cérébrale et pathologie cardiovasculaire).

Le β -carotène freine la vitesse des processus dégénératifs accélérés dans des situations particulières comme l'exposition excessive au soleil, le tabagisme, le diabète,... [43].

III – 2 – 5 – 7 – Action sur la croissance :

Du fait de son rôle dans la croissance et la multiplication des cellules, la vitamine A est nécessaire au bon développement et à la croissance de l'embryon, de l'enfant et de l'adolescent [51].

Chapitre IV : Méthodes d'identification des caroténoïdes.

Nous pouvons citer parmi les différentes techniques d'identification utilisables :

- Chromatographie liquide à haute performance.
- Chromatographie d'adsorption sur colonne.
- Chromatographie sur couche mince.

IV – 1 – Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

C'est vers 1969 qu'apparaît la chromatographie en phase liquide moderne (CPL). En 1973, les premiers appareils commerciaux ont été proposés et depuis la méthode n'a cessé de progresser.

Cette technique présente un champ d'application très vaste (molécules sensibles à la chaleur ou de hautes masses moléculaires) en raison d'un choix important de phase stationnaire et de l'évolution des détecteurs [24].

Principe :

Les principes utilisés dans la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ou à haute résolution, ou encore à haute pression, sont les mêmes que ceux qui sont utilisés dans la chromatographie sur échangeur d'ions ou la chromatographie par exclusion – Diffusion (GARRETT – GRISHAM ; 2000).

L'échantillon doit être totalement soluble dans la phase mobile qui sera appelé solvant d'élution (solvant ou mélange de solvants), celui – ci doit être poussé à haute pression afin d'assurer un débit constant dans la colonne et y éviter toute perte de charge .

L'HPLC classique fait intervenir des mécanismes d'échange soluté / phase mobile / phase stationnaire basé sur les coefficients de partage ou d'adsorption selon la nature des phases présentes (RICHARDIN ; 2006 in [16]).

La détection fait appel à une spectrophotométrie UV/visible à longueur d'onde variable ou encore des appareillages à barrette de diode permettant des analyses spectrales en 3 dimensions et aussi de vérifier la pureté de chaque pic.

Le choix d'un étalon interne satisfaisant demeure une difficulté lorsqu'on veut passer à une estimation quantitative des pics.

IV – 2 – Chromatographie d'adsorption sur colonne :

C'est la première chromatographie réalisée : séparation des pigments végétaux par adsorption sur de la craie (Tswett ; 1906).

Principe :

Le principe de la chromatographie d'adsorption sur colonne repose essentiellement sur des phénomènes d'adsorption et désorption (d'élution) ; la première consiste la fixation d'un gaz, d'un liquide ou d'un soluté sur une surface solide ; elle met en jeu des liaisons

(ex : liaisons hydrogènes), l'adsorption doit être réversible, et la désorption consiste à extraire le soluté adsorbé à l'aide d'un solvant appelé éluant.

Les différents solutés sont plus ou moins adsorbés sur la phase stationnaire, et plus ou moins soluble dans la phase mobile ; il en résulte une migration différentielle des solutés en fonction de la résultante entre les deux forces (de rétention et d'entraînement) et donc une séparation de ces solutés.

IV- 3 – Chromatographie sur couches minces (CCM).

A l'origine utilisée pour la séparation de substances colorées (d'où son nom), la CCM est aujourd'hui une méthode puissante d'analyse qualitative et quantitative [23].

Grâce à cette méthode chromatographique, Schwartz et Patroni- Killam (1985), isolent sur une couche mince d'hydroxyde de calcium Ca (OH₂), les isomères cis et trans, de l' α et du β - carotène

Principe :

Le principe de la chromatographie sur couche mince repose principalement sur des phénomènes d'adsorption, c'est-à-dire qui consiste en un transfert de la substance à analyser d'une phase stationnaire vers une autre mobile ; la phase stationnaire, fréquemment utilisée est le gel de silice, qui est un adsorbant puissant.

La phase mobile est un solvant organique pur, ou un mélange de plusieurs solvants, qui se progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur feuille semi rigide (plastique, aluminium). Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

L'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption. [13].

Généralement en CCM les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composés polaires.

IV-3-1- CCM d'adsorption :

L'adsorption des solutions, cette situation est moins simple que dans celle des gaz. car la substance dissoute et le solvant sont en concurrence pour occuper les points d'adsorption à la surface. Le mécanisme d'adsorption conduit à un équilibre qui dépend de la température, de la pression, et de la concentration. (Figure 07 ; voir annexe 01).

- A température constante , on obtient une isotherme d'adsorption ; courbe d'allure généralement parabolique , dont la partie ascendante est à peu près linéaire aux basses pressions et aux faibles concentrations de la substance dissoute.

le coefficient d'adsorption $\frac{C_{\text{adsorbé}}}{C_{\text{dissous}}}$ est constant.

La vitesse de migration de chaque substance dans un système de solvants :

$$R_F = \frac{\text{Distance parcourue par la substance}}{\text{Distance parcourue par le solvant}}$$

$$0 \leq R_F \leq 1.$$

Si $R_F = 0$, la substance reste au point de départ (l'isotherme coïncide avec l'axe des abscisses).

Si $R_F = 1$, la substance est totalement entraînée par le solvant jusqu'au front (l'isotherme coïncide avec l'axe des ordonnées).

-Principaux adsorbants :

La silice, l'alumine, le kieselguhr, les poudres de cellulose et de polyamide.

Silicagel G (Merck) avec 10% environ de plâtre ; c'est un adsorbant légèrement actif utilisé en chromatographie d'adsorption, de partage, ou d'échange, utilisé pour séparer les substances neutres, acides ou basiques (activer à 100-110°C).

IV-3-2- CCM de partage :

La chromatographie sur des couches imprégnées de produits lipophiles, comme la paraffine, est encore un procédé de partage.

Du fait qu'on se trouve ici en présence d'une phase stationnaire non polaire et d'une phase mobile polaire, on dit que c'est une chromatographie de partage à « phases inversées ».

Les substances se partagent alors entre les deux phases selon l'équation de Nernt (RANDERATH ; 1971).

$$\frac{C_1}{C_2} = \alpha = \text{constante.}$$

C_1, C_2 : Concentrations de la substance dans les phases 1 et 2.

α : Coefficient de partage, influe sur la vitesse de migration des substances.

Deuxième partie :

Matériels et méthodes

Chapitre I : Matériel végétal.

I-1 – Lieu d'étude :

La station de Tipaza été notre lieu d'étude choisi, il s'agit du site appelé : Anses de KOALI ; qui est une baie presque fermée, située à 70 Km à l'ouest d'Alger, le milieu est de mode calme et peu profond, surtout sableux, et à la sortie de la baie, le substrat est rocheux.

I-2 – Echantillonnage :

Notre étude a été réalisée sur trois espèces d'algues brunes qui sont les *Cystoseires* ; *Cystoseira barbata*, *Cystoseira compréssa* et *Cystoseira tamariscifolia*, dont le choix été dû à leur richesse en caroténoïdes et leur abondance dans ce site.

L'exploitation des prélèvements a pour objectif l'utilisation de ces algues après séchage pour extraire les caroténoïdes.

I-3 - Préparation des échantillons :

Pour obtenir la matière sèche, nos échantillons doivent passer par les étapes suivantes :

a/ Lavage :

Le but est de débarrasser l'échantillon de toutes épiphytes (végétales, animales, invertébrés, substances calcaire,... etc.), ces algues sont lavées à grande eau, rincées à l'eau distillée, puis égouttées.

b/ Séchage :

Le séchage se fait à l'air libre pendant une durée de 15 jours, on étale les algues sur des journaux, puis on les couvre par d'autres, afin de les protéger de la lumière pour obtenir le taux maximum de pigments caroténoïdes, et pour faciliter le séchage par absorption de l'eau avec changement des journaux chaque jour.

c/ broyage :

Les algues séchées sont pilées dans un mortier jusqu'à l'obtention d'une poudre pouvant passer à travers un tamis de (200µm) de diamètre pour homogénéiser la poudre. (figure 08: voir annexe 02).

d/ conservation :

La poudre obtenue est stockée dans des bocaux colorés (en brun) et recouverts du papier aluminium pour éviter l'effet négatif de la lumière sur le taux de caroténoïdes.

Chapitre II : Techniques analytiques

II-1 – Détermination du taux d'humidité.

L'évaluation du taux d'humidité de nos échantillons a été réalisée au laboratoire de biochimie de l'unité de recherche de Sidi Fredj de l'ISMAL.

II-1-1-Principe :

Séchage de la poudre d'algues à 103°C dans une étuve jusqu'à obtention d'un poids constant (AOAC ; 1980 in http://www.geniebio.ac-aix-marseille.fr/biospip/IMG/doc/INTRODUCTION_BIG_JO.doc).

II-1-2-Mode opératoire :

Matériel :

- balance basic plus (MC1 Sartorius).
- étuve
- dessiccateur.

Réalisation :

- On pèse la capsule sans couvercle, soit P_0 ce poids.
- On pèse 1g de l'échantillon dans la capsule avec une précision de 0,001 soit P_1 ce poids.
- On met la capsule avec l'échantillon fermée dans l'étuve à 103°C pendant 40 min.
- On retire la capsule de l'étuve, on la met sans couvercle dans un dessiccateur, on la laisse refroidir pendant 20 min. (figure 09: voir annexe 02)
- Après refroidissement, on pèse la capsule avec l'échantillon soit P_2 ce poids.
- On répète l'opération jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

II-1-3- Expression des résultats :

L'humidité est calculée comme suit :

$$\frac{\text{Poids final (constant)} - \text{poids initial}}{\text{Poids de la prise d'essai}} \times 100$$

II-2- Analyse quantitative par Spectrophotométrie.

II-2-1-Extraction des caroténoïdes par la méthode de Victor et col :

L'extraction des caroténoïdes a été réalisée au laboratoire de biochimie de l'unité de recherche (Sidi Fredj) de l'ISMAL et au niveau du laboratoire de biochimie du département de Technologie de l'INA d'Alger (étape d'évaporation des solvants dans un rotavapor).

La méthode choisie pour l'extraction des caroténoïdes est celle de Victor et al ; 1995. (figure 10 ; voir annexe 02).

II-2-1-1-Mode, opératoire :

- Une prise d'essai de 10g de poudre de chaque échantillon est filtrée dans un Buchner sous vide avec 40 ml d'Hexane – Ethanol (1 :1).
(Le mélange est maintenu pendant quelques minutes).
- Cette filtration est poursuivie jusqu'à la décoloration du résidu (l'échantillon est épuisé 3 à 4 fois).
- Le mélange est transvasé dans une ampoule à décanter avec l'ajout de 25 ml d'Hexane et 20 ml d'eau distillée. (figure 11: voir annexe 02)
- Après la décantation on procède à une légère agitation de 30 à 60 secondes, il résulte alors la séparation de 2 phases : phase organique et phase aqueuse (figure 12 : voir annexe 02)
 - La phase aqueuse est réextraite 2 à 3 fois par 40 ml de solvant Ethanol – Hexane (1 :1), à chaque fois la phase organique obtenue est rajoutée à la première phase organique.
 - L'ensemble des phases organiques est lavé avec de l'Hexane 3 à 4 fois et filtré, en présence de Na_2SO_4 qui est additionné au filtrat pour éliminer l'humidité. (figure 13 : voir annexe 02)
- La solution obtenue est évaporée dans un rotavapor à 40°C pour la récupération de l'Hexane. (figure 14 : voir annexe 02).
- Après l'évaporation du solvant, nous procédons à la saponification qui consiste à l'ajout d'un volume égale de KOH méthanoïque 10%.
- Le mélange est chauffé pendant 10 min sur une plaque chauffante à 40°C puis refroidi rapidement avec de la glace.
- Après la saponification, on passe au lavage avec l'Hexane, et à la fin on ajuste le volume à 25 ml avec de l'Hexane.
- Le concentré de chaque échantillon est mis dans un spectrophotomètre pour déterminer leurs absorbances est donc déterminer leurs teneurs en caroténoïdes.

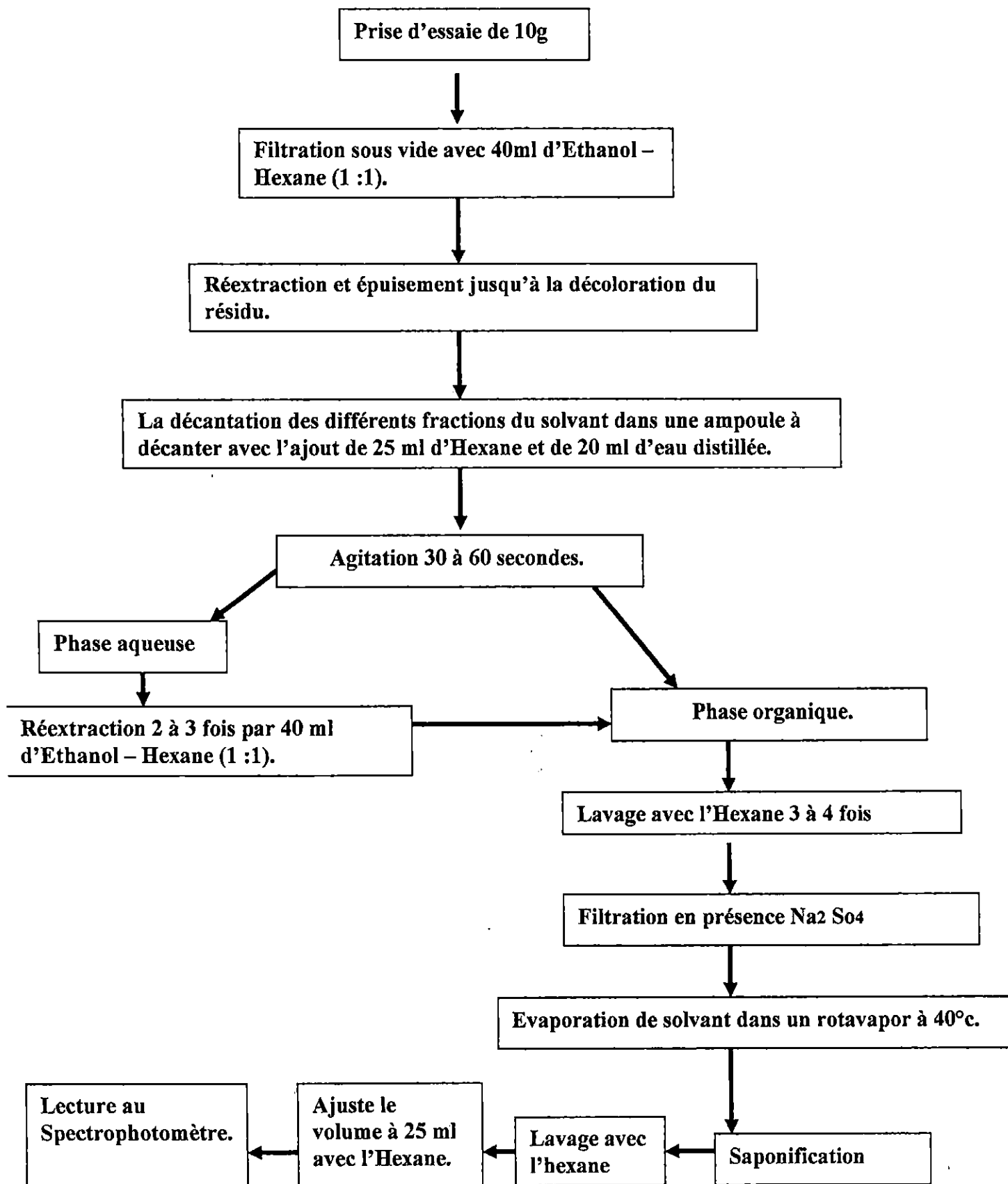
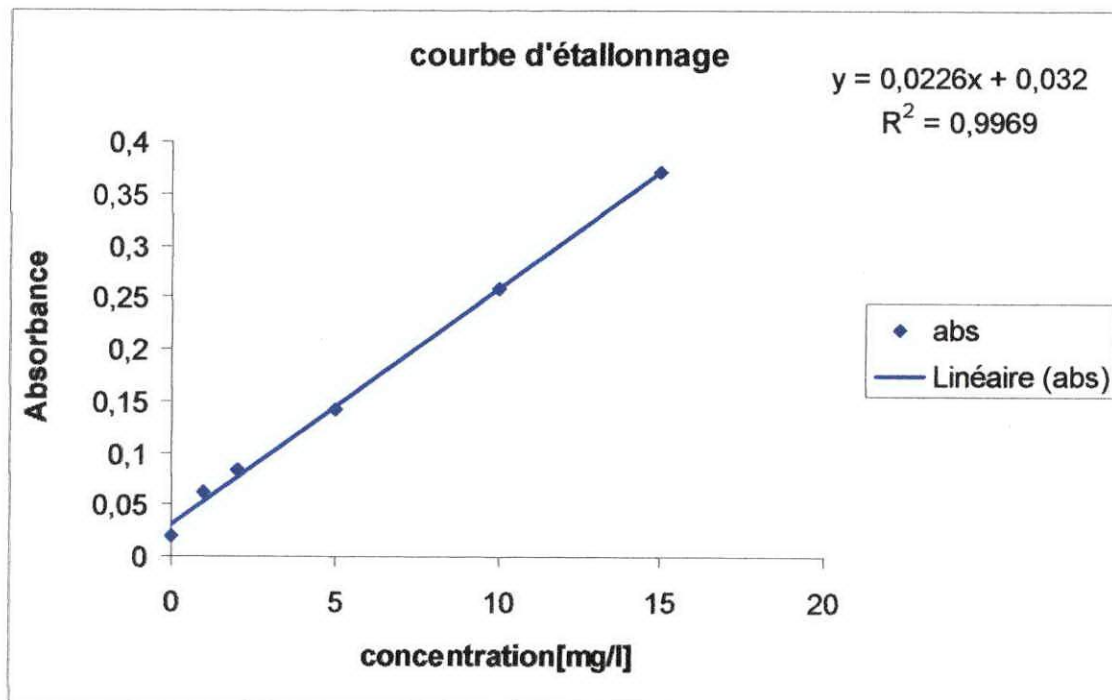


Figure 10 : Protocole d'extraction des caroténoïdes (Victor et al ; 1995 in SADOUN et BENYOUNES ; 2005).

Tableau 01 : Concentrations et absorbances utilisés pour le tracé de la courbe d'étalonnage.

	Concentrations (mg/l)	Absorbances
H₂O	0	0.02
S₁	1	0.063
S₂	2	0.084
S₃	5	0.142
S₄	10	0.259
S₅	15	0.370
Hexane (blanc)	0	0.040

**Figure 09** : Courbe d'étalonnage de bichromate de potassium (standard) en 5 points de dilution..

c- Expression des résultats :

A partir de la courbe d'étalonnage, on évalue les concentrations en β - carotène des échantillons.

II-3- Analyse qualitative spectrale :

L'analyse qualitative pour identifier les différents spectres a été réalisée au laboratoire de biochimie de l'unité de recherche de Sidi Fredj de l'ISMAL.

II-3-1-Identification des différents spectres :

En absence des standards pour les différents caroténoïdes présents dans nos solutions échantillons (sauf pour le β - carotène), et en absence d'un spectrophotomètre à balayage, nous avons procédé à déterminer seulement le maximum d'absorbance pour certains caroténoïdes, dont la longueur d'onde est connue (**tableau 02 : voir annexe 02**).

II-3-1-1-Mode opératoire :

- Une quantité de la solution extraite précédemment (solution mère) est mise dans une cuve qui est ensuite introduite dans un spectrophotomètre visible /UV afin de déterminer les absorbances correspondantes aux différentes longueurs d'onde introduites.
- Ces données sont traduites sous forme d'un balayage.

II-4- Identification des caroténoïdes par séparation sur couches minces « CCM » :

La chromatographie sur couches minces utilisée dans notre travail pour identifier les différents caroténoïdes contenus dans nos échantillons à savoir : *Cystoseira barbata*, *Cystoseira compressa* et *Cystoseira tamariscifolia*, a été réalisée au niveau du laboratoire de biochimie de l'unité de recherche de Sidi Fredj de l'ISMAL.

II-4-1-Séparation des caroténoïdes sur couches imprégnées par l'huile de paraffine :**II-4-1-1-Principe :**

On parle ici de chromatographie de partage du fait qu'on se trouve en présence d'une phase stationnaire non polaire (paraffine liée au support) et une phase mobile polaire (solvant). Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon (substance) est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. La vitesse de migration de chaque substance est donnée par le RF.

II-4-1-2- Mode opératoire :**a- Matériel et réactifs :**

- Cuve chromatographique : un récipient habituellement en verre, forme variable, fermé par un couvercle étanche. (Figure 10 : voir annexe 02)
- Plaque en Aluminium 20*20cm, couverte de gel de silice G et d'hydroxyde de calcium prête à l'emploi. (Figure 11 : voir annexe 02)
- Solvants : méthanol, acétone, éther de pétrole.
- Réactifs : sulfate de sodium (Na_2SO_4), carbonate de calcium (CaCO_3).

b- Préparation des échantillons :

- 1g d'échantillon de chaque espèce est broyé dans 4ml ou 5 ml d'acétone avec la présence du sulfate de sodium Na_2SO_4 (une pincée) et de carbonate de calcium (CaCO_3) (une pincée) jusqu'à l'obtention d'une solution bien verte, qui sera filtrée.
- On ajoute 0,2 ml d'éther de pétrole à 1ml de cette solution [62].

c- Réalisation :

- On plonge des plaques chromatographiques prêtes à l'emploi dans une cuve contenant une solution de 1 'huile de paraffine épaisse à 8% dans l'éther de pétrole. (Figure 12 : voir annexe 02).
- On interrompt l'imprégnation quand le front arrive à 3 cm du bord supérieur.
- On laisse les plaques sécher 24 heures environ à l'air libre (Pour que l'éther de pétrole sera éliminé complètement avant la chromatographie).
- On trace 2 cm dans la partie non imprégnée (*) sur laquelle on dépose une goutte de chaque échantillon à l'aide d'une micropipette, le séchage se fait à l'air libre.
- Ensuite, la plaque sera plongée dans une cuve en position verticale contenant un système de solvants bien déterminé : méthanol /acétone (5 :2) à 1cm du bord inférieur de la plaque

(*) : Le fait de déposer les tâches dans la partie non imprégnée de la couche à pour effet de faire d'abord migrer les substances sous forme d'un trait mince avec le front jusqu'à la zone imprégnée ou la chromatographie proprement dite se fait ; il s'ensuit, une séparation particulièrement poussée qui donne des tâches rectangulaires.

(la partie non imprégnée), puis on ferme la cuve pour qu'elle soit saturée de vapeur des solvants.

- On arrête la migration à 10 cm du bord supérieur (front de solvant), on sèche les plaques à l'aire libre.

d- Lecture des plaques :

On cercle chaque tâche et on pointe leur centre à partir duquel on calcule le RF (Rating Factor, Retarding Factor, Rapport frontal) de chaque échantillon.

Les tâches seront identifiées selon le tableau qui donne les RF des caroténoïdes séparés sur couches imprégnées à l'huile de paraffine (**tableau 03: voir annexe 02**).

II-4-2-Couches non imprégnées :

II-4-2-1-Principe :

On se trouve ici dans le cas de la CCM d'adsorption, dont le principe se repose essentiellement sur deux phénomènes d'adsorption et de désorption qui sont en concurrence. La vitesse de migration de la substance (échantillon) est donnée par le RF.

II-4-2-2-Mode opératoire :

a- Matériel et réactifs :

- Cuve chromatographique
- Plaque en aluminium 20*20cm, couverte de gel de silice G et d'hydroxyde de calcium prête à l'emploi.
- Solvants : méthanol, acétone, éther de pétrole, benzène.
- Réactifs : sulfate de sodium (Na_2SO_4), carbonate de calcium (CaCO_3).
- Révélateur : solution ammoniacale à 5% de nitrate d'argent.

b- Préparation des échantillons :

Pour cette partie nous avons réalisé 4 essais dont le solvant d'extraction et d'élution est différent à chaque fois.

1^{er} essai :

Extraction :

- Une prise d'essai de 0,5g de chaque échantillon, est broyée avec 4ml de méthanol en présence de sulfate de sodium (Na_2SO_4) et de carbonates de calcium (CaCO_3) (une pincée) jusqu'à obtention d'une solution bien verte qui sera filtrée.
- On mélange 1ml de cette solution avec 0,2 ml d'éther de pétrole [62].

Même procédure pour le 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} essai.

c- Réalisation :

- La plaque doit être activée dans l'étuve à 103 à 105°C pendant 10mn, puis retirée et refroidie avant l'utilisation.
- On trace à 2 cm une ligne de départ sur laquelle on dépose une goutte de chaque échantillon à l'aide d'une micropipette, le séchage se fait à l'air libre.
- Ensuite, la plaque sera plongée dans une cuve en position verticale contenant un système éluant bien déterminé (voir tableau 04) à 1cm du bord inférieur de la plaque. On ferme la cuve pour qu'elle soit saturée de vapeur des solvants.
- On arrête la migration à 10 cm du bord supérieur (front du solvant), on sèche les plaques à l'air libre.

Tableau 04 : solvants d'extraction et systèmes éluants utilisés.

	Solvant d'extraction	Système éluant
1^{er} essai	méthanol	Ether de pétrole /benzène/ méthanol (1 :1) et 1% de méthanol
2^{ème} essai	méthanol	benzène /méthanol (98 :2).
3^{ème} essai	méthanol	Acétone / éther de pétrole (1 :1).
4^{ème} essai	éther de pétrole	Ether de pétrole /benzène (1 :1).

d- Lecture des plaques :

-On cercle chaque tâche et on pointe leur centre à partir duquel on calcule le RF (Rating Factor, Retarting Factor, Rapport frontal) de chaque échantillon.

-Les tâches seront identifiées selon la référence (BOUMEDINE ; 1991).

e- lecture des plaques pulvérisées :

On pulvérise la plaque avec un révélateur (solution ammoniacale à 5 % de nitrate d'argent), puis on identifie le RF de chaque échantillon selon la référence (BOUMEDINE ; 1991).

Troisième partie :

Résultats et discussion

Résultats :

1-Le taux d'humidité :

Les différents poids obtenus à chaque pesée de chaque échantillon sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 01: Les différents poids obtenus après chaque pesée.

Echantillon Poids : P (g)	<u>C.barbata</u>	<u>C.compressa</u>	<u>C.tamariscifolia</u>
P ₁	17.3924	17.4055	17.3971
P ₂	17.3568	17.3609	17.3564
P ₃	17.3553	17.3368	17.3412
P ₄	17.3452	17.3336	17.3380
P ₅	17.3443	17.3334	17.3320
P ₆	17.3441	17.3332	17.3319
P ₇	17.3440		

Poids de la capsule : 16. 5148

- La teneur en eau chez les trois espèces est donnée dans le tableau ci-après.

Tableau 02 : Le taux d'humidité chez les trois espèces de Cystoseires.

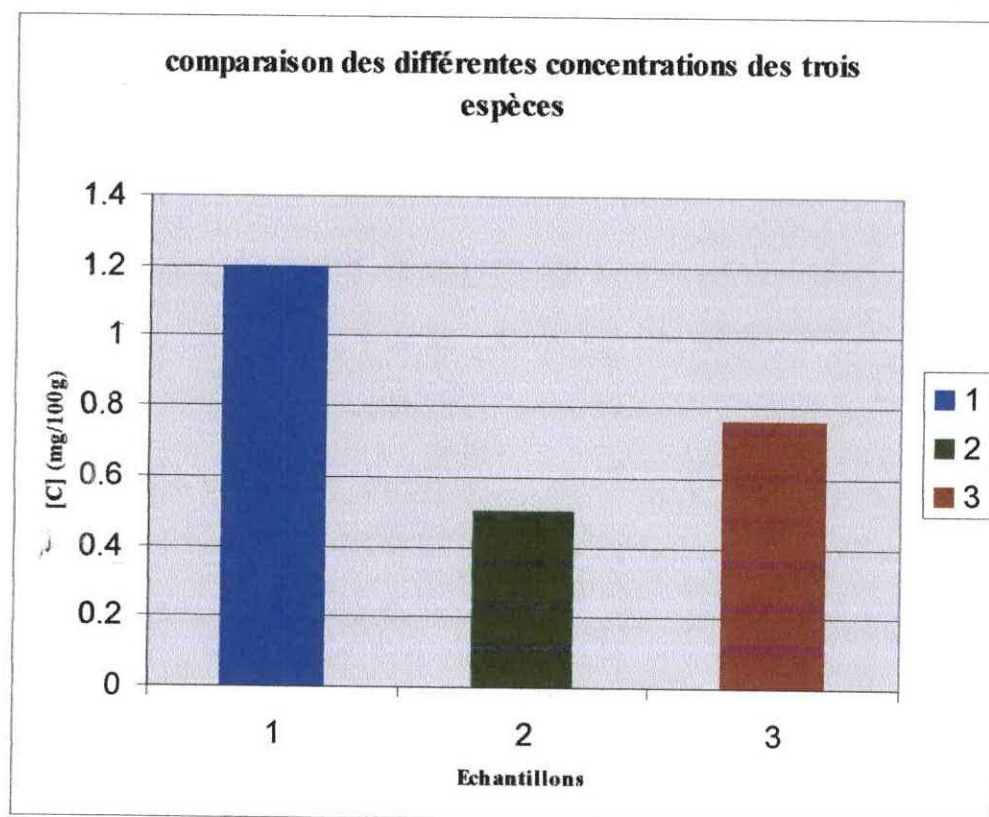
Espèces	Taux d'humidité (%)
<u>Cystoseira barbata</u>	17.08
<u>Cystoseira compressa</u>	18.16
<u>Cytoseira tamariscifolia</u>	18.29

2- Analyse quantitative par Spectrophotométrie des caroténoïdes représentés par le β - carotène :

A partir de la courbe d'étalonnage on a calculé les différentes concentrations en caroténoïdes (représentées par le β -carotène) correspondantes aux différentes absorbances.

Tableau 03:Concentrations en β -carotène correspondantes aux différentes absorbances.

Echantillons	Absorbance	[C] mg/l	[C] mg/100g
<u><i>Cystoseira barbata</i></u>	0.143	5 mg/l.	1,2 mg / 100g
<u><i>Cystoseira compressa</i></u>	0.078	2.03 mg / l	0,5 mg / 100g
<u><i>Cystoseira tamariscifolia</i></u>	0.097	3 mg / l	0,76 mg / 100g



1 : *C.barbata*

2 : *C.compressa*

3 : *C.tamariscifolia*

Figure 01 : Histogramme présentant les différentes teneurs en caroténoïdes (représentées par le β -carotène) chez les trois espèces. ✕

3- Identification des différents spectres :

Les différentes absorbances obtenues en fonction de chaque longueur d'onde des pigments caroténoïdes pour chaque échantillon, sont présentées dans le tableau ci- dessous.

Tableau 04 : Absorbances correspondantes aux différentes longueurs d'onde.

LW (*)	Absorbances		
	Echantillon.1 <i>C.barbata</i>	Echantillon .2 <i>C. compressa</i>	Echantillon.3 <i>C.tamariscifolia</i>
470	0	0	0
450	1,211	0,948	1,434
440	0,957	0,827	1,087
425	3,392	3,491	3,444
400	3,384	2,486	1,939
380	1,254	0,780	1,163

(*) : longueurs d'onde

On trace le graphe qui présente ces différentes données afin d'avoir le maximum d'absorbance (pics d'absorbance) de certains pigments caroténoïdes

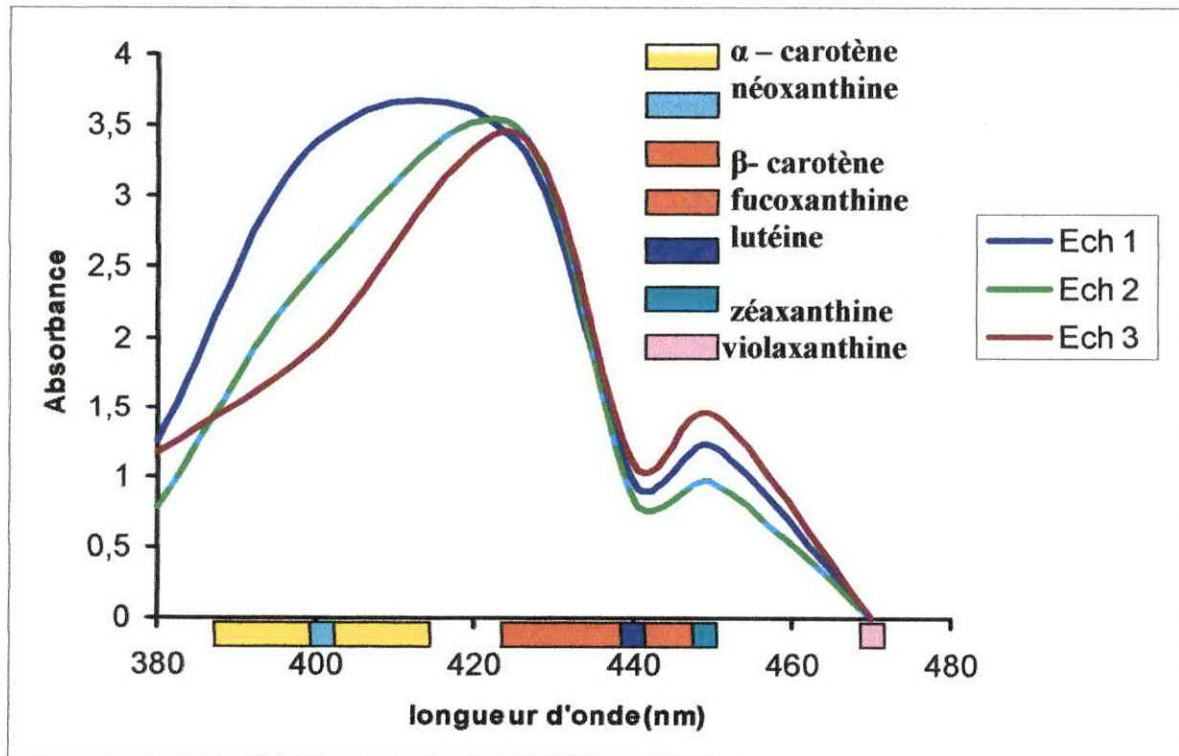


Figure 02 : Balayage d'absorbance de quelques pigments caroténoïdes.

4- Identification des caroténoïdes par CCM :

4-1- Lecture des plaques imprégnées à l'huile de paraffine :

Système éluant : méthanol / acétone (5 : 2) saturé de huile de paraffine.

En absence des standards correspondants aux différents RF, les composés ont été déterminés selon la littérature (tableau 03 ; voir annexe 02).

D'après les plaques présentées dans les figures ci - dessous, les taches des pigments obtenus sont interprétées dans le tableau suivant :

Tableau 05 : Les pigments correspondants aux différents RF trouvés.

	RF	Couleurs des taches	Pigments correspondants	Groupe ment fonctionnel
<i>C. barbata</i> Parcours : 8 cm (2h)	0,12 ≈ 0,1	orange	B-carotène	-
	0,475 ≈ 0,48	Orange claire	Torularhodine, ester méthylique	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{-C OR} \end{array}$
	0,725 ≈ 0,69	Orange foncé	Acide β-apo-8'caroténique (C30), ester méthylique	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{-C OR} \end{array}$
<i>C. compressa</i> Parcours : 10cm (2 h :30)	0,10	Orange	B - carotène	-
	0,21 ≈ 0,15	Jaune clair	γ -carotène	-
	0,66 ≈ 0,69	Orange clair à jaune	Acide β-apo-8'caroténique (C30), ester méthylique	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{-C OR} \end{array}$
	0,76 ≈ 0,83	Orange foncé	B-apo-8'caroténal (C30)	=O
<i>C. tamariscifolia</i> Parcours : 8 cm (2h)	0,12 ≈ 0,1	orange	B - carotène	-
	0,47 ≈ 0,48	jaune	Torularhodine, ester méthylique	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{-C OR} \end{array}$
	0,675 ≈ 0,69	orange foncé	Acide β-apo-8'caroténique (30), ester méthylique	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{-C OR} \end{array}$

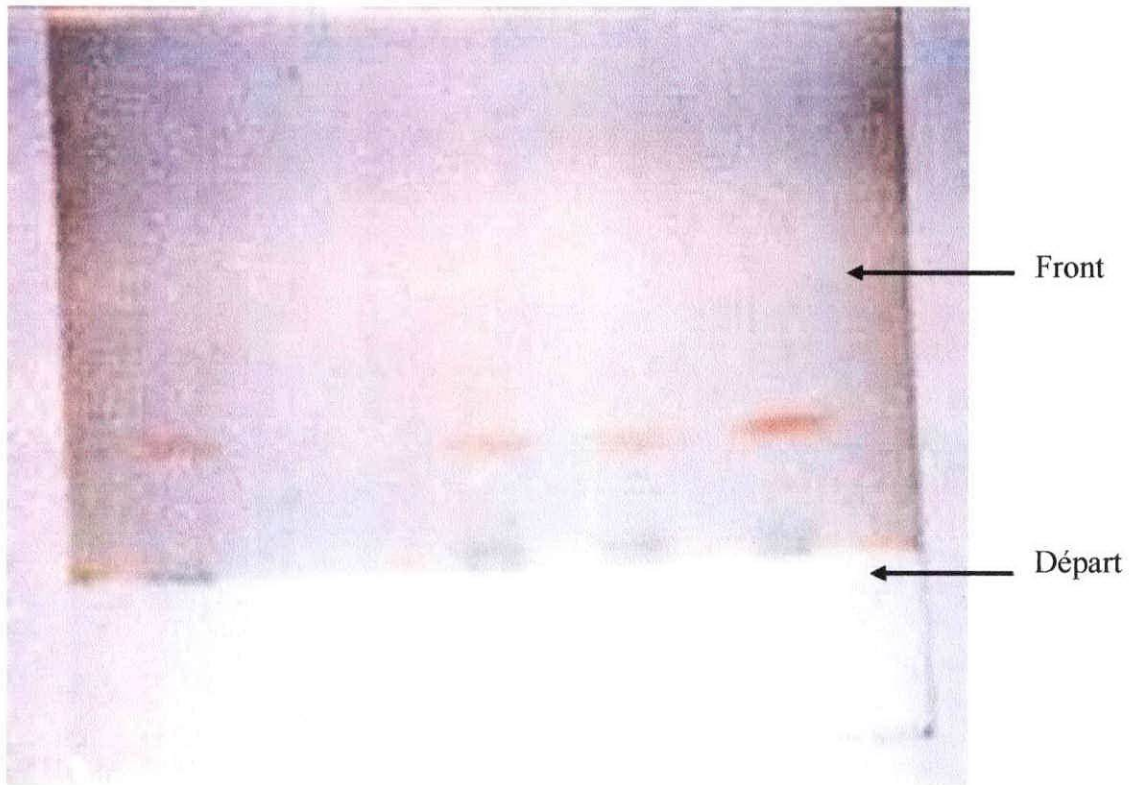


Figure 03 : Plaque chromatographique présentant les taches des pigments chez *Cystoseira compressa*. (temps de développement : 2h30)

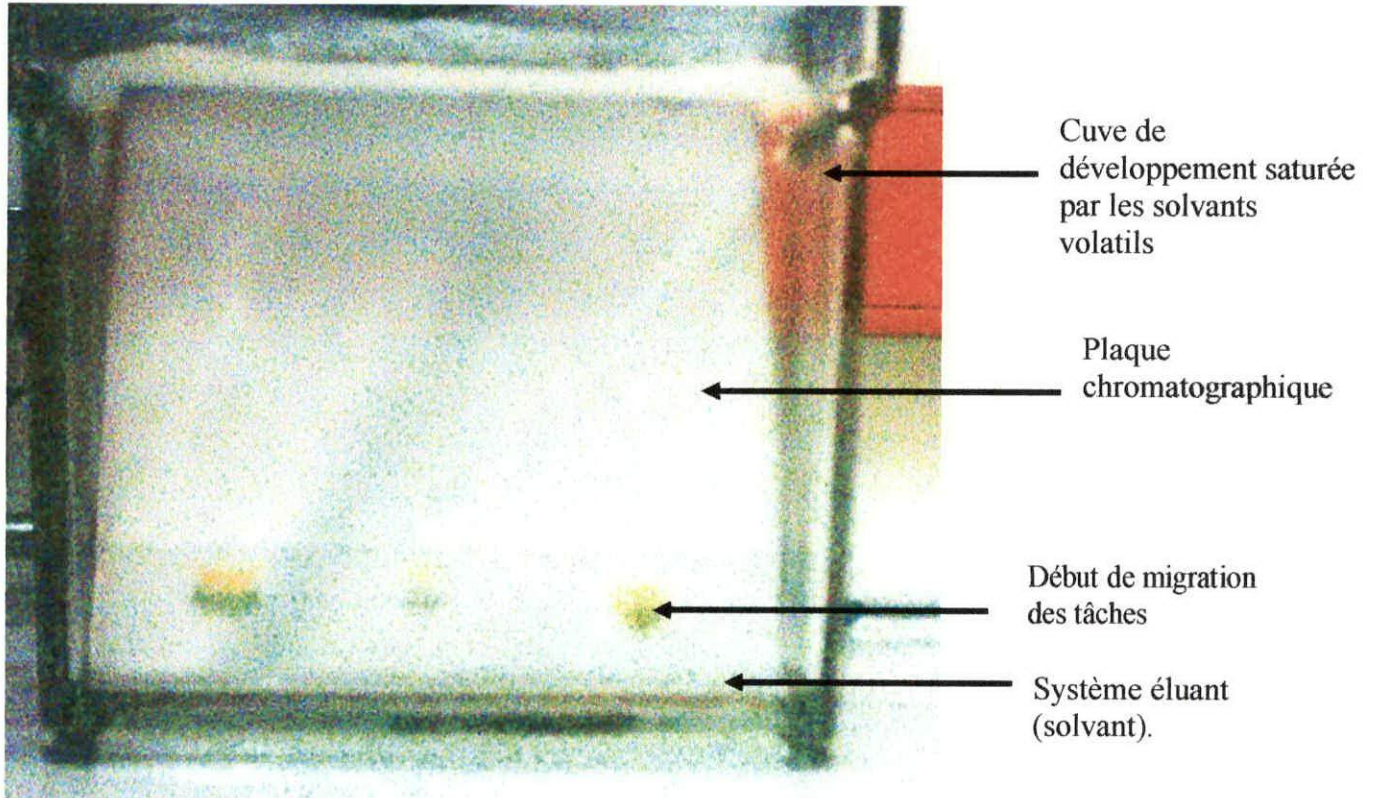


Figure 04 : Plaque chromatographique présentant les taches des pigments chez *Cystoseira barbata* et *Cystoseira tamaricifolia* après 15 min de dépôt.

pour C. compressa : pas de tâches sont très faibles, donc pas de tâches

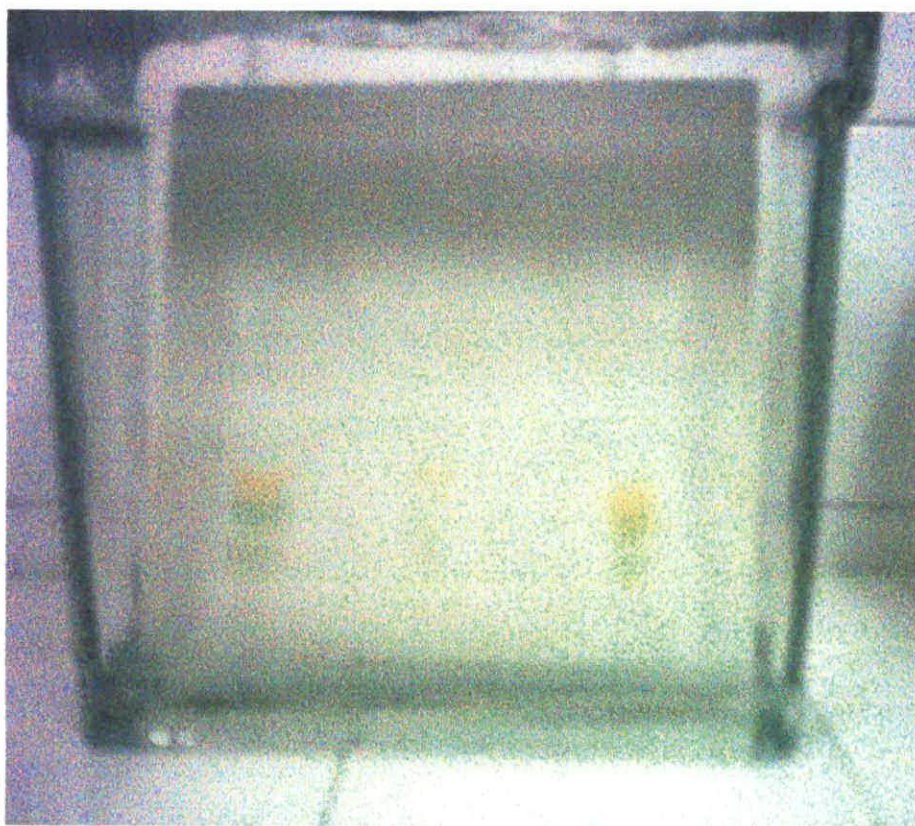


Figure 05 : Développement des taches après 35 min de dépôt chez *C.barbata* et *C.tamariscifolia*



Figure 06: Cuve chromatographique contenant la plaque CCM (fin de migration)

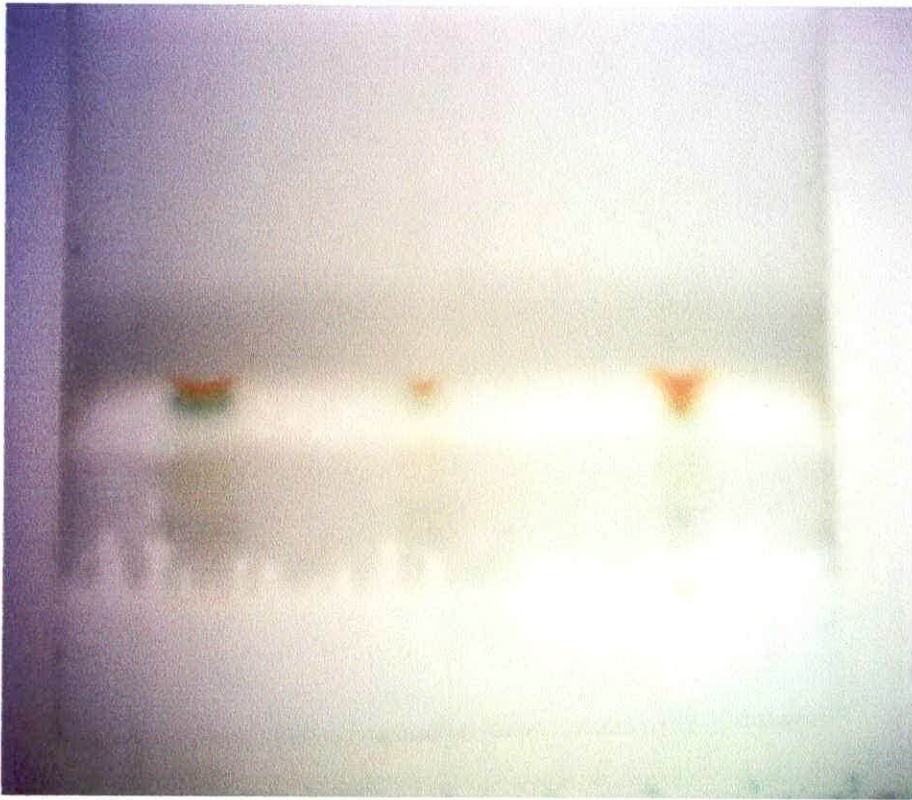


Figure 07 : Les taches des pigments chez *C.barbata* et *C. tamariscifolia* après 2h.

4-2- lecture des plaques non imprégnées :

- 1^{er} Système éluant : éther de pétrole/ benzen (5 :5) + 1 % méthanol

- pour l'extraction on utilise le méthanol
- parcours : 10 cm
- temps de développement : 14 min

-Avant la pulvérisation de la plaque :

Les composés correspondants aux différents RF ont été déterminés selon la littérature (BOUMEDINE ; 1991) .

Tableau 06 : les pigments correspondants aux différents RF trouvés chez *Cystoseira tamariscifolia*

	RF	Couleur des taches	Pigments correspondants	Groupe ment fonctionnel
<i>C.tamariscifolia</i>	0,11 ≈ 0,07	orange	Cryptoxanthine	-OH
	0,97 ≈ 0,94	Orange jaune	β- carotène	-

Pour les espèces : *C. barbata* et *C. compressa* :

Rien n'a été observé, mais après pulvérisation de la plaque avec la solution ammoniacale à 5% de nitrate d'argent, (EGGER; 1962, planta 58-664 in RANDERATH; 1971)

on a pu obtenir pour les deux espèces :

une tache jaune dont le RF = 0,13 ..

- 2^{ème} Système éluant : benzen / méthanol (98 : 2).

- pour l'extraction on utilise le méthanol
- parcours : 10 cm.
- temps de développement : 14 min.

- Avant la pulvérisation de la plaque on a les pigments suivants :

**Tableau 07 : les pigments correspondants aux différents RF trouvés
Chez les trois espèces de Cystoseires**

	RF	Couleurs des taches	Pigments correspondants	Groupe fonctionnel
<i>C. tamariscifolia</i>	0,1 ≈ 0,07	jaune	Cryptoxanthine	-OH
	0,18 ≈ 0,15	Orange foncé	-	-
	0,21 ≈ 0,26	Orange jaune	Rhodoxanthine	= O
	0,98 ≈ 0,94	orange	β-carotène	
<i>C. compressa</i>	0,1 ≈ 0,07	Orange -jaune	Cryptoxanthine	-OH
<i>C. barbata</i>	0,1 ≈ 0,07	Orange -jaune	Cryptoxanthine	-OH

-Après la pulvérisation de nos plaques avec la solution ammoniacale à 5% de nitrate d'argent, rien n'a été de plus observé.

- 3^{ème} Système éluant : acétone / éther de pétrole (1 :1)

- pour l'extraction on utilise le méthanol
- parcours : 10 cm
- temps de développement : 14min

Avant la pulvérisation de la plaque ; les taches sont totalement entraînées jusqu'au front (pas de séparation), et on remarque le même résultat dans le cas de la pulvérisation de la plaque.

- 4^{ème} Système éluant : éther de pétrole / benzen (1 :1).

-pour l'extraction on utilise l'éther de pétrole ou (l'acétone).

-parcours : 10 cm.

-temps de développement : 14 min.

Avant et après pulvérisation des plaques avec la solution ammoniacale à 5% de nitrate d'argent, aucune tache n'a été observée.

Discussion :

Les caroténoïdes par leurs rôles nutritionnel, photoprotecteur, agent colorant et antioxydant, ont fait que plusieurs chercheurs s'intéressent à ces pigments.

Les algues marines en particulier les algues brunes constituent une source disponible et facile à obtenir pour extraire ces caroténoïdes.

L'essai de la mise au point des techniques d'extraction et d'identification nous a permis de déterminer chez les trois espèces d'algues brunes étudiées (*Cystoseires* ; *C. barbata*, *C. tamariscifolia*, *C. compressa*), la teneur en caroténoïdes représentée par le β -carotène et d'identifier certains pigments caroténoïdes.

-Détermination de taux d'humidité :

La teneur en eau chez les trois espèces d'algues séchées est élevée, ce qui peut s'expliquer par les conditions de séchage. ce dernier, s'est fait à l'air libre car le séchage à l'étuve entraîne la perte d'une quantité importante des pigments (sensibilité des caroténoïdes aux températures élevées).

Il peut y avoir une dégradation de plus de 50% à partir de 100°C, et de 80 % à 95 % à 140°C (BRADOCK et ESTERSON ; 1974 in BENCHOUKH et BENKHROUF ; 1996).

De plus, ce taux élevé peut être dû aux mauvaises conditions de stockage (conservation des algues séchées), par la présence de l'humidité au niveau du laboratoire.

-Détermination de la teneur en caroténoïdes (représenté par le β -carotène) :

L'extraction des caroténoïdes par la méthode de Victor et col ; 1995, après saponification nous a permis d'avoir une solution qui ne contient que des caroténoïdes (élimination des chlorophylles).

En effet la spectrophotométrie d'absorption, est une méthode relativement précise, nécessite la préparation de l'échantillon à analyser.

Les autres pigments comme les chlorophylles peuvent gêner et modifier l'absorbance des caroténoïdes.

Le dosage quantitatif par spectrophotométrie des caroténoïdes représentés par le β -carotène, a révélé que *Cystoseira barbata* renferme la plus grande teneur en caroténoïdes (1,2 mg / 100g), suivie de *cystoseira tamariscifolia* (0,76 mg / 100g) et en dernier de *cystoseira compressa* (0,5 mg / 100g).

La teneur moyenne en β -carotène chez les trois espèces de cystoeires est de 0,82 mg/100g de matière sèche.

On remarque que cette valeur est inférieure à celle trouvée chez la spiruline (70-170 mg /100g de matière sèche) d'après (FALQUET ; 1996 in [52]), et aussi aux différentes valeurs des produits végétaux principalement :

- les carottes (26 mg/100g), (IFOAM ; 1997 in [55]).
- les mangues (3mg/100g) [53].
- les abricots (1, 5 à 3 mg/100g) [59].

Par contre, on note que la quantité en β -carotène chez les cystoseires est supérieure à celle des produits animaux tels que :

- l'huile de foie de morue.
- le foie.
- les poissons gras (anguille, thon rouge).
- le jaune d'œuf et le caviar (d'après CIQUAL ; 2006, tableau 08, voir annexe 03).

La faible quantité du β -carotène dans nos échantillons peut s'expliquer par :

- La méthode de séchage utilisée dans notre travail.
- Les lavages contribuent à la perte des pigments.
- Le mode d'extraction influe sur le rendement en pigments, en effet, on évalue les pertes après saponification de l'ordre de 10 à 20 % (KHACHIK ; 1987).
- Les paramètres physico-chimiques (lumière, air) agissent sur les pigments peuvent entraîner une destruction partielle au cours de la préparation et de la conservation de nos échantillons.
- Cette perte de pigment au cours de la préparation de l'échantillon amène à une sous estimation du taux des caroténoïdes ((MERLIN et al ; 2006).

On peut attribuer aussi cette faible valeur du β -carotène, à la nature et la composition des Cystoseires en caroténoïdes (où les xanthophylles et la phycoxanthylles sont dominantes) (tableau 01 ; voir annexe 01).

La biosynthèse des caroténoïdes qui nécessite la présence de l'acide mévalonique comme produit du départ pour former l'isoprène actif (unité répétitive des caroténoïdes) (figure 08 ; voir annexe 03), reste à discuter pour mieux comprendre et expliquer le résultat obtenu dans notre étude.

-Identification des spectres :

L'identification des différents spectres par spectrophotométrie à montrer q'on a un maximum d'absorbance au voisinage de 425 nm qui correspond selon la littérature (tableau 02 ; voir annexe 02) au β -carotène et fucoxanthine et aussi une forte absorbance au voisinage de 400 nm qui correspond à la néoxanthine selon la même source.

Ces résultats sont approximativement les mêmes que ceux observés chez les trois espèces utilisées dans notre étude.

L'analyse spectrale de nos échantillons a permis de mettre en évidence la présence des caroténoïdes suivants : le β – carotène et la fucoxanthine en une importante concentration, en quantité moyenne la néoxanthine et en faibles quantités : l' α – carotène, la lutéine et la zéaxanthine .On note l'absence totale de la violaxanthine.

importante concentration, en quantité moyenne la néoxanthine et en faibles quantités : l' α - carotène, la lutéine et la zéaxanthine. On note l'absence totale de la violaxanthine.

-Identification des caroténoïdes par CCM :

La chromatographie sur couches minces est indispensable aux recherches des traces de caroténoïdes dans les mélanges naturels.

Les caroténoïdes sont en général si fortement colorés qu'une révélation est superflue.

Dans le domaine de la CCM, on utilise aussi bien les techniques d'adsorption que de partage. Les techniques d'adsorption des caroténoïdes sur couches minces (couches de gel de silice + hydroxyde de calcium non imprégnées) ne donnent pas de bons résultats (présence des artefacts tels que des isomérisations ou des oxydations), on cite l'exemple des xanthophylles qui sont dégradées en quelques minutes en produits incolores (EGGER ; 1962. in RANDERATH ; 1971).

La chromatographie de partage sur couches imprégnées de huile de paraffine et de triglycéride donne de meilleurs résultats sur des plaques de « gel de silice G » ou bien du Kieselgur (EGGER ; 1962. in RANDERATH ; 1971).

Cette technique est indiquée dans le cas des hydrocarbures ainsi que des caroténoïdes oxygénés, qui ne possèdent pas d'hydroxyle libre ou qui contiennent plusieurs carbonyles.

***Séparation sur couches imprégnées d'huile de paraffine :**

En absence des standards, on pense qu'on a identifié certains caroténoïdes en fonction de leurs RF cités dans la littérature (KARRER ; 1958 in RANDERATH ; 1971).

Le système éluant (solvant) que nous avons utilisé est le méthanol / acétone (5 :2), après un temps de développement de 2h : 30, pour une distance de 10 cm (pour l'espèce *C.compressa*), et un temps de 2h pour une distance de 8cm (pour *C.barbata*, et *C.tamariscifolia*) a supposé la séparation des composés suivants :

- β -carotène, ester méthylique de la torularhodine et ester méthylique de l'acide β -apo-8' caroténique chez l'espèce *cystoseira barbata*.

- β -carotène, γ - carotène, ester méthylique de l'acide β - apo - 8' caroténique, β -apo-8'caroténal chez *cystoseira compressa*.

- β -carotène, ester méthylique de la torularhodine, et ester méthylique de l'acide β -apo-8' caroténique chez *cystoseira tamariscifolia*.

Ces résultats ont été reproductibles, car l'imprégnation des plaques d'huile de paraffine à 8% d'éther de pétrole a réduit la polarité de l'adsorbant (phase stationnaire non polaire), et d'une phase mobile polaire. Cette dernière, est constituée d'acétone et du méthanol qui

De ce fait, les R_F mesurés sont plus ou moins élevés. Etant donné, que la phase stationnaire est moins polaire, elle absorbe plus les composants moins polaires que ceux qui sont polaires d'où la faiblesse des R_F du β - carotène et du γ - carotène et l'augmentation des R_F de la torularhodine, ester méthylique de l'acide β -apo -8' - caroténique (C_{30}), ester méthylique de β -apo -8' -caroténal (C_{30}) appartenant à la classe des caroténoïdes oxygénés.

D'après ces résultats, nous remarquons que le RF augmente à mesure que les dimensions de la molécule diminuent, donc, on est en accord avec la théorie : RF augmente à mesure que la longueur de la chaîne diminue, c'est à dire que la polarité augmente.

On note l'absence de certains caroténoïdes notamment les xanthophylles (lutéine, violaxanthine, capxanthine, isozéaxanthine et zéaxanthine), car leur séparation se fait sur des plaques imprégnées avec une solution de triglycéride .En absence de cette dernière (solution triglycéride non disponible), on n'a pas pu réaliser cette partie expérimentale.

La solution de triglycéride sépare d'une manière parfaite les caroténoïdes les plus polaires qui ne sont pas retenus par la phase stationnaire de paraffine.

Du moment qu'on se trouve dans une chromatographie de partage à phases inversées (phase stationnaire non polaire et phase mobile polaire), le β -carotène est le premier pigment séparé avec un $R_F = 0,1$ (tableau 05 ; partie résultat) ; Ceci s'explique par la structure chimique (40 atomes de carbones) avec présence seulement des groupements méthyles (CH_3) qui diminuent la polarité de la molécule.

La présence des groupements hydroxyles (OH) dans une molécule, augmente sa polarité et elle est plus rapidement retenue par une phase stationnaire polaire.

Dans notre cas (phases inversées), les pigments caroténoïdes oxygénés sont les moins rapidement retenus (entraînés par la phase mobile polaire), donc présentent des RF plus grands (augmentation de la vitesse de migration).

Concernant le pouvoir éluotrope de la phase mobile souvent les mélanges de deux ou trois solvants de polarités différentes donnent de meilleurs séparations que des solvants chimiquement homogène , et nous remarquons que l'augmentation du pourcentage de méthanol dans l'acétone élue mieux les solutés (séparation plus importante de soluté) , et chaque'un de ces solvants a un pouvoir éluotrope important , ceci est conforme au classement du pouvoir éluotrope de quelques solvants (*Reineignement communiqué par Dr .NEHER.R et VON ABX .E,Bâle in RANDERATH ;1971*). (tableau 09 ;voir annexe 03).

***Séparation sur couches non imprégnées :**

On a utilisé plusieurs systèmes éluants pour cette partie à titre expérimental, mais avec le manque de certains révélateurs et de standards, les résultats obtenues sont moins reproductibles qu'avec la séparation des caroténoïdes sur couches imprégnées d'huile de paraffine .

L'identification des R_F selon la littérature (BOUMEDINE ; 1991) et selon les systèmes éluants et les solutions d'extraction, a révélé la présence de certains pigments :

-Le premier système éluant utilisé pour mettre en évidence les caroténoïdes aldéhydiques est ; l'éther de pétrole / benzen (1 :1), l'addition de 1% de méthanol renforce l'élution (utilisé pour les composés les moins polaires) nous a donné la cryptoxanthine et le β -carotène chez l'espèce *Cystoseira tamariscifolia*

-Le deuxième système éluant est ; Benzen / Méthanol (98 :2), utilisé pour les composés les plus polaires, devraient nous donner les séparation suivantes : rhodoxanthine, la cryptoxanthine, l'isozéaxanthine, la zéaxanthine et la capxanthine (ISLERO et RUEGG. *R-communications personnelles* in RANDERATH. 1971), mais d'après nos résultats on a obtenus les pigments suivants ; β -carotène, rhodoxanthine, et la cryptoxanthine.

L'absence de certains pigments dans ces deux systèmes d'élution est due essentiellement au manque de révélateur, en particulier la pulvérisation des plaques avec la solution alcoolique de rhodanine, puis de l'ammoniaque concentrée ou de la soude concentrée, car dans le cas des caroténoïdes aldéhydiques, qui sont moins colorés, il est recommandé d'utiliser la rhodanine (WINTERSTEIN et HEGEDUS ; 1960, *Hoppe - seyler's Z. physiol. chem.* 321,97 in KURT. RANDERATH; 1971), (WINTERSTEIN et HEGEDUS ; 1960, *chimia*, 14, 18. in RANDERATH ; 1971).

Nous remarquons que le R_F du β - carotène est le plus élevé par rapport aux R_F des autres caroténoïdes qui sont principalement des xanthophylles. Cette différence peut s'expliquer par la structure chimique de ces caroténoïdes car plus le composé contient des groupements méthyles (CH_3), moins il est polaire et donc moins adsorbé par l'adsorbant qui est très polaire (gel de silice G), plus, son R_F est élevé. (HADJ M'HAMMED ; 1985).

-Le troisième système éluant est : Ether de pétrole/ Benzen (1 :1) ; il n'y a pas une séparation de pigments, car ce mélange n'est pas renforcé par le méthanol, c'est pour cette raison là, les composés les moins polaires ne migrent pas.

Nous pouvons expliquer aussi l'absence de ces composés au manque de révélateurs tels que la rhodanine, malgré la présence de la solution ammoniacale à 5% de nitrate d'argent.

- Pour le quatrième système ; Acétone/ Ether de pétrole (1 :1), les taches sont totalement entraînées jusqu'au front, il n'y a pas de séparation même lorsque on a pulvérisé la

plaque par la solution ammoniacale à 5 % de nitrate d'argent . On pense que ce résultat est du premièrement à l'absence de révélateur fort de ce système éluant, il s'agit de chlorure d'antimoine III (STAHLE ; 1975 in BOUMEDINE ; 1991), qui donne une apparition nette de β -apo-caroténal et de β -carotène avec xanthophylles. Donc le manque de ce révélateur, nous a empêcher d'observer. (VERNIN ; 1970 in BOUMEDINE ; 1990).

Nous pouvons noter aussi que l'absence de certains pigments est due à leurs caractères de solubilité qui sont moins solubles dans le méthanol qui est utilisé comme solvant d'extraction et aussi due à la nature de la plaque elle même ; le gel de silice a une réaction acide et beaucoup de substances basiques ne migrent pas quand on chromatographie avec des solvants neutres (formation de sel).

Le caroténoïde le plus représentatif que nous avons identifié par la chromatographie sur couches minces non imprégnées chez les cystoseires récoltées dans la région de Tipaza (Anses de Koali) est la cryptoxanthine de couleur orange jaune à jaune.

L'insuffisance du degré d'activation de la couche de la plaque ou la cuve non saturée d'une façon homogène peut être également être la cause du manque de reproductibilité des R_F .

Enfin, il est possible que tout simplement la quantité de la substance déposée sur la plaque soit petite ou peu concentrée en caroténoïdes.

Les plaques couvertes d'un mélange de chaux et de gel G (4 :1 ou 6 :1) donnent une meilleur séparation (WINTERSTEIN, STUDER et RUEGG ; 1960, *chem .Ber*, 93, 2951 in RANDERATH ; 1971).

-Conclusion :

La technique de séparation sur couches minces est une méthode puissante d'analyse qualitative ; elle est simple et rapide, qui nous permet de suivre l'évolution d'une réaction, mais révèle des inconvénients vu les difficultés de sa reproductibilité.

Il s'est avéré que l'imprégnation à l'huile de paraffine à 8 % d'éther de pétrole est une technique intéressante pour la séparation des pigments caroténoïdes quand ils sont mal séparés sur plaques non imprégnées.

Cependant, l'imprégnation à l'huile de paraffine est insuffisante car les caroténoïdes les plus polaires migrent pratiquement avec le front, mais, ils sont toutefois séparés et identifiés d'une manière parfaite si l'on imprègne la couche mince avec une solution de triglycérides qui sont plus polaires que la paraffine.

Conclusion

générale

Conclusion :

L'exploitation des algues marines à des fins alimentaires et commerciales (additifs alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques) a fait que, on s'est intéressé à leur étude, précisément, à l'étude de leurs constituants qui sont les pigments caroténoïdes.

Notre contribution s'est axée sur l'essai de la mise au point des techniques d'extraction, d'analyse spectrale quantitative et qualitative, de séparation sur couches minces des pigments.

Le dosage quantitative des caroténoïdes (représentés par le β -carotène) chez les espèces étudiées ; les Cystoseires (*C. barbata*, *C. tamariscifolia* et *C. compressa*) a donné une valeur moyenne de 0,82 mg/ 100g de matière sèche.

L'analyse qualitative des spectres, en se basant sur le maximum d'absorbance a révélé la présence de sept pigments caroténoïdes : α -carotène, néoxanthine, β -carotène, fucoxanthine, lutéine, zéaxanthine et violaxanthine.

La chromatographie sur couches minces imprégnées d'huile de paraffine a permis la séparation de cinq pigments : β -carotène, γ -carotène, acide β -apo -8' caroténique, β -apo -8' caroténal et torularhodine.

La chromatographie sur couches minces non imprégnées a permis d'identifier: cryptoxanthine, rhodoxanthine , β - carotène.

A la lumière de ces résultats obtenus après un premier essai d'analyse spectrale et chromatographique, il serait intéressant de poursuivre ce travail d'une part de vérifier la reproductibilité de la technique utilisée pour séparer les pigments, d'autre part d'essayer la mise au point d'autres techniques tels que la chromatographie de partage sur colonne et la chromatographie liquide à haute performance.

Il convient aussi de vérifier ces résultats sur les mêmes espèces qui vivent dans des milieux différents, à des périodes différentes de l'année et d'élargir l'échantillonnage à d'autres espèces.

Bibliographie

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANGELO .M & ANDREA.C** ; 1996 – Flore et faune de la méditerranée.
ED. Solar. Paris – P. 1-22, 10-32, 38.
- ARNAUD MULLER – F** ; 1997 – Micro algues marines, les enjeux de la recherche.
ED. INFREMER – P. 27-28.
- BENCHOUK. D & BENKHEROUF .S** ; 1996 - Extraction par solvants des caroténoïdes à Partir d'écorces d'oranges.
Thèse Ing. INA, El – Harrach – P. 17-22, 30-38, 48-56, 61-74.
- BIOSVERT .C** ; 1988 - Les jardins de la mer : Du bon usage des algues
Terre vivante. 6 Rue. Saulnier – 75009, Paris – P. 67.
- BOUMEDINE. A** ; 1991 – Valorisation des sous produits d'agrumes par extraction Caroténoïdes.
Thèse Ing. INA, El – Harrach- P. 9-11, 16-18, 26-28.
- CABIOC'H and al & BOUDOURESQUE .C.F and al**; 1992 – Guide des algues des mers D'Europe.
Illustration de la flore Méditerranéenne -© Delachaux et Niestlé S.A, David Perret, *Ed. Neuchatel (Switzerland) , Paris – P.14-15, 18-25, 160-182.*
- CHARLES .A & GUY.L & LAURENT .M** ; 1997, 2003 – Biochimie alimentaire ;
Chapitre 4 : lipides
Ed. DUNOD, Paris (5ème édition) ; Masson, Paris (4ème édition) –P.65-67.
- CHERFI S** ; 2000 – Endurcissement de grains de blé tendre (*Triticum aestivum*) : Effet D'une contrainte hydrique sur la germination, la croissance et sur L'évolution de protéines et de pigments photosynthétiques.
Mémoire. Ing. USTHB, Alger – P. 13 - 15, 32.
- DJABALI. M & HAMMOUCHE. S** ; 1997 – Effet d'un herbicide: le Norflurazon sur La teneur en pigments foliaires, en protéines, en nitrites et sur l'activité Nitrates Réductase d'une légumineuse le Soja Glycine max.
Mémoire Ing. USTHB, Alger- P. 11-12, 31.
- DJOUAHRA. C** ; 2002 – Contribution à l'étude de peuplement algal de la région D'Alger – plage.
Mémoire .Ing. USTHB, Alger.
- FEDDAL .S and al** ; 1992 – Travaux dirigés et travaux pratiques de Biochimie
Office des publications universitaires - P.28-29.
- Le GAL. Y** ; 1988 - Biochimie marine.
Ed. MASSON, Paris, Milan, Barcelone, Mexico. – P. 32 – 36, 171 – 172.

- GARRET & GRISHAM**; 2000 - Biochimie.
Ed. DE BOECK Université, Paris - P. 87.
- GAYRA. P** ; 1975 - Les algues : Morphologie – Cytologie - Reproduction - Ecologie.
Ed. DOIN, Paris – p.12-13, 15,17-18,20,102-104.
- GHAZI. F & SAHRAOUL S** ; 2005 - Evolution des composés phénoliques et des Caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de dattes Communes TANTBOUCHT et HAMRAIA
Thèse. Ing, INA, El – Harrach- P. 13, 40 -49.
- GORENFLOT. R** ; 1975 – Précis de botanique.
Ed. DOIN, Paris ; 8, Place de l'Odéon 75006-Paris .VI - P. 70.
- GUINARD J. L** ; 2000 – Biochimie végétale.
Ed. DUNOD, Paris - p. 190 – 192.
- Jacques – Henry Weil et al** ; Mai 2001 – Biochimie générale.
Imprimerie CHIRAT – 42540, Saint –just – la – pendue, N. 2637 – P.279- 280.
- KAMOUM. P** ; 1977 - Appareils et méthodes en Biochimie.
Ed. FLAMMARION MEDECINE – SCIENCES, Paris – P. 215 - 217.
- KHACHIK.F & BEECHER G.R & WHITTAKER .F**; 1986- Séparation, identification, and quantification of the major carotenoid in extrats of several green végétaux by liquid chromatography.
Journal agricultural.Food chem, 34, 603 – 616.
- KRUHLJ** ;1989 – Biochimie
II.Métabolismes.
Ed.Hermann,293 rue Lecourbe,75015 Paris- P.164-166.
- KURT RANDERRATH** ; 1971-Chromatographie sur couches minces.
Ed. GAUTHIER – VILLARS ; 55quai des Grands – Augustins, Paris -6^e - P.180-185, 339.
- LARPENT. J.P & LARPENT .M & GOURGAUD** ; 1997 - Mémento technique de Microbiologie.
Ed. Lavoisier TEC & DOC, Londres, New York, Paris – P. 241,246.
- OULD- AHMED.N** ;1994 –Etude des espèces phyrobentiques en voisinage de la centrale thermique De Marsa El Hadjadj (Golfe d'Arziw ; ouest algérien).Mention particulière Sur une espèce remarquable Chlorophyte,Caulerpale :Caulerpa prolifera (Forss bül)
La moureux.
Thèse magistèr,ISMAL (Alger) – 177 P +Annexes :78 tableaux + figures.
- PACCALEL .Y** ; 1994 – La mer et la vie, Larousse des algues de toutes les couleurs, Magie des végétaux.
17. Rue du Montparnasse 75298. Paris. CEDEX 06 – P.-38-39.
- RAVEN & EVERT & EICHHORN** ; 2000 - Biologie végétale ; Chapitre 17 : les algues Brunes, embranchement des phaeophyta.
Ed. DE BOECK Université, Paris – P .379, 381 -382.

- ROSSET.R & CAUDE.M & JARDY.A;** 1982 – Manuel pratique de chromatographie
En phase liquide.
*Préface du Rr .G .CHALRLOT ; MASSON, Paris, New York,
Barcelone, Milan, Mexico, Rio de Janeiro – P.8-9, 267-273*
- ROUAG .S & MOKRANE. N ;** 1993 - Effet herbicide Norflurazon sur la teneur en
pigment, en sucres, en protéines, ainsi q'en flavonoides d'une légumineuse
Dicotyle-donaires : le Soja || Glycine max ||
Mémoire. Ing, USTHB, Alger – P .13 – 17, 46.
- ROUESSAC.F & ROUESSAC.A ;** 1992 - Analyse chimique ; Méthodes et techniques
Instrumentales modernes
Ed. MASSON – P.
- SADOUN .A & BENYOUNES.W ;** 2005 – Culture de la spiruline et détermination
de certains Composés biochimiques.
Mémoire. Ing, ISMAL, Alger – P. 32-33.
- SERIDI. H ;** 1990 – Etude des algues marines benthiques de la région d'Alger.
Thèse. Magister, USTHB, Alger – P. 07 -71.
- 3ème colloque de l'AFAA. Société pour l'Algologie Appliquée MONTPELLIER ;**
octobre 1985 – Biotechnologie Algales ou science de l'eau.
Lavoisier Abonnement, 11, Rue Lavoisier 75384 Paris, Cedex 08.
- VAN .DEN HOEK .C & MANN. D.G. & JAHNS .H.M ;** 1995- Algae, AN Introduction
to Phycolog
CAMBRIDGE University. Presse.
- VOET. D & VOET. J. G ;** 1998 – Biochimie.
Ed. DE BOECK Université, Paris – P. 87.
- WAJCMAN. H & ELION. J ;** 1984 – Chromatographie liquide de haute performance en
Chimie des protéines.
Ed. INSERM – P. 11-12

Les sites web:

- [1] Les pigments caroténoïdes :
<http://www.Users.Info.Unicaen.Fr/> / □ [giguet / Java / Textes / Pigments.html](#) .24 k.
- [2] Les pigments photosynthétiques ; MOREAU .F & PRAT. R. 2005
[http://www.Biologie.et.multimedia – Université Pierre et Marie curie. UFR de biologie.](http://www.Biologie.et.multimedia-Universite.Pierre.et.Marie.curie.UFR.de.biologie)
- [3] Les caroténoïdes ; 2001.
[http://www.Analyse & Recherche Nutrinov ; Laboratoire @ nutrinov. Com.](http://www.Analyse.&Recherche.Nutrinov;Laboratoire@nutrinov.Com)
- [4] Panorama des algues benthiques en Méditerranée et dans l'Atlantique : Ecologie – Classification – Morphologie – et Utilisation.
[http://www.Lebrusc – chez – alice. Fr. /](http://www.Lebrusc-chez-alice.Fr/) - 8 k – 23 Fév. 2006.
- [5] La grande époque / Les algues marines dans nos assiettes.
[http://www.French.epochtimes. Com / news / 5-3-6 / 1084 – html – 22 k.](http://www.French.epochtimes.Com/news/5-3-6/1084-html)
- [6] Détermination des caroténoïdes : valeur de composition et de vitamine A en caroténoïde d'une Courge argentine (moschata de cucurbita) ; 2006.
[http://www.Archivos . Latinoamericanos de Nutricí ; Aportado 62.778, Chacao caracas 1060, Venezuela, SA.](http://www.Archivos.Latinoamericanos.de.Nutrici;Aportado62.778,Chacao.caracas1060,Venezuela,SA)
- [7] Description et types d'algues.
[http:// www .Lenntech . com / Français / Eutrophisation / algue. htm.](http://www.Lenntech.com/Français/Eutrophisation/algue.htm) 23 k.
- [8] Les algues marines au menu des cantines Scolaires, par JAROUSSEAU .V ; 17 Fév. 2006.
[http:// www.agoravox. Fr / tb – receive. php?id – article = 7127.](http://www.agoravox.Fr/tb-receive.php?id=7127)
- [9] Chromatographie sur couche mince.
[http:// www. ac – nancy – metz .Fr / enseign / physique / CHIM / Jumber/ CCM / CHROMATO . html](http://www.ac-nancy-metz.Fr/enseign/physique/CHIM/Jumber/CCM/CHROMATO.html) –14 k.
- [10] CCM; DALMEYDA. V ; 1998.
[http:// www. chez. com / dalmeyda / cours / ccm /](http://www.chez.com/dalmeyda/cours/ccm/) -18 K.
- [11] Chromatographie d'adsorption sur colonne ; CRONENBERGER. L & PACHECO. H ; 1966.
[http:// www. Cerimes . éducation . Fr / index. php ? Page = Fiches & op1 = view , 430, 1, 7, 311, -24 k.](http://www.Cerimes.education.Fr/index.php?Page=Fiches&op1=view,430,1,7,311,-24k)
- [12] Les différents modes de chromatographie liquide : chromatographie d'adsorption.
[http:// www.snv. Jussien. Fr. / bmedia / la font / chromato / A62. html](http://www.snv.Jussien.Fr/bmedia/lafont/chromato/A62.html) – 56 k.
- [13] CCM.
[http:// WWW. eduenet. education. Fr / r n chimie / chi _ org / viollon / TP 6. PDF.](http://WWW.eduenet.education.Fr/rnchimie/chi_org/viollon/TP6.PDF)
- [14] La chromatographie
[http:// WWW. ac – nancy – metz . Fr / enseign / physique / CHIM / chromato 01/ chromato 01. htm.](http://WWW.ac-nancy-metz.Fr/enseign/physique/CHIM/chromato01/chromato01.htm)
- [15] Chromatographie sur couche mince.
[http:// WWW. ac – nancy – metz . Fr / eneign / physique / CHIM / Jumber / CCM / CCMCADR. htm.](http://WWW.ac-nancy-metz.Fr/eneign/physique/CHIM/Jumber/CCM/CCMCADR.htm)
- [16] HPLC.
[http:// www . ac – nancy – metz .Fr / enseign / physique / CHIM / Jumber / HPLC/ hplccadr. htm.](http://www.ac-nancy-metz.Fr/enseign/physique/CHIM/Jumber/HPLC/hplccadr.htm)
- [17] Travaux pratiques de biologie végétale.
[http:// www 2 .Unil. ch / LPC / docs / TP biol / TP BIOL 2003 _ TOC mod. html](http://www2.Unil.ch/LPC/docs/TPbiol/TPBIOL2003_TOCmod.html) - 277 k.

- [18] Les algues les plus courantes à la réunion : les phéophycées.
http://www.Perso.wanadoo.Fr/Jean-marc.charel/a_generalite.htm – 14 k.
- [19] Algues macrophytes du lagon : cyanophycées rhodophyte rhodophyta pheophyceae
Ulvothamniellales: pheophyceae (chromophytes).
<http://www.Vieocean.Free.Fr/paf/Fichec1.html> – 18 k.
- [20] 01 Santé – pharmacie naturelle – icontent : les algues marines.
<http://www.01santé.com/xoops/modules/icontent/index.php?page=590-85k>.
- [21] *Cystoseira barbata* f. *barbata*.
<http://lis.snv.jussieu.fr/cgi-bin/viewxper.cgi?base=cystoseira;taxon=2>.
- [22] *Cystoseira compressa*.
<http://lis.snv.jussieu.fr/cgi-bin/viewxper.cgi?base=cystoseira;taxon=5>
- [23] *Cystoseira comprimée*.
<http://lebrusc.chez-alice.fr/pages/cystofim.html>.
- [24] *Cystoseira tamariscifolia*.
<http://botania.free.fr/fiche.php?id=268>.
- [25] Algues marines : Cytologie .
http://perso.wanadoo.fr/g.lemanissier/algues_2.htm.
- [26] Panorama des macroalgues benthiques de Méditerranée et de l'Atlantique du Nord-est
décrites dans ce site.
<http://lebrusc.chez-alice.fr/pages/panorama0.html>.
- [27] Panorama des macroalgues marines benthiques Algues brunes.
<http://lebrusc.chez-alice.fr/pages/panoram4.htm>.
- [28] *Cystoseira crinita*.
<http://lebrusc.chez-alice.fr/pages/cystoseiracrinita.htm>.
- [29] Algues brunes.
http://www.ifremer.fr/lerlr/etudes_recherches/alguesbrunes.htm.
http://www.yfolire.net/sais/natur_a1.htm
http://www.yfolire.net/sais/anim_a1.htm
<http://www.consciencedupeuple.com/crusine-out.pdf>
- [30] MÉTHODES PHYSIQUES DE SÉPARATION ET D'ANALYSE ET MÉTHODES
DE DOSAGE DES BIOMOLÉCULES.
<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/chromato/A62.html>.
- [31] Nutrition et Prévention
http://www.professeur-joyeux.com/alimentation_resultats_abarac.htm.
- [32] Phaeophyceae.
http://fr.wikipedia.org/wiki/Algue_brune.

- [33] Utilisation directe d'algues.
<http://lebrusc.chez-alice.fr/pages/utilis.html>
- [34] Caractères cytologiques des algues
<http://lebrusc.chez-alice.fr/pages/cyto.html>
- [35] Morphologie des algues marines benthiques
<http://lebrusc.chez-alice.fr/pages/morpho.html>
- [36] *Cystoseira tamariscifolia*
http://www.sbroscoff.fr/INVENTAIRES/InvAlgues/index.algues.php?action=illustration&nom=Cyst_tamar_dessin_modif.jpg&id_algue=112
- [37] *Cystoseira compressa*
http://www.sportesport.it/brown_algae06.htm
- [38] ORGANISATION DES NATIONS UNIES POUR L'ALIMENTATION ET L'AGRICULTURE
Rome 1987 ; Comparaison des caractéristiques principales de quelques espèces de *Cystoseira*
<http://sadluleth.ca/nz/collect/faodocs/import/www.fao.org/docrep/x0169f/x0169f1r.htm>
- [39] *Cystoseira barbata*.

http://www.sportesport.it/brown_algae06.htm
- [40] les cystoseires de la région de Tipaza 01.
http://www.ffem.net/jahia/webdav/site/ffem/users/administrateur/public/Fiche_identification_LittoralAlgerien.pdf
- [41] les cystoseires de la région de Tipaza 02.
http://www.ffem.net/jahia/webdav/site/ffem/users/administrateur/public/Rapport_Presentation_LittoralAlgerie.pdf
- [42] *Liste des xanthophylles*
<http://fr.wikipedia.org/wiki/Xanthophylle>
- [43] Lutéine et caroténoïde
<http://www.vitalux.ch/f/lutein/>
- [44] A bonne vue, bonne caroténoïde
http://www.e-sante.fr/fr/magazine_sante/sante_magazine/vue_carotenoide-6881-25-art.htm
- [45] Caroténoïdes et cancer : une histoire à rebondissement
<http://www.aprifel.com/articles-sante,detail.php?m=2&rub=7&a=702>
- [46] Rôles et transformations des pigments caroténoïdes dans les réseaux Trophiques marins.
<http://users.info.unicaen.fr/~giguette/java/textes/pigments.html>
- [47] Influence des colorants chez l'homme
<http://www.membres.lycos.fr/benjylamalice/hobbies.html>

- [48] Caroténoïdes et autres molécules antioxydants des chloroplastes
http://www-dsv.cea.fr/content/cea/d_dep/d_devm/d_lep/dommmages1.htm
- [49] Sources des caroténoïdes
<http://www.food-info.net/fr/caro/occ.htm>
- [50] chez monette : Aliment de la semaine
<http://chezmonette.hautetfort.com/archive/2006/05/22/aliment-de-la-semaine.html>
- [51] La vitamine A (rétinol).
http://www.dico-vitamines.com/vitaminesA_suite.shtml
- [52] Antenna Technology . Spiruline; Aspects nutritionnels , FALQUET.J; 1996
http://www.personaltrainer.fr/medias/271203_spiruline_aspects_nutritionnels.pdf
- [53] La mangue ; Tout sur... la mangue.
http://www.linternaute.com/femmes/cuisine/encyclopedie/fiche_composant/153/mangue.shtml
- [54] VITAMINE A & CAROTENOIDES PROVITAMINIQUES
Sources alimentaires de vitamine A (d'après le Ciqual)
http://www.afssa.fr/ouvrage/fiche_apports_en_vitamine%20A.html
- [55] Alimentation bio : manger santé ! (comparatif nutritionnel).
<http://www.bioweight.com/bio.html>
- [56] Structure des caroténoïdes
<http://www.food-info.net/fr/caro/stru.htm>
- [57] Manipulation 18: chromatographies :les longueurs d'ondes
<http://marsal.univ-tln.fr/TPdos/TP7.html>
- [58] Poste 2:
 Etude de la composition pigmentaire des feuilles
<http://www.aprifel.com/articles-sante,detail.php?m=3&rub=7&sousrub=4&a=1151>
- [59] Alimentation
<http://www.medisite.fr/medisite/Abricot.html>
- [60] TP 02 : Spectrophotométrie-Echelle de teintes –Suivi cinétique d'une réaction d'oxydoréduction.
http://physiquark.free.fr/IMG/pdf/TP01_BeerLambert_cinetique-2.pdf#search=%22spectrophotometrie%20de%20Beer-LAMBERT%22
- [61] Classification des algues.
<http://www.Perso.Wanadoo.Fr./gonzales.Manuel/Textes/algues.html>. 25 k.
- [62] Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules.
<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/chromato/A62.html>

Annexe

Annexes

Annexe 01 :

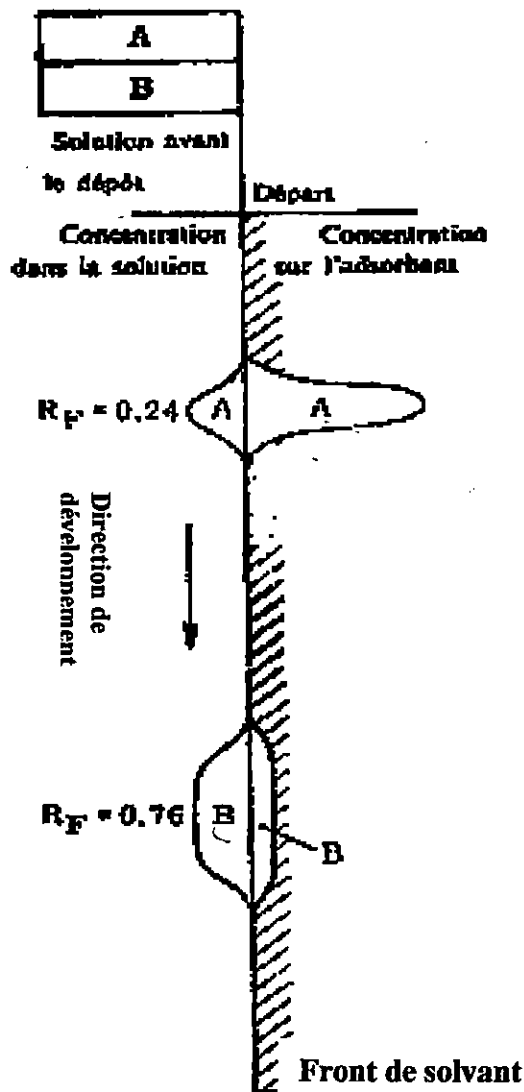
Les tableaux :

Tableau 01 : La classification des algues [61].

<u>Embranchements</u>	<u>Classes</u>	<u>Pigments</u>	<u>Ordres</u>
Chlorophytes ou « Algues vertes » Possèdent des pigments chlorophylliens leur donnant une couleur verte	Chlorophyceae	Chlorophylle a et b Caroténoïdes (carotène, xanthophylles)	Volvocales, Chlorococcales, Chaetophorales, Caulerpales, Codiales, Tetrasporales, Siphonocladales,...
	Ulvophyceae	d°	Ulotionales, Ulvales, Ctenocladales, Prasiolales, Cladophorales, Dasycladales, Siphonocladales...
	Charophyceae	d°	Ex : Chara, Spirogyre.
	Prasinophyceae	d°	Ex : Prasinocloris.
Cryptophytes	Cryptophyceae	Chlorophylle a et b, phycobiliprotéines	Ex : Cryptomonas, Chilomonas.
Chromophytes ou « algues brunes » Souvent appelées chrysophytes (qui contiennent des pigments caroténoïdes leur donnant une couleur proche du jaune).	Diatomées	Chlorophylle a et c masquées par des caroténoïdes dont la fucoxanthine et des xanthophylles.	Ex : Navicula
	Chrysophyceae	d°	Ex : Ochromonas
	Fucophyceae (phaeophyceae)	d°	Chordariales, Cutlériales, Dictyotales, Fucales, Laminariales....
	Xanthophyceae ou algues jaunes	d°	Ex : Vaucheria
Raphidophytes	Raphidophyceae	d°	Ex : Heterostigma.

Prymnesiophytes	Prymnesiophyceae	d°	Ex : Coccolithophoridées.
Pyrrhophytes ou dinoflagellés	Dinophyceae	Chlorophylle a et c, périidine et fucoxanthine.	Ex : Alexandrium, peridinium.
Euglenophytes	Euglenophyceae		Ex : Euglena.
Rhodophytes ou « algues rouges » Contenant des bilichromoprotéines leur donnant une couleur qui varie du rose au rouge et au violet.	Rhodophyceae	Chlorophylles a et d, caroténoïdes, bilichmoprotéine, phycoérythrine rouge, phycocyanine bleue.	Bangiales, Nemaliales, Compsogonales, Gigartinales, Ceramiales, Gélidiales, Porphyridales.

Les figures :



lors de dépôt, grosse tache
on retrouve ici de 2 [C]
[C] de composé de la solute
et l'autre de l'adsorbant
et lors de migration de tache
l'adsorbant retire les composés
de la solute et le solvant
entraîne ces composés
qui et la différence ces forces
est traduit en R_F obtenu.
- B. est \ominus polar. par rapport
à A

Figure 07 : Chromatogramme sur couche mince avec des isothermes d'adsorption linéaire accompagnées de diffusion ou d'un passage lent à l'équilibre (A.J.P.MARTIN .*Endearour*.6.21 (1947) in RANDEATH; 1971).

Annexe 02 :

Tableaux :

Tableau 02 : Les longueurs d'ondes correspondantes aux différents pigments caroténoïdes. (JEFFREY et al ; 1997, ZAPATA et al ; 2000 in [58]), [57].

Type de pigment	Maximum d'adsorption en nm (Dans les solvants organiques)
- β - carotène	425- 450- 480 (446)
- α - carotène	400- 420- 425
- Lutéine	425- 445- 475
- Néoxanthine	400
- Fucoxanthine	425- 450- 475
- Zéaxanthine	450
- Violaxanthine	425- 450- 475 (443)

Tableau 03 : RF des caroténoïdes sur des plaques imprégnées de Kieselgur. (KARRER ; 1958, *Konstitution and Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe*, Birkhäuser, Bâle. in RANDERATH ; 1971).

Composé	Nombre de substituants (11)					R _f	
	-OH	∩	-O	-OR	O -COR	Imprég. paraffine (a)	Imprég. graisse (b)
Capsanthine	2		1				0,74
Isozéaxanthine	2						0,49
Zéaxanthine	2						0,54
Diméthoxy-izozéaxanthine				2		0,60	
Cryptoxanthine	1					0,90	0,07
Rhodoxanthine			2				0,26
Tonalarhodine, ester méthylique					1	0,48	
Echinénone			1			0,61	
β-Apo-8'-caroténal (C ₃₉)			1			0,83	
Acide β-apo-8'-caroténique (C ₃₉), ester méthylique					1	0,69	
Acide β-apo-6'-caroténique (C ₃₉), ester méthylique					1	0,58	
Lutéine (xanthophylle)	2						0,56
Epoxyde de lutéine	2	1					0,72
Violaxanthine	2	2					0,84
Néoxanthine	3	1					0,95
β-Carotène						0,10	0,00
γ-Carotène						0,15	0,00
Dipalmitate de lutéine (physalis, hélerie)					2	0,02	

(11) Structures d'après W. KARRER, *Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe*, Birkhäuser, Bâle (1958).

(a) Système : méthanol/acétone (1 : 2) (saturé de paraffine).

(b) Système (méthanol/acétone/eau (20 : 4 : 3) (saturé de graisse).

Figures :



Figure 01 : Broyage des algues séchées dans un mortier.



Figure 02 : Refroidissement de nos échantillons dans un dessiccateur avec des grains de silice

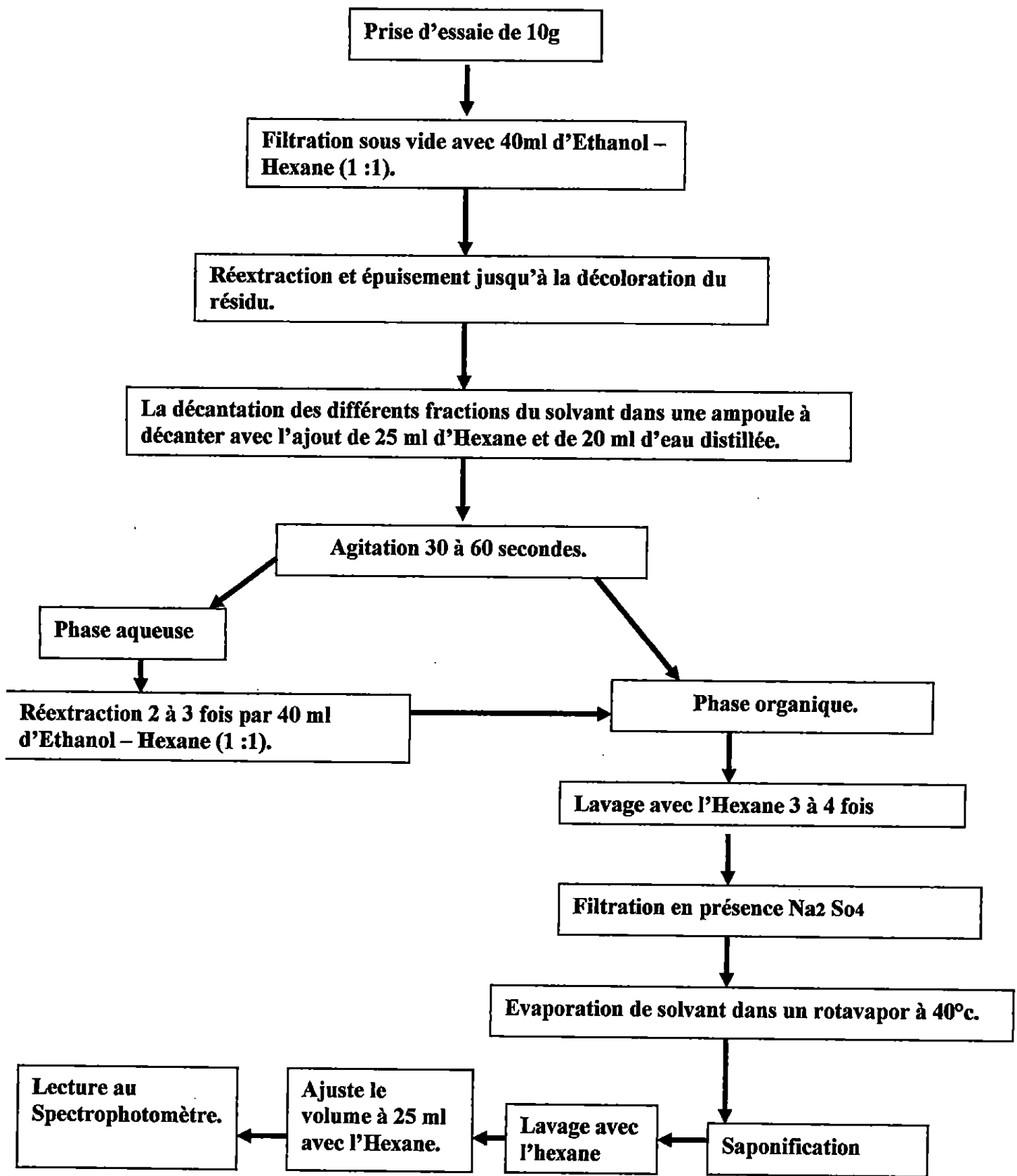


Figure 03 : Protocole d'extraction des caroténoïdes (Victor et al ; 1995 in SADOUN et BENYOUNES ; 2005).



Ampoule à décanter enveloppée de papier Aluminium

Figure 04: La décantation des résidus obtenus dans une ampoule à décanter



Phase aqueuse (verte)

Phase organique (jaune)

Figure 05 : La séparation de deux phases ; phase aqueuse et phase organique.



Figure 06 : La filtration de phases organiques obtenues en présence de Na₂SO₄

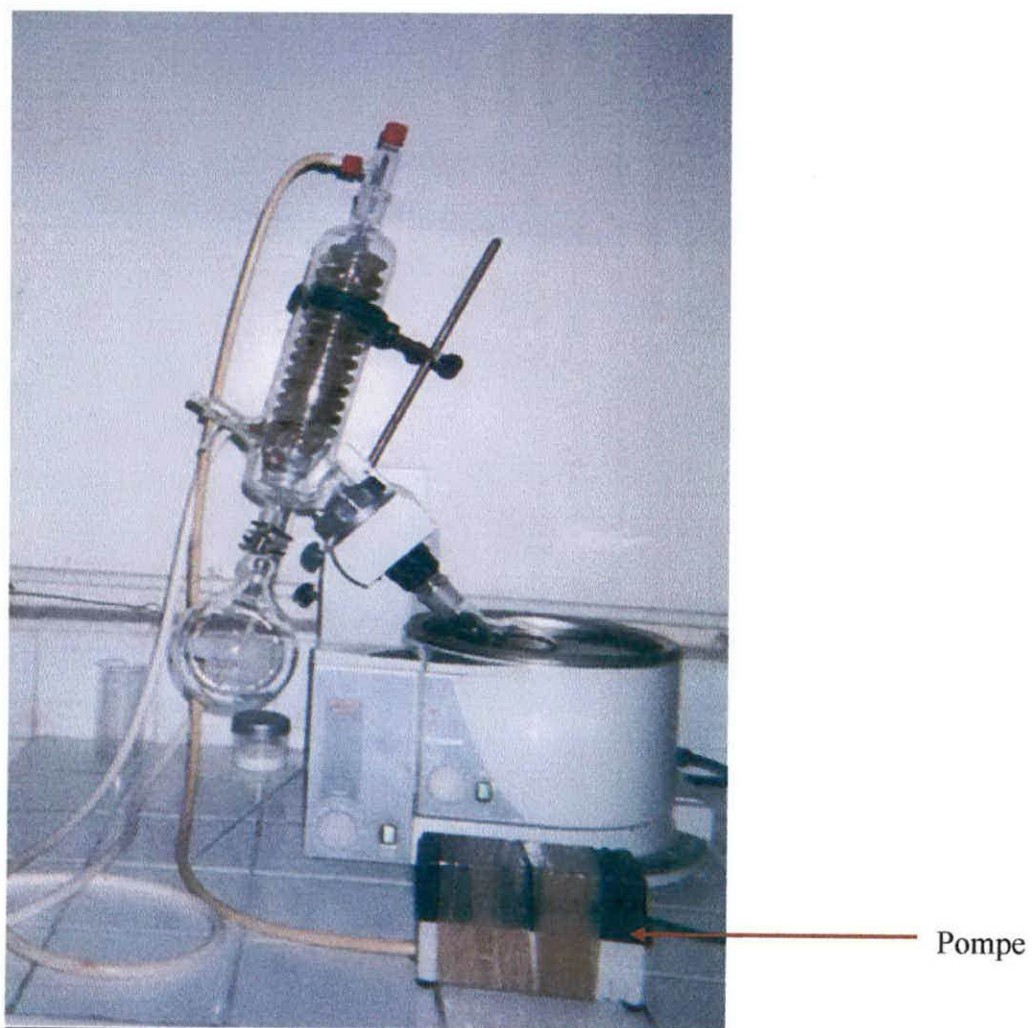


Figure 07 : Evaporation de la solution obtenue dans un rotavapor à 40°C.

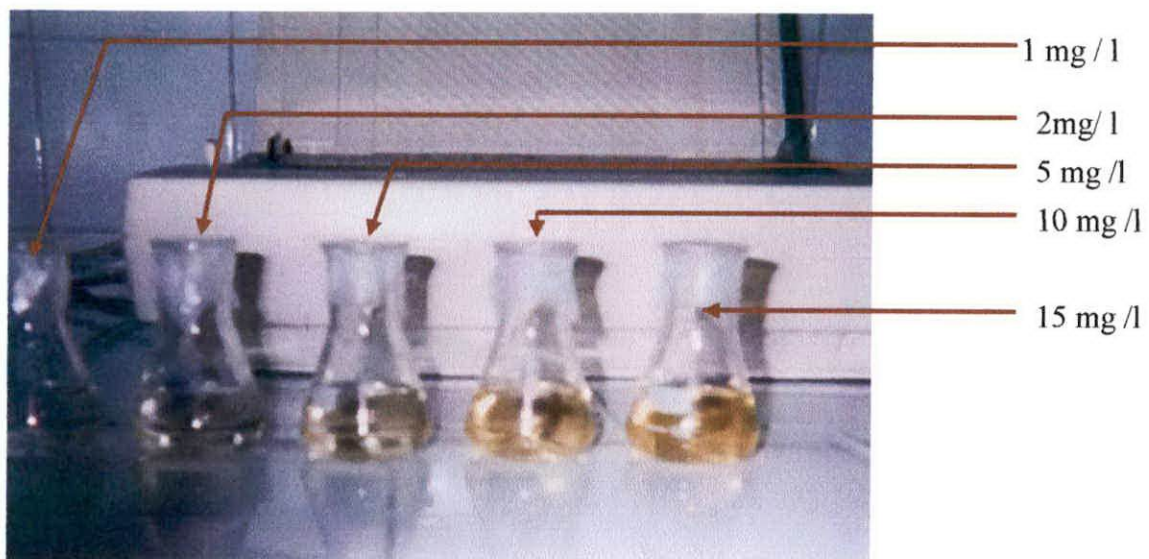


Figure 08 : Les différents standards préparés par la solution mère (bichromate de potassium).

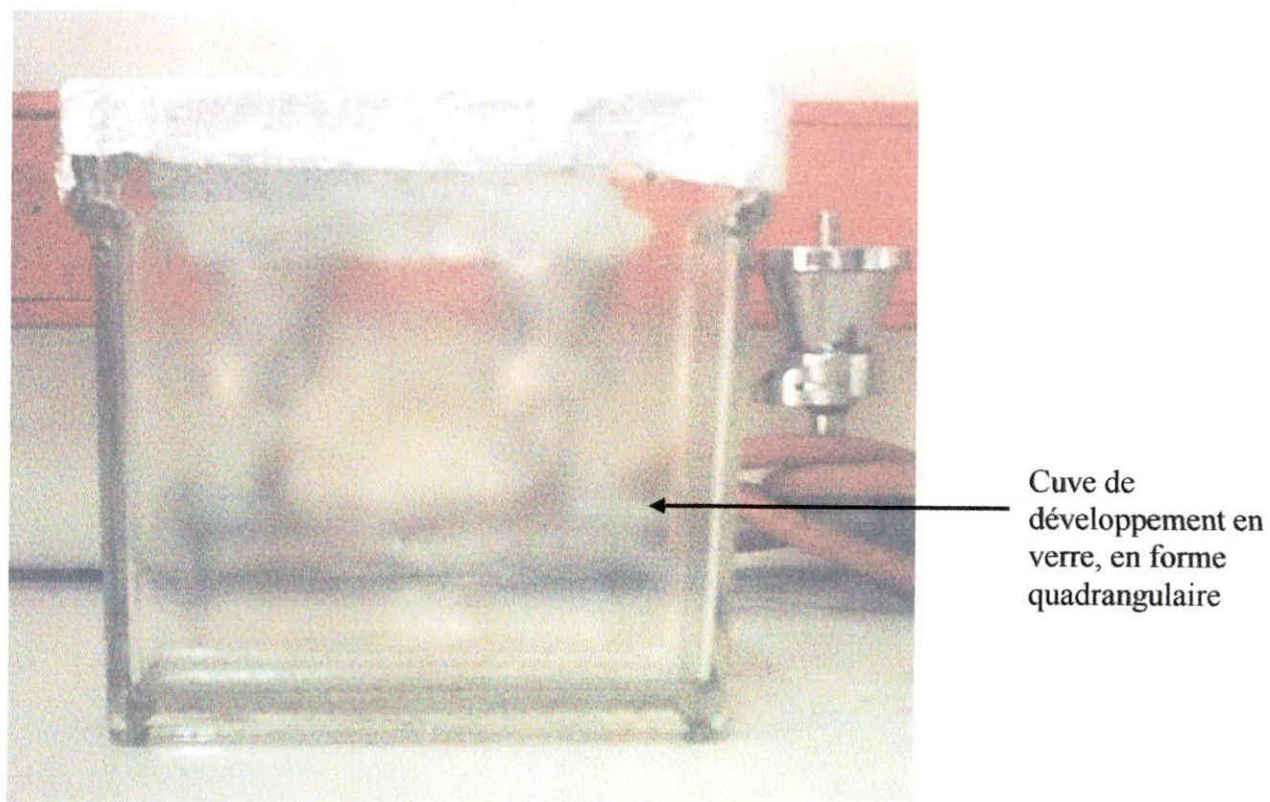


Figure 10 : Cuve chromatographique en verre.

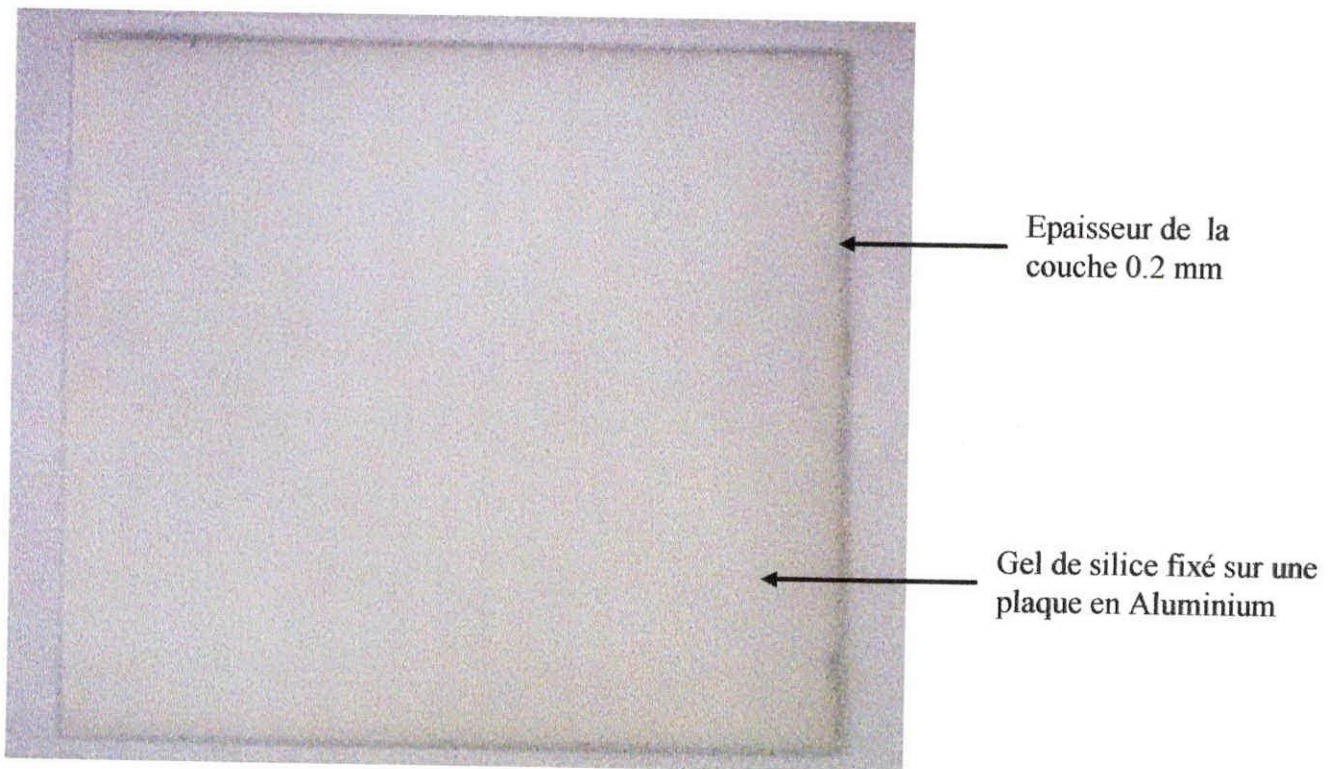


Figure 11 : Une plaque chromatographique (chromatogramme)
Plaque « Fluka » (20 * 20) avec indicateur fluorescent 254 nm.

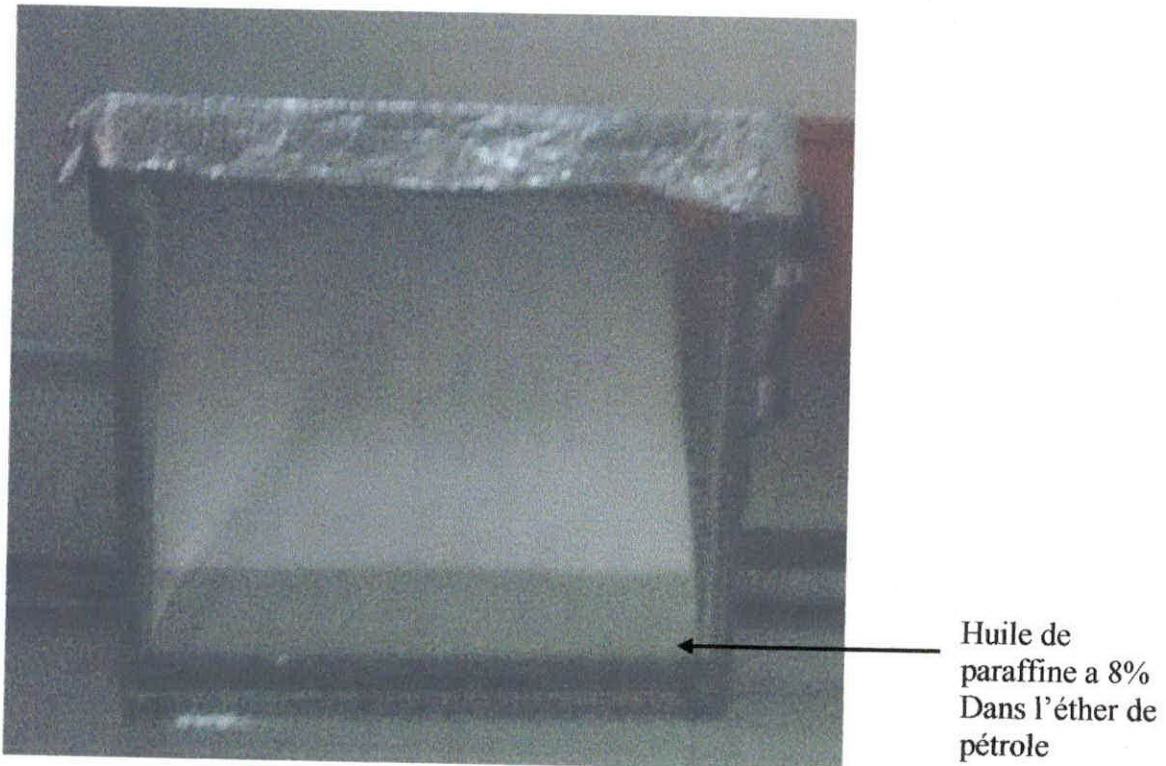


Figure 12 : Couche chromatographique imprégnée par l'huile de paraffine.

Annexe 03 :

Tableau 08 : Concentration de quelques produits animaux et végétaux en β – carotène (d'après Ciqual ; 2006 in [54])

Produits	β – carotène (vitamine A) mg/100g M.S
Produits animaux :	
-foie	1.25 – 1.5
-foie gras, poisson gras (anguille, thon rouge)	0.9 – 1 (rétinol)
-beurre	0.5 – 0.75
-jaune d'œuf	0.5 – 0.6 (rétinol)
Produits végétaux :	
-spiruline sèche	70 – 170
-oseille	11
-mangue	3 – 4
-abricot sec	4 – 5
-carotte cuite	8 – 9
-carotte en conserve	6 – 7
-melon, poivrons vert et jaune, macédoine	1 – 2
-cassava	1.7
-kapok	1.62
-tomate	0.5 – 1
-pêche	0.5 – 1
-courgette	0.35
-prune	0.57
-datte sèche	0.03
-orange	0.05 – 0.2
-pomme	0.07

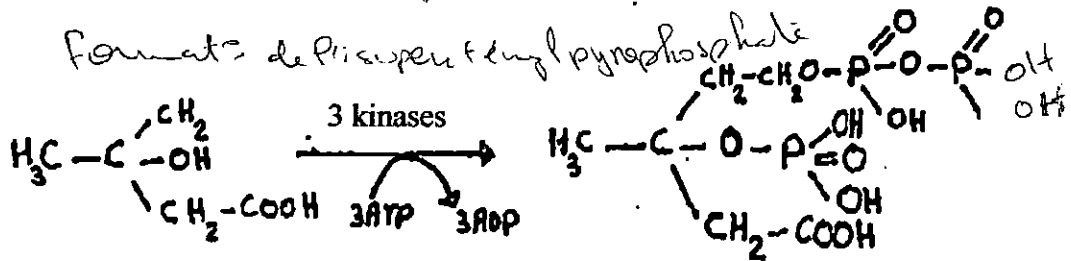
Tableau 09 : Série éluotrope de systèmes à un ou deux solvants.

(Les chiffres indiquent des volumes.

La colonne de droite est la suite de celle de gauche).

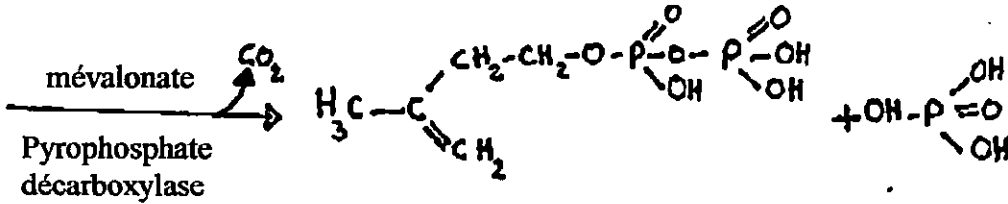
Renseignement communiqué par Dr.NEHER.R et VON ABX .E, Bâle in RANDEATH ; 1971).

Augmentation de la force d'éluion	↓	Benzène Benzène /Chloroforme (1 :1) Chloroforme Cyclohexane/acétate d'éthyle (8 :2) Chloroforme/acétone (95 :5) Benzène/ acétate d'éthyle (8 :2) Chloroforme / éther (9 :1) Benzène / méthanol (95 :5) Benzène / éther (6 :4) Cyclohexane / acétate d'éthyle (1 :1) Chloroforme / éther (8 :2) Benzène / acétone (8 :2) Chloroforme / méthanol (9 :1) Chloroforme / acétone (85 :15) Benzène /éther (4 :6) Benzène / acétate d'éthyle (1 :1) Chloroforme / éther (6 :4)	Augmentation de la force d'éluion	↓	Cyclohexane/ acétate d'éthyle (2 :8) Acétate de butyle Chloroforme / méthanol (95 :5) Chloroforme / acétone (7 :3) Benzène / acétate d'éthyle (3 :7) Acétate de butyle /méthanol (99 :1) Benzène / éther (1 :9) Ether / méthanol (99 :1) Ether Ether / diméthyl formamide (99 :1) Acétate d'éthyle Acétate d'éthyle / méthanol (99 :1) Benzène / acétone (1 :1) Chloroforme /méthanol (9 :1) Dioxane Acétone Méthanol Dioxane /eau (9 :1)
-----------------------------------	---	---	-----------------------------------	---	--

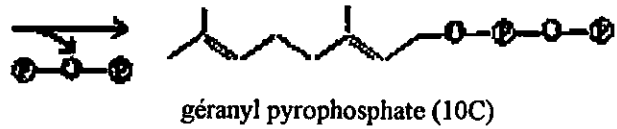
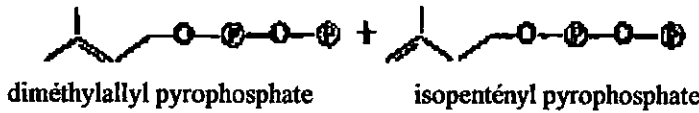


acide mévalonique

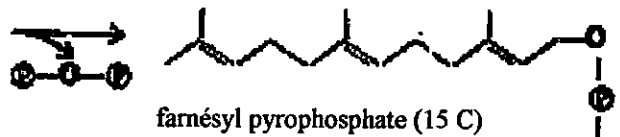
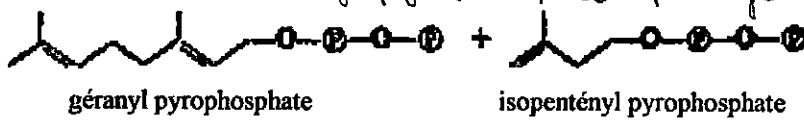
composé instable qui se décarboxyle en perdant son pyrophosphate



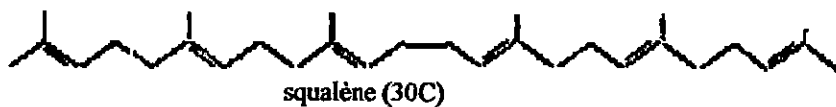
isopentényl pyrophosphate



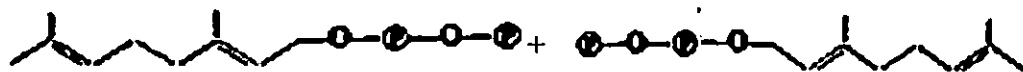
Ce composé se condense avec une nouvelle molécule d'isopentényl pyrophosphate pour former le farnésyl pyrophosphate



2 molécules se condensent en perdant chacune leur pyrophosphate pour former le squalène



2 molécules de géranyl pyroph. se condensent en perdant un pyrophosphate



2 géranyl pyrophosphate

nous donnera GG P (20C)

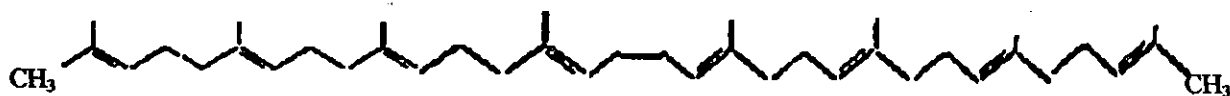


géranyl-géranyl pyrophosphate (20C)

condensation 2 géranyl-géranyl pyrophosphate

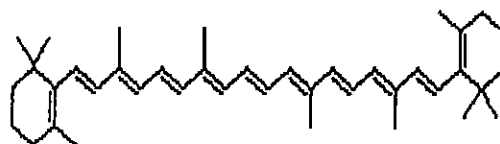


Par condensation de 2 molécule sous forme de dimère nous donne le phytoène chacun perd son pyrophosphate



phytoène (40C)

Suivie d'une cyclisation et désaturation des extrémités pour donner le carotène



β -carotène $C_{40}H_{56}$

Figure 08 : Réactions de biosynthèse des caroténoïdes (KRUH ; 1989)