

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

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر و تهيئة الساحل

École Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



THESE

*Présentée en vue de l'obtention du grade de*

**DOCTEUR EN SCIENCES**

Domaine: Science de la vie et de la nature

Filière: Hydrobiologie marine et continentale

Specialité: Science de la mer

**Par**

DAHMOUNE Bouchra

**Optimisation des conditions d'extraction par micro-ondes et ultrasons  
des saponines et des caroténoïdes de deux Échinodermes Astéroïdea de  
la marge algérienne (*Echinaster sepositus* et *Ophidiaster ophidianus*)  
et étude de leurs activités biologiques**

Soutenu le 29 / 11 / 2021 devant le jury suivant:

Mme. BACHARI-HOUMA F	Pr. ENSSMAL	Directeur de thèse
M. HAUCHARD D	Assistant Pr-HDR. ENSCR, France	Co- directeur de thèse
M. HAMDI B	Pr. ENSSMAL	Président
M. ABEDLGHANI F. M	Pr. USTO	Examinateur
M. CHERIF Y. F	Pr. USTHB	Examinateur
Mme. KHATIB N	Dr. USTHB	Examinatrice
Mme. ALOUACHE S	Dr. ENSSMAL	Examinatrice
M. CHIBANE M	Pr. UAMOB	Invité

**Année universitaire: (2020/2021)**

# *Remerciement*

## Remerciement

---

Ce travail est le fruit de collaborations forgées sur la sincère volonté d'offrir une contribution, quelle qu'elle soit, à la recherche. Et il m'est agréable de remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Je remercie le **Pr. HAMDI Boualem**, pour le grand honneur qu'il nous a fait en présidant ce jury. Qu'il veuille bien trouver ici l'assurance de mes profondes estimations.

Je remercie le **Pr. CHERIF Yazid Foudil**, **Pr. ABDELGHANI F.M**, **Dr. KHATIB N** et **Dr. Alouache SOUHIHAL** qui ont accepté de siéger dans le jury de cette thèse et d'apporter leurs critiques pertinentes et leurs suggestions. Merci pour votre grandeur scientifique et votre modestie.

Je tiens à remercier le **Professeur BACHARI HOUMA FOUZIA** mon directeur de thèse qui m'a toujours accordé patience, soutien et confiance, me guidant constamment vers de nouvelles connaissances et formations enrichissantes.

Un remerciement particulier à mon co-directeur de thèse **Dr. HAUCHARD Didier** pour avoir généreusement accueilli mon projet de thèse, étant prompts à répondre à mes sollicitations, et ayant apporté le recul nécessaire sur certains problèmes qui me semblaient insolubles au premier abord. Par ailleurs, je n'oublierai jamais ces moments plus informels, qui ont été l'occasion pour moi de ne jamais me sentir dépaycée.

Je remercie très sincèrement le **Pr. Chibane Mohammed** qui a adopté mon projet de thèse, et pour avoir soutenu vivement ce travail en y apportant une approche plutôt originale qui s'est avérée très prometteuse; et pour m'avoir offert des compétences précieuses, avec toute attention et patience.

Je suis très reconnaissante à **GUEGAN jean-Paul** (de l'équipe de recherche de Chimie Organique et Interfaces CORINT de l'école nationale supérieure de chimie de Rennes) et au **Dr. JEHAN Philippe** (du Service de Spectrométrie de Masse au niveau du Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest (CRMPO) de l'université de Rennes, pour avoir apporté la plus grande contribution scientifique à ce travail et pour avoir conduit la recherche jusqu'au bout afin d'élucider la structures des molécules étudiées. Une autre fois je ne peux remercier que **GUEGAN jean-Paul**, il s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de mon stage à l'école de chimie de Rennes, il n'a jamais ménagé sa personne ni son temps pour le bon déroulement de travail, mais également de m'avoir formée pour réaliser les expériences RMN.

Je remercie très chaleureusement, le **Dr. DAHMOUNE Farid**, pour avoir porté un grand intérêt à ce travail en mettant à ma disposition ses compétences dans le domaine

## Remerciement

---

d'optimisation des méthodes d'extraction des substances naturelles, pour ses conseils pratiques, et son soutien lors des moments difficiles.

Je remercie **Dr. DAHMOUNE Amina**, pour toute l'aide qu'elle m'a procurée, merci pour votre soutien attentif et bienveillant.

Je remercie également toute l'équipe du laboratoire de gestion de valorisation des ressources naturelles et assurance qualité LGVRNAQ de l'université de Bouira, en particulier le directeur, le **Pr. MOUNI lotfi**, et tous les doctorants (Chedri, Nessma, hayet, Saida, Hassina, amel...etc) c'est au sein de ce laboratoire que j'ai commencé la recherche et j'ai réalisé l'optimisation et une partie des activités antioxydantes, je les remercie pour leur soutien, aussi bien sur le plan technique, que par l'ambiance fort conviviale qu'ils offrent. Je n'oublierai pas non plus toutes nos discussions enrichissantes et parfois même hilarantes!

Je remercie profondément toute l'équipe de laboratoire de Chimie et Ingénierie des Procédés (CIP) de l'École Nationale Supérieure de Chimie de Rennes (ENSCR) pour leur accueil chaleureux dans le cadre de la bourse profas B<sup>+</sup>, et pour leur soutien technique. Je remercie particulièrement mon co-directeur de thèse de m'avoir formé en électrochimie et ceci malgré les multiples charges qui lui sont attribuées.

Je tiens à remercier toute l'équipe de recherche CORINT pour leurs conseils, leur professionnalisme et leur gentillesse dont ils ont fait preuve à mon égard durant mon stage à l'ENSCR. Mes remerciements vont particulièrement:

- Au **Pr. FERRIERE Vincent** le directeur de laboratoire pour toute l'aide qu'il m'a procurée, ses compétences, notamment en identification structurale des molécules d'origine naturelle, m'ont été très précieuses.
- À **VIVES Thomas** qu'il trouve ici l'expression de ma profonde sympathie.

Je remercie aussi toute l'équipe du Laboratoire d'Application de Résonance Magnétique Nucléaire (LARMN, Université de Lille 2) et à CAYAN Elsa de l'université de Renne 1 qui a assisté les multiples expériences RMN et qu'elle s'est montrée particulièrement attentive à l'égard de ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux membres des laboratoires pédagogiques et de recherche de l'ENSCR pour leur soutien et affection. En particulier **OUGHEBBI Laurence** et **LOUARN Gaëtan** pour leur bonne humeur.

Je remercie tout le personnel de l'École Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du littoral ENSSMAL (Algérie) pour toute l'aide qu'ils m'ont apportée en particulier **Pr. HMIDA Farid** et **Dr. MEZOUAR Khodir**.

## Remerciement

---

Je remercie toute l'équipe du club de plongée (Pointe, Alger), qu'il trouve ici l'expression de ma profonde sympathie.

Je remercie infiniment le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (MESRS) de m'avoir accordé la bourse Profas B<sup>+</sup>, le Consulat d'Algérie à Nantes (France) pour leurs orientations et disponibilité, ainsi que toute l'équipe de l'École Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du littoral ENSSMAL (Algérie) pour leurs contributions et assistance à la réalisation de ce stage.

À mes parents, un merci ne serait répondre à votre soutien, sans vous et vos innombrables sacrifices je n'aurais pas pu mener à bien ce travail.

À mes sœurs et frères, les mots me manquent pour vous remercier, le support que vous m'avez apporté est tout simplement inestimable, en particulier ma grande sœur et son mari merci infiniment.

À mon cher mari qui a été toujours là pour me guider avec ses conseils, je le remercie pour sa patience, sa compréhension et son calme. Sans mes parents et toi je ne serais pas ce que je suis aujourd'hui. Je tiens aussi à remercier ma belle famille pour son soutien en particulier Papila.

À mes chères amies et collègues, particulièrement (Djemaa, Nawale, Fadhila et fayrouze) merci infiniment pour avoir rendu mon aventure de recherche agréable et passionnante, tous mes encouragements pour la suite.

Pour finir, je prie Allah d'éclairer mes lanternes et de me guider dans le droit chemin pour les travaux futurs.

Merci à tous et à toutes.

## **Table des matières**

**Liste des tableaux**

**Liste des figures**

**Liste des abréviations**

**Liste des symboles**

**Liste des formules**

## **Introduction**

Contexte de l'étude .....	22
Approches retenues et étapes de thèse .....	22
Objectif de thèse .....	26

## **Partie I : synthèse bibliographique**

<b>I. Les échinodermes, Asteroidea .....</b>	<b>28</b>
I.1. Généralité sur la classe des astéroïdes .....	28
I.1.1. Famille des Echinasteridae .....	30
I.1.1.1. <i>Echinaster sepositus</i> .....	30
I.1.2. Famille des Ophidiasteridae .....	36
I.1.2.1. <i>Ophidiaster ophidianus</i> .....	36
<b>II. Substance active d'origine marine .....</b>	<b>39</b>
II.1. Généralité sur les saponins .....	40
II.1.1. Structure des saponines .....	40
II.1.1.1. Aglycone (génine) .....	41
II.1.1.2. Glycone (sucres) .....	45
II.1.2. Les saponins des Échinodermes .....	47
II.1.3. Les saponines des asteroidea .....	47
II.1.4. Les saponines d' <i>Echinaster sepositus</i> .....	49
II.1.5. Les saponines d' <i>Ophidiaster ophidianus</i> .....	51
II.1.6. Propriétés biologiques et pharmacologiques des saponines des astéries .....	52
II.2. Généralité sur les caroténoïdes .....	56
II.2.1. Structure des caroténoïdes .....	56
II.2.2. Classification des caroténoïdes .....	57
II.2.3. Principaux caroténoïdes selon les organismes producteurs .....	58
II.2.4. Propriété physico-chimiques des caroténoïdes .....	59
II.2.4. Les caroténoïdes des échinodermes .....	61
II.2.6. Les caroténoïdes des asteroidea .....	62
II.2.7. Propriétés pharmacologiques des caroténoïdes .....	63
<b>III. Nouvelles perspectives pour l'extraction des saponines et des caroténoïdes .....</b>	<b>67</b>
III.1. L'extraction par micro-ondes .....	68
III.1.1. Les micro-ondes .....	68
III.1.2. Le chauffage par micro-ondes .....	69
III.1.3. L'extraction assistée par micro-ondes (EAM) .....	71
III.1.3.1. Appareillage pour l'extraction AEM .....	72

III.1.3.2. Les facteurs influençant l'EAM .....	73
III.2. L'extraction par ultrasons .....	74
III.2.1. Les ultrasons .....	74
III.2.2. Propagation des ondes ultrasons et formation des bulles de cavitation .....	75
III.2.3. L'extraction assistée par ultrasons (EAU) .....	76
III.2.4. Appareillage pour l'extraction EAU .....	77
III.2.5. Les facteurs influençant l'EAU .....	78

## **Partie II: matériels et méthodes**

<b>I. Matériel biologique.....</b>	<b>82</b>
I.1.Récolte du matériel biologique .....	82
I.2. Localisation de station d'échantillonnage .....	82
<b>II. Extraction des substances actives .....</b>	<b>84</b>
II.1. Traitement des échantillons, dissection et extraction .....	84
II.2. Procédures d'extraction .....	87
II.2.1. Extraction assistée par micro-ondes (EAM) .....	87
II.2.2. Extraction assistée par ultrasons (EAU) .....	88
II.2.3. Extraction conventionnelle (EC) .....	88
II.3. Conception de travaux expérimentaux et modélisation statistique .....	89
II.3.1. Étude préliminaire .....	89
II.3.2. Application de plan d'expérience pour l'optimisation de l'extraction .....	93
II.3.3. Analyse statistique des données .....	97
II.4. Purification des extraits .....	97
II.4.1. Isolement des saponines .....	98
II.4.1.1. Estimation de la teneur totale des saponines .....	99
a. Étude quantitative des saponines d' <i>E.sepositus</i> .....	100
II.4.2. Isolement des caroténoïdes .....	100
II.4.2.1. Estimation de la teneur totale des caroténoïdes .....	101
II.4.3. Estimation de rendement total d'extraction .....	101
<b>III. Activité biologique .....</b>	<b>104</b>
III.1. Activité anti-oxydante .....	104
III.1.1. Effet scavenger du radical DPPH <sup>•</sup> .....	104
III.1.2. Effet scavenger de l'anion superoxyde O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> .....	105
III.1.3. Capacité de réduction de l'hémolyse oxydatif par les saponines .....	108
III.1.3.1. Détermination des concentrations non hémolytique des saponines .....	109
III.1.3.2. Évaluation de l'activité anti-hémolytique des saponines .....	110
<b>IV. Identification structurale des saponines d'<i>Echinaster</i></b>	
<b><i>sepositus</i> .....</b>	<b>111</b>
IV.1. La spectrométrie de masse .....	111
IV.2. La Résonance Magnétique Nucléaire RMN .....	112

## Partie II: Résultats et discussions

<b>I. Les caractères morphométriques d'<i>E. sepositus</i> et d'<i>O. ophidianus</i> .....</b>	<b>116</b>
a. Mensurations et pesés .....	117
b. Rapport gonado-somatique (RGS) chez <i>E. sepositus</i> .....	119
<b>II. Optimisation de l'extraction des saponines et des caroténoïdes .....</b>	<b>121</b>
II.1. Extraction assistée par micro-ondes .....	121
II.1.1. Étude préliminaire .....	121
II.1.1.1. Effet de solvant d'extraction .....	121
II.1.1.2. Effet de la concentration de solvant d'extraction .....	123
II.1.1.3. Effet de ratio liquide-solide .....	127
II.1.1.4. Effet de la puissance .....	129
II.1.1.5. Effet de temps .....	129
II.1.2. Application de plan d'expérience .....	130
II.1.2.1. La teneur des saponines .....	130
II.1.2.1.1. Analyse de la variance et effet des facteurs .....	132
II.1.2.1.2. Les conditions optimales et la validation de la méthode d'extraction des saponines par l'EAM .....	139
II.1.2.2. La teneur des caroténoïdes .....	141
II.1.2.2.1. Analyse de la variance et effet des facteurs .....	142
II.1.2.2.2. Les conditions optimales et la validation de la méthode d'extraction des caroténoïdes par l'EAM .....	145
II.2. Extraction assistée par ultrasons .....	146
II.2.1. Étude préliminaire .....	146
II.2.1.1. Effet de solvant d'extraction .....	148
II.2.1.2. Effet de la concentration de solvant d'extraction .....	148
II.2.1.3. Effet de ratio liquide-solide .....	149
II.2.1.4. Effet de mode de pulsation .....	149
II.2.1.5. Effet de temps .....	149
II.2.2. Application de plan d'expérience .....	150
II.2.2.1. La teneur des saponines .....	150
II.2.2.1.1. Analyse de la variance et effet des facteurs .....	152
II.2.2.1.2. Les conditions optimales et la validation de la méthode d'extraction des caroténoïdes par l'EAU .....	155
II.2.2.2. La teneur des caroténoïdes .....	156
II.2.2.2.1. Analyse de la variance et effet des facteurs .....	156
II.2.2.2.2. Les conditions optimales et la validation de la méthode d'extraction des caroténoïdes par l'EAU .....	159
II.3. Comparaison des méthodes d'extraction : EAM, EAU et EC .....	160
II.4. Étude quantitative des saponines d' <i>E. sepositus</i> .....	165
II.4.1. Variabilité inter-organe .....	165
II.4.2. Variabilité sexuelle et saisonnière .....	167

<b>III. Activité biologique des saponines et des caroténoïdes .....</b>	171
III.1. Activité anti-oxydante des saponines et des caroténoïdes .....	171
III.1.1. Activité anti-oxydante déterminée par le test du DPPH• .....	171
III.1.2. Activité anti-oxydante déterminée par le test électrochimique .....	172
III.2. Capacité de réduction de l'hémolyse oxydatif par les saponines .....	175
III.2.1. Activité hémolytique .....	175
III.2.2. Réduction de l'hémolyse oxydatif .....	176
<b>IV. Identification structurales des saponines d'<i>E. sepositus</i> .....</b>	179
IV.1. Analyse par spectrométrie de masse .....	179
IV.1.1. Distribution des saponines dans les différents organes d' <i>E. sepositus</i> .....	182
IV.2. Analyses par spectrométrie de masse en tandem (HR-ESI-SM/SM) et identification de nouvelles saponines .....	187
IV.3. Analyse par résonance magnétique nucléaire .....	200
IV.2.1. Élucidation structurale de la sepositoside A .....	200
IV.2.2. Élucidation structurale de la lozonicoside A .....	206
<b>Conclusion .....</b>	211
<b>Bibliographie</b>	
<b>Annexe</b>	

## Liste des tableaux

Titres	Pages
<b>Tableau 1:</b> Caractéristiques des « étoiles de mer », <i>Echinaster sepositus</i> , <i>Ophidiaster ophidianus</i> , <i>Hacelia attenuata</i> et <i>Asterias rubens</i> . <b>R/r</b> : Rapport entre la longueur des bras (R) et le diamètre du disque central (r) .....	34
<b>Tableau 2:</b> Propriétés fonctionnelles des saponines des astéries .....	55
<b>Tableau 3:</b> Activité pharmacologique et application industrielle des caroténoïdes d'origine marine .....	65
<b>Tableau 4:</b> Présentation des techniques d'EAM et EAU, avec leur principe, avantages et inconvénients .....	80
<b>Tableau 5:</b> Conditions opératoires pour le choix de la nature de solvant .....	90
<b>Tableau 6:</b> Conditions opératoires de l'étude préliminaire de l'extraction assistée par micro-ondes .....	92
<b>Tableau 7:</b> Condition opératoires de l'étude préliminaire de l'extraction assistée par ultrasons .....	92
<b>Tableau 8:</b> Conditions opératoires de l'EAM dans le cadre de plan d'expérience .....	94
<b>Tableau 9:</b> Conditions opératoires de l'EAU dans le cadre de plan d'expérience.....	95
<b>Tableau 10:</b> Variables indépendantes et les niveaux des facteurs influençant sur l'extraction assistée par micro-ondes .....	96
<b>Tableau 11:</b> Variables indépendantes et les niveaux des facteurs influençant sur l'extraction assistée par ultrasons .....	96
<b>Tableau 12:</b> Les résultats des caractères métrique d' <i>E.sepositus</i> et d' <i>O.ophidianus</i> .....	118
<b>Tableau 13:</b> Teneurs moyennes des saponines et probabilités calculées en fonction de la nature de solvant d'extraction pour <i>E. sepositus</i> et <i>O. ophidianus</i> .....	122
<b>Tableau 14:</b> Analyse de variance des teneurs des saponines au seuil de signification $\alpha=0,05$ .....	123
<b>Tableau 15:</b> Test de la différence significative (HSD) de Tukey pour les différentes concentrations de MeOH (cas d' <i>E. sepositus</i> ) .....	124
<b>Tableau 16:</b> Test de la différence significative (HSD) de Tukey pour les différentes concentrations de MeOH (cas d' <i>O. ophidianus</i> ) .....	125
<b>Tableau 17:</b> Information sur les groupements des teneurs des saponines en fonction de la concentration de MeOH au seuil de signification $\alpha=0,05$ pour les deux espèces étudiées d' <i>E. sepositus</i> et <i>O.ophidianus</i> . <b>n</b> : nombre de répétition de chaque expérience.....	126
<b>Tableau 18:</b> Résultats des analyses préliminaires pour l'extraction par micro-onde cas d' <i>E.sepositus</i> . Les mêmes lettres dans la même colonne signifient qu'il n'y a pas de différence significative à au seuil de signification $\alpha=0,05$ .....	128
<b>Tableau 19:</b> Résultats des analyses préliminaires pour l'extraction par micro-onde cas d' <i>O.ophidianus</i> . Les mêmes lettres dans la même colonne signifient qu'il n'y a pas de différence significative à au seuil de signification $\alpha =0,05$ .....	128
<b>Tableau 20:</b> Valeurs expérimentales et prédites de la teneur des saponines en (mg.g-1) d' <i>E.sepositus</i> et d' <i>O.ophidianus</i> obtenus par l'EAM dans le cadre de plan d'expérience.....	131
<b>Tableau 21:</b> Analyse de la variance (ANOVA) appliquée à la teneur des saponines obtenues par l'EAM à partir <i>E. sepositus</i> .....	133
<b>Tableau 22:</b> Analyse de la variance (ANOVA) appliquée à la teneur des saponines obtenues par l'EAM à partir d' <i>O. ophidianus</i> .....	134

## Liste des tableaux

Titres	Pages
<b>Tableau 23:</b> Conditions optimales d'extraction des saponines par micro-onde .....	139
<b>Tableau 24:</b> Valeurs expérimentales et prédites des quantités des saponines dans les conditions optimales (EAM) .....	140
<b>Tableau 25:</b> Analyse de la variance (ANOVA) appliquée à la teneur des caroténoïdes obtenus par l'EAM à partir d' <i>E. sepositus</i> .....	142
<b>Tableau 26:</b> Analyse de la variance (ANOVA) appliquée à la teneur des caroténoïdes obtenus par l'EAM à partir d' <i>O. ophidianus</i> .....	143
<b>Tableau 27:</b> Conditions optimales d'extraction des caroténoïdes par micro-ondes .....	146
<b>Tableau 28:</b> Valeurs expérimentales des quantités des caroténoïdes dans les conditions optimales d'EAM .....	146
<b>Tableau 29:</b> Résultats des analyses préliminaires pour l'extraction des saponines par ultra-sons à partir d' <i>E. sepositus</i> . Les mêmes lettres dans la même colonne signifient qu'il n'y a pas de différence significative dans la teneur des saponines au seuil de signification ( $P=0,05$ ) .....	147
<b>Tableau 30:</b> Résultats des analyses préliminaires pour l'extraction des saponines par ultra-sons à partir d' <i>O. ophidianus</i> . Les mêmes lettres dans la même colonne signifient qu'il n'y a pas de différence significative dans la teneur des saponines au seuil de signification ( $P=0,05$ ) .....	147
<b>Tableau 31:</b> Valeurs expérimentales et prédites de la teneur des saponines en ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) d' <i>E. sepositus</i> et d' <i>O. ophidianus</i> obtenue par l'EAU dans le cadre de plan d'expérience.....	151
<b>Tableau 32:</b> Analyse de la variance (ANVA) appliquée à la teneur de saponines obtenues par l'EAU à partir d' <i>E. sepositus</i> .....	152
<b>Tableau 33:</b> Analyse de la variance (ANOVA) appliquée à la teneur de saponines obtenues par l'EAU à partir d' <i>O. ophidianus</i> .....	153
<b>Tableau 34:</b> Conditions optimales, valeurs expérimentales et prédites d'EAU des saponines d' <i>E. sepositus</i> et d' <i>O. ophidianus</i> .....	155
<b>Tableau 35:</b> Analyse de la variance (ANVA) appliquée à la teneur de caroténoïdes obtenues par l'EAU à partir d' <i>E. sepositus</i> .....	157
<b>Tableau 36:</b> Analyse de la variance (ANOVA) appliquée à la teneur de caroténoïdes obtenues par l'EAU à partir d' <i>O. Ophidianus</i> .....	157
<b>Tableau 37:</b> Conditions optimales, valeurs expérimentales et prédites d'EAU des caroténoïdes d' <i>E. sepositus</i> et d' <i>O. ophidianus</i> .....	159
<b>Tableau 38:</b> Comparaison entre les méthodes d'extraction développées .....	162
<b>Tableau 39:</b> Conditions optimales d'EAM des saponines et des caroténoïdes des étoiles de mer étudiées .....	164
<b>Tableau 40:</b> Analyse de la variance (ANOVA) relative à la variabilité inter organe de la teneur des saponines d' <i>E. sepositus</i> ( $\text{mg.g}^{-1}$ ). Pour chaque sexe et chaque saison, les mêmes lettres dans la même colonne signifient qu'il n'y a pas de différence significative dans la teneur des saponines au seuil de signification.....	165
<b>Tableau 41:</b> Teneurs des saponines dans différents espèces d'étoiles de mer .....	170
<b>Tableau 42:</b> Valeur des IC50% et AI50% des saponines et des caroténoïdes d' <i>E. sepositus</i> et <i>O. ophidianus</i> .....	172
<b>Tableau 43:</b> Valeur de AI30% et AI50% en utilisant la régression linéaire et polynomiale de second ordre (Cas des saponines d' <i>E. sepositus</i> ) .....	174

## Liste des tableaux

Titres	Pages
<b>Tableau 44:</b> Les ions saponines détectés dans les différents organes d' <i>E. sepositus</i> (EST: estomac, CAE: caeca pylorique, GON: gonades, TEG ORL: tégument oral, TEG ABR: tégument aboral) des deux sexes (♀: femelle, ♂: mâle), collectés à différentes saisons .....	183
<b>Tableau 45:</b> Les congénères des saponines détectés dans les différents organes d' <i>E. sepositus</i> (EST: estomac, CAE: caeca pylorique, GON: gonades, TEG ORL: tégument oral, TEG ABR: tégument aboral) des deux sexe (♀: femelle, ♂: mâle), collectés à différentes saisons (t: tous les saisons, hi: hiver, pr : printemps, et: été, Au: automne). M: masse moléculaire, S: structure moléculaire .....	197
<b>Tableau 46:</b> Valeurs des déplacements chimiques RMN-1H (900 MHz) et -13C (150 MHz) de la génine (aglycone) d'extrait de tégument oral dans méthanol deutéré CD3OD .....	201
<b>Tableau 47:</b> Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup> H (900 MHz) et RMN <sup>13</sup> C (150 MHz) des sucres des saponines de tégument oral dans le méthanol deutéré CD3OD ( $\delta$ en ppm, <i>J</i> en Hz) .....	204
<b>Tableau 48:</b> Valeurs des déplacements chimiques RMN-1H (900 MHz) et -13C (150 MHz) de l'extrait d'estomac dans méthanol deutéré CD3OD ( $\delta$ en ppm, <i>J</i> en Hz) .....	207

## Liste des figures

Titres	Pages
<b>Figure 1:</b> Divers formes des astéries. (A): ordinaire, (B): étoilées, (C): globuleuse, (D): pentagonale. Source des photos : (A) : <a href="https://fr.wikipedia.org/wiki/Asterias_rubens#/media/Fichier:Asterias_rubens.jpg">https://fr.wikipedia.org/wiki/Asterias_rubens#/media/Fichier:Asterias_rubens.jpg</a> .consulté le 10-20-2020; (B) : <a href="http://echinoblog.blogspot.com/2008/05/fossil-starfish-story-deep-sea.html">http://echinoblog.blogspot.com/2008/05/fossil-starfish-story-deep-sea.html</a> .consulté le 20-10-2020. (C): <a href="https://fr.wikipedia.org/wiki/Podosphaeraster#/media/Fichier:Podosphaeraster_gustavei.jpg">https://fr.wikipedia.org/wiki/Podosphaeraster#/media/Fichier:Podosphaeraster_gustavei.jpg</a> . Consulté le 20-10-2020. (D) : <a href="https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sphaeriodiscus_bourgeti.jpg">https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sphaeriodiscus_bourgeti.jpg</a> . Consulté le 20-10-2020	29
<b>Figure 2:</b> Les étoiles de mer rouge	32
<b>Figure 3:</b> Représentation schématique des différentes parties des saponines (D'après D'Auria <i>et al.</i> , 1999; Sandvoss <i>et al.</i> , 2001[Modifier])	41
<b>Figure 4:</b> Biosynthèse des stéroïdes et triterpenoïdes selon Hostettmann et Marston (1995) et Maier (2008)	42
<b>Figure 5:</b> Les aglycones triterpéniques, (A): Oleanane; (B): Ursane; (C): Lupane ...	43
<b>Figure 6:</b> Les génines stéroïdiques, (A): Spirostane; (B): Furostane; (C) néosapogénine: 25S-spirostane; (D): Isosapogénine: 25R-spirostane; (E): Diosgénine; (F): Digitogénine; (G): Smilagénine	44
<b>Figure 7:</b> Structures chimiques des principaux saccharides des saponines des étoiles de mer	46
<b>Figure 8:</b> Sepositoside d' <i>E. sepositus</i> (De Simone <i>et al.</i> , 1981 et Riccio <i>et al.</i> et 1981) et luzonicoside d' <i>E. luzonicus</i> (Kicha <i>et al.</i> , 2015)	50
<b>Figure 9:</b> Saponine d' <i>O. ophidianus</i> (Riccio <i>et al.</i> , 1985)	52
<b>Figure 10:</b> Structure des principaux carotènes	57
<b>Figure 11:</b> Les caroténoïdes des Échinodermes	61
<b>Figure 12:</b> Les caroténoïdes d' <i>E. sepositus</i> (A et B) et d' <i>O. ophidianus</i> (C et D)....	63
<b>Figure 13:</b> Comparaison entre chauffage conventionnel (a), chauffage par micro-onde (b). Selon (Chemat et Lucchesi, 2005) et (Bozkurt et Icier, 2010)	71
<b>Figure 14:</b> Représentation schématique des conditions d'irradiation micro-onde: (A): propagation monomode; (B): propagation multi-modes (Mandal <i>et al.</i> , 2007).	73
<b>Figure 15:</b> Représentation schématique de la croissance et de l'implosion d'une bulle de cavitation (Pétrier <i>et al.</i> , 2008)	75
<b>Figure 16:</b> Localisation de la station de prélèvement	83
<b>Figure 17:</b> Procédure générale d'extraction et d'isolement des saponines et des caroténoïdes	103
<b>Figure 18:</b> Voltampérogrammes cycliques de la réduction d'O <sub>2</sub> <sup>-</sup> dissout en absence (courbe B et C) et en présence (courbe A) des saponines de l'étoile de mer <i>Echinaster sepositus</i> . (A) et (B): courbes de voltampérométrie cyclique, (C): courbes convolées semi-drivées. v=100 mV/s; DMF+NBU <sub>4</sub> PF <sub>6</sub> =0.1M	107
<b>Figure 19:</b> Les corrélations observées à l'aide de différentes expériences RMN bidimensionnelles	114
<b>La figure 20:</b> Caractères morpho-métriques des étoiles de mer étudiées, <i>E. sepositus</i> (A) et d' <i>O. ophidianus</i> (B). (R: longueur des bras; r: rayon du disque central)	116
<b>Figure 21:</b> Les gonades de l'étoile de mer <i>E. sepositus</i> . A: gonade femelle; B: gonade mâle	119
<b>Figure 22:</b> Évolution mensuelle du rapport gonado-somatique d' <i>E. sepositus</i>	120

## Liste des figures

Titres	Pages
<b>Figure 23:</b> Surface de réponse pour les différentes interactions sur la teneur des saponines (cas de l'EAM d' <i>E. sepositus</i> ). (a): solvant/temps, (b): solvant/puissance, (c): solvant/ratio, (d): puissance/temps, (e): ratio/temps, (f): puissance/ratio .....	136
<b>Figure 24:</b> Surface de réponse pour les différentes interactions sur la teneur des saponines (cas de l'EAM d' <i>O. ophidianus</i> ). (a): solvant/temps, (b): solvant/puissance, (c): solvant/ratio, (d): puissance/temps, (e): ratio/temps, (f): puissance/ratio .....	137
<b>Figure 25:</b> Surface de réponse pour les différentes interactions sur la teneur des caroténoïdes (cas de l'EAM d' <i>E. sepositus</i> ). (a): solvant/temps, (b): solvant/puissance, (c): solvant/ratio, (d): puissance/temps, (e): ratio/temps, (f): puissance/ratio .....	144
<b>Figure 26:</b> Effet du cycle de pulsation sur l'EAU des saponines d' <i>E. sepositus</i> et d' <i>O. ophidianus</i> .....	149
<b>Figure 27:</b> Surface de réponse pour les différentes interactions sur la teneur des saponines (cas de l'EAU d' <i>E. sepositus</i> ). (a): solvant/temps, (b): solvant/ration, (c): puissance /temps .....	154
<b>Figure 28:</b> Surface de réponse pour les différentes interactions sur la teneur des caroténoïdes (cas de l'EAU d' <i>E. sepositus</i> ). (a): solvant/temps, (b) : solvant/ration, (c) : puissance /temps .....	158
<b>Figure 29:</b> Teneurs en saponines d' <i>E. sepositus</i> et d' <i>O. ophidianus</i> obtenues par MAE, UAE et EC .....	162
<b>Figure 30:</b> Teneurs en caroténoïdes d' <i>E. sepositus</i> et d' <i>O. ophidianus</i> obtenues par MAE, UAE et EC .....	162
<b>Figure 31:</b> Images au microscope électronique à balayage de lyophilisat d' <i>Echinaster sepositus</i> avant (A) et après extraction par extraction conventionnelle (B), extraction assistée par ultrasons (C) et extraction assistée par microonde (D).....	163
<b>Figure 32:</b> Teneurs des saponines et des caroténoïdes exprimées en % et obtenues à partir d' <i>E. sepositus</i> par EAM .....	164
<b>Figure 33:</b> teneurs des saponines et des caroténoïdes exprimés en % et obtenues à partir d' <i>O. ophidianus</i> par EAM .....	164
<b>Figure 34:</b> Variabilité inter-organe de la teneur des saponines d' <i>E. sepositus</i> en fonction de sexe et de saison .....	166
<b>Figure 35:</b> Détermination de IC50% pour les saponines d' <i>E. sepositus</i> avec le test DPPH* .....	171
<b>Figure 36:</b> Détermination de la capacité anti-oxydante (AI <sub>30</sub> ) à partir de la courbe 1-(I <sub>pas</sub> /I <sub>pa0</sub> ) en fonction de la concentration des saponines d' <i>E. sepositus</i> , en utilisant le modèle de régression linéaire .....	173
<b>Figure 37:</b> Détermination de la capacité anti-oxydante (AI <sub>30</sub> et AI <sub>50</sub> ) à partir de la courbe 1-(I <sub>pas</sub> /I <sub>pa0</sub> ) en fonction de la concentration des saponines d' <i>E. sepositus</i> , en utilisant le modèle de régression polynomial .....	173
<b>Figure 38:</b> Détermination de EC50% pour les saponines d' <i>E. sepositus</i> .....	175

## Liste des figures

Titres	Pages
<b>Figure 39:</b> l'effet de différents traitements (à différents temps d'incubation: 15, 30, 60 et 120 min) sur l'hémolyse oxydative des érythrocytes. [sap* d'Ech, saponine d' <i>E. sepositus</i> (1 mg.L <sup>-1</sup> ); sap* d'Oph, saponine d' <i>O. ophidainus</i> (1mg L <sup>-1</sup> ); VitE, Vitamin E (60uM); VitE*, (0,25uM)] .....	176
<b>Figure 40:</b> Spectre de masse HR-ESI-MS en mode positif des saponines de tégument orale des femelles. Les signaux marqués en noir correspondent aux saponines déjà identifiées chez <i>E. sepositus</i> . Les signaux marqués en gris pourraient correspondre à des nouvelles saponines pour cette espèce .....	181
<b>Figure 41:</b> Spectre de masse HR-ESI-MS en mode négative des saponines de tégument orale des femelles. Les signaux marqué en noir correspondre aux saponines déjà identifiées chez <i>E. sepositus</i> . Les signaux marqués en gris pourraient correspondre à des nouvelles saponines pour cette espèce .....	182
<b>Figure 42:</b> Comparaison de la distribution et de l'intensité relative des ions saponines obtenus des cinq organes d' <i>E. sepositus</i> . EST: estomac, CAE: caeca pylorique, GON: gonades, TEG ORL: tégument oral, TEG ABR: tégument aboral, ♀: femelle, ♂: mâle .....	185
<b>Figure. 43:</b> Spectre CID des ions parent <i>m/z</i> 921 (A) et <i>m/z</i> 891 (B), et comparaison de leurs schémas de fragmentations en HR-ESI-MS/MS .....	189
<b>Figure 44:</b> Schémas de fragmentation de l'ion <i>m/z</i> 921 pouvant correspondre à la sepositoside A .....	190
<b>Figure 45:</b> Schémas de fragmentation de l'ion <i>m/z</i> 891 pouvant correspondre à la luzonicoside .....	192
<b>Figure 46:</b> Spectre CID des ions parents <i>m/z</i> 907 .....	193
<b>Figure 47:</b> Schémas de fragmentation de l'ion <i>m/z</i> 907 pouvant correspondre à la sepositoside B (A), et la luzonicoside F (B) .....	195
<b>Figure 48:</b> Les structures moléculaires prédites pour les ions saponines détectées chez <i>E. sepositus</i> .....	198
<b>Figure 49:</b> Spectre HSQC d'extrait du tégument oral .....	202
<b>Figure 50:</b> Génine (majeure) d'extrait de tégument oral .....	203
<b>Figure 51:</b> Spectre HSQC de la zone des anomères de composé majeur de l'extrait de tégument oral .....	204
<b>Figure 52:</b> Structure établie à partir de l'extrait de tégument oral .....	205
<b>Figure 53:</b> Spectre HSQC de l'extrait d'estomac, (A): spectre complet, B : Zone des anomères .....	208
<b>Figure 54:</b> Structure établie à partir de l'extrait de l'estomac .....	209

## Liste des abréviations

---

<b>3-Moe-Glc</b>	Methylglucose
<b>3-Moe-Xyl</b>	Methyl xylose
<b>A-Glc</b>	Acide glucuronique
<b>ANOVA</b>	Analyse de la variance
<b>Au</b>	Automne
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BBD</b>	Box et Behnken design
<b>CAE</b>	Caeca pyloriques
<b>CID</b>	Collision-induced dissociation
<b>COSY</b>	Correlated SpectroscopY
<b>DMF</b>	N,N-Dimethylformamide
<b>DL</b>	Degré de liberté
<b>DPPH•</b>	Diphényl picryl-hydrazine
<b>DXHU</b>	Deoxy-xylo-hex-ulose
<b>Ech</b>	<i>Echinaster sepioitius</i>
<b>EC</b>	Extraction conventionnelle
<b>EAM</b>	Extraction assistée par micro-ondes
<b>EAS</b>	Extraction accélérée par solvant
<b>EAU</b>	Extraction assistée par ultrasons
<b>ERMS</b>	European Register of Marine Species
<b>ERO</b>	Espèce réactive d'oxygène
<b>ESI +/-</b>	Ionisation Electrospray en mode positif/négatif
<b>EST</b>	Estomac
<b>ESMO</b>	Extraction par solvant assistée par micro-ondes
<b>ét</b>	été
<b>GON</b>	Gonade
<b>HbO<sub>2</sub></b>	Oxyhémoglobine
<b>HDMO</b>	Hydro-distillation assistée par micro-onde
<b>hi</b>	Hiver
<b>HMBC</b>	Heteronuclear Multiple-Bound Correlation
<b>HR-ESI-MS</b>	Spectrométrie de masse de haute résolution par la technique d'ionisation ElectroSpray
<b>HR-ESI-MS/MS</b>	Spectrométrie de Masse en tandem de haute résolution, ionisation ElectroSpray
<b>HSQC</b>	Heteronuclear Single Quantum Correlation
<b>Gal</b>	Galactose
<b>Glc</b>	Glucose
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peroxyde d'hydrogène
<b>ISCR</b>	Institut des Sciences Chimiques de Rennes
<b>LC-SM</b>	Spectrométrie de masse couplée à la Chromatographie Liquide à Haute Pression
<b>MAP<sup>TM</sup></b>	Microwave assisted process
<b>MSR</b>	Méthodologie de surface de réponse
<b>NOESY</b>	Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
<b>Oph</b>	<i>Ophidiaster ophidianus</i>
<b>PBS</b>	Buffer (tampon) phosphate salin

## Liste des abréviations

---

<b>PLE</b>	Extraction liquide sous pression
<b>pr</b>	Printemps
<b>Rha</b>	Rhamnose
<b>RGS</b>	Rapport gonado-somatique
<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>RMN-C</b>	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone
<b>RMN-1D</b>	Résonance Magnétique Nucléaire à une dimension
<b>RMN-2D</b>	Résonance Magnétique Nucléaire à deux dimensions
<b>RMN-H</b>	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
<b>ROESY</b>	Rotating frame Overhause Effect Spectroscopy
<b>Sap</b>	Saponine
<b>Sap Ech</b>	Saponine d' <i>Echinaste sepsositus</i>
<b>Sap Oph</b>	Saponine d' <i>Ophidiaster ophidianus</i>
<b>Sap*</b>	Saponines aux concentration non hémolytique
<b>SFE</b>	Extraction par fluide supercritique
<b>SM</b>	Spectrométrie de Masse
<b>SM/SM</b>	Spectrométrie de Masse en tandem
<b>Som Car adj</b>	Sommes des carrés ajustées
<b>tt</b>	Tout les saisons
<b>TEG ABO</b>	Tégument aboral
<b>TEG ORL</b>	Tégument oral
<b>TOCSY</b>	Total Correlation Spectroscopy
<b>VitE</b>	Vitamine E à 60µM
<b>VitE*</b>	Vitamine E au concentration non protectrice
<b>VMHD</b>	Hydro-distillation assistée par micro-onde sous pression réduite
<b>WORMS</b>	World Register of marine species
<b>Xyl</b>	Xylose

## Liste des symboles

Symbole	Définition
<b>A</b>	Absorbance
<b>AI<sub>30</sub>%</b>	Concentration en extrait capable de réduire de 30% le courant de pic an
<b>AI<sub>50</sub>%</b>	Concentration en extrait capable de réduire de 50% le courant de pic an
<b>B</b>	Champ magnétique
<b>B<sub>0</sub></b>	Coefficient constant
<b>B<sub>i</sub></b>	Coefficient des limites linéaires
<b>B<sub>ii</sub></b>	Coefficient des limites quadratiques
<b>B<sub>ij</sub></b>	Coefficient des limites interactives
<b>C<sub>p</sub></b>	Nombre des points centraux
<b>C</b>	Concentration
<b>E</b>	Champ électrique
<b>E</b>	Erreur expérimentale
<b>E<sup>1%</sup><sub>cm</sub></b>	Absorbance d'une solution de 1 g.100 mL <sup>-1</sup>
<b>EC50 %</b>	Concentration de saponines requise pour lyser 50 % des érythrocytes
<b>f</b>	Fréquence
<b>IC50 %</b>	Concentration des extraits qui inhibe 50% du DPPH*
<b>I<sub>pa</sub></b>	Intensité du pic du courant anodique
<b>I<sub>pa0</sub></b>	Intensité du pic du courant anodique de réoxydation de O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
<b>I<sub>pas</sub></b>	Intensité du pic du courant anodique de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> pour une concentration don d'extrait testé
<b>I<sub>pC</sub></b>	Intensité du pic du courant cathodique
<b>% IP</b>	Pourcentage d'inhibition
<b>J<sub>c</sub></b>	Courant de conduction
<b>K</b>	Nombre de facteur
<b>l</b>	Largeur
<b>m</b>	moyenne
<b>M<sub>.ex</sub></b>	Masse d'extrait de saponine
<b>M<sub>mat-prem</sub></b>	Masse de la matrice première (lyophilisat)
<b>n</b>	Nombre de répétition
<b>N</b>	Nombre de facteur
<b>N</b>	Effectif
<b>P</b>	Pression acoustique
<b>P<sub>cps</sub></b>	Poids du corps
<b>M</b>	Masse moléculaire
<b>M<sub>.ex</sub></b>	Masse d'extrait de saponine
<b>P<sub>cal</sub></b>	Probabilité calculé
<b>PH</b>	Pression hydrostatique
<b>PM</b>	Pression maximale
<b>Q<sub>TS</sub></b>	Quantité de saponines totales
<b>r</b>	Rayon du disque central
<b>R</b>	Longueur des bras
<b>R/r</b>	Rapport entre la longueur des bras et le rayon du disque central
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficient de régression
<b>R<sup>2</sup> adj</b>	Coefficient de régression ajusté
<b>S</b>	Structure moléculaire
<b>Rend<sub>T</sub></b>	Quantité d'extraits bruts en mg.g <sup>-1</sup> de matrice sèche
<b>t</b>	Temps

## Liste des symboles

---

<b>Symbole</b>	<b>Définition</b>
<b><math>\tan\delta</math></b>	Facteur de dissipation
<b><math>V_e</math></b>	Valeur expérimentales
<b><math>V_e</math></b>	Valeurs extrêmes
<b><math>V_p</math></b>	Valeur prédites
<b><math>X_i, X_0</math></b>	Valeur au point central
<b><math>X_i, X_j</math></b>	Variables indépendantes
<b><math>Y</math></b>	Réponse étudiée
<b><math>\Delta X</math></b>	Valeur de pas de changement
<b><math>\varepsilon</math></b>	Coefficient d'extinction molaire
<b><math>\varepsilon'</math></b>	Constante diélectrique
<b><math>\varepsilon''</math></b>	Moment dipolaire

## Liste des formules

Formules	pages
(1) Estimation de facteur de dissipation .....	69
(2) Estimation de pression acoustique .....	75
(3) Calcul de l'indice gonado-somatique .....	86
(4) Détermination de nombre des expériences dans les plans de surface de réponse .....	93
(5) Équation de modélisation des réponses de plans de surface .....	95
(6) Équation de détermination des valeurs des variables indépendantes ..	96
(7) Calcul de rendement d'extraction des saponines .....	99
(8) Loi de Beer-Lambert .....	101
(9) Calcul de rendement d'extraction des caroténoïdes .....	101
(10) Calcul de rendement en extrait brut .....	102
(11) Calcul de pourcentage d'inhibition de DPPH• .....	105
(12) Calcul de pourcentage d'hémolyse .....	109
(13) Modèle mathématique d'EAM des saponines d' <i>Echinaster</i> <i>sepositus</i> .....	132
(14) Modèle mathématique d'EAM des saponines d' <i>Ophidiaster</i> <i>ophidianus</i> .....	132
(15) Modèle mathématique d'EAM des caroténoïdes d' <i>Echinaster</i> <i>sepositus</i> .....	141
(16) Modèle mathématique d'EAM des caroténoïdes d' <i>Ophidiaster</i> <i>ophidianus</i> .....	141
(17) Modèle mathématique d'EAU des saponines d' <i>Echinaster</i> <i>sepositus</i> .....	150
(18) Modèle mathématique d'EAU des saponines d' <i>Echinaster</i> <i>sepositus</i> .....	150
(19) Modèle mathématique d'EAU des caroténoïdes d' <i>Echinaster</i> <i>sepositus</i> .....	156
(20) Modèle mathématique d'EAU des caroténoïdes d' <i>Ophidiaster</i> <i>ophidianus</i> .....	156

# *Introduction*

### Contexte d'étude

Au cours de ces dernières années, il a été observé un intérêt croissant pour la pharmacologie marine, car les substances naturelles d'origine marine possèdent des activités très spécifiques et présentent de ce fait un grand intérêt dans différents domaines relevant de la chimie pour le vivant (santé humaine et animale, cosmétique, pharmaceutique, agroalimentaire, peinture antifouling...). Dans le milieu marin les Echinodermes Asteroidea (étoiles de mer) représentent une source de métabolites secondaires structurellement uniques et aux vertus pharmaceutiques inégalées. Parmi ces métabolites les saponines et les caroténoïdes suscitent depuis des années un intérêt croissant de la part des scientifiques. Un des facteurs expliquant le grand intérêt porté aux saponines et aux caroténoïdes des astéries est le fait que ces molécules allient à la fois des activités intéressantes et des structures chimiques complexes. Ce sont des molécules avantageuses pour les applications médicales, pharmaceutiques, agroalimentaires et cosmétiques (**Hostettmann et Martson, 1995** et **Galasso et al., 2017**).

Notre travail s'inscrit dans cette optique, et il porte sur une recherche en pharmacologie marine basée sur l'exploitation et la valorisation de la diversité des substances actives des étoiles de mer de la côte algérienne.

L'originalité de cette thèse porte sur l'étude de ces métabolites secondaires en développant des méthodes innovantes, des processus verts et des protocoles optimisés dans l'extraction des produits bioactives.

### Approche retenues et étapes de thèse

Au début de la thèse notre recherche s'est orientée sur les saponines de l'étoile de mer *Echinaster sepositus*, l'étoile de mer commune de la Méditerranée et l'une des espèces les plus fréquemment rencontrée sur les côtes Algériennes.

L'intérêt accordé aux saponines de cette espèce est justifié par leurs structures inhabituelles et rares dans la nature. Ce sont des saponines macrocycliques utilisées comme marqueurs chimiotaxonomiques du genre *Echinaster*. Elles sont isolées pour la première fois par des chercheurs italiens à partir de l'étoile de mer *Echinaster sepositus* de Naples de la côte italienne (**Desimne et al., 1981** et **Riccio et al., 1981**), puis à partir d'espèce tropicale de l'indo-Pacifique *Echinaster luzonicus* par **Riccio et al. (1981)**, et récemment d'étoile de mer tropicale *Leiaster.sp* (**Malyarenko et al., 2016**). Or, les saponines des autres étoiles de mer

appartiennent à deux classes majeures, les glycosides de polyhydroxysteroides, et les asterosaponines (**Hostettmann et Martson, 1995**).

Les recherches les plus récentes sur les saponines des étoiles de mer sont principalement centrées sur l'identification de ces molécules par des méthodes d'analyse de séparation et / ou de caractérisation pointues notamment la Spectrométrie de Masse (SM), la Spectrométrie de masse couplée à la Chromatographie Liquide à Haute Pression LC-SM, la Spectrométrie de Masse en tandem (SM/SM) et la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) (**De marino et al., 1998 ; Kicha et al., 2001; Sandvoss et al., 2000, 2001, 2003; Tang et al., 2005; Kicha et al., 2010; Ivanchina et al., 2011; Demyer et al., 2014 et Aicha et al., 2015**), Néanmoins aucun travail n'a porté sur les méthodes d'extraction, pourtant l'extraction est l'étape clef de l'analyse et de l'exploitation des biomolécules.

Les saponines des astéries ont toujours été isolées par des méthodes conventionnelles basées sur une macération dans un solvant organique le plus souvent le méthanol ou l'éthanol (**Tang et al., 2005; Tang et al., 2006; Kicha et al., 2010 et Ivanchina et al., 2011**). Ces méthodes sont généralement moins efficaces, prennent beaucoup de temps et consomment énormément de solvants et de matière première. De ce fait, le recours à des méthodes d'extraction quantitatives rapides et non destructives est préconisé, à savoir l'extraction par fluide supercritique (SFE), l'extraction liquide sous pression (PLE), l'extraction assistée par micro-ondes (EAM) et l'extraction assistée par ultrasons (UAE).

L'EAM et l'EAU sont considérés en tant qu'alternatives à l'extraction solide-liquide traditionnelle des métabolites secondaires, et par comparaison avec d'autres techniques innovantes telles que l'extraction par fluide supercritique, elles sont attrayantes par la simplicité des équipements utilisés, la faible consommation en énergie et l'efficacité d'extraction de divers analytes à partir de différentes matrices (**Foubert et al., 2010 et Avula et al., 2011**). L'application de ces méthodes pour l'étude des substances actives d'origines marines semble primordiale en raison de leur caractère quantitatif qui permettra d'obtenir des qualités accrues des substances d'intérêt tout en utilisant de faibles quantités de matières premières. Une telle approche d'investigation utilise un échantillonnage modéré et permet la préservation des espèces exploitées.

C'est donc dans cette optique que notre recherche s'est tournée vers l'application des méthodes non conventionnelles (EAM et EAU) pour l'extraction des saponines de l'étoile de mer *E. sepositus*. L'objectif visé, consiste à optimiser et modéliser l'EAM et l'EAU.

Pour réaliser cette modélisation, nous avons opté pour les méthodes des plans d'expériences. Le but des plans d'expériences est d'obtenir un maximum d'informations en ne réalisant qu'un minimum d'essais, ce qui répond parfaitement à notre objectif qu'impose l'utilisation de faible quantité de matières premières. Ces plans permettent d'établir des modèles quadratiques faisant intervenir des paramètres différents (dans notre étude ces paramètres sont: la concentration de solvant, le temps, la puissance et le ratio liquide-solide) qui influencent la performance de l'EAM et d'EAU des saponines à partir d'*E. sepositus*.

Les seuls travaux mis en revue sur les saponines d'*E. sepositus* remontent à 40 ans (**Desimne et al., 1981** et **Riccio et al., 1981**), et sont principalement centrés sur les saponines de l'animal entier, aucun de ces travaux ne s'intéresse au contenu en saponines de chaque organe. Or ce serait une approche intéressante du point de vue biologique de distinguer les organes analysés. Cela permettrait une meilleure compréhension de l'activité métabolique de ces molécules. C'est pourquoi le travail proposé dans cette recherche consiste en l'extraction des saponines émises par les différents compartiments anatomiques d'*Echinaster sepositus* (le tégument aboral et oral, les gonades, les caeca pyloriques et l'estomac) des deux sexes (mâle et femelle) collectés à différentes saisons (hiver, printemps, été et automne). L'objectif étant de déterminer la variabilité inter-organe, sexuelle et saisonnière de la distribution des saponines tant d'un point de vue qualitatif que quantitatives.

L'investigation des saponines met en œuvre des méthodes de caractérisation et d'élucidation structurale très variées (la Spectrométrie de masse SM, la Spectrométrie de masse SM/SM et la Résonance Magnétique Nucléaire RMN). Dans notre travail, un premier recensement des saponines dans les différents extraits a été effectué par des analyses de spectrométrie de masse de haute résolution par la technique d'ionisation ElectroSpray (HR-ESI-SM). Cette méthode d'ionisation a été sélectionnée car c'est une technique d'ionisation douce, continue et fonctionnant à pression atmosphérique, et permet notamment l'analyse de molécules de haute masse moléculaire (**Cole, 1997** et **De Hoffmann et Stroobant , 2005**).

Sur la base des spectres de masse enregistrés, il semble que chaque organe comprenne un mélange spécifique de saponines de compositions et de structures variées. Afin de différencier les différentes structures des ions saponines, des analyses par HR-ESI-SM/SM ont été effectuées. Cette approche a permis d'identifier certaines molécules déjà décrites dans la littérature et de mettre en évidence des fragments caractéristiques qui sont utilisés pour proposer une ébauche structurale pour les saponines inconnues.

Des expériences RMN mono et bi dimensionnelle ont finalement été utilisées pour valider les structures de composés majeurs.

L'isolement des saponines à partir d'un extrait brut passe par plusieurs étapes de purification (purification par séparation densitométrique ou par extraction liquide-liquide, purification sur colonne...etc). Les déchets de purification (ou les sous-produits d'extraction) sont initialement riches en d'autres composés de polarité différente que celle des saponines. Il est pertinent d'essayer de tirer profit de ces déchets.

Les sous-produits de purification densitométriques concentrent de nombreux caroténoïdes. Il nous a donc paru pertinent d'essayer de valoriser ces sous-produits par l'isolement des caroténoïdes qu'ils contiennent. C'est dans cette optique qu'un autre axe de recherche articulé sur l'extraction des caroténoïdes est né.

L'extraction des caroténoïdes a donc été principalement réalisée sur les sous-produits de purification des saponines, de ce fait les plans d'expériences utilisés pour l'optimisation d'EAM et d'EAU des saponines sont utilisés pour l'optimisation d'extraction des caroténoïdes.

Lors d'échantillonnages par plongée de nombreuses espèces *d'O. ophidianus* ont été prélevées car cette espèce colorée en rouge et orange est fortement confondue avec *E. sepositus*. De cela, un autre axe de recherche s'est orienté vers l'extraction des saponines et des caroténoïdes de cette espèce. En effet, les expériences sur *O. ophidianus* sont menées pour vérifier si les méthodes d'EAM et d'EAU sont reproductibles.

Les métabolites secondaires sont recherchés parce qu'ils sont reconnus pour leurs activités biologiques nombreuses qui promeuvent des effets positifs de santé. Dans ce contexte nous avons tenté d'évaluer l'activité antioxydante des saponines et des caroténoïdes des étoiles de mer car les substances naturelles douées d'activité antioxydante présentent un intérêt sans équivoque dans le domaine de la recherche bio pharmacologique. Parmi les méthodes d'évaluation de la capacité antioxydante de composés naturels, le test d'inhibition de diphényl picryl-hydrazine (DPPH\*) est le plus utilisé, car il est reproductible, simple et moins coûteux que certaines autres méthodes. Il est donc utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des saponines et des caroténoïdes isolés à partir d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus*. Outre, ce test, l'activité antioxydante est évaluée aussi par: (i) l'exploitation d'une méthode innovante électrochimique qui utilise le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) électrogénéré, cette méthode a été mise au point récemment à l'ISCR (Institut des Sciences Chimiques de Rennes, France) dans

l'équipe du Dr Hauchard Didier (**Bourvelec *et al.* 2008**); et (ii) l'évaluation de la capacité de réduction de l'hémolyse oxydative induite par des initiateurs de radicaux libres ( $\text{Cu}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ ).

En résumé, l'ensemble de cette thèse est basé en amont sur l'optimisation d'EAM et d'EAU des saponines d'*E.sepositus*, sur l'identification et la caractérisation par des méthodes spectrométriques des saponines de cette espèce et sur la détermination de l'hétérogénéité inter-organe, sexuelle et saisonnière de leur distribution. L'évolution du travail nous a permis de manière progressive d'isoler les caroténoïdes à partir des sous-produits de purification des saponines, et d'extraire les deux substances (saponines et les caroténoïdes) pour une autre espèce *O. ophidianus*.

### Objectif de thèse

Les buts principaux de cette recherche consistent à:

- Optimiser les conditions d'extraction des saponines et des caroténoïdes par ultrasons et micro-onde. Et développer des modèles mathématiques qui expliquent l'interaction des paramètres expérimentaux optimisés sur l'extraction de ces substances;
- Évaluer l'activité antioxydante des saponines et des caroténoïdes d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus*;
- Identifier et caractériser le contenu en saponines de l'étoile de mer *O. sepositus* et déterminer l'hétérogénéité inter-organe, sexuelle et saisonnière de leur distribution tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif.

Outre cette introduction et la conclusion générale, le manuscrit est organisé en 3 parties:

- La première partie, décrit d'une manière succincte la littérature concernant, la classe des asteroidea, les saponines et les caroténoïdes, et les méthodes d'extraction conventionnelles et innovantes;
- La deuxième partie, décrit les protocoles expérimentaux relatifs: (i) à l'optimisation de l'AEM et l'EAU des saponines et des caroténoïdes à partir d'*E. sepositus* et d'*O.ophidianus*; (ii) aux tests d'activité antioxydante; (iii) aux méthodes de caractérisation structurelle des saponines;
- La troisième partie, section principale de la thèse, contient les résultats obtenus concernant l'optimisation des méthodes d'extraction des saponines et des caroténoïdes, l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro*, et l'identification des saponines d'*E. sepositus*.

# *Partie I*

## *Synthèse Bibliographique*

## I. Les échinodermes, Asteroidea

### I.1. Généralité sur la classe des asteroidea

Les Asteroidea ou "étoiles de mer" sont des invertébrés multicellulaires qui forment un groupe très ancien de la biomasse marine dont les premières traces fossiles remontent à la période d'ordovicien (Clark et Downey, 1992). Il constitue avec quatre autres classes: les Crinoïdes, les Ophiures, les Holothurides et les Echinides l'embranchement des Echinodermes.

Cette classe est la plus diversifiée des échinodermes vivants et elle regroupe plus de 1800 espèces (Mah, 2020) réparties dans 7 ordres, 36 familles et environ 370 genres (Mah 2012 et Black, 2012) (Tab. 1 en annexe). Les lignées modernes d'astéroïdes comprennent les Ordres suivants: Brisingida, Forcipulatida (super-ordre des Forcipulatacea); Notomyotida, Paxillosida, Valvatida (super-ordre des Valvatacea); Spinulosida (super-ordre des spinulosacea), et Velatida (WoRMS, 2020).

Les "étoiles de mer" sont présentes dans toutes les mers, et tous les bassins océaniques du monde, y compris l'Atlantique, l'Inde et le Pacifique ainsi que l'Arctique et l'océan Austral, habitant des milieux intertidaux jusqu'à 6000 m abyssaux. ils sont, par ailleurs plus diversifiés dans les régions tropicales de l'Atlantique et de l'Indo-Pacifique (Black, 1990 et Clark et Downey, 1992).

Sur les 36 familles d'asteroidea 23 sont présentes principalement ou exclusivement dans les zones d'eau froide (0 à 5 °C : les eaux profondes ou les eaux de haute latitude), 6 familles dans les régions tempérées (5 à 15 °C) et 7 familles dans les régions tropicales (supérieure à 15 °C) (Tab. 1 en annexe).

Plusieurs caractères définissent la classe des Asteroidea à savoir les caractères morphologiques et biochimiques:

- **Caractères morphologiques selon Clark et Downey (1992):**

Les "étoiles de mer" ont un corps aplati, souple et couvert d'un épiderme pigmenté. **Elles sont de taille et de forme très variable (pentagonales: Sphaeriodiscus, globuleuses: Podospaeraste, étoilées: Zoroastre) (Fig. 1).**

Elles portent des bras (radius) larges qui ne sont pas nettement séparés du disque central définissant ainsi la zone inter-radius. Le nombre de bras est en général d'ordre 5 ou des multiples de cinq à l'exception des espèces irrégulières.

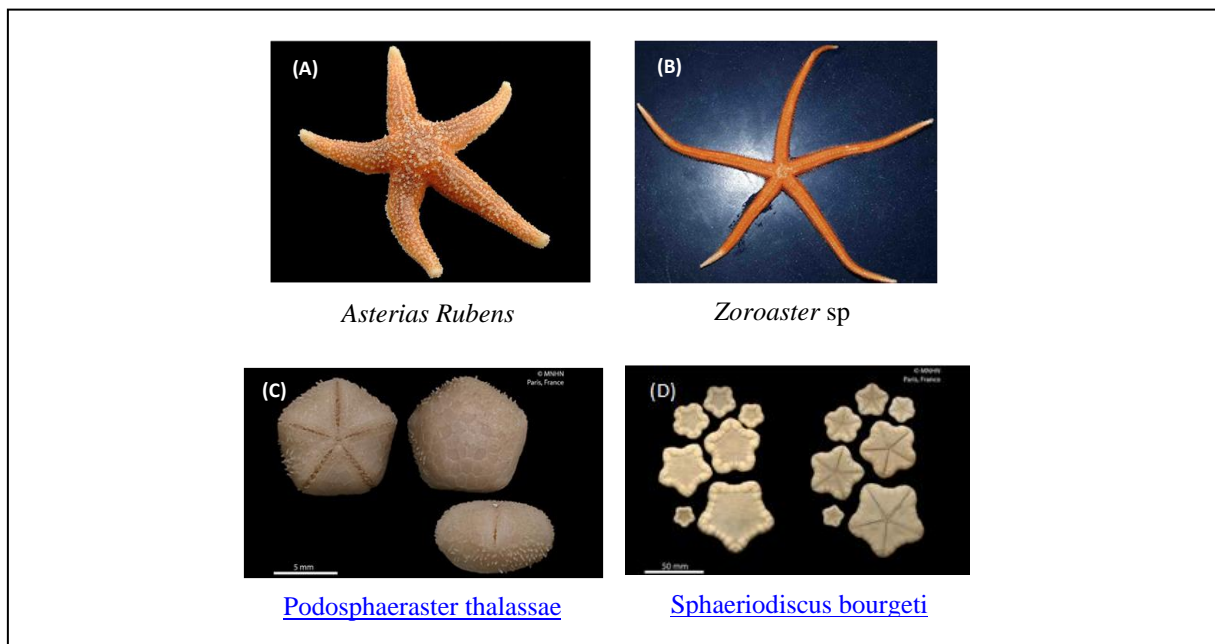
Ils sont pourvus chacun d'un sillon sur la face ventrale avec des ambulacres, des pédicellaires et des ocelles en bout. Les bras se rejoignent à leur base pour limiter un disque central.

La bouche est généralement située sur la face orale et l'anus sur la face dorsale (parfois absent) du disque central.

Sur la face dorsale et au niveau d'un inter radius on remarque la présence d'une plaque calcaire blanchâtre nommée la plaque madréporique.

La face orale est composée des centaines de pieds ambulacraires (podia) disposés en rangées et entourés par des bandes plus extérieures de piquants mobiles.

L'ampoule ambulacraire est une vésicule musculeuse, située à la base des podia. Il se poursuit par un tube vertical, et se termine par une ventouse.



**Figure1:** Divers formes des astéries. (A): ordinaire, (B): étoilées, (C):globuleuse, (D): pentagonale. Source des photos : (A): [https://fr.wikipedia.org/wiki/Asterias\\_rubens#/media/Fichier:Asterias\\_rubens.jpg](https://fr.wikipedia.org/wiki/Asterias_rubens#/media/Fichier:Asterias_rubens.jpg) .consulté le 10-20-2020;(B): <http://echinoblog.blogspot.com/2008/05/fossil-starfish-story-deep-sea.html>.consulté le 20-10-2020. (C): [https://fr.wikipedia.org/wiki/Podosphaeraster#/media/Fichier:Podosphaeraster\\_gustavei.jpg](https://fr.wikipedia.org/wiki/Podosphaeraster#/media/Fichier:Podosphaeraster_gustavei.jpg). Consulté le 20-10-2020. (D) : [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sphaeriodiscus\\_bourgeti.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sphaeriodiscus_bourgeti.jpg). Consulté le 20-10-2020.

- **Caractères biochimiques:**

Les astéries ont de riches colorations: rouge vif; rouge; orange et les tons jaunes etc. La coloration des étoiles de mer est due à des pigments épidermiques, de la famille des caroténoïdes. **Les principaux mécanismes de défense des astérides sont basés sur la sécrétion d'un grand nombre de substances toxiques qui leur permettent de se protéger,**

comme les saponines qui lui donnent une odeur répulsive et un gout désagréable (Mackie *et al.*, 1977).

### I.1.1. Famille des Echinasteridae

La famille des Echinasteridae est la seule famille de l'ordre des Spinulosida. Les individus de cet ordre sont caractérisés par de **petits piquants (des protubérances)** disposés irrégulièrement, des tubes ambulacraires brisés qui se terminent chacun par une ventouse, **des plaques marginales peu développées**, un squelette très délicat à décrire, et **l'absence totale des pédicellaires** (Mah et Blake, 2012).

La famille des Echinasteridae est répartie en 8 genres et 135 espèces, et elle présente une large répartition géographique en l'occurrence dans les régions tempérées, froide et tropicale (Mah et Blake, 2012).

Ce sont des étoiles de mer régulières. Le disque central est très réduit et les bras sont allongés. Le squelette dorsal est corné d'ossicules très petits portant des piquants non regroupés en paxilles. Les pédicellaires sont absents chez les espèces de cette famille. Ces dernières peuvent être confondues avec les espèces de la famille des Ophidiasteridae.

#### I.1.1.1. *Echinaster sepositus*

Le genre Echinaster compte environ 27 espèces réparties dans l'océan Atlantique, Indien, Pacifique et la mer Méditerranée.

*Echinaster sepositus* fait partie de genre *Echinaster* (sous genre Echinaster (Echinaster)) selon le WoRMS, 2020 (**World Register of Marine Species**):

Embranchement	Echinodermata
Sous-embranchement	Asterozoa
Classe	Asteroidea
Super-ordre	Spinulosacea
Ordre	Spinulosida
Famille	Echinasteridae
Genre	<i>Echinaster</i>
Sous genre	<i>Echinaster (Echinaster)</i>
Espèces	<i>Echinaster sepositus</i> (Retzius, 1783)

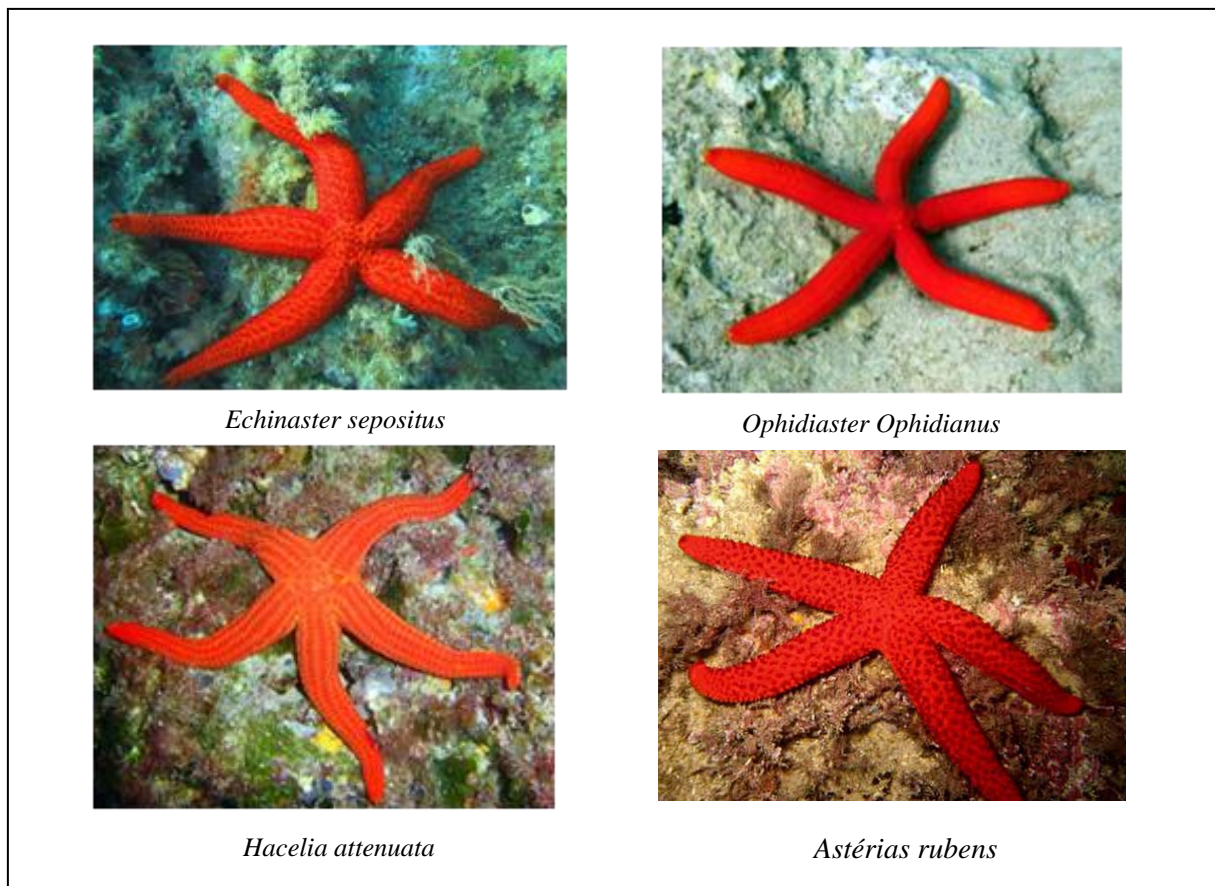
Elle est distribuée le long de la Méditerranée occidentale et l'Atlantique Est. Elle occupe des divers biotopes entre 0 et 40 m de profondeur, elle vit sur les roches, dans les bancs de moules, et dans l'herbier de posidonie (**Grimas *et al.*, 2004 et Augier, 2010**).

Sur les côtes algériennes *E. sepositus* est inventoriée par plusieurs auteurs (**Koehler, 1969; Grimas *et al.*, 2004; Grimas, 2010 et Boumediene et Bouras, 2014**). Elle fait partie de la biocénose de l'horizon moyen (5-13 m) (**Boumediene Bouras, 2014**), et elle est rencontrée sur des fonds hétérogènes des étages médiolittoraux et infralittoraux, notamment dans l'herbier à posidonie.

Les critères d'identification de cette espèce sont les suivants:

- la couleur de corps: *Echinaster sepositus* est caractérisée par une couleur rouge vif (ou rouge de sang);
- le nombre et la forme des bras: le nombre de bras est cinq, parfois plus, mais rarement moins; les bras mincissent progressivement jusqu'à l'extrémité qui devient obtuse;
- la taille de disque central: le disque central est petit;
- la disposition et la forme des protubérances sur la face aborale: les protubérances chez *E. sepositus* sont petites ne dépassent pas 1.5 mm et disposées irrégulièrement. Elles sont très rapprochées et ne sont pas réunies par groupes, mais elles suivent les contours du réseau squelettique.
- Les plaques dermiques: chez *E. sepositus* les plaques dorsales (carénales et marginales) sont difficiles à distinguer.
- La plaque ambulacraire: chez *E. sepositus* la plaque ambulacraire est formée de trois piquants.
- La face orale est caractérisée par une gouttière ciliée.

*Echinaster sepositus* ressemble aux deux autres "étoiles de mer" rouges visibles en Méditerranée: *Ophidiaster ophidianus* et *Hacelia attenuata* (appartiennent à l'ordre des Valvatida). **La figure 2** montre ces espèces.



**Figure 2: Les étoiles de mer rouge.**

Source des photos: [https://fr.wikipedia.org/wiki/Echinaster\\_sepositus#/media/Fichier:Echinaster\\_sepositus\\_Banyuls\\_03.jpg](https://fr.wikipedia.org/wiki/Echinaster_sepositus#/media/Fichier:Echinaster_sepositus_Banyuls_03.jpg). Consulté le 22-10-2020 , [https://fr.reeflex.net/tiere/5271\\_Ophidiaster\\_ophidianus.htm](https://fr.reeflex.net/tiere/5271_Ophidiaster_ophidianus.htm). Consulté le 22-10-2020 ; [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Havelia\\_attenuata\\_Murcia\\_2.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Havelia_attenuata_Murcia_2.jpg). Consulté le 22-10-2020.

**Alimentation et prédation:** *E. sepositus* ressemble aussi à une autre astérie possédant des colorations et des formes de bras assez variables à savoir *Asterias rubens* (**Fig. 2**) (qui appartient à l'ordre des Forcipulatidés) très répandue au Nord-Est de l'océan Atlantique (Koehler, 1969). Le **tableau 1** reporte l'ensemble des hétérogénéités morphologiques qui facilitent l'identification de ces espèces.

*E. sepositus* comme les autres espèces de genre *Echinaster* s'accoutument d'une variété de substrats, y compris les micro-algues, les biofilms, le sédiment et les invertébrés incrustants, tels que les éponges et les tuniciers (**Mah et Blake, 2012**). *E. sepositus* est traditionnellement considéré comme une mangeoire d'éponges, et aucune information n'est disponible sur la prédation aux premiers stades de développement.

**Reproduction:** La reproduction d'*E. sepositus* est sexuée à fécondation externe, et la ponte se fait en été et peut s'étendre jusqu'au début d'automne (en août et septembre).

*E. sepositus* est une espèce gonochorique avec un cycle de reproduction annuelle, elle contient 10 unités de reproduction (deux gonades dans chaque bras). Les gonades matures chez les femelles sont rouges foncé et chez les mâles sont jaunes (**Riesgo et al., 2011**).

Les gonades femelles contiennent des ovocytes toute au long de l'année, de ce fait, l'ovogenèse est un processus continu chez *E. sepositus* (ne présente pas une période de repos), mais il est asynchrone (les gonades contiennent des ovocytes à différents degrés de maturation). Les gonades mâles contiennent des cellules spermatogonies de février-mars à septembre-octobre. Autrement dit la spermatogenèse est limitée à 5 à 6 mois de printemps à l'été (**Riesgo et al., 2011**).

**Tableau 1:** Caractéristiques des "étoiles de mer", *Echinaster sepositus*, *Ophidiaster ophidianus*, *Hacelia attenuata* et *Asterias rubens*.**R/r:** Rapport entre la longueur des bras (R) et le diamètre du disque central (r).

Caractéristiques		Espèces				Bibliographies
		<i>Echinaster sepositus</i>	<i>Ophidiaster ophidianus</i>	<i>Hacelia attenuata</i>	<i>Asterias rubens</i>	
<b>Radius</b>	Nombre	6 à 7	5 à 6	5 à 6	4 à 9	Koehler (1969).
	Longueur (R) cm	6 à 15	Plus de 5	Plus de 5	Variable	
	Forme	Aplatie	Cylindrique	Élargie	Large et courte Mince et allongé	
	Forme d'extrémité	Obtuse	Arrondie	Pointue	-	Boell (1955).
<b>Rapport R/r</b>		6 à 15	8 à 10	5 à 6	Variable	
<b>Face dorsale</b>						
<b>Piquants</b>	Nombre par plaque	-	8	-	-	Hyman (1955).
	Forme	Petite et courte	Arrondie et percée	Arrondie et percée	Cylindrique	
	Longueur	1.5 cm	-	-	-	
	Forme d'extrémité	Obtuse	-	-	Arrondie, spinuleuse Renflée, capitée	
	Disposition	Irrégulière	Régulière (en rangée longitudinale)	Régulière (en rangée longitudinale)	Irrégulière	
	Les aires porifères intercalaires	Absentes	Présentes	Présentes	Absentes	
	Les pédicellaires	Absents	Présents	Présents	Présents	

**Tableau 1 (suite):** Caractéristiques des "étoiles de mer", *Echinaster sepositus*, *Ophidiaster ophidianus*, *Hacelia attenuata* et *Asterias rubens*.**R/r:** Rapport entre la longueur des bras (R) et le diamètre du disque central (r).

Caractéristiques		Espèces				Bibliographies
		<i>Echinaster sepositus</i>	<i>Ophidiaster ophidianus</i>	<i>Hacelia attenuata</i>	<i>Asterias rubens</i>	
Plaques cardinales Dorsales	Nombre de Piquants	-	-	-	1 à 2	Koehler (1969).  Boell (1955).          Hyman (1955).
	Nombre	-	2 rangées carénales 1 rangée latéro-dorsale	2 rangées carénales et 1 rangée latéro-dorsale	1 rangée cardinale latérale 1 rangée cardinale médiane	
Plaque marginale dorsale	Forme des piquants	Grande	-	-	-	
	Nombres des piquants	-	2	2	1	
<b>Face orale</b>						
Piquants	Forme	Petite et courte	Arrondie et percée	Arrondie et percée	Cylindrique	
	Disposition	Irrégulière	2 rangées latéro-ventrales.	3 rangées latéro-ventrales	Irrégulière	
	Les aires porifères intercalaires	Absentes	Présentes 1 rangée	Présentes 2 rangées	Absentes	
	Les pédicellaires	Absents	Présents	Présents	Présents	
Plaques						
Plaques marginales ventrales	Forme des piquants	Grande	-	-	Petite	
Plaques Adambulacraire	Nombre des piquants	3	-	-	1 à 2	
	Disposition	Irrégulière	Régulière 2 rangées	Régulière 2 rangées	Irrégulière	

### I.1.2. Famille des Ophidiasteridae

La famille des Ophidiasteridae appartient à l'ordre de valvatita qui est une lignée diversifiée, et taxonomiquement la plus nombreux à tous les niveaux, avec 16 familles, 187 genres et 763 espèces (**Mah et black, 2012**). Cet ordre correspond à des "étoiles de mer" des milieux tropicaux peu profonds, tels que les récifs, les mangroves et fonds sableux (**Yamaguchi, 1975**). Cependant, certaines familles de cet ordre (tel que Les Oreasteridae et les Ophidiasteridae) sont présentes dans les eaux profondes (**Mah et Black, 2003**).

Les valvatida sont pourvues d'une série de plaques marginales bien définie qui marque la périphérie du corps, et d'un grand disque central. Sur la face orale les podia sont répartis en deux rangées, et sur la face aborale le tégument est parsemé de pédiculaires en forme de valves (des pinces bivalves à deux mors). Cela les distingue en particulier des Spinulosida, dépourvues de pédicellaires et des Forcipulatida, avec des pédicellaires à trois mors.

Beaucoup d'espèces d'ordre des valvatida comme oreasterids, archasterid posent des procurations au niveau de croissance et de la biologie à cause de capture de ces espèces pour le trafic (tourisme et l'aquarium). *Linckia laevigata*, une Ophidiasteridae bleu brillant est l'une des espèces les plus touchées par le commerce (**Green, 2003**).

La famille des Ophidiasteridae doit son nom à la forme de ces bras qui sont très allongés et donne l'aspect d'un serpent, en grec "ophis" signifie serpent et "aster" étoile. Elle s'agit des espèces avec un disque central réduit par rapport aux autres familles de Valvatida.

Cette famille rassemble 27 genres et environ 106 espèces. C'est parmi les 7 familles qui regroupent le plus grand nombre d'espèces d'asteroidea (**Mah, 2012**). Les Ophidiasteridae sont généralement réparties dans les régions tropicales et froides, avec une diversité importante dans les eaux peu profondes, des régions tropicales et subtropicales (l'Atlantique et le Pacifique peu profonde) (**Clarck et Rowe, 1971 et Clark et Downey, 1992**).

#### I.1.2.1. *Ophidiaster ophidianus*

*Ophidiaster ophidianus* connue sous les noms vernaculaires astérie serpent ou astérie pourpre, est une espèce d'étoile de mer de la famille des Ophidiasteridea, selon le WoRMS:

Embranchement	Echinodermata
Sous-embranchement	Asterozoa
Classe	Asteroidea
Super-ordre	Valvatacea
Ordre	Valvatida
Famille	Ophidiasteridea
Genre	<i>Ophidiaster</i>
Espèces	<i>Ophidiaster ophidianus</i> (Lamarck, 1816)

*Ophidiaster ophidianus* est une étoile violacée, parfois rose, orange, rouge avec des petites taches mauves ou jaunes. Le disque central est très petit, portant des bras cylindriques avec des extrémités arrondies. Chaque bras porte une petite constriction caractéristique et une seule rangée de pieds ambulacraires cernés de chaque côté par deux rangées de petites épines émoussées puis par deux rangées d'épines un peu plus longues en forme de massue. Ces bras sont souples et peuvent se tordent dans les trois dimensions, et sont caractérisés par une section circulaire et un diamètre constant. Le nombre de bras est constant, un nombre différent de 5 est rarement signalé. Et comme *E. sepositus* cette espèce ne possède pas de pédicellaire. Le tégument présente une fine granulation homogène et uniforme.

Les espèces d'*O. ophidianus* colorées en rouge et orange peuvent être confondues avec *E. sepositus* et *Hacelia attenuata*, mais en diffèrent surtout par la forme des bras. *Echinaster sepositus* présente des bras effilés avec une extrémité obtuse. Les bras d'*Hacelia attenuata* sont caractérisés par une section conique et une extrémité pointue. La constriction des bras est non marquée chez *E. sepositus* et *H. Attenuata* à l'encontre d'*O. Ophidianus*. **Le tableau 1** reporte l'ensemble des données qui facilite l'identification de ces espèces.

*O. ophidianus* est une espèce Atlanto-méditerranéenne d'affinité méridionale, s'étend de la Méditerranée à la côte atlantique africaine, on la trouve aussi dans la manche et la mer de nord. En Algérie elle est signalée par **Molinier and Picard, (1956); Pérès and Picard, (1964); Harmelin et Ruitton, (2010) et Boumediene et Bouras, (2014)**.

Elle affectionne les eaux tempérées, et elle est thermophile d'où la distribution en Méditerranée (**Harmelin et Ruitton 2010**). La distribution géographique de cette espèce a été détaillée par **Harmelin et Ruitton (2010)** d'un point de vue évolutif en fonction des

changements climatiques. Ces auteurs notent que la distribution d'*O. ophidianus* en méditerranée qui était restreinte aux secteurs les plus chauds du bassin (sud du bassin) est affectée par le réchauffement climatique. En effet, la présence de cette espèce sur les côtes continentales septentrionales (nord du bassin) plus froides qui était autrefois très occasionnelle, mais est maintenant de plus en plus fréquente.

Cette espèce occupe les fonds durs, rocheux ou caillouteux de la zone circalittorale et infralittoral entre -5 et -30 m de profondeur, exceptionnellement jusqu'à -100 m (Ziesmki et André, 2017). Elle se rencontre parmi les algues photophiles et le coralligène, dans les tombants bien exposés, sous les surplombs, à l'entrée des grottes et parfois dans l'herbier à *Posidonia oceanica*.

**Alimentation et prédation:** *O. ophidianus* est un prédateur de mollusques (gastéropodes, bivalves), elle peut également être détritivore ou charognarde (Ziesmki et André, 2017). Les prédateurs de l'espèce pourraient être ceux habituels aux étoiles de mer, à savoir des grands crustacés comme les langoustes et de gros gastéropodes comme le grand triton *Charonia lampas* (Morton, 2012).

**Reproduction:** comme les autres étoiles de mer la reproduction d'*O. ophidianus* est sexuée à fécondation externe. La maturation des gamètes et la ponte a lieu en septembre. Les larves sont sans doute du type *Bipinnaria* ou *Branchiolaria*. La durée de vie de ces larves dans le plancton n'est pas connue pour cette espèce; elle pourrait être de plusieurs semaines (Harmelin et Ruitton, 2010).

*O. ophidianus* est relativement peu fréquente en méditerranée, les deux espèces *H. attenuata* et surtout *E. sepositus* sont beaucoup plus communes.

## II. Substance active d'origine marine

La biodiversité marine (animale et végétale) se traduit par une diversité de substances naturelles originales. Ces substances sont rarement observées dans le milieu terrestre, elles ont des structures caractéristiques et possèdent un éventail d'activités biologiques et pharmacologiques (Maier, 2008). De ce fait, au cours de ces dernières années, il a été observé un intérêt croissant pour les molécules biologiques provenant d'organismes marins, particulièrement les métabolites secondaires.

Les métabolites secondaires d'origine marine traduisent une diversité (différentes molécules, terpène, alcaloïdes, ...) et une spécificité importante (synthétisé souvent au niveau du genre et quelquefois de l'espèce) (Kornprobst, 2005). Ces produits présentent principalement deux originalités, originalité au niveau de la composition chimique et une autre au niveau de la structure.

**L'originalité au niveau de composition chimique** est due à la composition chimique particulière de l'eau de mer. Les organismes marins incorporent les éléments présents dans l'eau de mer au niveau de leurs métabolites. Les éléments qui marquent les substances marines sont:

- Les halogènes (Cl, Br, F, I), l'incorporation des halogènes est évidente, car ils sont des éléments majeurs de l'eau de mer avec une concentration supérieure à 10 ppm;
- Le soufre est incorporé dans les métabolites primaires comme les polysaccharides des algues, et dans les métabolites secondaires soient associés à des sucres des saponines des échinodermes, soient sous forme d'esters sulfuriques de phénols dans les algues rouges;
- Les éléments rares présents à l'état de trace dans l'eau de mer, certaines algues et mollusques incorporent dans leurs métabolites des éléments rares comme l'arsenic qu'est associé aux carbohydrates arséniés des algues brunes et mollusques. Le bore marqué dans la borophycine isolée de la cyanobactérie *Nostoc linckia*, et le nickel au niveau de la tunichlorine isolée de l'Ascidie *Trididemnum solidum* et dans le mollusque *Dolabella auricularia*.

**L'originalité structurelle la plus marquée**, est due aux organismes qui synthétisent ces substances et qui sont exclusivement marins. Parmi ces substances on note les saponines et les caroténoïdes des échinodermes Asteroidea, sujet de cette thèse.

## II.1. Généralité sur les saponines

Les saponines constituent un vaste groupe des métabolites secondaires qui sont principalement d'origine végétale. Ils sont aussi découverts chez certains organismes marins tels que les échinodermes (étoiles de mer et les concombres de mer) (**Nigrelli, 1952; Yamanouchi, 1955; Guido *et al.*, 1965 et Mackie et Turner, 1970**) et les éponges (**Thompson *et al.*, 1985**).

Les saponines sont des molécules hétérosides possédant un ou plusieurs groupements osidiques liés à une génine de type triterpène ou stéroïde appelée sapogénine. Elles sont caractérisées par leurs propriétés tensio-actives qui les distinguent des autres glycosides par la formation d'une mousse dans l'eau. Les saponines sont inhérentes du nom latin *sapo*, *saponis* qui signifie « savon ».

Les saponines sont des composées non volatiles, elles sont caractérisées par une combinaison structurelle d'un groupement polaire hydrophile (sucre) et non polaire hydrophobe lipophile (génine). Cette combinaison détermine le caractère amphiphile des saponines et explique leurs propriétés émulsifiantes.

Dans les solutions aqueuses le caractère amphotère des saponines définit ses propriétés physico-chimiques notamment la solubilité et la formation d'une mousse stable (**Sparg *et al.*, 2004**).

Les saponines sont solubles dans l'eau, l'alcool, le chloroforme, le benzène, l'acétate éthylique. Le glycone est soluble dans l'eau et l'alcool dilué et insoluble dans les solvants organiques apolaires. La sapogénine est insoluble dans l'eau, mais soluble dans des solvants organiques.

La formation des mousses stables est la caractéristique principale des saponines. Le mécanisme de la formation de cette mousse n'est pas clair selon la littérature (**Hostettmann et Marston, 1995**).

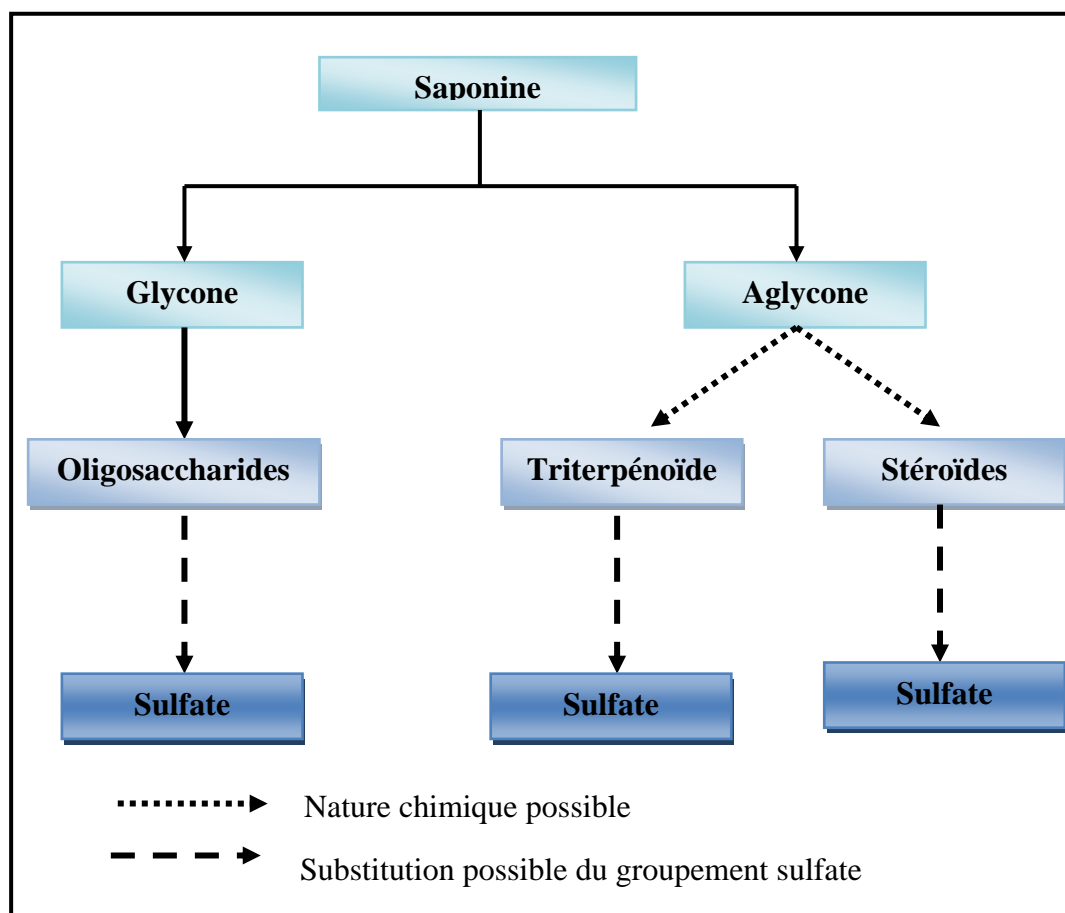
### II.1.1. Structure des saponines

Structuralement, les saponines sont constituées de deux parties distinctes la partie glycone (saccharidique) et la partie aglycone nommée génine (non saccharidique) (**Fig. 3**). Selon la nature de la génine deux types de saponine sont distingués, saponine stéroïdique et saponine triterpénique. Le troisième type est attribué aux hétérosides d'amines stéroïdiques selon la

classification de **Hostettman et Marston, 1995**. Les hétérosides d'amines stéroïdiques sont classés parmi les familles des alcaloïdes par d'autres auteurs (**Bruneton, 2009**).

On distingue donc les types suivants:

- **Les saponines triterpéniques** sont les plus courantes et surviennent surtout chez les angiospermes dicotylédones (**Bährle-Rapp, 2007**) et le concombre de mer;
- **Les saponines stéroïdiques** sont de distribution restreinte, elles sont présentes presque exclusivement dans les angiospermes monocotylédones et certains invertébrés marins en particulier les étoiles de mer;
- **Les saponines à alcaloïde stéroïdique** qui correspondent aux glucoalcaloïdes (pseudo-alcaloïdes) on les retrouve chez les Solanacées (ex: aconitine).

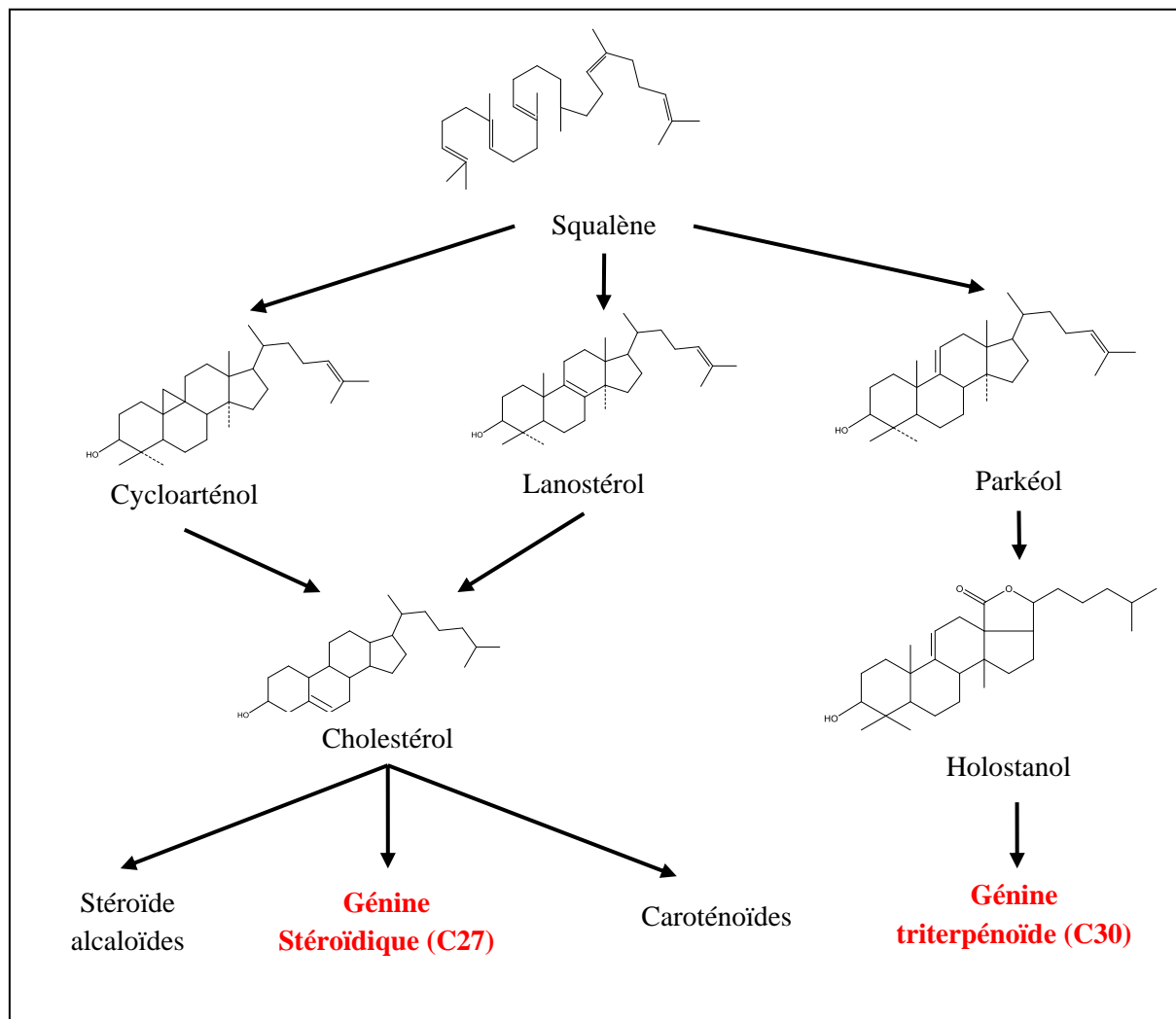


**Figure 3:** Représentation schématique des différentes parties des saponines.

(D'après D'Auria *et al.*, 1999 et Sandvoss *et al.*, 2001[Modifier]).

#### II.1.1.1. Aglycone (génine)

Deux types de structure ont été mises en évidence, en considérant la partie aglycone les structures triterpéniques et stéroïdiques. Le squalène à (six unités isoprène) est le précurseur des deux types de génine (**Hostettmann et Marston, 1995**) (**Fig.4**).



**Figure 4:** Biosynthèse des stéroïdes et triterpénoïdes selon **Hostettmann et Marston (1995)** et **Maier (2008)**.

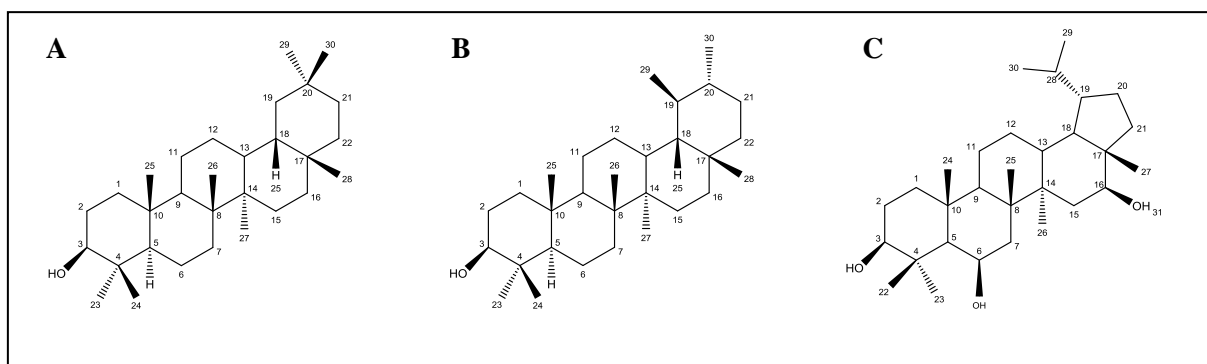
- **Les triterpénoïdes**

Les triterpénoïdes sont des composés en C<sub>30</sub>, et peuvent être classés en 10 sous-groupes selon la structure du triterpène: les dammaranes, tricullanes, cucurbitanes et lanostanes qui sont tétracycliques, et les lupanes, hopanes, oléananes, taraxastéranes, ursanes et cycloartanes qui sont pentacycliques.

Les triterpénoïdes sont issus de la cyclisation du 3S-2,3-époxy-2,3-dihydrosqualène ou plus rarement du squalène lui-même. Cette cyclisation est aboutie à 40 squelettes différents qui ont donné naissance à plus de 4000 composés. Les squelettes les plus communs des génines triterpéniques des plantes sont l'oléanane, l'ursane et le lupane et de loin les hopane et les fridelane (**Fig. 5**). La génine triterpénique qui apparaisse en grande majorité chez les concombres de mer est dérivé de l'holostane (**Fig. 4**).

Les éléments structuraux qui caractérisent les squelettes à 30 C des triterpénoïdes sont les suivants selon **Hostettmann et Marston (1995)** et **Bruneton (2009)**:

- Le groupement hydroxyle en C-3 est constant;
- La présence d'une double liaison entre C-12 et C13 ( $\Delta^{12,13}$ );
- Les positions C-2, C-7, C-11, C-15, C-16, C-21 et C-22 peuvent porter des groupements hydroxyle qui peuvent être oxydés en cétone;
- Les méthyles portés sur les carbones C-12, C-28 et C-30 peuvent être oxydés (hydroxyméthyle, aldéhyde ou carboxyle);
- Une estérification partielle de la génine peut se produire parfois par des acides aliphatiques de faibles masses moléculaires (aescine de la graine du marronnier d'Inde, théasaponine, acide gymnémique).



**Figure 5:** Les aglycones triterpéniques, (A): Oleanane; (B): Ursane; (C): Lupane.

- Les stéroïdes

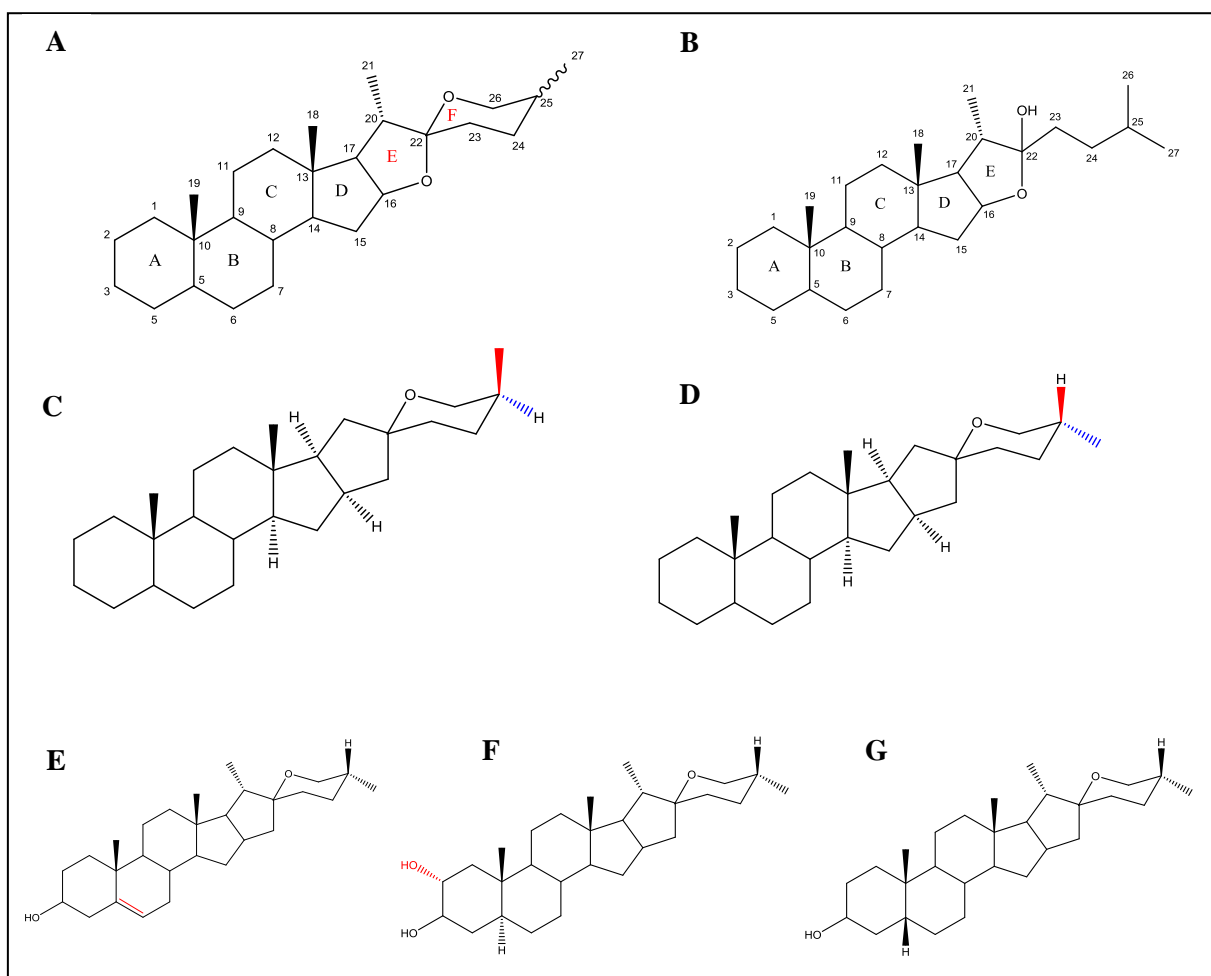
Les sapogénines stéroïdiques sont caractérisées par un squelette en 27 C dont on distingue deux structures, une structure hexacyclique dénommée spirostane compte tenu de la nature spiro du carbone C-22 (**Fig. 6A**), une autre structure furostane caractérisée par un squelette pentacyclique résultant de l'engagement de groupement hydroxyle en position C 26 dans une liaison glycosidiques (**Fig. 6B**).

Les deux cycles furanique et pyranique E et F respectivement sont la conséquence d'une cétilisation intramoléculaire qui intervient après l'oxydation en C-16, C-22 et C-26 d'un précurseur cholestanique. Les variations structurales des génines stéroïdiques sont limitées (**Bruneton, 2009**), en effet:

- Les carbones de l'hexacyclique comportent de nombreux carbones asymétriques, et seule la configuration en C-25 est variable et détermine l'existence de deux séries:

néosapogénines (le méthyl est axial, 25-*S*;) et isosapogénine (le méthyle est équatorial, 25-*R*) (**Fig. 6C et 6D**);

- La fusion des cycles B/C et C/D est toujours *trans*, celle des cycles D et E est toujours *cis*;
- La configuration des carbones C-20 est axiale *S* et celle de C-22 est équatorial *R*;
- La double liaison  $\Delta_{5,6}$  peut être conservée (exemple de la diosgénine) ou réduite ce qui induit à fusion des cycles A/B en *trans* (H-5 $\alpha$ ) ou en *cis* (H-5 $\beta$ ) exemple digitogénine et smilagénine respectivement (**Fig. 6E, F et G**);
- L'hydroxylation en C-3 est constante, en C-1, C-2, C-5, C-6 est possible et en C-15, C-17, C-24 sont rares;
- Un hydroxyle de la génine peut subir une lactonisation (spirostan-26-ones, *Solanum*), une déméthylation (18-norspirotanols, *Trillium*) ou une sulfatation.



**Figure 6:** Les génines stéroïdiques, (A):Spirostane; (B):furostane; (C) néosapogénine: 25*S*-spirostane; (D) isosapogénine: 25*R*-spirostane; (E): Diosgénine; (F): Digitogénine; (G): Smilagénine.

### II.1.1.2. Glycone (sucres)

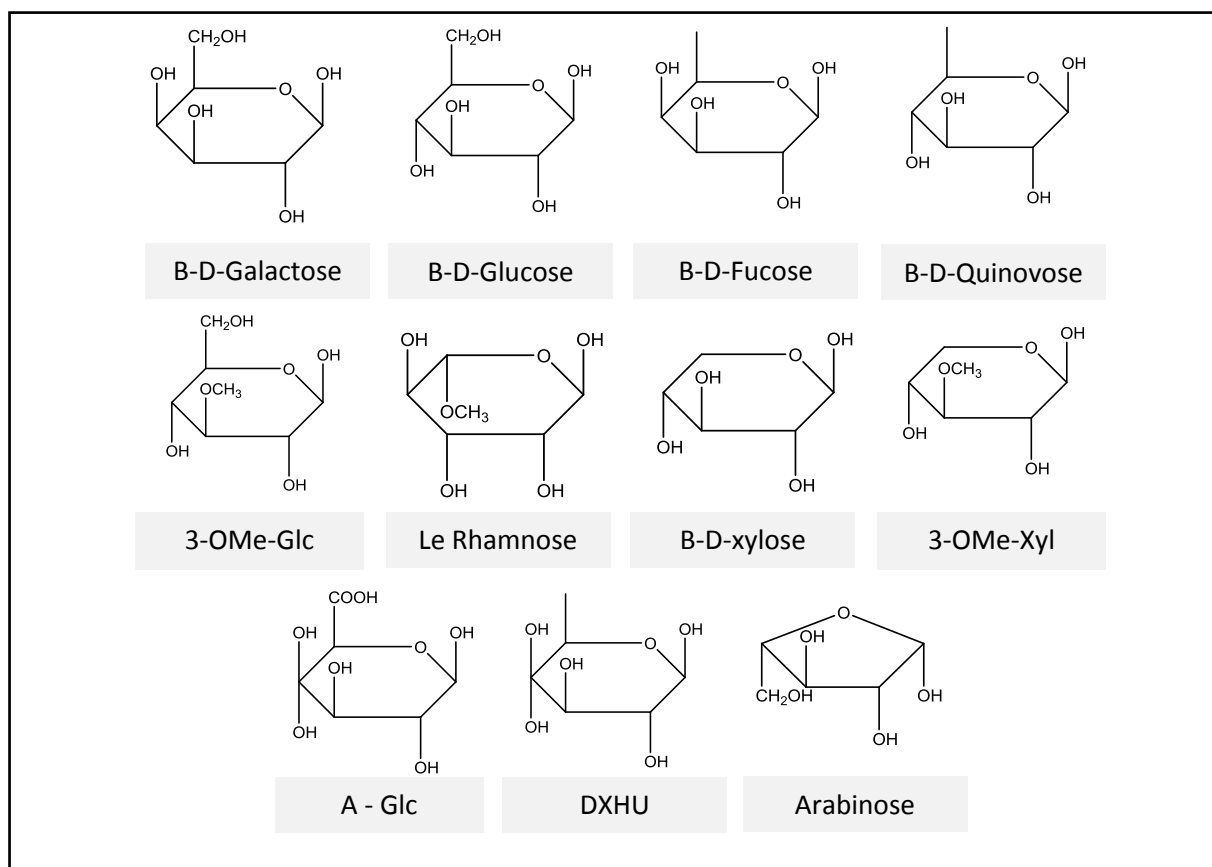
La partie osidique des saponines peut-être constituées d'une à douze unités osidiques reliées entre eux en chaîne linéaire ou ramifiée, avec un ordre, une nature et un nombre très variable. Les oses constitutifs des saponines sont généralement: des hexoses (D-glucopyranose et D-galactopyranose); des 6-désoxy-hexoses (L-rhamnopyranose, D-fucopyranose et D-quinovopyranose); des acides uroniques (acide D-glucuronique) et des pentoses (L-arabinopyranose, D-xylopyranose et D-apiofuranose). D'une part, ils sont liés ensemble par une liaison *O*-glycosidique entre l'hydroxyle du carbone anomérique du premier sucre et l'hydroxyle d'un carbone de position variable du second sucre, et d'une autre part, ils sont liés à différentes positions de l'aglycone par une liaison du type *O*-glycosidique (de type éther ou de type ester), les liaisons s'établissent entre l'hydroxyle du carbone anomérique du sucre et l'hydroxyle ou l'acide carboxylique de l'aglycone.

Selon les chaînes des sucres fixées on distingue:

- Les saponines monodesmosidiques, dans ce type de saponine une seule chaîne de sucre est fixée au niveau de l'hydroxyle de C-3 de l'aglycone par une liaison éther. Les saponines stéroïdiques et triterpénoïdes sont souvent monodesmosidiques;
- Les saponines bidesmosidiques, elles possèdent deux chaînes osidiques liées à la génine. Chez les saponines stéroïdiques la deuxième chaîne de sucre est liée en C-26 tandis que la première est toujours liée en C-3, c'est le cas des furostanols (les saponines stéroïdiques du type furostane). Dans le cas des saponines à génines triterpéniques les chaînes osidiques sont liées en C-3 et en C-28 par une liaison ester avec le carbonyle, ce type de liaison est rencontrée dans les saponines triterpéniques de type oléane;
- Les saponines tridesmosidiques, elles sont rares et comportent trois chaînes osidiques;
- Les saponines tétradesmosidiques, semblent très rares.

La partie oligosaccharidique des étoiles de mer peut posséder un à six saccharides les plus communs sont: le galactose (Gal), le glucose (Glc), le fucose, le méthylglucose (3-Moe-Glc), le rhamnose (Rha) (méthylpentose), xylose (Xyl), le méthylxylose (3-Moe-Xyl), l'acide glucuronique (A-Glc), le deoxy-xylo-hex-ulose (DXHU) et l'arabinose. Tous ces saccharides sont sous la forme pyranose mais certaines présentent la forme furanose comme le  $\beta$ -L-arabinose (**Fig. 7**).

La nature, le nombre, l'enchaînement des saccharides et la liaison avec l'aglycone, ainsi que la variabilité structurelle des chaînes latérales (R) de l'aglycone définissent d'une part la diversité structurelle des saponines et d'autre part leurs propriétés fonctionnelles.



**Figure 7:** Structures chimiques des principaux saccharides des saponines des étoiles de mer.

### II.1.2. Les saponines des Échinodermes

Chez les Échinodermes les saponines constituent la classe majeure des métabolites secondaires, et elles sont caractérisées par une diversité structurelle et un large éventail d'activité biologique.

Deux classes d'Échinoderme contiennent les saponines, les holothuries et les astéries, les différences structurelles des saponines des deux classes sont marquées au niveau de l'aglycone, de glycone, et la présence ainsi que la position de groupement sulfate.

Les saponines dérivées des étoiles de mer sont caractérisées par une génine stéroïdique alors que celle des holothuries est génine triterpénique.

La partie oligosaccharidique est variable entre les holothuries et les astéries, cette variabilité est due en nombre et à la catégorie des monosaccharides. Les saponines des étoiles de mer possèdent un à six saccharides et ceux d'holothuries comprennent deux à six saccharides.

Les sucres communément retrouvés dans les saponines des étoiles de mer sont: le glucose, le quinovose, le fucose, le xylose et le DXHU. Le quinovose, le xylose, le 3-O-méthylglucose et le 3-O-méthylxylose sont fréquemment retrouvés dans les saponines des holothuries.

Chez les étoiles de mer le groupe sulfate est situé dans la partie aglycone de la molécule, alors que chez les holothuries le groupe sulfate est placé dans la partie glycone (**Kornprobst et al., 1998**).

### II.1.3. Les saponines des asteroidea

Les étoiles de mer sont une source fascinante de saponines d'intérêt thérapeutique dont des activités cytotoxiques, hémolytiques, antivirales, antifongiques et antimicrobiennes sont certaines (**Dong et al., 2011**).

Trois catégories de saponines ont été identifiées chez les "étoiles de mer", les glycosides de polyhydroxystéroïdes, les asterosaponins et les saponines macrocycliques (**D'Auria et al., 1993 et Maier, 2008**). Les glycosides de polyhydroxystéroïdes et les astérosaponines sont les deux types les plus répondus chez les "étoiles de mer" tandis que les saponines macrocycliques sont présentes chez le genre *Echinaster* (**Kornprobst et al., 1998 et Maier et al., 2008**). Ce qui fait la différence entre les trois catégories, c'est l'enchaînement de la partie glycone, l'enchaînement de l'aglycone et la substitution par le groupement(s) sulfate (s) (**D'Auria et al., 1993; Kornprost et al., 1998 et Maier, 2008**).

Selon **D'Auria et al. (1993); Kornprobst (2005) et Maier (2008)** les glycosides de polyhydroxystéroïdes se caractérisent par une variabilité structurelle due à:

- La présence de nombreuses fonctions hydroxyles;
- La présence de sulfate (s);
- La présence d'une instauration sur le stéroïde;
- La composition de la partie aglycone;
- La composition de la partie oligosaccharide.

**Les astérosaponines** sont des pentaglycosides ou hexaglycosides stéroïdiques sulfatés, de haut poids moléculaire 1500 da (Dalton). Leur diversité structurelle est moindre par rapport aux polyhydroxysteroides car le sulfate se substitue toujours en C3 de l'aglycone, et la position des fonctions hydroxyle et de double liaison  $\Delta^{9,11}$  ne change pas (Maier, 2008).

**Les saponines macrocycliques** ont une structure différente des deux premières catégories. Elles sont présentes chez le genre *Echinaster* (D'Auria *et al.*, 1993; Kornprobst, 2005 et Maier, 2008). Leur partie glycone est caractérisée par la présence de trois saccharides formant un cycle entre le C<sub>3</sub> et le C<sub>6</sub> de l'aglycone d'où le nom saponine macrocyclique (D'Auria *et al.*, 1993; Kornprobst, 2005 et Maier, 2008).

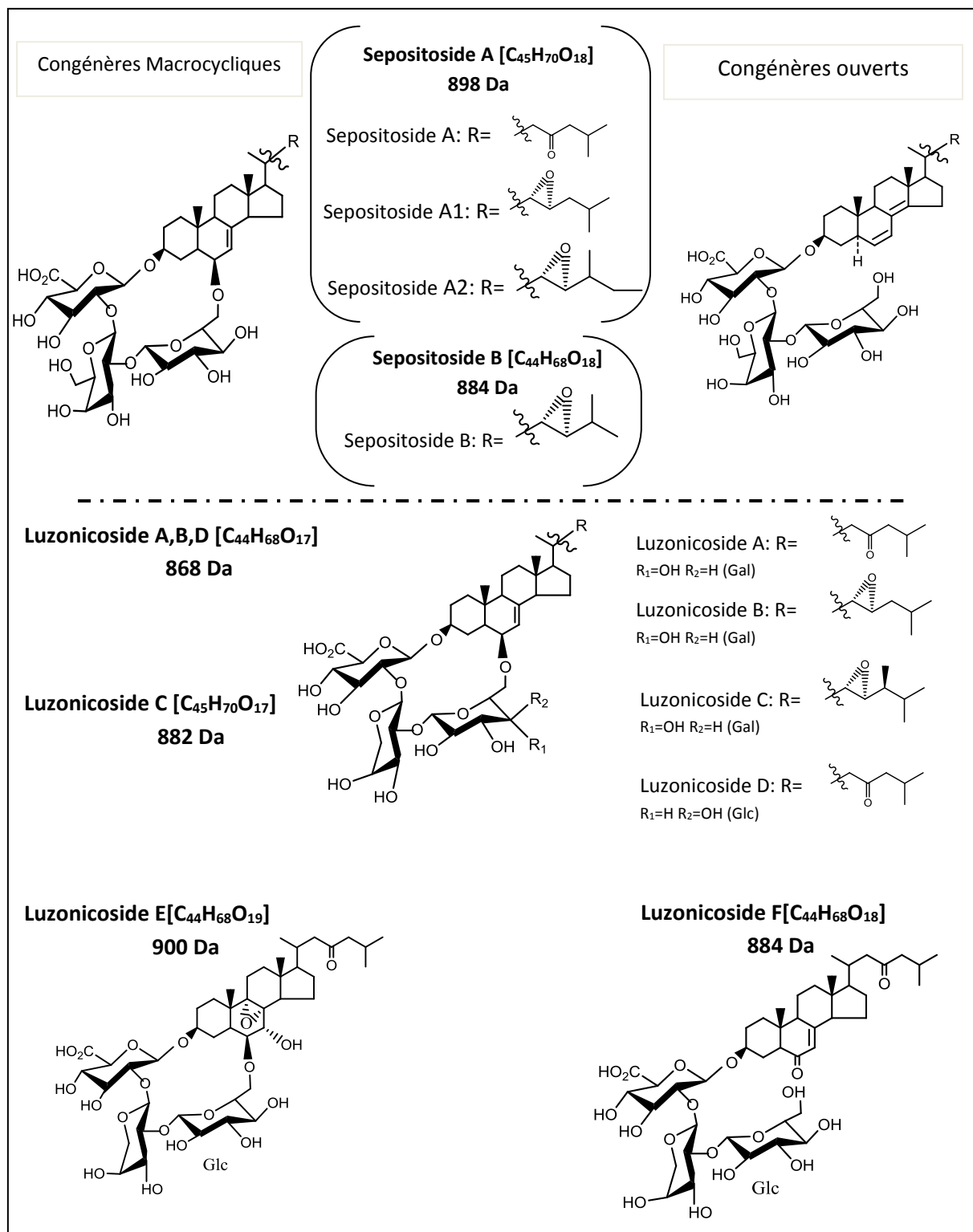
#### II.1.4. Les saponines d'*Echinaster sepositus*

Les saponines macrocycliques ont été découvertes originellement chez les étoiles de mer du genre *Echinaster* à savoir *Echinaster sepositus* et *Echinaster luzonicus* par **Minale et al., 1978; Minale et al., 1979; Desimne et al., 1981 et Riccio et al., 1981**). Depuis plus de 30 ans, ces saponines sont utilisées comme marqueurs chimiotaxonomiques du genre *Echinaster*. Récemment, ce type de molécule est isolé d'étoile de mer tropicales *Leiaster.sp.* Cette découverte indique que les saponines macro-cycliques sont plus largement distribuées dans les étoiles de mer que les deux espèces du genre *Echinaster* (**Malyarenko et al., 2016**).

Sept saponines ont été identifiées dans l'étoile de mer commune *E. sepositus* vivant en Méditerranée, dont quatre saponines sont macro-cycliques (**Minale et al., 1978 et Desimon et al., 1981**).

La saponine majeure de cette espèce est la Sepositoside A [ $C_{45}H_{70}O_{18}$ ] (**Fig. 8**), elle renferme un acide glucuronique, un glucose et un galactose dans la partie saccharidique et un aglycone stéroïdien du type 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -cholesta-8,14-dien-23-one (**Minale et al., 1978 et Desimon et al., 1981**). La sepositoside A est accompagnée par deux isomères macrocycliques mineurs qui diffèrent uniquement dans la structure de la partie aglycone et qui porte une fonction époxyde sur le C22 et C23 (22, 23-epoxystéroïde), l'aglycone du premier isomère est du type 22(R)-chloro-5 $\alpha$ -cholesta-8,14-diene-36,23(S)-diol, et celui de deuxième isomère est a27-nor24-methyl-22(R)-chloro-5 $\alpha$ -cholesta-8,14-diene-38,23(S)-diol. Une quatrième saponine macrocyclique mineure de formule brute  $C_{44}H_{68}O_{18}$  est identifiée chez *Echinaster sepositus*, elle est caractérisée par le même glycone que la sepositoside A et elle porte une fonction époxyde sur le C22 et C23 d'un aglycone de type 24-nor-22(R)-chloro-5 $\alpha$ -cholesta-8,14-diene-38,23(S)-diol, (**Minale et al., 1979 et Riccio et al., 1982**) (**Fig. 8**), cette saponine est nommée dans ce travail **sepositoside B**. À côté de ces structures macrocycliques des structures mineures et ouvertes sont répertoriées chez *Echinaster sepositus* ces structures sont des isomères des structures macrocycliques qui perdent le lien entre le glycone et le C6 de l'aglycone avec apparition d'une autre double liaison sur l'aglycone (**Fig. 8**).

La saponine majeure de l'espèce tropicale de l'indo-Pacifique *Echinaster luzonicus* est la Luzonicoside, elle diffère de la sepositoside A dans la partie glycone qui renferme un acide glucuronique, un arabinose et un galactose (**Riccio et al., 1982**) (**Fig. 8**).



**Figure 8:** Sepositoside d'*E. sepositus* (De Simone *et al.*, 1981 et Riccio *et al.*, 1981) et luzonicoside d'*E. luzonicus* (Kicha *et al.*, 2015).

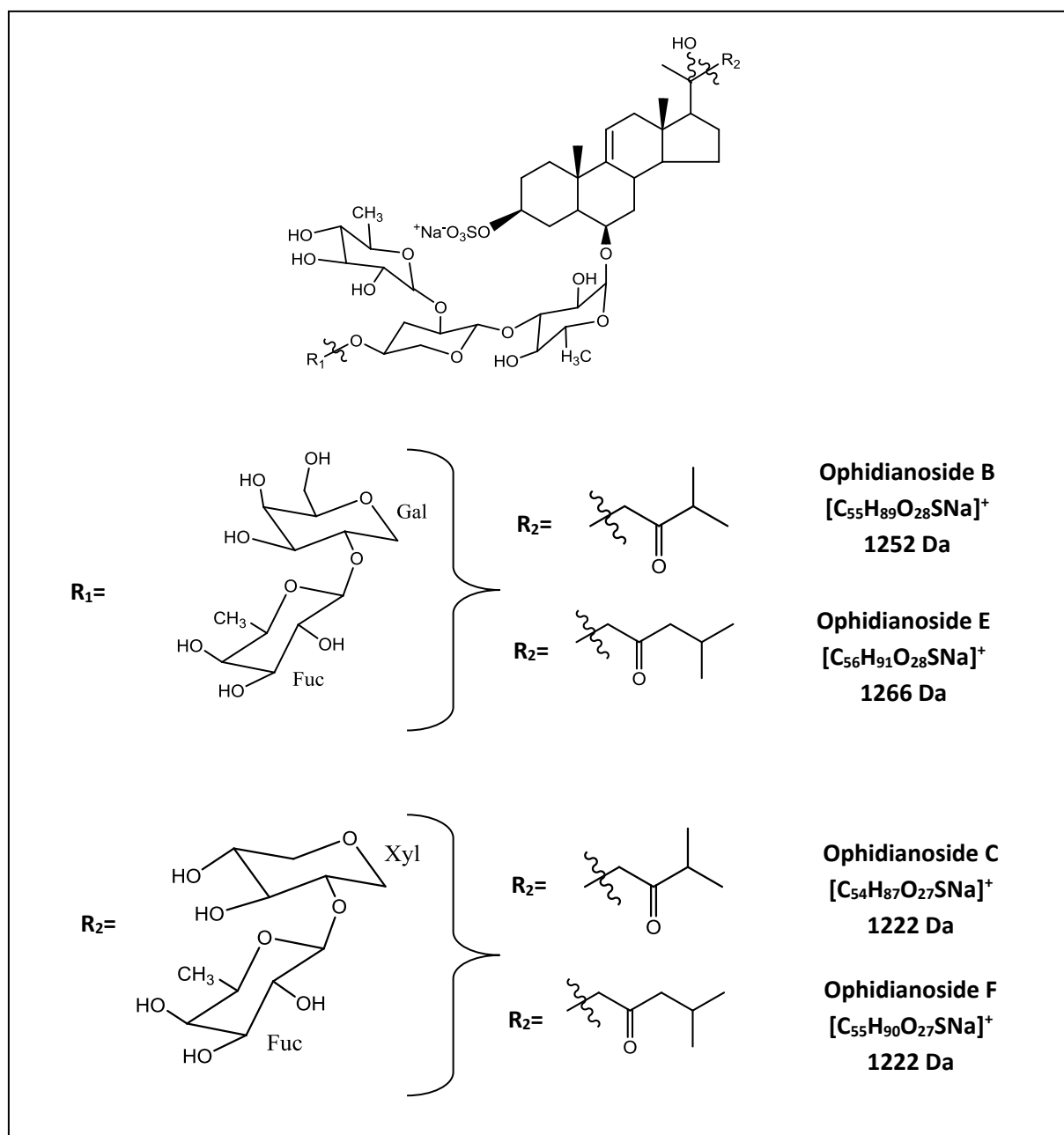
### II.1.5. Les saponines d'*Ophidiaster ophidianus*

Les astérosaponines sont les saponines présentes chez *Ophidiaster ophidianus*.

Les travaux de recherche de **Riccio et al. (1985)** ont permis d'identifier quatre saponines dont deux composés majeurs ophidianosides B, C et deux autres mineurs ophidianoside E et F (**Fig. 9**).

**L'ophidianosides B et C** sont des pentaglycosides et contiennent un aglycone stéroïdien à 26 atomes de carbone [ $3\beta$ ,  $6\alpha$ ,  $20\xi$ -tri- h ydroxy- 24- nor- 5a-cholest-9 (11) -en -23-one (24-north ornastérol A)] (**Fig. 9**). La chaîne oligosaccharidique de ces saponines est liée au C6 de l'aglycone et comprend les saccharides suivants: quinovose, xylose, quinovose, galactose et le fucose pour ophidianosides B. Des sucres du type quinovose, xylose, quinovose, xylose et fucose forment la chaîne oligosaccharide d'ophidianoside C.

**L'ophidianoside E et F** contiennent les mêmes fragments oligosaccharidiques que l'ophidianoside B et C respectivement. L'aglycone de ces saponines est l'aglycone commun des astérosaponines le Thornasterol A 27. La structure d'Ophidianoside E est la même que la thornasteroside A d'*Acanthaster planci*.



**Figure 9:** Saponines d'*O. ophidianus* (Ricchio *et al.*, 1985).

### II.1.6. Propriétés biologiques et pharmacologiques des saponines des astéries

Dans la littérature un grand nombre d'effets biologiques et de propriétés pharmacologiques ont été reporté pour les saponines: propriété hémolytique, antitumorale, anti-inflammatoire, antifongique, antibactérienne, antivirale, ichtyotoxique, cytostatique et antinéoplasique. Ces activités résultent de leurs propriétés tensioactives (Kerr et Chen 1995; Prokof'eva *et al.*, 2003 et Caulier *et al.*, 2011).

Les saponines des "étoiles de mer " présentent des propriétés biologiques très importantes à savoir l'intervention dans la communication chimique et la reproduction.

Plusieurs études ont mis en évidence la participation des saponines comme kairomone dans les relations prédateur-proie. En effet, les saponines de l'épiderme de certaines astéries (*Leptasterias polaris*, *Marthasterias glacialis* et *Asterias rubens*) sont chimiodétectées par les coquilles St-Jacques (*Pecten maximus*) (Thomas et Gruffydd, 1971), les oursins (*Sphaerechinus granularis*) et les mollusques (*Buccinum undatum*) (Makie *et al.*, 1968 et Harvey *et al.*, 1978). La détection des saponines par ces espèces provoque des réactions de fuite qui deviennent d'autant plus importantes avec l'augmentation de la concentration des saponines dans l'eau de mer (Thomas et Gruffydd, 1971). La présence de ces molécules dans l'eau provoque un effet cytotoxique considérable sur d'autres animaux. En effet, les saponines d'holothuries et d'astéries sont connues par leurs effets d'immobiliser le sperme de l'oursin et d'inhiber le développement des œufs fertiles (Amnisimov *et al.*, 1980 et Nobuhiro *et al.*, 1984).

Plusieurs chercheurs ont démontré que la quantité des saponines dans les gonades des "étoiles de mer" présente de forte variation saisonnière, ce qui hypothétise l'intervention de ces molécules dans la reproduction des "étoiles de mer" (Ikegami *et al.*, 1972 a et b; Gilgan *et al.*, 1976; Mackie *et al.*, 1977; Voogt et Huiskanps, 1979 et Naruse *et al.*, 2010).

**L'activité membranolytique (hémolytique)** est l'activité principale reconnue pour les saponines. Les saponines provoquent la lyse des cellules des champignons, des virus, et des bactéries, grâce à leurs propriétés tensioactives (Hostettmann et Martson, 1995; Kalinin *et al.*, 1996 et Jorg *et al.*, 2011). En effet, les saponines avec le cholestérol des membranes cellulaires et l'ergostérol des membranes fongiques forment des complexes qui génèrent des petits canaux solitaires et qui deviennent de plus en plus larges avec de fortes doses (Stonik *et al.*, 1999 et Jorg *et al.*, 2011). Cette capacité spécifique a contribué à leur usage dans les recherches physiologiques (Authi *et al.*, 1988; Chio *et al.*, 2001 et Plock *et al.*, 2001).

Le mécanisme de la formation des complexes par l'activité membranolytique s'effectue comme suit: les saponines s'intègrent dans la membrane grâce à leur partie hydrophobe (sapogénines); dans la membrane, elles forment des complexes avec les stérols, qui par la suite, s'accumulent en plaques grâce à l'interaction de leurs résidus saccharidiques orientés à la phase externe de la membrane (Jorg *et al.*, 2011).

L'interférence stérique de ces fractions saccharidiques provoque la courbure de la membrane conduisant ensuite soit à:

- La formation de pores dans la membrane (**Stonik et al., 1999; Jorg et al., 2011**);
- La formation des protubérances hemi-tubulaires dans la membrane;
- La formation de complexe avec les stérols intégrés à la membrane.

Les effets de la formation de ces complexes sur la cellule selon **Stonik et al. (1999) et Jorg et al. (2011)** sont:

- La Modification de la perméabilité, de la stabilité et de la microviscosité des membranes ce qui induit à terme la lyse de la cellule;
- La modification des interactions lipide-protéine ce qui rend les enzymes membranaires notamment l'ATP ase inactive;
- L'inhibition de transport actif provoque la libération des substances de faibles poids moléculaires (K<sup>+</sup>, phosphore inorganique) vers l'extérieur de la cellule.

L'activité hémolytique est intensivement étudiée, elle a été rapportée la première fois par Kober en 1887 ( **Hostettmann et Martson, 1995**). Le potentiel hémolytique des saponines est affecté par toutes les caractéristiques de sa composition chimique, la structure de la partie aglycone (**Voutquenne et al., 2002 et Gauthier et al., 2009**), le nombre des saccharides de la chaîne latérale et la longueur de la chaîne latérale (**Voutquenne et al., 2002 et Chwalek et al., 2006**), le type et la variation de l'enchaînement des unités de sucre dans la chaîne latérale (**Chwalek et al., 2006**) et la position de(s) groupement(e) sulfate(s) (**Kalinin et al., 1996**).

Il est très important de noter que les étoiles de mer et les holothuries sont immunisées contre l'effet hémolytique de leurs saponines, car leurs stérols membranaires comprennent une double liaison en C7, contrairement aux stérols des membranes cellulaires et fongiques qui ont une double liaison en C5 (**Maier, 2008**).

Les autres propriétés fonctionnelles des saponines des "étoiles de mer" à savoir les propriétés biologiques et pharmacologiques sont portées dans le **tableau 2**.

**Tableau 2:** Propriétés fonctionnelles des saponines des astéries.

Propriétés		Bibliographies
Propriétés biologiques	Rôle dans la digestion.	Garneau <i>et al.</i> (1989). Kisha <i>et al.</i> (2001).
	Rôle dans la reproduction.	Mackie <i>et al.</i> (1977). Naruse <i>et al.</i> (2010).
	Rôle dans la signalisation chimique et communication chimique interspécifique.	Makie <i>et al.</i> (1968). Harvey <i>et al.</i> (1987).
	Activité répulsive montrée par d'autres organismes marins.	Thomas et Gruffydd (1971). Harvey <i>et al.</i> (1987).
	Activité cytotoxique.	Nigrelli <i>et al.</i> (1967). Malyarenko <i>et al.</i> (2014). Elaheh <i>et al.</i> (2014).
	Activité ichthyotoxique.	Mackie <i>et al.</i> (1977). Elaheh <i>et al.</i> (2014)
Propriétés pharmaceutiques	Activité hémolytique.	Mackie <i>et al.</i> (1975;1977).
	Activité cytotoxique contre le méylome humain et des souris	Kicha <i>et al.</i> (2010 b).
	Activité antinéoplasique.	Nigrelli <i>et al.</i> (1967).
	Activité antivirale.	Andersson <i>et al.</i> (1989).
	Activité antifongique.	Nigrelli <i>et al.</i> (1967). Voogt et Rheenen (1982). Voogt et Groot (1983). Bruno <i>et al.</i> (1990). Chludil <i>et al.</i> (2002)
	Blocus phrénique de nerf diaphragme du rat.	Friess (1972).
	Activité anti- inflammatoire.	Mackie <i>et al.</i> (1977). Thao <i>et al.</i> (2013). Xia <i>et al.</i> (2020).
	Activité antibactérienne.	Voogt et huishkamp (1979). Palagiano <i>et al.</i> (1995). Palagiano <i>et al.</i> (1996).
	Agent chimio thérapeutique et activité anti-tumorale.	Guang <i>et al.</i> (2006).
	Activité anti-tumorale	Tang <i>et al.</i> (2009). Kicha <i>et al.</i> (2010 a). Kicha <i>et al.</i> (2015). Popov <i>et al.</i> (2016).

## II.2. Généralité sur les caroténoïdes

D'autres constituants physiologiquement actifs des étoiles de mer ont été étudiés dans cette thèse, il s'agit de caroténoïdes.

Les caroténoïdes sont des métabolites secondaires, ils se présentent sous forme de pigment chez de nombreux êtres vivants. Dans la nature plus de 750 caroténoïdes ont été isolés, et ils sont largement utilisés en tant que supplément nutritionnel et comme colorant dans l'alimentation et dans l'industrie pharmaceutique.

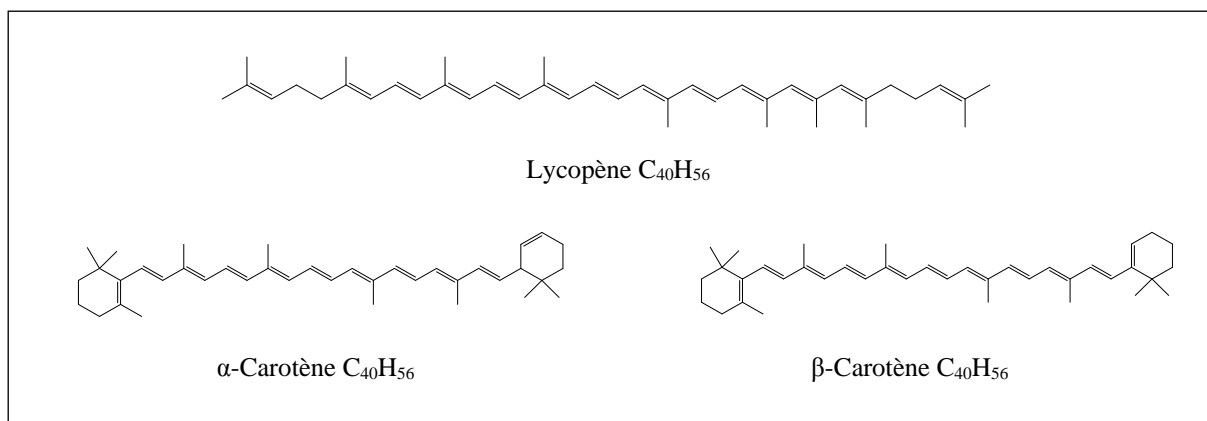
### II.2.1. Structure des caroténoïdes

Les caroténoïdes, sont caractérisés par des structures à base de carbone et d'hydrogène (constitués exclusivement d'atomes de carbone **C** et d'hydrogène **H**) formés à partir de la polymérisation d'unités isopréniques (5 atomes de carbone) à structure aliphatique ou alicyclique. Et ils appartiennent à la famille des terpénoïdes.

Ils sont issus de la condensation de huit unités en C5 liées tête-à-queue, et au centre elles sont liées queue-à-queue de façon à ce que la séquence soit inversée. Et y en résulte donc une structure en 40 atomes de Carbone (C40) (**Bacher *et al.*, 2011**) (**Fig. 10**). En outre des structures en C30 ou C50 peuvent exister (**Perez-Galvez et Minguez-Mosquera, 2001**).

Les caroténoïdes sont en grandes variétés structurelles, cette variabilité est le résultat de plusieurs éléments:

- **Le nombre de carbone constitue le squelette de la molécule:** les structures en C40 sont majoritaires, le squelette d'autres molécules peut varier de 30 à 50 C;
- **Le nombre et la position de la double liaison:** différentes configurations sont possibles selon le nombre de doubles liaisons. La configuration *all-trans* est largement prédominante et des formes (*cis/trans*) (*E/Z*) sont possibles;
- **L'ouverture des cycles:** des structures linéaires ou cycliques sont distinguées, et les cycles (un ou deux) se situent aux extrémités de la molécule;
- **Le type des cycles sur la structure:** il peut s'agir de cycle  $\beta$ ,  $\epsilon$  ou aromatique;
- **La présence ou non de groupements hydroxyles ou oxo:** (ex : 3-hydroxy, 4-ceto ou 5,6-époxy).



**Figure 10:** Structure des principaux carotènes.

## II.2.2. Classification des caroténoïdes

Les caroténoïdes regroupent deux grandes classes (**Rivera et Canela-Garayoa, 2012**):

- 1- **Les carotènes** (caroténoïdes hydrocarbonés) composés uniquement d'atomes de carbone et d'hydrogène comme α-carotène, β-carotène, lycopène (**Fig. 10**) et phytoène. On peut distinguer deux sous classes dans les carotènes, les carotènes acycliques et les carotènes cycliques:
  - **Caroténoïdes acycliques**, qui n'ont pas de cycle dans leur formule (phyloène, phylofluène, neurosporène et lycopène);
  - **Caroténoïdes cycliques**, et selon leur formule on distingue soit les **monocycliques** (β-zéacarotène, la α-zéacarotène), soit les **bicycliques** (α-carotène et β- acarotène).
- 2- **Les xanthophylles** (les caroténoïdes oxygénés) sont des caroténoïdes comportant des atomes d'oxygène, donc porteurs de fonctions alcool, cétone, époxy, carbonyle, hydroxyle, méthoxy ou acide carboxylique (violaxanthine, canthaxanthine, zéaxanthine, spirilloxanthine, torularhodine).

Les xanthophylles peuvent être classées en caroténols (hydroxy-caroténoïdes) et époxy- caroténoïdes:

- **Les caroténols (hydroxy-caroténoïdes)** caractérisés par une ou deux fonctions alcools (Iycoxanthine, lycophylle, rubixanthine, β-cryptoxanthine, zeinoxanthine, α-cryptoxanthine, la zéaxanthine et lutéine);
- **Les époxy-caroténoïdes** avec un ou deux groupements époxy (β-carotène-5,6-époxyde, anthéroxanthine, violaxanthine, lutéoxanthine, auroxanthine, néoxanthine et llutéine-5,6-époxyde).

Il existe d'autres caroténoïdes qui n'ont pas d'analogues structuraux (capsanthine, la capsorubine, crocétine et bixine), comme on distingue de plusieurs isomères *cis-trans* d'un même caroténoïde résultant de la variabilité de configuration de la double liaison (**Faure, 2006**).

### II.2.3. Principaux caroténoïdes selon les organismes producteurs

Le règne végétal représente la première source de caroténoïdes. Ils sont sous forme de pigments jaunes, rouges ou oranges, et on les trouve au niveau des fleurs, des fruits, des grains, des racines et des feuilles. Dans les tissus verts, leurs couleurs sont masquées par celle de la chlorophylle.

Les caroténoïdes sont synthétisés principalement par les organismes photosynthétiques (procaryotes et eucaryotes), et ils sont produits à des faibles teneurs chez les organismes non photosynthétiques (**Duc et Fraser *et al.*, 2006**).

Dans les fruits et les légumes consommés on distingue selon la nature de carotène synthétisé les catégories suivantes (**Britton et Khachik, 2009**):

- Les végétaux verts riches en  $\beta$ - carotène (25 à 30%), de luteine 40 à 50%), violaxanthine (15%), néoxanthine (15 %) et de petites quantités d' $\alpha$ -carotène, de zéaxanthine, d'antheraxanthine et de luteine 5,6-époxyde dans les chloroplastes;
- Les fruits et végétaux jaune-orangé sont riches en  $\beta$ - et  $\alpha$ -carotène;
- Les fruits orange riches en-cryptoxanthine;
- Les fruits rouge comme les tomates et leurs fruits sont riches en lycopène (**Tyssandier *et al.*, 2003**);
- Les graines jaune-oranges accumulent de la lutéine, du  $\beta$ -carotène, de la zeaxanthine et des cryptoxanthines.

Les caroténoïdes peuvent être présents chez certains animaux (les oiseaux, les insectes, certains poissons et invertébrés marins et sont visibles au niveau des plumes, des ailes, de la chair et de la carapace respectivement).

Ils sont généralement d'origine alimentaire, comme ils peuvent être produits par certains métabolismes de transformation (oxydation ou réduction).

À titre d'exemple, les œufs sont riches en lutéine et esters de lutéine. Ils contiennent de la zéaxanthine lorsque les volailles sont nourries avec du maïs. Les organismes marins à chair rose (poissons et crustacés) contiennent de l'astaxanthine et de la canthaxanthine, absorbées lorsqu'ils ingèrent des bactéries.

Dans le règne animal, ils peuvent être à l'état libre ou en combinaison avec les holoprotéines et les hydrates de carbone forment ainsi les caroténoprotéines et caroténoïdes glycosidiques.

Les caroténoïdes sont aussi synthétisés dans une moindre mesure, par des levures, champignons, algues marines, microalgues ou certaines espèces bactériennes.

Des espèces de nombreuses familles bactériennes synthétisent des caroténoïdes identifiables par la coloration de leurs cellules végétatives et de leurs spores.

Chez les bactéries la plupart des caroténoïdes répertoriés sont des caroténoïdes identifiés chez les eucaryotes, à l'exception des dérivés époxy. Cependant, certains caroténoïdes comme la zéaxanthine ne sont synthétisés que par les espèces de genre *Flavobacterium* et *Paracoccus* (*Flavobacterium multivorum* et *Paracoccus zeaxanthinifaciens* (**Berry et al., 2003**). En outre, d'autres bactéries synthétisent des caroténoïdes qui en spécifiques.

#### II.2.4. Propriétés physico-chimiques des caroténoïdes

- **La solubilité des caroténoïdes**

Les caroténoïdes présentent une faible solubilité dans l'eau, car ce sont des molécules extrêmement hydrophobes. La polarité des caroténoïdes qui est déterminée par la nature de groupement fonctionnel lié à la chaîne polyène influence d'une part leurs solubilités dans les solvants organiques, et d'autre part leurs interactions avec les membranes biologiques et d'autres molécules (telles que les protéines) (**Jomova et Valko, 2013**).

Les caroténoïdes apolaires (carotènes) ou estérifiés sont solubles dans l'hexane, le toluène et l'éther de pétrole. Les caroténoïdes plus polaires (les xanthophylles telles que: la zéaxanthine et la lutéine) sont solubles dans le méthanol et l'éthanol (**Rodriguez-Amaya, 2001 et Machmudah et Goto, 2013**).

In vivo, les caroténoïdes sont localisés dans les membranes, leur solubilité est influencée par leur interaction avec les protéines membranaires. Ces interactions modifient leur polarité et facilitent leur transport dans le milieu aqueux (**Britton, 1995**).

- **Absorption de la lumière UV visible**

Les caroténoïdes absorbent de la lumière UV-Visible entre 400 et 600 nm grâce à leurs systèmes conjugués des doubles liaisons, ce système constitue le chromophore qui donne aux caroténoïdes leurs couleurs attractives.

L'absorption de la lumière UV visible est en fonction de la structure des caroténoïdes (le nombre de doubles liaisons et la cyclisation) et le solvant de solubilisation qui détermine les longueurs d'onde d'absorption maximale.

Le spectre d'absorption de la majorité des caroténoïdes est caractérisé par trois maxima, ainsi la zéaxanthine avec 11 doubles liaisons présente avec des longueurs d'onde d'absorption maximum ( $\lambda$  max) à 451,478 et 426 nm. L'absorbance de la zéaxanthine à  $\lambda$  max est environ 2 fois plus grande dans le méthanol que dans l'hexane (**Zang et al., 1997**).

Les phytoène et phytofluène possédant 3 à 5 doubles liaisons respectivement absorbent au-dessous de 400 nm.

La forme du spectre UV visible est influencée par la cyclisation des caroténoïdes, le  $\beta$  carotène présente un effet hypsochrome par rapport au lycopène du fait qu'il est bicyclique.

- **Stabilité et réactivité des caroténoïdes**

La structure chimique insaturée des caroténoïdes les rend peu stables et très réactifs. La température, la lumière, l'oxygène et certaines enzymes sont des agents qui peuvent entraîner une dégradation des caroténoïdes (**Boon et al., 2010**).

Les caroténoïdes sont des molécules thermolabiles leur dégradation thermique peut se produire à des températures supérieures à 50°C. La lumière entraîne des effets plus destructeurs que la chaleur (**Shi et al., 2003**).

L'effet de l'oxygène est plus destructif que la température et la lumière en particulier dans les caroténoïdes purifiés par les solvants organiques (**Boon et al., 2010**). La dégradation oxydative dépend de la quantité d'oxygène disponible. Elle est stimulée par la lumière, les enzymes et les métaux, et elle aboutit à des composés de faibles points moléculaires qui perdent la couleur et l'activité biologique des caroténoïdes d'origine (**Rodriguez-Amaya, 2001**).

D'une façon générale la température, l'exposition à la lumière, l'oxydation, la présence d'acides, l'adsorption sur des surfaces actives (comme l'alumine) provoquent l'isomérisation en transformant les caroténoïdes qui sont de configuration « trans » en configuration « cis » et permettent ainsi leur dégradation (**Rodriguez-Amaya, 2001**).

L'ensemble des agents qui provoquent l'isomérisation et la dégradation des caroténoïdes peuvent exister au cours de l'extraction et de l'analyse et des mesures préventives doivent être prises pour garantir la fiabilité des résultats analytiques.

## II.2.5. Les caroténoïdes des échinodermes

Les organismes marins sont une source importante de caroténoïde, ils produisent des structures trop variées. Parmi les 750 caroténoïdes répertoriés en littérature, plus de 250 composés sont d'origine marine (**Galasso *et al.*, 2017**).

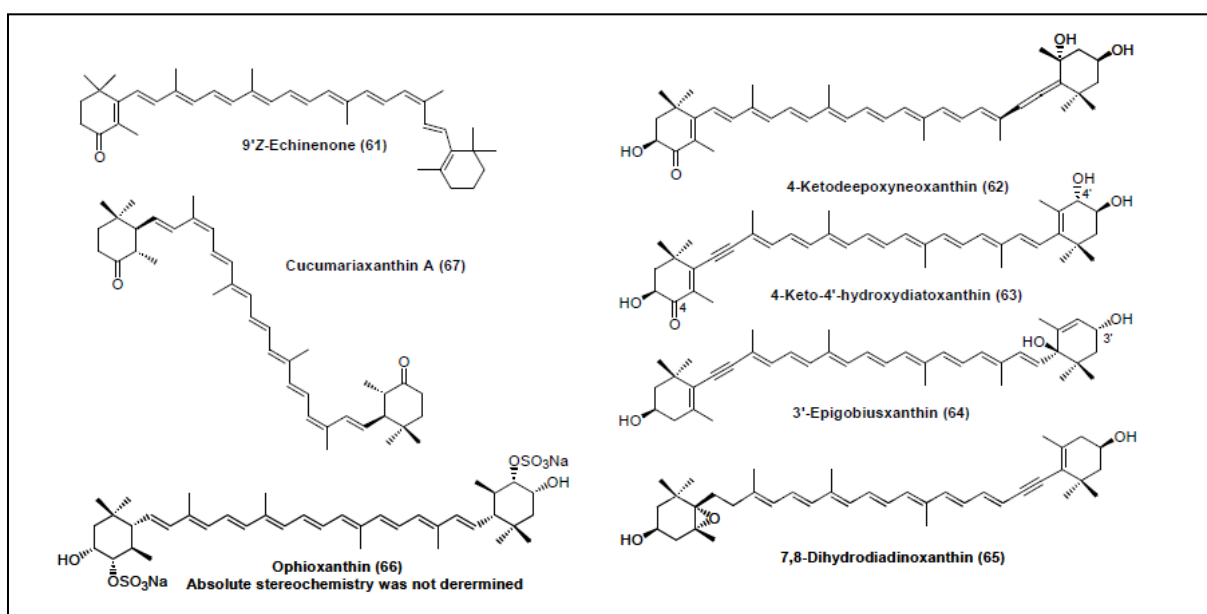
Les invertébrés marins notamment les éponges, les anémones, les coraux, les méduses, les ascidies, et les échinodermes sont les organismes qui présentent la plus large gamme de caroténoïdes comme le révèlent leurs couleurs vives et trop variées.

Les échinodermes (les oursins, les étoiles de mer et les holothuries), contiennent principalement les pigments suivants:  $\beta$ -carotène, échinénone, canthaxanthine, astaxanthine, fucoxanthine (**Tab. 5**).

**Chez les Echinides, "Oursins":** le caroténoïde majeur est nommé l'échinénone. L'échinénone est un caroténoïde à fonction cétone. Il est isolé à partir des gonades, et il est caractérisé par sa forme isomérisée9'-cis (**Maoka, 2011**).

**Chez les Astérides, « Etoiles de mer»:** les principaux caroténoïdes des étoiles de mer sont astaxanthine, 7,8-didehydroastaxanthine, and 7,8,7',8'-didehydroastaxanthine qui sont des métabolites oxydés de  $\beta$ -carotene, diatoxanthin, et alloxanthin, respectivement (**Maoka, 2011**).

**La figure 11** illustre les principaux caroténoïdes identifiés chez les Echinodermes.



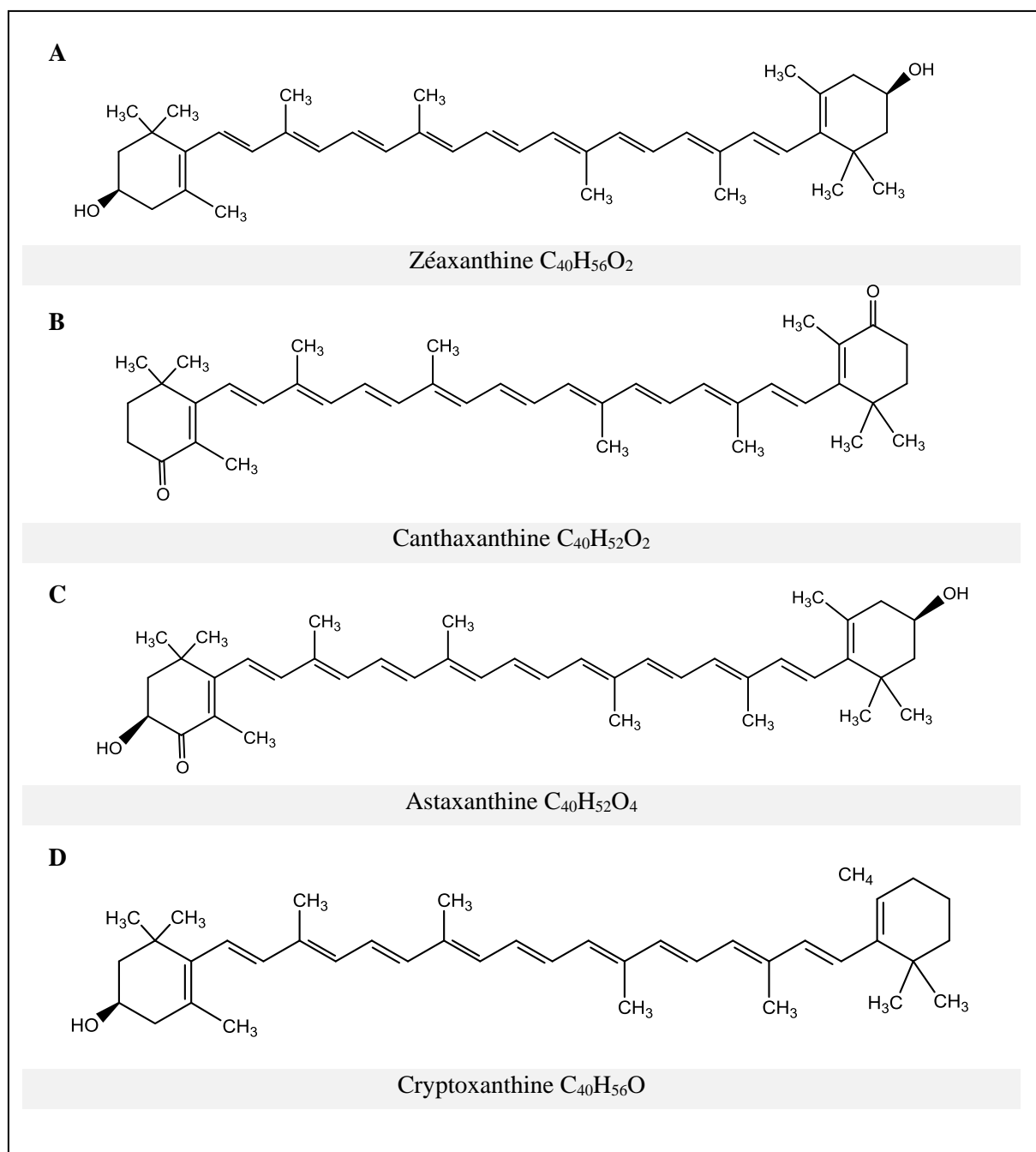
**Figure 11:** Les caroténoïdes des Échinodermes.

### II.2.6. Les caroténoïdes des asteroidea

Les caroténoïdes des étoiles de mer peuvent être accumulés par la prise alimentaire ou obtenus par la transformation métabolique chez les animaux marins (**Cardoso et al., 2017**).

En plus des caroténoïdes majeurs des étoiles de mer (astaxanthine, 7,8-didehydroastaxanthine, and 7,8,7',8'-didehydroastaxanthine), plusieurs d'autres caroténoïdes mineurs ont été identifiés chez de nombreuses espèces. On note en particulier, 4-cétodéépoxyneoxanthine, 4-céto-4'-hydroxydiatoxanthine, 3'-épigobiusxanthine et 7,8- dihydrodiadinoxanthine, isolés de l'étoile de mer *Acanthaster planci* (**Cardoso et al., 2017**). Chez *Marthasterias glacialis* d'autres composés ont été isolés à savoir la zéaxanthine, l'astaxanthine et la lutéine (**Ferreres et al., 2010**).

Chez les étoiles de mer étudiées les caroténoïdes signalés sont la zéaxanthine et canthaxanthine chez *E.sepositus* (**Czeczuga, 1983**). Chez *O. ophidainus* l'astaxanthine est le composé majeur, le  $\beta$ -carotène et cryptoxanthine sont les composés mineurs. Ces caroténoïdes pourraient être des intermédiaires dans la synthèse d'astaxanthine à partir de  $\beta$ -carotène (**Fig. 12**).



**Figure 12:** Les caroténoïdes d'*E.sepositus* (A et B) et d'*O. ophidianus* (C et D).

### II.2.7. Propriétés pharmacologiques des caroténoïdes

En général, les caroténoïdes sont des composés à fonctions très variées. Ils sont une source et précurseurs de la vitamine A (des provitamines A), en particulier le  $\alpha$ -Carotène, le  $\beta$ -carotène et le  $\beta$ -cryptoxanthine (Amorim-Carilho *et al.*, 2014). Ils ont des effets protecteurs contre certaines pathologies comme les atteintes rétinienne ou dermatologiques.

Ils ont été valorisés comme étant un principe actif à l'encontre de plusieurs pathologies à savoir: le cancer, les maladies cardiovasculaires, les pathologies rétinienne, l'infection à VIH, les pathologies dermatologiques.

Les caroténoïdes de la faune marine possèdent des effets potentiels à savoir: l'effet antioxydant, antiprolifératif, anti-inflammatoire et antitumoral. Et ils peuvent être utilisés comme un agent cosmétique de photoprotection de la peau contre les effets néfastes du rayonnement UV solaire, ou comme nutraceutique pour prévenir les maladies liées au stress oxydatif (**Tsuchima et Mastuno, 1990; Mastuno, 2001; Nichols et Katiyar 2010 et Gonzalez et al., 2011**).

Le **tableau 3** reporte l'intérêt des caroténoïdes les plus rencontrés dans les organismes marins ainsi que leurs applications industrielles.

**Tableau 3:** Activités pharmacologiques et applications industrielles des caroténoïdes d'origine marine.

Type de caroténoïde	Activités pharmacologiques				Applications industrielles de Ces caroténoïdes isolés des espèces marines			Présence chez les Échinodermes
	Activité	Concentration bioactive	Modèle	Bibliographie	Source marine	Applications	Entreprise	
<b>Astaxanthine</b>	anti-oxydante	10µg/mL	Cellules de Leydig	<b>Wang et al., 2015</b>	<i>H. pluvialis</i> (Algue verte)	Nutraceutique, Produit pharmaceutique, Cosmétique	Cyanotech (USA) Jingzhou Natural Astaxanthin Inc. (China), Algaetech International (Malaysia), Parry Nutraceuticals (India), Mera Pharmaceuticals Inc. (USA).	Oursin: ( <i>A. lixula</i> ) Holothuries Astéries: ( <i>O. ophidianus</i> )
	Antiproliférative	10 µM	Adénocarcinome prostatique humain	<b>Sharoni et al., 2002</b>				
	Stimulation du système immunitaire	40 mg/kg/jour	Fibrosarcome (Meth-A tumor)	<b>Jyonouchi et al., 2002</b>				
	anti-obésité	6, 12 et 18 mg/jour	Humain	<b>Yoshida et al., 2010</b>				
	Protection cardiovasculaire	50 mg/kg	Rats	<b>Hussein et al., 2005</b>				
<b>β-carotène</b>	Anti-oxydante	20mg	Les fumeurs	<b>Allard et al., 1994</b>	<i>D. salina</i> (algue verte)	Colorant pour les aliments et boissons, Additif alimentaire, Agent antioxydant, Immunostimulant,	AquaCarotene (USA), Cognis Nutrition & Health (Australia), Cyanotech (USA),	Oursin Holothuries Astéries: ( <i>O. ophidianu</i> )
	Guérison de l'érythème	30 à 90mg/jour	Humain	<b>Stahl et Sies 2012</b>				
	Antiproliférative	30 µM	ostéosarcome murin (LM8)	<b>Rokkaku et al., 2013</b>				
	Anti-inflammatoire	0.02 µmol/L	Cellules endothéliales de la veine humaines	<b>Di Pietro et Di Tonno 2012</b>				

**Tableau 3 (suite):** Activités pharmacologiques et applications industrielles des caroténoïdes d'origine marine.

Type de caroténoïde	Activités pharmacologiques				Applications industrielles de Ces caroténoïdes isolés des espèces marines			Présence chez les Échinodermes
	Activité	Concentration bioactive	Modèle	Bibliographie	Source marine	Applications	Entreprise	
<i>fucoxanthine</i>	Anti-oxidante	5,50,100 et 200 $\mu$ M( 50 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Cellules Vero	<b>Heo et al., 2009</b>	<i>L. japonica</i> (Algue brune)	nutraceutiques, cosmétiques,	AlgaNova International (China),  Leili Natural Products Co., Ltd. (China).	Oursin Holothuries Astéries
	Protection UV	5,50 et 100 $\mu$ M (50 mJ/Cm <sup>2</sup> UV-B)	Fibroblastes humains	<b>Heo et Jeon, 2009</b>	<i>I. Galbana</i> (Haptophytes)	pharmaceutiques.		
	Antiproliférative	5 et 10 $\mu$ M	Cancer de prostate	<b>Kotake-Nara et al, 2005</b>	<i>P. tricornutum</i> (Diatomé)			
	anti-obésité	2 mg	Rats	<b>Matsumoto et al., 2010</b>	<i>O. aurita</i> (Diatomé)			
<b>Zéaxanthine</b>	Prévention ADM	5 $\mu$ L	Lymphatique Dermique des Cellules endothéliales humaines (HLD EC)	<b>Gao et al., 2011</b>	/	/	/	Asteries ( <i>E.sepositus</i> )
<b>canthaxanthine</b>	Antiproliférative	10 $\mu$ M	mélanome humain et murin (SK-MEL-2, JB/SM et B16F10)	<b>Palozza et al., 1998.</b>	Haloferax alexandrines (archée)	colorant pour les aliments et les boissons, produits pharmaceutiques,	Hangzhou Spring Biotechnology Co., Ltd. (China),  Elitex Biological Technology (Australia),  _Zipontchem Tech Co., Ltd. (China).	Oursin Holothuries Astéries ( <i>E. sepositus</i> )
	Stimulation du système immunitaire	1.9 mg/mL	Carcinome des poches bicales de haSMter	<b>Shklar et Schwartz, 1988</b>	Dietzia natronolimnaea HS-1 Thraustochytrid strain KH105	colorant de jaune d'oeuf,  colorant de peau de poulet.		

### III. Nouvelles perspectives pour l'extraction des saponines et des caroténoïdes

L'étude des saponines et des caroténoïdes est très délicate, aussi bien au niveau de l'extraction, de la séparation et de l'identification structurale. L'obtention d'une molécule pure et intacte est difficile car ces molécules sont présentes souvent sous forme de mélanges complexes.

L'extraction de ces substances à partir des invertébrés marins est souvent suivie d'une succession d'étapes de séparation qui sont la pré-purification et la purification. La pré-purification permet d'éliminer les acides gras, cette étape est une extraction liquide-liquide réalisée après l'évaporation du solvant d'extraction. La purification est l'étape de séparation de mélange de saponines ou de caroténoïdes et d'isolement des substances pures. Elle est réalisée par des techniques chromatographiques (chromatographie sur couche mince, chromatographie sur colonnes, chromatographie en phase liquide haute performance, flash chromatographie...) sur différents supports (silice ou sur phases greffées comme la C<sub>18</sub>). Les pertes en substance peuvent être importantes dans les différentes étapes de séparations (pré-purification et purification) ce qui impose l'utilisation d'une grande quantité de l'extrait brute. La quantité d'extraits brutes est déterminée par la méthode initiale d'extraction qui doit fournir suffisamment de masse pour parcourir les autres étapes de purification. De ce fait, l'un des objectifs de notre travail est d'appliquer plusieurs techniques d'extraction afin de valoriser la technique qui donne la quantité la plus importante en substances étudiées.

Il existe plusieurs techniques d'extraction des molécules bioactives à partir des produits naturels. Ces techniques peuvent être dites *conventionnelles* (utilisées depuis longtemps) et *nouvelles ou alternatives* (développées plus récemment).

Parmi les techniques conventionnelles, on trouve la macération, l'extraction par agitation magnétique, l'extraction en mode batch, l'entraînement à la vapeur (hydrodistillation) et l'extraction par Soxhlet...etc.

Dans la catégorie « technique nouvelle » on peut citer l'extraction assistée par microondes ou ultrasons (EAM et EAU), l'extraction accélérée par solvants (EAS), et l'extraction avec des fluides supercritiques...etc.

**Les techniques d'extractions conventionnelles** sont des méthodes classiques d'extraction solide-liquide. Elle est réalisée, en principe, par contact d'un solide (matière première) avec un liquide (solvant).

Et elle est gérée par les processus suivants:

- la dissolution ou la solubilisation du soluté (composé d'intérêt) dans les particules par le solvant;
- la diffusion de l'extrait (solvant + solutés) vers l'extérieur de la particule.

Les facteurs intervenant dans ce type d'extraction sont liés à l'état du solide et du soluté, à la nature du solvant, à la température, à la concentration résiduaire en soluté sur le solide.

En général, l'avantage majeur de l'extraction conventionnelle est la simplicité. Et les inconvénients les plus significatifs sont: la durée importante d'extraction, la grande quantité de solvant consommée. Pour résoudre ces problèmes des techniques d'extraction alternatives sont développées. Ces techniques tiennent compte d'une part, des inconvénients des techniques conventionnelles, et d'autre part apportent des performances quantitatives importantes.

**Les techniques d'extraction alternative sont** basées sur la conception de procédés d'extraction innovant permettant de réduire la consommation en énergie et en solvant nocifs, tout en favorisant l'utilisation de solvants alternatifs, afin de garantir des rendements importants en produits valorisables dans un laps de temps réduit.

Les substances actives des étoiles de mer ont toujours été isolées par des méthodes conventionnelles basées sur l'utilisation des solvants organiques (**Tang et al., 2005, 2006, Kicha et al., 2010 et Ivanchina et al., 2011**). Ainsi, dans cette étude deux méthodes d'extraction alternatives ont été appliquées: L'extraction assistée par micro-ondes (EAM) et l'extraction assistée par ultra-sons (EAU), dans le but de maximiser les rendements d'extraction des saponines et des caroténoïdes des étoiles de mer, toute en utilisant de petites quantités de matière première. Ces techniques d'extraction seront présentées dans cette partie en détail.

### **III.1. L'extraction par micro-ondes**

#### **III.1.1. Les micro-ondes**

Les microondes ou les hyperfréquences sont des ondes électromagnétiques qui résultent d'un champ électrique (**E**) et d'un champ magnétique (**B**) se propageant dans l'espace et variant dans le temps. Ils occupent une bande de fréquences de trois décades de 300 GHz à 300 MHz dans le spectre électromagnétique.

Ils sont positionnés sur le spectre électromagnétique entre les infrarouges et les radiofréquences avec les longueurs d'onde qui s'étalent de 1 millimètre à 1 mètre.

### III.1.2. Le chauffage par micro-ondes

La source de la chaleur dans le cas de chauffage par micro-onde est l'énergie cinétique des particules qui est transformée partiellement en chaleur.

Dans le chauffage par micro-onde l'énergie électrique est convertie en énergie cinétique par deux phénomènes qui interviennent simultanément: la rotation dipolaire et la conduction ionique.

- **Rotation dipolaire**

Un matériau diélectrique quand il est soumis à un champ électrique statique ou alternatif subit une déformation des molécules ainsi qu'une réorientation de ses moments dipolaires permanents (**Dressen, 2009**). En effet, les dipôles tendent à s'orienter dans la direction du champ sur une demi-alternance, se désorientent lorsque le champ s'annule et se réorientent dans l'autre sens pendant la seconde demi-alternance.

La libre rotation des molécules est opposée par les forces de liaison par pont hydrogène et les forces de liaisons de Van der Waals, ces forces d'interactions entre molécules contrariées imposent l'alignement des dipôles par rapport au champ électrique ce qui induit à une friction engendrant une chaleur (**Roussy et Gpearce 1995**).

- **Conduction ionique**

**Le courant de conduction ( $J_c$ )** est le résultat de la migration des ions soumis à un champ électrique (**E**) dans les sens du champ "c'est le mécanisme de conduction ionique". La résistance du milieu à ces courants ioniques induit des frictions libérant de la chaleur par effet Joule. La conduction ionique et la rotation dipolaire apparaissent généralement simultanément, mais sont dépendantes du type de solvant utilisé, de la charge et de la taille des ions présents dans la matrice.

Sous l'action d'un rayonnement micro-onde la dissipation de chaleur (d'énergie) par le solvant peut être évaluée par le facteur de dissipation (**tan $\delta$** ) lié au facteur de perte diélectrique ou moment dipolaire ( **$\epsilon''$** ) et à la constante diélectrique ( **$\epsilon'$** ) par la relation suivante (**Sparr Eskilsson et Björklund, 2000**):

$$(\tan\delta) = \frac{\epsilon''}{\epsilon' * \epsilon''} \quad (1)$$

Avec :

**$\epsilon''$**  : **Le moment dipolaire**, mesure la capacité à convertir l'énergie micro-onde en chaleur.

$\epsilon'$ : **La constante diélectrique** correspond à la capacité des molécules à se polariser dans un champ électrique.

La dissipation d'énergie par le solvant peut être maximale s'il possède une constante diélectrique forte. C'est le cas des solvants polaires qui possèdent un dipôle permanent et qui vont donc fortement absorber les micro-ondes, au contraire des solvants apolaires qui possèdent une constante diélectrique faible.

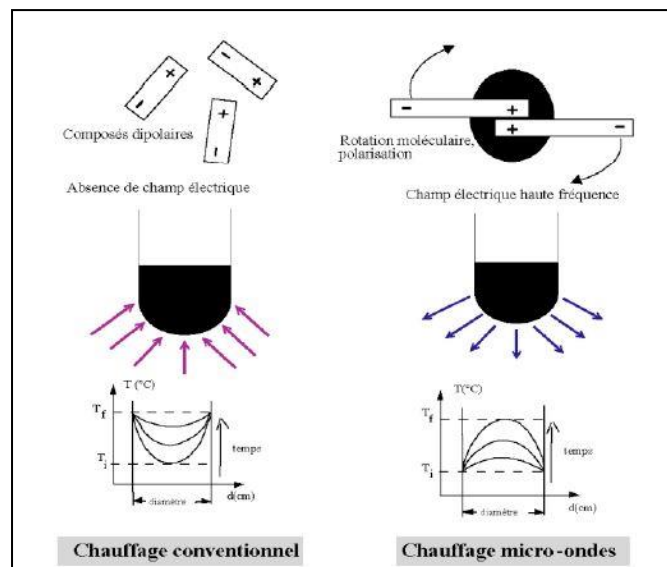
Les solvants les plus communément employés dans l'extraction micro-onde sont les solvants polaires. Ces solvants possèdent une forte capacité à absorber les micro-ondes, à s'échauffer et à transférer la chaleur à la matrice. Le processus d'extraction est équivalent aux autres techniques à la différence que le chauffage est rapide, sans inertie et sans perte de chaleur.

L'extraction par micro-onde peut être réalisée avec un solvant transparent aux micro-ondes ou sans solvant, dans le cas de matrices fraîches à forte teneur en eau (>70%). Dans ce cas, c'est directement la matrice qui s'échauffe grâce à l'eau qu'elle contient. Donc, à l'inverse des techniques classiques de chauffage par conduction ou convection, l'utilisation des micro-ondes implique une interaction directe entre un rayonnement électromagnétique et la matrice. Le chauffage résulte ainsi de la conversion en chaleur de l'énergie d'une onde électromagnétique dans la matrice. Ce chauffage particulier appelé aussi chauffage diélectrique.

La différence entre le chauffage conventionnel (conduction thermique) et le chauffage par micro-onde (chauffage diélectrique), peut-être résumée dans les points suivants (**Fig. 13**):

- La source principale de production de chaleur pour le chauffage par microondes est l'agitation thermique. Donc la matrice est elle-même source de chaleur;
- Le transfert de chaleur sous chauffage par micro-onde se fait de l'intérieur de volume traité vers l'extérieur, contrairement au chauffage conventionnel qui se fait de l'extérieur vers l'intérieur. Donc le gradient de température dans les cas de chauffage par micro-onde est inversé par rapport à un chauffage conventionnel (**Cendre, 2011**);
- Le mode de chauffage est en volume et instantané dans le cas de chauffage par micro-onde, et il est en surface et continu dans le cas de chauffage conventionnel.

- La convection et la conduction ce sont des phénomènes thermiques qui jouent seulement le rôle d'équilibrage de la température dans le cas de chauffage par micro-onde.



**Figure 13:** Comparaison entre chauffage conventionnel (a), chauffage par micro-onde (b). Selon (Chemat et Lucchesi, 2005) et (Bozkurt et Icier, 2010).

### III.1.3. L'extraction assistée par micro-ondes (EAM)

L'extraction par micro-ondes regroupe différents procédés: les procédés d'extraction par solvant assistés par micro-ondes (ESMO/EAM), l'entraînement à l'air assisté par micro-ondes (EAMO), l'hydrodistillation assistée par micro-ondes sous pression réduite (VMHD), l'hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDMO), l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (ESSAM).

Dans notre thèse le procédé utilisé est l'extraction par solvant assistée par micro-onde (EAM). La simplicité, l'efficacité et la rapidité de la mise en œuvre de cette méthode en fait une technique de choix pour l'extraction de métabolites secondaires.

Le principe d'EAM est relativement simple, il consiste à irradier la matrice broyée placée à l'intérieur de l'enceinte micro-onde en ajoutant un solvant organique. L'ensemble (solvant et matrice) est chauffé simultanément sans jamais atteindre l'ébullition.

D'une part, le solvant d'extraction au contact de la matrice est chauffé par les micro-ondes ce qui permet de solubiliser les substances d'intérêt. Et d'autre part, l'eau présente dans la matrice absorbe les micro-ondes ce qui provoque le chauffage de la matrice, et conduit à

l'expansion et à la rupture des membranes cellulaires libérant ainsi des molécules à extraire dans le solvant (**Spar Eskilsson et Bjorklund, 2000**).

La nature des composés à extraire définit le type de solvant à utiliser; pour l'extraction de composés polaires l'utilisation d'un solvant absorbant fortement les micro-ondes tel que le méthanol est recommandé, en revanche pour l'extraction de composés apolaires on utilise un solvant n'absorbant pas les micro-ondes tel que l'hexane (**Chemat et Lucchesi, 2005**).

L'EAM est utilisée dans de nombreux travaux de recherche pour extraire les biomolécules, il est utilisé par **Eskilsson et al. (2000)**; **Kwon et al. (2003)** et **Heng et al. (2013)** pour l'extraction des saponines des plantes, et par **Hiranvarachat et Dehahasti (2014)** et **Ho et al. (2015)** pour l'extraction des caroténoïdes des carottes et des tomates.

### III.1.3.1. Appareillage pour l'extraction EAM

L'appareillage adopté aux laboratoires pour EAM est le four micro-onde.

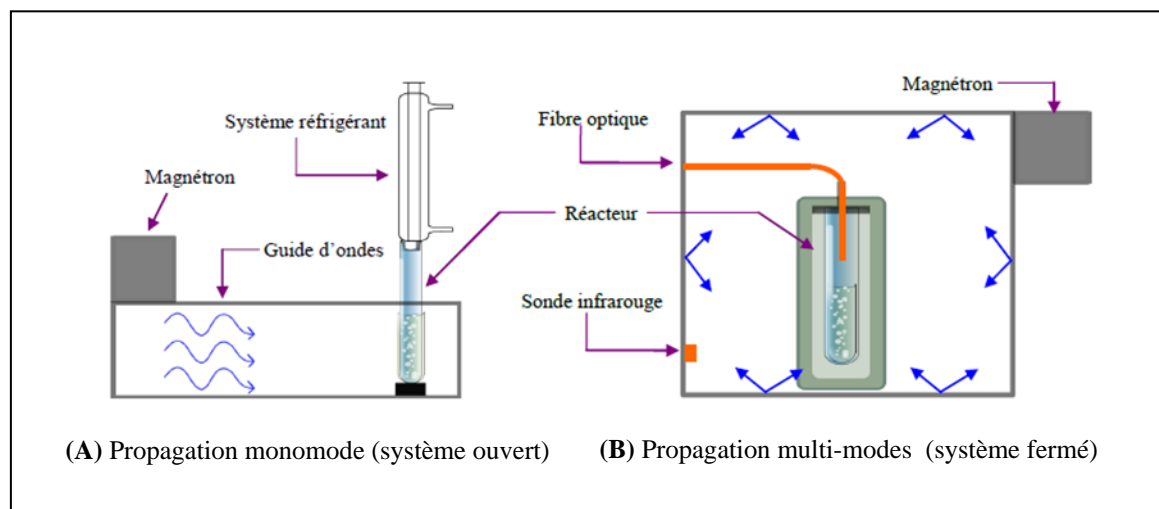
Les fours micro-ondes commercialisés sont constitués des éléments suivants : un magnétron, un guide d'onde, le four (l'applicateur) ou la cavité micro-onde, un réacteur transparent aux micro-ondes dans lequel est disposé l'échantillon. En outre, de nombreux éléments peuvent être ajoutés et adaptés à savoir un système de contrôle des températures et un système de sécurité pour éviter les surpressions.

- **Le magnétron** ou le générateur des micro-ondes, c'est une diode thermoïonique cylindrique qui génère les micro-ondes à partir d'énergie électrique; elle est composée d'une cathode chauffée qui émet des électrons et d'une anode polarisée positivement par rapport à la cathode qui attire les électrons par le champ électrique continu.
- **Le guide d'onde** est une pièce métallique sous forme d'un tube parallélépipédique creux. Il conduit les ondes depuis le générateur jusqu'à l'applicateur. Ses dimensions conditionnent le mode de propagation des ondes électromagnétiques (**Datta et Anantheswaran, 2001**).
- **L'applicateur** c'est la cavité micro-onde ou la cavité de propagation des ondes micro-ondes conduit par le guide d'onde. On distingue deux grandes catégories d'applicateurs (**Fig. 14**):

**Un applicateur d'onde monomode** dans ce type de cavité la radiation micro-onde est orientée par le guide d'onde vers une zone restreinte, c'est la zone dans laquelle se situe l'échantillon;

**Un applicateur d'ondes multi-modes** cette cavité permet la dispersion aléatoire des ondes, ainsi l'échantillon, placé à l'intérieur de la cavité est agité de manière à ce que tout le

contenu soit irradié de manière homogène (**Letellier et Budzinski, 1999 et Mandal et al., 2007**).



**Figure14:** Représentation schématique des conditions d'irradiation micro-onde: **(A):** propagation monomode; **(B):** propagation multi-modes (**Mandal et al., 2007**).

### III.1.3.2. Les facteurs influençant l'EAM

Selon **Camel (2000)** et **Mandal et al. (2007)** les paramètres majeurs qui peuvent influencer l'EAM, et en particulier le rendement de l'extraction et la qualité de l'extrait sont les suivants: la nature du solvant, le temps et la température d'extraction, la puissance d'irradiation et la nature de la matrice.

- **La nature du solvant**

Le choix du solvant d'extraction en EAM est déterminé par sa capacité à absorber les micro-ondes, la solubilité des molécules d'intérêt, et par les interactions solvant-matrice. En général, l'absorption des micro-ondes par le solvant (et donc le chauffage) est proportionnelle à la polarité (**Camel, 2000**).

La nature de solvant définit le type de chauffage et par conséquent le mécanisme d'extraction et la composition d'extrait final.

On distingue selon la polarité des solvants les cas suivant:

- Si le solvant est de polarité importante donc possède une constante diélectrique ( $\epsilon'$ ) élevée, le chauffage est du type conductif: les micro-ondes permettent en premier lieu le chauffage du solvant et ce dernier par conduction chauffera la matrice. Dans ce cas, si la teneur en eau dans la matrice est importante l'ensemble matrice-solvant se chauffe simultanément (on parle d'un chauffage simultanée) car les molécules d'eau

ont une forte capacité à absorber les micro-ondes. Donc la teneur eau dans la matrice joue un rôle important dans le processus de chauffage;

- Si le solvant est transparent aux micro-ondes donc possédant une constante diélectrique ( $\epsilon'$ ) est faible, le chauffage sera plutôt direct: la matrice absorbe directement les micro-ondes et se chauffe.

Il faut noter que le volume de solvant est aussi important, ce dernier doit être suffisant pour que la matrice reste immergée pendant l'extraction.

- **Le temps d'irradiation**

La grandeur temporelle d'EAM est généralement courte de quelques secondes à plusieurs minutes contrairement aux extractions conventionnelles. Le temps d'extraction varie avec la nature de solvant et la puissance des micro-ondes et doit être optimisée. L'application des temps prolongés d'extraction n'améliore pas forcément le rendement d'extraction et peut occasionner la dégradation thermique des molécules thermolabiles (**Camel, 2000**).

- **La température d'extraction**

La température affecte l'efficacité de l'extraction car il contribue à l'amélioration de rendements. Une augmentation de la température réduit la viscosité du solvant et par conséquent augmente la diffusion de celui-ci dans la matrice conduisant à une désorption des molécules d'intérêt. Le rendement est ainsi meilleur à des températures élevées. Les limites opératoires de la température sont déterminées par la dégradation thermique des produits thermolabiles. La température d'extraction dépend principalement du type de solvant et de la matrice, et de la puissance de micro-onde (**Camel, 2000**).

- **Puissance d'irradiation**

La puissance d'irradiation appliquée est étroitement liée au temps et à la température d'extraction. Elle est augmentée pour diminuer le temps d'extraction, et à l'inverse minimisée pour éviter la dégradation thermique des molécules. Là aussi une optimisation s'impose.

## **III.2. L'extraction par ultrasons**

### **III.2.1. Les ultrasons**

Les ultrasons sont des ondes vibrationnelles mécaniques de fréquence allant de 16 KHz à 1 GHz, au-dessus de la limite supérieure d'audibilité de l'oreille humaine (16 kHz). Ils peuvent se propager dans n'importe quel milieu élastique (comprenant l'eau, l'eau saturée en gaz, et la boue (**Sillanpää, 2011**)). On distingue domaines d'utilisation des ultrasons:

- **Les ultrasons de puissance**: forte intensité et faible fréquence, de **16 kHz à 1 MHz**;

- **Les ultrasons de diagnostic**: faible intensité et haute fréquence, de **1 à 10 MHz**.

### III.2.2. Propagation des ondes ultrasons et formation des bulles de cavitation

La propagation des ondes ultrasons dans un milieu liquide va générer des cycles successifs de **compression** (haute pression,  $P > 0$ ) et de **raréfaction** (dépression,  $P < 0$ ) (Serpone et Colarusso, 1994). L'onde ultra sonore se propage suivant l'équation:

$$P = PH + PM \sin(2\pi f t) \quad (2)$$

Avec :

**P**: la pression acoustique dans le milieu;

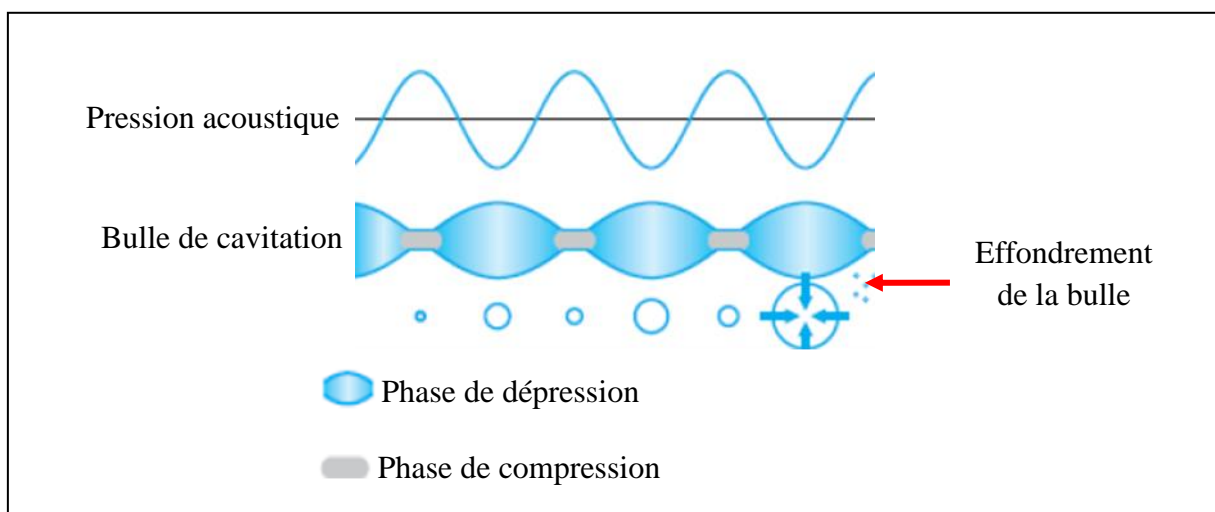
**PH**: la pression hydrostatique du milieu en absence d'onde;

**PM**: la pression maximale dans le milieu;

**f** : la fréquence (Hz);

**t** : le temps (s).

Les mouvements moléculaires au sein du milieu sont générés par la différence de pression. Au cours du cycle de raréfaction la distance entre molécules augmente car les forces maintenant la cohésion du liquide sont vaincues et des bulles de cavitation vont se former. Pendant la phase de raréfaction ces bulles augmentent et pendant les phases de compression elles diminuent (**Fig. 15**), la succession de ces cycles conduit à l'implosion des bulles de cavitation, libérant ainsi une grande quantité d'énergie (Pétrier *et al.*, 2008).



**Figure 15:** Représentation schématique de la croissance et de l'implosion d'une bulle de cavitation (Pétrier *et al.*, 2008).

### III.2.3. L'extraction assistée par ultrasons (EAU)

L'extraction assistée par ultrasons (EAU) est régie par le phénomène de cavitation.

Dans les solutions aqueuses et en présence de l'irradiation ultrasonique le phénomène de cavitation est décrit en trois étapes (**Suslick, 1989**):

- **La nucléation:** c'est la formation d'une bulle;
- **L'expansion:** c'est la croissance rapide d'une bulle durant le cycle compression/raréfaction jusqu'à l'atteinte de sa taille critique;
- **L'impulsion:** c'est l'effondrement critique des bulles dans le liquide.

L'interaction entre les ondes ultrasonores et les bulles gazeuses définit deux types de cavitation selon l'amplitude de la variation de pression (**Lepoint et Mullie, 1994**):

- **La cavitation stable:** ce phénomène est marqué à faible amplitude de pression et ne conduit pas aux phénomènes sono-chimiques;  
Dans des conditions de faible amplitude la bulle de gaz répond de façon linéaire à la variation de pression et son diamètre varie de façon sinusoïdale simultanément à la pression;
- **La cavitation transitoire:** ce phénomène est marqué à forte amplitude où la réponse de la bulle est non linéaire.

La cavitation entraîne localement des différences de températures (chauffage/refroidissement), de différence de pression et l'élévation des forces de cisaillement dans le milieu.

L'extraction assistée par ultrasons (UAE) des biomolécules est attribuée à la propagation des ondes ultrasonores dans un milieu liquide et les phénomènes de cavitation résultants. Les ondes ultrasonores de haute puissance et de basse fréquence qui se déplacent dans un milieu liquide engendrent des cycles alternés de compression et raréfaction (dépression). Quand les cycles de raréfaction augmentent, les forces maintenant la cohésion du liquide sont vaincues et des bulles de cavitation apparaissent.

Une bulle de cavitation peut être générée près de l'interface liquide-solide (paroi cellulaire par exemple) et pendant un cycle de compression implose. L'impulsion des bulles de cavitation près de la paroi cellulaire agit comme des micro-jets qui entraînent la sonoporation (perforation des parois et des membranes cellulaires) et la rupture des parois cellulaires provoquant la libération de contenu de la cellule (**Vilkhu et al., 2008; Rahman et Chemat et al., 2017**).

L'EAU est la technique privilégiée pour extraire les composés bioactifs des plantes (des vitamines de polyphénols, des polysaccharides et des saponines). Plusieurs recherches ont porté sur l'utilisation de l'EAU pour l'extraction des saponines d'origine végétale ( **Lau et al., 2003; Li et al., 2005; Ganzera et al., 2004; Ha et al., 2006; Zhang et al., 2010; Foubert et al., 2010 et Avula et al., 2011**), et pour l'extraction des caroténoïdes des plantes **Singh et al. (2015) et Jaeschke et al. (2017)**. Par ailleurs, peu de recherche porte sur son application pour l'extraction des biomolécules à partir des matrices animales. Elle est utilisée par **Kjartansson et al. (2006)** pour l'extraction de la chitine à partir de la carapace des crevettes, et par **Yue et al. (2006)** pour isoler la lutéine des jaunes d'œufs.

#### III.2.4. Appareillage pour l'extraction EAU

Les ultrasons sont produits par un dispositif communément appelé transducteur. Le principe de fonctionnement des transducteurs est basé sur les propriétés des matériaux piézoélectriques permettant de convertir l'énergie électrique en énergie mécanique. Cette vibration mécanique crée une onde ultrasonore par sa transmission dans le milieu liquide.

Il existe différents transducteurs:

- **Sonificateur à sonde ultrasonore (contact direct)**

Il est composé de quatre parties distinctes qui sont: le générateur; le convertisseur ultrasonore; la sonde d'amplification et la sonde ultrasonore proprement dite.

Le générateur transforme le courant électrique usuel en énergie électrique à haute fréquence. Le convertisseur transforme l'énergie électrique en énergie mécanique d'une fréquence donnée. La sonde d'amplification augmente l'amplitude de l'onde ultrasonore tandis que la sonde ultrasonore transmet l'onde au milieu réactionnel.

- **Bacs à ultrasons (contact indirect)**

Dans ce type d'appareillage la source vibrante est généralement placée au fond du bac, et elle génère des fréquences comprises entre 20 et 60 kHz à de faibles intensités acoustiques, généralement comprises entre 1 et 5 W cm<sup>-2</sup>.

L'irradiation ultrasonore se fait d'une manière indirecte, généralement un liquide (l'eau) sert à transmettre l'énergie depuis la zone d'irradiation jusqu'au réacteur où se produit la réaction chimique.

Dans notre travail, c'est le bac ultrason qu'est utilisé pour réaliser l'EAU.

### III.2.5. Les facteurs influençant l'EAU

Plusieurs paramètres influencent l'extraction par ultra-sons à savoir: la puissance des ultrasons, la fréquence, les dimensions du réacteur, la température, le solvant, le ratio liquide-solide, la structure et la taille des particules.

- **La puissance des ultrasons**

Afin d'avoir le seuil de cavitation une puissance minimale est requise. L'effet des ultrasons augmente avec la puissance, cependant il existe une limite physique marquée par la formation d'un bouclier de bulle à la surface émettrice lorsque la puissance est trop élevée et la cavitation est intense. Le bouclier de bulle, nommé aussi le coussin de bulle, amorti l'onde et diminue l'effet des ultrasons (**Laugier, 2007**).

- **La fréquence des ultrasons**

Les fréquences élevées réduisent l'effet de la cavitation, et les basses fréquences provoquent une augmentation de la température et de pression par le biais des cavitations violentes (**Wu et al., 2013**).

- **La température**

Dans les procédés d'extraction par solvant l'augmentation de la température favorise le transfert de masse, mais au-dessous d'un seuil critique (température optimale) qui ne provoque pas la dégradation des composés à extraire.

Dans l'extraction par ultrasons l'augmentation de la température diminue la solubilité des gaz dans les liquides, et augmente la tension de vapeur du solvant, de ce fait le seuil de cavitation est abaissé et l'efficacité des ultrasons est diminuée (**Wu et al., 2013**).

- **La pression**

Dans un milieu soumis aux ultrasons pour provoquer la cavitation dans le liquide, il faut que la pression appliquée (PI) soit inférieure à la pression de vapeur de liquide.

La pression appliquée (PI) est définie comme étant la somme de la pression hydrostatique (Ph) et de la pression acoustique (Pa). Donc pour provoquer la cavitation il faudra augmenter la pression acoustique (et donc augmenter l'intensité des ultrasons) (**Wu et al., 2013**).

- **Le gaz**

Le gaz influence la cavitation par deux effets, l'effet de surface et l'effet de couche (**Wu et al., 2013**).

**L'effet de surface:** le gaz dissous dans le liquide pénètre dans la bulle durant la phase d'expansion, et il est diffusé de l'intérieur de la bulle vers le liquide durant la phase de compression. Le flux de gaz entrant à la bulle est supérieur au flux sortant, car la quantité de

gaz échangés entre deux milieux est proportionnelle à la surface d'échange. De ce fait, la bulle contient plus de gaz grâce à l'effet de surface.

**L'effet de couche:** dans la phase d'expansion le liquide qui entoure la bulle est comprimée (forme une couche), et contient de grandes concentrations de gaz dissous, ce qui entraîne un autre flux de gaz qui rentre dans la bulle pendant la phase d'expansion, c'est l'effet de couche.

- **Le solvant**

Le choix de solvant d'extraction est généralement basé sur la grande affinité entre le solvant et le soluté, mais dans l'EAU il est également lié aux propriétés physiques de solvant à savoir, la tension de vapeur et la tension interfaciale.

L'intensité de la cavitation diminue à mesure que la pression de vapeur et la tension superficielle augmentent (**Vilkhu et al., 2008**).

**La tension de vapeur** est le paramètre le plus important, en effet l'augmentation de la tension de vapeur défavorise la cavitation, mais réduit les pressions et les températures atteintes dans la bulle lors de son implosion.

**La tension interfaciale** (surface de tension) défavorise la cavitation quand elle est élevée. En effet, les tensions élevées provoquent une forte cohésion de fluide, donc une cavitation difficile.

**La viscosité** diminue la zone active ultrasonore en absorbant l'onde (C'est-à-dire la viscosité dégrade l'énergie acoustique en chaleur). Donc le rôle de la viscosité est primordial dans la propagation de l'onde ultrasonore, et elle est en relation étroite avec l'amortissement de l'onde ultrasonore (**Wu et al., 2013**).

En résumé, plus la viscosité et la tension interfaciale sont élevées, plus les forces de cohésion sont importantes et plus la cavitation est difficile.

Dans l'extraction des substances à partir d'un échantillon quelconque l'interaction solvant/échantillon est un paramètre primordial. En général, le choix de solvant est basé sur l'affinité moléculaire entre le solvant et le soluté.

Selon **Rochebrochard d'Auzay et al. (2010)** la hauteur de solvant dans le réacteur d'extraction ainsi que la géométrie de réacteur influent les effets sono chimiques produits, selon les réflexions des ondes ultrasonores sur les parois.

Dans les cas des matrices sèches les ultrasons peuvent être utilisés pour faciliter le gonflement et l'hydratation, et causer l'élargissement des pores de la paroi cellulaire (**Vinatoru, 2001**).

Aussi la désintégration par ultrasons réduit la taille des particules ce qui augmente la quantité des particules exposées à l'extraction par solvant et par la cavitation ultrasonore (**Vinatoru, 2001**).

L'EAM et l'EAU sont des méthodes simples en manipulation, cependant chaque technique a ses avantages et inconvénients. Le **tableau 4** résume les différences entre l'EAM et EAU.

**Tableau 4:** Présentation des techniques d'EAM et EAU, avec leur principe, avantages et inconvénients.

Méthode	Matériel	Principe	Avantages	Inconvénients
EAM	Four micro-onde	Destruction de solide par la conduction ionique et la rotation dipolaire (énergie de micro-onde)	- Simple - peu coûteux -Utilisant moins de solvant -Rendement élevé -Temps réduit	- Engendre des températures élevées -Rendement faible pour les solutés ou les solvants apolaires
EAU	Bain à ultrasons Sonde Ultrasonore combinée à un agitateur	Destruction de la paroi cellulaire par la cavitation ultrasonore	-Simple, efficace -Peu coûteux -Rendement élevé -Temps réduit -Température basse	- Mise au point plus complexe

Nous avons effectué cette étude bibliographique afin d'évaluer l'état de l'art concernant les domaines couverts par notre étude: les étoiles de mer et leurs substances actives et les techniques d'extraction des biomolécules.

Cette recherche nous a démontré d'une part, l'intérêt des étoiles de mer étudiées *E. sepositus* et *O.ophidianus* comme source potentielle de métabolites secondaires (saponines et caroténoïdes) à grand intérêt biologique et pharmacologique. Et d'autre part, l'intérêt de l'application des méthodes innovantes dans l'investigation des biomolécules.

Elle nous a aidé à choisir deux méthodes simples, efficaces, et largement utilisées pour l'extraction des saponines et des caroténoïdes à partir des étoiles de mer étudiées à savoir l'EAM et l'EAU.

# *Partie II*

## *Matériels et Méthodes*

## I. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans notre recherche est les Astéridae "étoiles de mer". Les astéries représentent une source inépuisable de composés naturels structurellement uniques et aux vertus pharmaceutiques inégalées.

Deux espèces ont été étudiées dans notre travail à savoir: *E. sepositus* et *O. ophidianus*.

### I.1. Récolte du matériel biologique

Les individus des étoiles de mer (*E. sepositus* et *O. ophidianus*) étudiés provenaient d'une récolte faite en plongée sous-marine dans la baie d'Alger entre 5 à 10 m de profondeur. Des prélèvements mensuels ont été réalisés de septembre 2017 à septembre 2018.

Les espèces récoltées ont été identifiées par l'étude de la morphologie externe. La validation de la position taxonomique est effectuée par l'utilisation de bases de données taxonomiques standardisées: le Registre Européen des Espèces Marines (**European Register of Marine Species: ERMS**) et le Registre Mondial des Espèces Marines (**World Register of Marine Species: WORMS**).

### I.2. Localisation de station d'échantillonnage

Les espèces étudiées provenaient d'une récolte faite en plongée sous-marine dans la baie d'Alger au niveau de la pointe Pescade (3°1 de longitude Est et 36° 49 de latitude Nord). (**Fig.16**).

La baie d'Alger s'inscrit dans la partie centrale de la côte algérienne (région d'Alger) qui regroupe d'autres baies, la baie de l'El Djamilia et la baie de Bou Ismail. Elle s'étend de cap Matifou (Bordj El- Bahri), à l'Est, à la pointe Pescade (Rais Hamidou), à l'Ouest, sur une superficie de 180 Km<sup>2</sup>. Elle est délimitée au Nord par la mer Méditerranée (avec une longitude Est 03°.14'.50 à 03°.00'.40 et une latitude Nord 36°.49'.35 à 36°.49'.50) et au Sud par la plaine de la Mitidja (**Fig. 16**).

Le choix de cette station tient compte de ses caractéristiques, un site exposé aux houles et aux vents des secteurs Nord-Ouest et Nord-Est, mais protégé naturellement par les deux îlots de pointe Pescade (formées d'une petite crique). Ce qui facilite le prélèvement et l'échantillonnage.

**La figure 16** renseigne sur la localisation du site qui a fait l'objet de la présente étude.

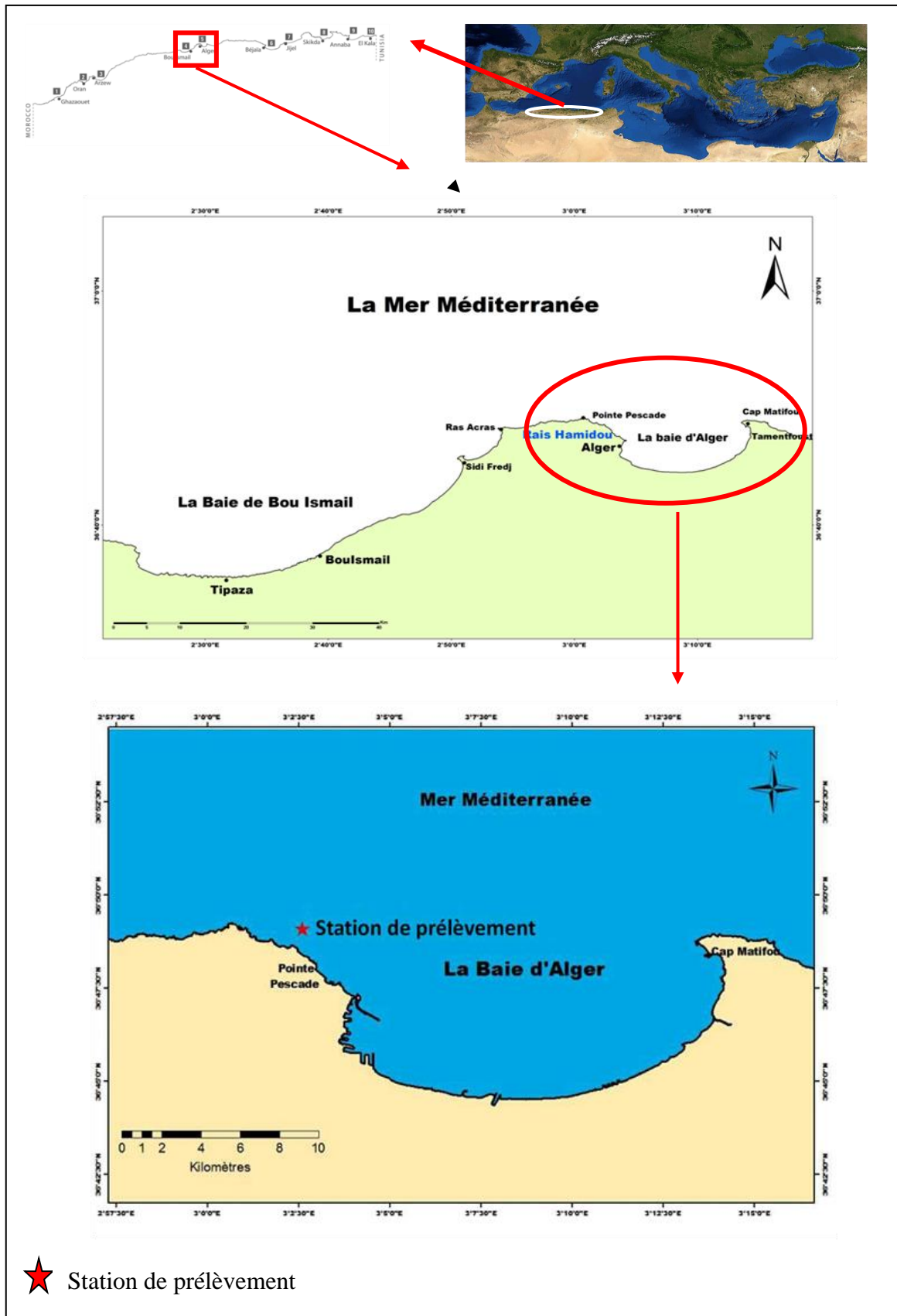


Figure 16: Localisation de la station de prélèvement.

## II. Extraction des substances actives

À côté des métabolites primaires, les étoiles de mer accumulent des métabolites dits secondaires qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines différents, à savoir la pharmacologie, l'industrie... (**Hostettmann et Martson, 1995 et Cheeke, 2000**). Ceci est le cas des saponines et des caroténoïdes.

L'objectif de ce travail est d'étudier et d'optimiser les procédés d'extraction des saponines et des caroténoïdes à partir de deux Echinodermes astéroïdae de la marge algérienne *E. seposistus* et *O. ophidianus*.

Cette partie de thèse est consacrée à la présentation de l'ensemble du matériel et des protocoles expérimentaux utilisés afin de réaliser l'extraction des substances étudiées.

Dans un premier temps nous présentons les méthodes de traitement des étoiles de mer pour obtenir les matières premières qui ont servi de support à l'étude.

Dans un deuxième temps nous décrivons les outils et le matériel d'extraction (micro-onde et ultrason). Et par la suite, nous présentons brièvement les techniques d'extractions utilisées (Extraction Assistée par Micro-onde: EAM et l'Extraction Assisté par Ultrason: EAU) pour les deux composés étudiés (saponines et caroténoïdes). La description détaillée des procédés d'extraction est donnée dans la partie synthèse bibliographique.

Nous présentons aussi dans cette partie l'approche adoptée pour optimiser chaque procédé d'extraction. Il s'agit en premier lieu de réaliser une étude préliminaire des paramètres expérimentaux afin de sélectionner pour chaque paramètre son domaine de variation.

Puis, en deuxième lieu il s'agit de définir les combinaisons des différents paramètres expérimentaux adoptés, en les faisant varier dans le domaine de variation déjà défini, au moyen des plans d'expériences.

Les étapes de purification pour obtenir les saponines et les caroténoïdes sont aussi décrites dans cette partie.

### II.1. Traitement des échantillons, dissection et extraction

Pour chaque prélèvement, les étoiles de mer récoltées ont été identifiées, des mensurations ainsi que des observations sont effectuées.

- **Mensurations et pesées**

Des mensurations sont effectuées sur chaque individu à l'aide d'une règle graduée, d'une part. D'autre part, une mesure pondérale est effectuée pour chaque individu pour relever le poids du corps ( $P_{cps}$ ).

Les valeurs sont notées sur des fiches établies au préalable.

Les principales mesures retenues sont définies de la manière suivante:

- **R**: La longueur des bras comptée depuis la bouche juste à l'extrémité des bras;
- **r**: Le rayon du disque central;
- Le rapport **R/r** est calculé.

- **Dissection**

En vue de réaliser les extractions, les individus d'*E. sepositus* sont disséqués et cinq de leurs compartiments corporels sont isolés: les cæca pyloriques (CAE), les gonades (GON), le tégument oral (TEG ORL) et le tégument aboral (TEG ABO) et l'estomac (EST).

Pour *O. ophidianus* l'extraction a été réalisée à partir du corps entier de l'animal.

Pour disséquer une étoile de mer on procède comme suit: l'animal est découpé à l'aide de ciseaux en commençant par une petite partie de l'extrémité de chaque bras, on incise ensuite le tégument en prenant soin de suivre le contour des bras de façon à séparer la face aborale (la partie supérieure) de la face orale (la partie inférieure). Après cela on soulève le tégument en partant de l'extrémité des bras et à l'aide d'une lame on décolle délicatement les organes sous-jacents en terminant par le disque central, la suite de la dissection se fait dans un bac rempli à ras bord d'eau de mer. On peut alors observer sur la partie aborale l'appareil digestif de l'animal d'où on commence par prélever les cæca pyloriques qui se décollent assez facilement suivi de l'estomac aboral. Après avoir totalement prélevé ces derniers on passe à la face orale qui contient notamment les gonades et l'estomac cardiaque qu'on prélève chacun séparément.

Les deux faces aborale et orale sont ensuite parfaitement nettoyées à l'eau distillée. Chaque organe récupéré (les cæca pyloriques, les gonades le tégument oral et le tégument aboral et l'estomac) est pesé puis conservé à  $-4^{\circ}\text{C}$  dans des flacons préalablement étiquetés.

Le sexe d'*E. sepositus* est déterminé après dissection et isolement des gonades. La couleur des gonades est l'un des caractères macroscopiques de détermination de sexe, selon **Riesgo et al. (2011)** la couleur des gonades est rouge brique chez les femelles et elle est jaune chez les mâles.

Nous cherchons dans le cadre de ce travail à mettre en relation les variations quantitatives et qualitatives de saponines chez *E. sepositus* avec le stade de maturité sexuelle de cette étoile de

mer. De ce fait, le rapport gonado-somatique (**RGS**) est déterminé. Le RGS reflète l'évolution pondérale des gonades qui caractérise le développement des gonades et le stade de maturité sexuelle des individus. Cet indice pondéral est calculé mensuellement pour chaque individu selon la formule suivante:

$$\text{RGS}(\%) = \frac{\text{pgo (g)}}{\text{pt(g)}} * 100\% \quad (03)$$

Avec:

pgo: poids des gonades (g);

pt: poids totale de l'individu (g).

#### • Préparation des échantillons

La préparation des échantillons est étape cruciale il doit prendre en considération les méthodes d'extraction et les molécules d'intérêt. Dans notre étude la lyophilisation est adoptée.

Avant de procéder à l'extraction les étoiles de mer ainsi que les différents compartiments anatomiques ont été lyophilisés. Le lyophilisat obtenu est pesé puis stocké dans des tubes étanches jusqu'à l'utilisation.

Les lyophilisats de corps entiers d'*E. sepositus*, d'*O. ophidianus* sont réalisés afin d'extraire les substances d'intérêts (saponines et caroténoïdes).

#### • Extraction

Dans notre recherche l'extraction est réalisée en deux étapes principales, ces étapes sont identiques quelle que soit la procédure d'extraction (EAM, EAU, EC):

- Dans un premier temps on procède à l'extraction d'un mélange brut riche en composés bioactifs. La procédure générale de cette étape consiste à mélanger une quantité de la poudre lyophilisée (1g) avec un volume équivalent de solvant d'extraction pendant un certain temps (les valeurs des paramètres expérimentaux diffèrent selon les procédures d'extraction et l'expérience en cours pour chaque procédure (voir **Tab. 6 et Tab. 7** dans *la partie II.3.1* **Tab 8** pour l'EAM et **Tab 9** pour l'EAU dans *la partie II.3.2*);

Les extraits obtenus sont filtrés à l'aide de papier filtre Wattman N°1 monté sur un Buchner et relié à une pompe à vide. Les filtrats sont ensuite évaporés pour fournir des extraits bruts riches en substances actives. L'évaporation de solvant d'extraction est menée au moyen de rota-évaporateur (du type STUART® ROYAUMES UNIS) à basse pression dans un bain-marie à 30°C jusqu'à l'évaporation de méthanol.

Les basses pressions permettent d'évaporer le solvant à des faibles températures évitant ainsi la dégradation des composés thermosensibles;

- Puis dans second temps on procède l'isolement des saponines et des caroténoïdes par plusieurs étapes de purification de l'extrait brut (voir *partie II.4.1.* et *II.4.2.*)

## II.2. Procédures d'extraction

Outre les procédés conventionnels d'extraction, d'autres procédés non conventionnels peuvent être appliqués pour l'extraction des substances actives des Astéroïdæ à savoir l'extraction assistée par micro-onde (EAM), et l'extraction par ultrason (EAU). Ces méthodes sont caractérisées par un temps d'extraction limité et une consommation réduite en solvants nocifs et en énergie. De ce fait, l'un des objectifs de notre recherche est l'application de ces processus dans l'extraction des saponines et des caroténoïdes des étoiles de mer étudiées afin de maximiser les rendements d'extraction.

### II.2.1. Extraction assistée par micro-ondes (EAM)

L'EAM est réalisée au moyen d'un four micro-onde multi-mode (NN-S674MF, Samsung, Malaysia) dont les caractéristiques sont les suivantes:

- Fréquence de 2450kHz;
- Puissance de sortie maximale de 1000W avec une incrémentation de 100;
- Dimension de la cavité de chauffage est de (22,5 cm × 37,5 cm × 38,6 cm).

Le principe d'EAM est relativement simple, il consiste à placer le matériel biologique dans un ballon placé à l'intérieur de l'enceinte microonde en ajoutant un solvant organique ou non.

Le chauffage de solvant par l'énergie des micro-ondes conduit au chauffage de la matrice biologique par conduction.

Ce chauffage provoque l'expansion et la rupture des parois cellulaires libérant ainsi des molécules à extraire dans le solvant (**Spar Eskilsson et Bjorklund, 2000**).

Le système de refroidissement à l'extérieur du four microonde permet la condensation de solvant et son retour d'une façon continue à l'intérieur du ballon.

Afin de réaliser l'extraction par micro-onde 1 g de la matière première (poudre lyophilisée des étoiles de mer) est placé dans un ballon fond plat, puis un volume équivalent de solvant d'extraction est additionné. Le ballon est positionné dans la cavité du four de micro-onde et le mélange est irradié par une certaine puissance et pendant un certain temps suivant les conditions opératoires d'EAM reportés dans le **tableau 9** pour l'étude préliminaire et le **tableau 21** pour l'optimisation de l'EAM.

L'extrait obtenu est filtré à l'aide d'un papier filtre Wattman n° 1 monté sur un buchner relié à une pompe à vide, puis roto-évaporé pour éliminer le solvant. Le résidu récupéré est pesé pour

quantifier la masse d'extrait brut. Les résidus sont traités afin d'isoler les saponines et les caroténoïdes selon la procédure d'écrite dans *la partie II.4.1* et *II.4. 2*, respectivement.

### **II.2.2. Extraction assistée par ultrasons (EAU)**

L'extraction assistée par ultrasons est réalisée au moyen d'un bain à sonication du type SELECTA caractérisé par une fréquence de 50/60 Hz et une puissance de 195 W.

Le concept général d'extraction assistée par ultrasons repose sur les effets mécaniques des ultrasons qui améliorent le transfert de masse en induisant une plus grande pénétration du solvant dans les matériaux cellulaires. Les ultrasons peuvent également faciliter la libération de contenu circulaire en provoquant des perturbations au niveau des parois. Par Conséquent, deux facteurs principaux déterminent la performance de l'extraction assistée par ultrasons : le transfert de masse et l'efficacité de rupture des cellules (**Mason et Paniwnyk, 1996**).

Pour réaliser l'EAU 1g d'échantillon est pesé puis mis dans un flacon opaque de 150 ml, un volume de solvant est introduit dans le flacon. Et l'ensemble est placé dans le bain à sonication. Une fois le temps d'extraction est écoulé l'extrait obtenu est traité selon la procédure décrite dans *la partie II.4*.

La concentration de solvant, le temps de sonication, et le ratio liquide de chaque expérience réalisée sont mentionnés dans les tableaux 10 pour l'étude préliminaire et le **tableau 32** pour l'optimisation de l'extraction.

### **II.2.3. Extraction conventionnelle (EC)**

Afin de comparer les résultats d'AEU et d'EAM avec la procédure conventionnelle une extraction sous agitation magnétique a été mené pendant 24 h à température ambiante en introduisant 1 g de lyophilisat de l'étoile de mer dans 50 ml de MeOH à 70%.

L'extrait obtenu est analysé comme décrit dans *la partie II.4*.

L'extraction par agitation est réalisée en utilisant un couplage entre un agitateur magnétique et un réceptacle contenant la matrice brute. Le principe de la méthode repose sur un mélange mécanique du solvant avec la matrice pendant un certain temps, cette agitation impose un temps de repos avant la filtration.

Les extraits de saponines et de caroténoïdes obtenus par les différentes méthodes d'extraction ont été comparés d'une manière quantitative.

Afin d'étudier l'influence des micro-ondes, des ultrasons et de la macération sur la microstructure de lyophilisat des étoiles de mer des observations au Microscope Electronique à Balayage (MEB) ont été effectués avant et après les différents processus d'extraction.

Les échantillons d'étoiles de mer obtenus après traitement par micro-ondes, ultrason et macération ont été lyophilisés afin d'éliminer toute trace d'eau, puis analysés par Microscopie Électronique à Balayage de type (JEOL JSM-7100F, détecteur EDS Oxford institue 50 mm<sup>2</sup>). Les conditions opératoires d'analyse sont les suivantes: Sous vide d'air; Tension d'accélération: 15 kV; Taille du spot: 5; Distance de travail : 15 mm.

### II.3. Conception de travaux expérimentaux et modélisation statistique

Dans notre étude les plans d'expériences ont été utilisés pour optimiser l'extraction.

L'optimisation par plan d'expérience nécessite une définition précise de certains paramètres:

- La réponse qui décrit l'extraction: rendement, pics...etc
- L'objectif d'étude: minimiser ou maximiser la réponse;
- Les facteurs qui peuvent influencer la réponse (nommé aussi paramètres expérimentaux ou variables indépendantes);
- Les niveaux (ou intervalle) des facteurs qui sont la limite supérieure et inférieure des facteurs.

Les niveaux de facteurs peuvent être choisis en fonction de la littérature ou de résultats préliminaire. Dans notre étude le plan Box et Behnken (BBD) est adopté pour optimiser l'EAM et l'EAU. Les niveaux des facteurs de ce plan ont été sélectionnés à base d'une étude préliminaire.

#### II.3.1. Étude préliminaire

Cette partie est consacrée à l'étude des paramètres expérimentaux séparément afin de déterminer l'intervalle approprié de chaque paramètre dans le plan d'expérience.

Les paramètres expérimentaux étudiés sont les suivants:

**Dans le cas d'extraction assistée par micro-onde:** % de solvant, le temps, la puissance et le ratio liquide-solide qui sont désignés par X1, X2, X3 et X4 respectivement.

**Dans le cas d'extraction assistée par ultrasons les variables indépendantes sont:** % de solvant (X1), le temps (X2), le ratio liquide-solide (X3).

Chacun de ces paramètres est étudié pour optimiser une réponse qu'est la teneur des saponines.

Dans cette étude la procédure expérimentale suivie consiste à faire varier un paramètre expérimentale en maintenant fixes tous les autres paramètres.

#### a. Le choix de la nature et de la concentration de solvant d'extraction

Dans les procédés d'extraction des substances naturelles le choix du solvant est une étape primordiale, car elle permet de sélectionner le solvant qui assure une meilleure diffusion à travers la matrice solide et qui possède une meilleure capacité de mise en solution du soluté à extraire. En effet, un solvant d'extraction efficace doit posséder une faible viscosité, une masse volumique peu élevée, une grande capacité de dissolution, une faible température d'ébullition et si possible il doit être non toxique, inflammable et non explosif.

Pour étudier l'effet de type de solvant sur l'EAM et EAU des saponines d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus* trois solvants ont été testés: le méthanol 70%, l'éthanol 70% et l'eau.

Les autres conditions opératoires pour l'EAM et l'EAU sont résumées dans le tableau suivant:

**Tableau 5:** Conditions opératoires pour le choix de la nature de solvant.

L'extraction Assistée Micro-ondes (EAM)			Extraction Assistée Ultrasons EAU	
<u>Ratio (mL.g<sup>-1</sup>)</u>	<u>Puissance (W)</u>	<u>temps (min)</u>	<u>Ratio (mL.g<sup>-1</sup>)</u>	<u>temps (min)</u>
20/1	200	5	40	30

Le meilleur solvant a été choisi sur la base du résultat de la teneur la plus élevée en saponine (exprimée en mg.g<sup>-1</sup> de poudre sec).

Pour les deux méthodes d'extraction (EAM et EAU) le meilleur solvant est testé à différentes proportions volumiques solvant-eau (v/v) afin de sélectionner la concentration adéquate pour l'extraction.

Les concentrations testées sont: 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% et 90%.

La concentration qui donne la teneur la plus élevée en saponines est choisie pour le reste des essais préliminaires.

#### b. Ratio liquide-solide

Après avoir fixé la concentration de solvant, l'effet de volume de solvant est évalué pour les deux procédés d'extraction en fixant la masse de solide (1g) et en variant le volume liquide, c'est ainsi qu'on définit le ratio liquide-solide (mL.g<sup>-1</sup>).

Le ratio liquide-solide est un paramètre important, car il détermine le gradient de concentration de solvant. En effet, plus le volume est important plus le gradient de concentration est important.

Les ratios utilisés dans notre étude sont les suivants: 10/1, 20/1, 30/1, 40/1, 50/1. Le meilleur ratio est défini sur la base de la quantité la plus élevée des saponines.

#### **c. La puissance (EAM)**

Pour l'extraction assistée par micro-onde l'impact de puissance est étudié en variant la puissance de 100% à 500% (100%, 200%, 300%, 400%, 500%). Dans cette étape les deux paramètres précédents concentration et volumes de solvant ont été fixés.

#### **d. Mode de pulsation (EAU)**

Le choix de la vitesse d'extraction ou de cycle de pulsation (continue ou discontinue) est important dans l'EAU, car ce facteur affecte les bulles de cavitation.

Dans notre travail, en fixant les paramètres précédents, l'extraction est réalisée en utilisant deux modes de pulsation: 10min en discontinu (pulsation=60 Sec, OFF=60 Sec et pulsation=30 Sec, OFF=30 Sec) et 10min en continu.

#### **e. Le temps**

Le temps d'extraction est un paramètre principal dans les procédures d'extraction des substances naturelle.

Pour l'extraction l'EAM la gamme de temps est la suivante: 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 6 min, 8 min). Les autres conditions opératoires (concentration de solvant, ratio et la puissance) opératoires ont été fixées en se basant sur les résultats des essais précédents.

Dans le cas d'EAU la cinétique d'extraction est étudiée en utilisant la concentration et le volume de solvant qui donne la teneur la plus élevée des saponines. La gamme de temps étudiée varie entre 5 et 35 minutes avec un intervalle de 5 minutes.

**Les tableaux 6 et 7** Récapitulent les conditions opératoires pour l'ensemble de l'étude préliminaire.

**Tableau 6:** Conditions opératoires de l'étude préliminaire de l'extraction assistée par micro-ondes.

Effet de la concentration de MeOH				Effet de ratio				Effet de puissance				Effet de temps			
MeOH*	Ratio	Puissance	Temps	MeOH	Ratio*	Puissance	Temps	MeOH	Ratio	Puissance*	Temps	MeOH	Ratio	Puissance	Temps*
%	mL.g <sup>-1</sup>	% W	Min	%	mL.g <sup>-1</sup>	% W	min	%	mL.g <sup>-1</sup>	% W	min	%	mL.g <sup>-1</sup>	% W	min
20	20	200	5	50	10	200	5	50	40	100	5	50	40	200	1
30	20	200	5	50	20	200	5	50	40	200 <sup>a</sup>	5	50	40	200	2
40	20	200	5	50	30	200	5	50	40	300	5	50	40	200	3 <sup>a</sup>
50 <sup>a</sup>	20	200	5	50	40 <sup>a</sup>	200	5	50	40	400	5	50	40	200	4
60	20	200	5	50	50	200	5	50	40	500	5	50	40	200	5
70	20	200	5									50	40	200	6
80	20	200	5									50	40	200	8
90	20	200	5												

**Tableau 7:** Conditions opératoires de l'étude préliminaire de l'extraction assistée par ultrasons.

Effet de la concentration de MeOH			Effet de ratio			Effet de temps		
MeOH*	Ratio	Temps	MeOH	Ratio*	Temps	MeOH	Ratio	Temps*
%	mL.g <sup>-1</sup>	min	%	mL.g <sup>-1</sup>	min	%	mL.g <sup>-1</sup>	min
20	40	30	70	10	30	70	40	5
30	40	30	70	20	30	70	40	10
40	40	30	70	30	30	70	40	15
50	40	30	70	40 <sup>a</sup>	30	70	40	20
60	40	30	70	10	30	70	40	25 <sup>a</sup>
70 <sup>a</sup>	40	33						30
80	40	33						35
90	40	30						

\* : le paramètre qui varie.

<sup>a</sup> : l'optimum de l'étude préliminaire.

### II.3.2. Application de plan d'expérience pour l'optimisation de l'extraction

Les plans d'expériences aboutissent à l'optimisation et la modélisation mathématique des procédés d'extraction en faisant varier simultanément plusieurs paramètres expérimentaux. De ce fait, l'utilisation des plans d'expérience est de grand intérêt dans l'étude des procédés d'extraction en vue d'aboutir à des lois de types empiriques.

Les résultats obtenus par le plan d'expérience permettent une meilleure compréhension du procédé. Le modèle mathématique obtenu permet de décrire le procédé d'extraction, de définir les paramètres qui caractérisent ce procédé, d'expliquer l'interaction de ces paramètres, de définir les conditions optimales d'extraction et de prévoir les résultats de futures investigations.

La méthode choisie pour optimiser et modéliser les paramètres opératoires d'EAM et d'EAU est la **Méthodologie de Surface de Réponse (SMR)** basée sur le **plan Box et Behnken (BBD)** de trois niveaux.

Les plans Box et Behnken ont été proposés pour la première fois en 1960. Ils sont faciles à mettre en œuvre et présentent les propriétés suivantes (**Goupy et Creighton, 2001**):

- Tous les facteurs ont trois niveaux: **-1** (limite inférieure), **0** (point central), et **+1** (limite supérieure);
- Les facteurs possèdent la propriété de séquentialité. En effet, on peut étudier les premiers facteurs tout en réservant la possibilité d'en ajouter de nouveaux sans perdre les résultats des essais.

Afin de définir le modèle mathématique qui prévoit les réponses investiguées, le nombre des expériences à réaliser, dans les plans de surface de réponse, est exprimé par la formule suivante:

$$N = 2k(k - 1) + C_p \quad (4)$$

**Avec:**

**N** : le nombre des expériences;

**K** : le nombre de facteurs (variables indépendantes);

**C<sub>p</sub>** : le nombre des points centraux.

Dans notre étude et dans le cas d'EAM le plan de **Box et Behnken est un plan à quatre variables et trois niveaux**. Donc le nombre de points expérimentaux est:  $2*4*(4-1)+3= 27$  (**Tab. 8**).

**Tableau 8:** Conditions opératoires de l'EAM dans le cadre de plan d'expérience.

	Variables indépendantes			
	<u>MeOH (%)</u>	<u>Temps min</u>	<u>Puissance (W)</u>	<u>Ratio (mL.g<sup>-1</sup>)</u>
1	30	1	200	35
2	70	1	200	35
3	30	5	200	35
4	70	5	200	35
5	50	3	100	20
6	50	3	300	20
7	50	3	100	50
8	50	3	300	50
9	30	3	200	20
10	70	3	200	20
11	30	3	200	50
12	70	3	200	50
13	50	1	100	35
14	50	5	100	35
15	50	1	300	35
16	50	5	300	35
17	30	3	100	35
18	70	3	100	35
19	30	3	300	35
20	70	3	300	35
21	50	1	200	20
22	50	5	200	20
23	50	1	200	50
24	50	5	200	50
25	50	3	200	35
26	50	3	200	35
27	50	3	200	35

Dans le cas d'extraction assistée par ultrasons le plan de **Box et Behnken est un plan à trois variables et trois niveaux**. Donc le nombre de points expérimentaux est:

$2*3*(3-1)+3=15$  (**Tab.9**).

**Tableau 9:** Conditions opératoires de l'EAU dans le cadre de plan d'expérience.

	Variables indépendantes		
	<u>MeOH (%)</u>	<u>Temps (min)</u>	<u>Ratio (mL.g<sup>-1</sup>)</u>
1	30	10	35
2	70	10	35
3	30	30	35
4	70	30	35
5	30	20	20
6	70	20	20
7	30	20	50
8	70	20	50
9	50	10	20
10	50	30	20
11	50	10	50
12	50	30	50
13	50	20	35
14	50	20	35
15	50	20	35

L'ensemble de ces paramètres ont été étudiée pour optimiser deux réponses: la teneur des saponines et la teneur des caroténoïdes.

Dans le cas des plans de surface de réponse les résultats (les réponses étudiées) sont modélisés sous forme d'une équation polynomiale du second degré à plusieurs facteurs avec interactions d'ordre 2 (**Goupy, 2001**):

$$Y = B_0 + \sum_{i=2}^K B_i X_i + \sum_{i=1}^K B_{ii} X_i^2 + \sum_{i>1}^K B_{ij} X_i X_j + E \quad (5)$$

Avec:

$Y$ : représente la réponse étudiée (dans notre cas, teneur des saponines et des caroténoïdes);

$X_i$  et  $X_j$ : facteurs;

$B_0$ : coefficient constant;

$B_i$ : coefficient des limites linéaires;

$B_{ii}$ : coefficient des limites quadratiques;

$B_{ij}$ : coefficients des limites interactives;

$X_i, X_j$ : Variables indépendantes codés;

$E$ : erreur expérimentale.

Dans notre étude les niveaux inférieurs et supérieurs des variables indépendantes influençant l'expérimentation sont déterminés par l'étude préliminaire.

Les facteurs sont codés comme suit -1, 0 et +1, les codes représentent respectivement la limite inférieure, le point central, et la limite supérieure. Les variables indépendantes  $X_i$  et  $X_j$  sont alors codées selon l'équation suivante:

$$xi = \frac{Xi - X_0}{\Delta X} \quad (6).$$

Avec  $x_i$  valeur codé de la variable  $X_i$ ,  $X_0$  c'est la valeur de  $X$  au point central et  $\Delta X$  représente la valeur de pas de changement.

**Les tableaux 10 et 11** indiquent les niveaux de facteur pour chaque variable indépendante.

**Tableau 10:** Variables indépendantes et les niveaux des facteurs influençant sur l'extraction assistée par micro-ondes.

Niveau de facteur	Variables indépendantes			
	% MeOH	Ratio (mL.g <sup>-1</sup> )	Puissance	Temps (min)
-1	30	20	100	1
0	50	35	200	3
+1	70	50	300	5

**Tableau 11:** Variables indépendantes et les niveaux des facteurs influençant sur l'extraction assistée par ultrasons.

Niveau de Facteur	Variables indépendantes		
	%Me OH	Ratio (mL.g <sup>-1</sup> )	Temps (min)
-1	30	20	10
0	50	35	20
+1	70	50	30

Les coefficients des limites linéaires, quadratiques et interactives ont été déterminés selon les résultats de l'analyse de la variance.

Le modèle mathématique obtenu par un plan d'expérience est simplifié par élimination des effets jugés non significatifs dans l'analyse de la variance ce qui permet de réduire l'équation et de la manipuler facilement, tout en gardant une qualité d'ajustement quasiment similaire (**Tinsson, 2010**).

Les régressions des coefficients déterminés sont illustrées sous forme des surfaces de réponses en 3D afin d'évaluer l'effet interactif des variables indépendantes.

Pour valider les modèles obtenus des essais expérimentaux ont été réalisés dans les conditions optimales et les résultats obtenus sont comparés avec les valeurs prédites de modèles de régression.

### II.3.3. Analyse statistique des données

Dans notre travail toutes les expériences ont été effectuées trois fois. La répétition des essais a permis de s'assurer de ne pas être en présence d'une valeur extrême. En présence d'une valeur suspecte, l'essai est réalisé de nouveau et la valeur suspecte est écartée.

Les résultats sont des valeurs moyennes des 03 essais et sont exprimés en moyenne ( $\pm$  SD). L'analyse des effets des facteurs est réalisée par une étude statistique de la variance par (ANOVA) selon le (Test de Tukey) dans un intervalle de confiance de 95 %.

Le logiciel Minitab (Version.17) a été utilisé pour construire le plan d'expérience de (BBD) pour l'analyse de tous les résultats ou réponse obtenus.

Dans les plans d'expériences, afin d'avoir une bonne réponse et un modèle pertinent plusieurs conditions doivent être vérifiées:

- Les P values issues de l'analyse de la régression du modèle doivent être inférieurs à 0,05 ( $P < 0,05$ ). Si P-value  $< 0,05$  le modèle est significatif, et si P-value  $< 0,001$  le modèle est très significatif (**Fei et al., 2010**);
- Le P-value de manque d'ajustement (lack -of- fit) doit être supérieur à 0,05 (ne doit pas être significatif), dans le cas où le P-value de manque d'ajustement est significatif le modèle sera rejeté (**Granato et al., 2010**);
- L'efficacité d'ajustement globale est exprimée par le coefficient de corrélation  $R^2$  qui doit être élevé (**Chan et al., 2009**);
- La valeur du coefficient de détermination ajustée ( $R^2$  ajusté: valeur du  $R^2$  après élimination des coefficients inutiles du modèle) confirme la haute significativité du modèle si elle est élevée;
- Si la valeur de  $R^2$  ajusté est très inférieure à celle de  $R^2$  le modèle contient beaucoup de termes non significatifs (**El-Adawi et al., 2011**).

### II.4. Purification des extraits

La procédure de purification décrite dans cette partie est appliquée à tous les extraits bruts obtenus par les différentes méthodes d'extraction.

Avant de procéder à la purification, l'extrait brut est re-dissout dans 20 ml de méthanol 90 %, pour obtenir un extrait méthanolique (90:10).

### II.4.1. Isolement des saponines

Cette purification est basée sur les protocoles décrits par **Demeyer et al., 2014; Van Dyck et al., 2009 et Lide, 2009** pour obtenir des saponines à partir d'un extrait méthanolique.

Selon ces auteurs les étapes de purification peuvent être décrites comme suit:

#### a- Purification par extraction liquide-liquide

Dans cette étape trois extractions liquide-liquide sont réalisées au départ de l'extrait méthanolique en augmentant à chaque fois la polarité du solvant d'extraction (n-hexane 0,09 D, dichlorométhane 1,60 D, chloroforme 1,04 D). Les saponines restent dans le méthanol (1,70 D) pour chacune de ces extractions (**Lide, 2009**).

##### • *Première extraction liquide-liquide*

Afin d'éliminer les composés les moins polaires que les saponines et les composés apolaires le premier partitionnement est réalisé entre l'extrait méthanolique et le **n-hexane (v/v)**.

Le mélange (extrait méthanolique, n-hexane) est agité vigoureusement et laissé dans une ampoule à décanter pour permettre la séparation des phases. Une fois que les deux phases sont bien distinguées on les récupère.

- La phase inférieure (fraction méthanolique, **fraction A**) est utilisée pour l'isolement des saponines (**Fig. 17**).
- La phase supérieure (fraction hexanique, **fraction B**) est utilisée pour l'isolement des caroténoïdes (voir partie II.4.2) (**Fig. 17**).

Le volume de la fraction méthanolique est mesuré, puis l'extraction avec le n-hexane est répétée jusqu'à ce que la phase méthanolique inférieure devient incolore.

Le volume final de la fraction méthanolique (**A**) est ajusté à 20 % avec l'eau bi-distillée.

##### • *Deuxième extraction liquide-liquide*

Le deuxième partitionnement a été réalisé entre la fraction méthanolique (**A**) et le **dichlorométhane**. Dans cette nouvelle séparation densimétrique la phase méthanolique est récupérée et son volume est ajusté à 40% avec de l'eau bi-distillée.

##### • *Troisième extraction liquide-liquide*

La dernière séparation a été réalisée entre la solution méthanolique récupérée précédemment et le chloroforme. L'extrait méthanolique final récupéré est roto-éaporé, puis re-dissoute dans l'eau bi-distillée (extrait aqueux).

## b. Purification par chromatographie sur colonne

Cette phase de purification est réalisée sur une colonne de chromatographie (NS 12.5; 2.5 mm, lenz) contenant des billes d'amberlite XAD-4 préalablement conditionnées avec le méthanol et avec l'eau bi-distillée. Afin de procéder à la purification l'échantillon aqueux est déposé sur la colonne, puis il est lavé avec de l'eau bi-distillée pour éliminer les sels inorganiques et par du méthanol (100 %) pour décrocher les saponines des billes. La phase méthanolique recueillie est évaporée et dissoute dans l'eau bi-distillée.

## c. purification avec l'iso-butanol

Afin d'améliorer la pureté des saponines une extraction liquide-liquide avec de l'iso-butanol est réalisée. Au cours de ce partitionnement densitométrique les saponines migrent dans la phase isobutanolique que nous récupérons. L'iso butanol est évaporé et les résidus blancs récupérés forment des saponines brutes.

### II.4.1.1. Estimation de la teneur totale des saponines

Afin d'estimer la quantité des saponines totale, chaque extrait issu de la dernière extraction liquide-liquide avec l'iso-butanol est re-dissoute dans l'eau, puis lyophilisé dans des ballons à fond rond.

Les résultats concernant la quantité des saponines brutes extraites sont déterminés selon le Code des normes alimentaires (**Kwon et al., 2003**). En fait, des ballons à fond rond ont été séchés à 105 °C, refroidi dans un dessiccateur et pesés à poids constant avant la lyophilisation. Une fois la lyophilisation terminée, les flacons ont été pesés une seconde fois; la différence de poids correspond à la quantité totale de saponine dans l'échantillon ( $M_{ex}$  en mg).

Les résultats concernant la quantité des saponines extraites sont donnés sous forme de teneur de saponine totale par un gramme de matière lyophilisée de l'étoile de mer:

$$Q_{TS} \text{ (mg/g)} = \frac{M_{ex} \text{ (mg)}}{M_{mat-prem} \text{ (g)}} \quad (7)$$

Avec:

$Q_{TS}$  (mg/g): Quantité des saponines totales en mg/g de matrice sec;

$M_{ex}$ : Masse d'extrait de saponine;

$M_{mat-prem}$ : Masse de la matrice première (lyophilisat).

### a. Étude quantitative des saponines d'*E. sepositus*

À la suite de différentes expériences d'optimisation d'EAM et d'EAU, une méthode d'extraction robuste a été identifiée et utilisée pour extraire les saponines dans différents organes (CAE, GON, TEG ORL, TEG ABO et EST) des individus mâles et femelles d'*E. sepositus* collectés durant les quatre saisons de l'année (hiver, printemps, été et automne).

Cette approche a pour but d'étudier la variation quantitative des saponines de différents organes d'*E. sepositus* en fonction du sexe et de la saison, et de lier cette variation avec le stade de maturation de l'espèce.

### II.4.2. Isolement des caroténoïdes

Pour ce volet de l'étude, il est important de souligner que la **fraction B** issue de la première extraction liquide-liquide (entre extrait méthanolique est le n-hexane) est colorée dans le cas d'*E.sepositus* en rouge-jaunâtre, et dans le cas d'*O.ophidianus* en rouge-orangé. Cette coloration est due probablement à la présence des pigments caroténoïdes dans cette fraction. De ce fait, cette dernière est utilisée pour isoler les caroténoïdes selon la procédure décrite par **Machmudah et Goto (2013)** avec quelques modifications.

Les étapes de récupération des caroténoïdes sont les suivantes:

- Après avoir mesuré le volume de la fraction B, cette dernière est filtrée sur papier filtre Wattman N°42 montée sur un Buchner et reliée à une pompe à vide;
- Le filtrat est récupéré et le filtrant a fait objet d'une deuxième extraction avec n-hexane, cette extraction consiste à mélanger le filtrant avec un mélange de solvant acétone/n-hexane (v/v) (le volume de mélange de solvant est égal à 2 fois le volume de la fraction B initiale) pendant 15 minutes en utilisant un mélangeur antidéflagrant (de type rotor-stator L2/Air) pour dissoudre le filtrant pâteux dans le solvant;
- Une fois le temps d'extraction écoulé, le mélange est filtré une autre fois;
- L'opération d'extraction et de filtration sont répétées 3 fois ou plus (3 à 5 fois) jusqu'à ce que le filtrant devient incolore;
- Les filtrats récupérés de chaque extraction sont rassemblés et séchés à l'aide de sulfate de sodium Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, puis filtrés pour éliminer les particules de sel en suspension;
- Le filtrat récupéré est rota- évaporé à une température  $\leq 55$  °C, et les résidus obtenus sont récupérés et stockés dans des flacons opaques.

### II.4.2.1. Estimation de la teneur totale des caroténoïdes

La méthode généralement utilisée pour le dosage des caroténoïdes extraits d'une matrice naturel est basée sur la spectrophotométrie d'absorption visible.

La spectrophotométrie permet de mesurer l'absorbance d'un composé à une longueur d'onde donnée et d'estimer la concentration de ce composé en suivant la loi de Beer-Lambert:

$$A = \varepsilon * l * C \quad (8)$$

Avec :

**A** : absorbance à longueur d'onde du pic majeur;

**$\varepsilon$**  : le coefficient d'absorption (d'extinction) molaire en  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ , ou d'absorption en masse % ( $E^{1\%}_{cm}$  – absorbance d'une solution de 1 g.100 mL<sup>-1</sup>);

**C** : la concentration de la solution en (mol.L<sup>-1</sup>);

**l** : la largeur de cuve en cm.

Donc, la concentration des composés dans une solution est évaluée par l'absorption de la solution à une longueur d'onde  $\lambda$ . Elle dépend de coefficient d'extinction:

$$C(\text{mol/L}) = \frac{A}{\varepsilon \cdot l}$$

$$C(\text{mg/L}) = \frac{1000 \cdot A}{E^{1\%}_{cm}} \quad (9)$$

Le coefficient d'extinction molaire différent d'un caroténoïde à un autre. Dans le cas des caroténoïdes non identifiés (ou un mélange de caroténoïdes)  $E^{1\%}_{cm}$  a été supposé égal à 2500, et l'absorbance A est mesurée une longueur d'onde  $\lambda$  égale 450 nm (**Machmudah et Goto, 2013**).

Donc, la teneur des caroténoïdes totaux des étoiles de mer étudiées a été déterminée à l'aide de l'équation (8), avec  $E^{1\%}_{cm} = 2500$ , et A c'est l'absorbance à 450 nm.

Le schéma ci-après résume la procédure d'extraction des substances actives des étoiles de mer étudiées et montre les étapes de purification permettant de récupérer les saponines et les caroténoïdes (**Fig. 17**).

### II.4.3. Estimation de rendement total d'extraction

Le rendement total d'extraction présente la quantité d'extraits bruts obtenus après chaque procédés d'extraction avant de procéder aux différentes étapes de purification et d'isolement de saponines et de caroténoïdes (**Fig. 17**).

Il est estimé par la formule suivante:

$$\text{Rend}_T (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{M_{\text{ex brut}} (\text{mg})}{M_{\text{mat-prem}} (\text{g})} \quad (10)$$

Avec:

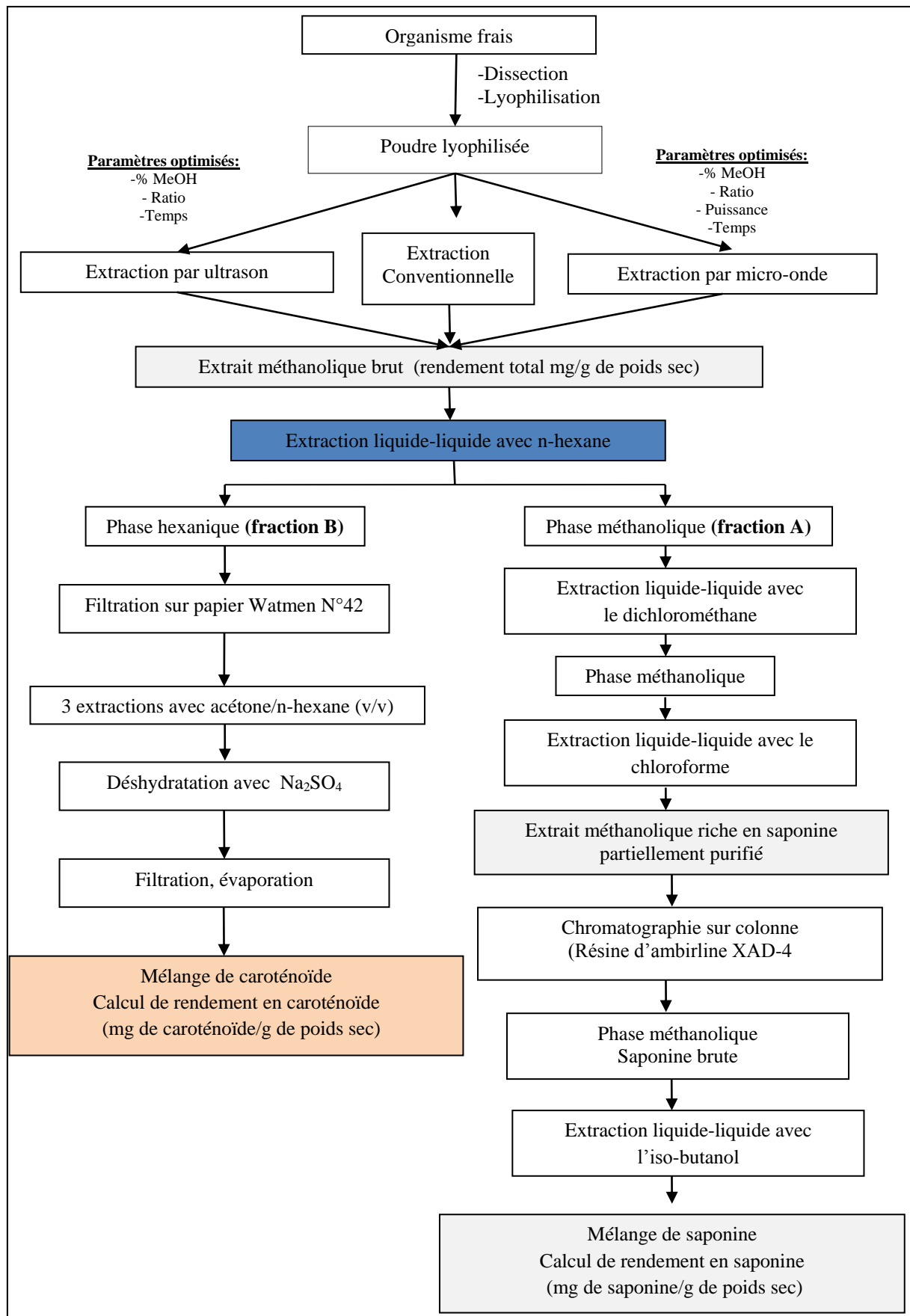
$\text{Rend}_T (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$ : Quantité d'extraits bruts en  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  de matrice sèche;

$M_{\text{ex}}$  : Masse d'extrait brut;

$M_{\text{mat-prem}}$ : Masse de la matrice primaire (lyophilisat).

Le rendement total d'extraction est estimé dans les conditions optimales d'EAM permettant d'optimiser simultanément les deux réponses (teneur des saponines et caroténoïdes) (**Tab. 40** dans *la partie II.3.de résultats et discussion*), afin d'exprimer les teneurs de saponines et caroténoïdes en pourcentage.

Le pourcentage des saponines et des caroténoïdes traduisant la quantité maximale des saponines et des caroténoïdes extraits à partir des étoiles de mer par EAM rapportée à la quantité totale d'extrait brute. Ce paramètre permet d'évaluer la performance d'EAM pour la récupération des saponines et des caroténoïdes.



**Figure 17:** Procédure générale d'extraction et d'isolement des saponines et des caroténoïdes.

### III. Activité biologique

Il existe plusieurs travaux s'étant intéressés aux activités biologiques des métabolites secondaires des étoiles de mer, notamment l'activité antioxydante (**Suguna et Bragadeeswaran, 2014 et Zhang et Wang *et al.*, 2013**) et l'activité hémolytique (**Lee *et al.*, 2013 et Ivanchina *et al.*, 2000**).

L'objectif de ce chapitre est de mesurer l'activité anti-oxydante des saponines et des caroténoïdes isolés à partir d'*E.sepositus* et d'*O.ophidianus*. De ce fait, nos extraits ont été soumis à une série d'expériences impliquant respectivement l'hémolyse (pour l'extrait de saponine), et la réduction de stress oxydatif pour les extraits des saponines et des caroténoïdes.

#### III.1. Activité anti-oxydante

Les méthodes les plus couramment utilisées pour évaluer le pouvoir antioxydant des molécules bioactives reposent sur la capacité de ces molécules à piéger les espèces radicalaires.

L'activité antioxydante des saponines des deux étoiles de mer étudiées a été évaluée *in vitro* selon trois méthodes, la première évalue le pouvoir antiradicalaire en mesurant le pourcentage de neutralisation de DPPH• (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl), la deuxième mesure le pourcentage de neutralisation du radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) électro généré par des tests électrochimiques (ces deux méthodes ont été également utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des caroténoïdes étudiée), et la troisième méthode consiste à évaluer la capacité de réduction de l'hémolyse oxydative induite par des initiateurs de radicaux libres ( $Cu^{2+}/H_2O_2$ ).

Les radicaux superoxydes ( $O_2^{\cdot-}$ ) et hydroxyles ( $OH^{\cdot}$ ) sont intéressants pour l'étude en raison de leur existence *in vivo* en tant qu'espèces réactives de l'oxygène (ERO), et de leur implication dans les processus dégénératifs des cellules. Leur piégeage est donc considéré comme une réaction importante permettant une évaluation plus précise des antioxydants naturels.

##### III.1.1. Effet *scavenger* du radical DPPH•

Ce test permet de mesurer le pouvoir réducteur des antioxydants par le calcul du pourcentage d'inhibition de diphényl picryl-hydrazine. Le DPPH• est un radical libre relativement stable de

couleur violette, l'intensité de cette couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu réactionnel à donner des protons (**Sanchez-Moreno, 2002**).

L'effet scavenger des saponines et des caroténoïdes étudiés sur le radical DPPH• est mesuré en utilisant la méthode de **Blanc et al., (2011)**. Brièvement, une solution de DPPH• d'une concentration de  $1.10^{-3}$  M a été préparée par la solubilisation de 19,7 mg de DPPH• dans 50 ml d'éthanol. Pour 2 mL d'extraits (de différentes concentrations), 150 µl de la solution de DPPH• ont été ajoutés. Après une incubation de 1h à obscurité, l'absorbance a été mesurée à 517 nm. Le pouvoir antiradicalaire de l'extrait est exprimé en pourcentage d'inhibition (% IP) du radical DPPH• par la formule suivante:

$$\text{Inhibition DPPH}(\%) = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs d'échantillon}}{\text{Abs control}} * 100 \quad (11)$$

L'éthanol absolu a été utilisé comme contrôle et la vitamine C, un antioxydant stable, a été utilisée comme contrôle positif.

La concentration des extraits qui inhibe 50% du DPPH• (IC50%) est déterminée à partir de la courbe qui représente les pourcentages d'inhibition en fonction la concentration de l'extrait.

### III.1.2. Effet *scavenger* de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$

Dans le présent travail, l'activité anti-oxydante des substances étudiées a été mesurée par des tests électrochimiques en utilisant le radical libre  $O_2^{\cdot-}$  électrogénéré à l'électrode. Cette méthode a été mise au point récemment à l'ISCR (Institut des Sciences Chimiques de Rennes, France) par **Bourvelec et al. (2008)** et appliquée à différents extraits végétaux (**René et al., 2010; Blanc et al., 2011; Brahmi et al., 2015 et Guendouze et al., 2015**). C'est la première fois qu'elle est appliquée à des extraits provenant du monde animal.

#### a. Principe des tests électrochimiques

Le principe de la méthode électrochimique repose sur la réactivité des molécules présentes dans l'extrait testé vis-à-vis du radical anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ .

Le radical  $O_2^{\cdot-}$  est électrogénéré à une électrode par la réduction de l'oxygène dissous dans un milieu aprotique. Dans ces conditions le système redox  $O_2/O_2^{\cdot-}$  est un système réversible et l'ajout des quantités croissantes de l'antioxydant conduit à une perte de réversibilité (diminution du pic d'oxydation d' $O_2^{\cdot-}$ ).

## b. Méthodes

Les tests électrochimiques ont été effectués par voltampérométrie cyclique à l'aide d'un potentiostat/galvanostat PGSTAT 30 Metrohm et piloté par un ordinateur avec le logiciel GPES (General Purpose Electrochemical System version 4.9, Eco Chemie BV).

La cellule électrochimique est constituée d'une électrode disque de carbone vitreux (diamètre 2 mm) comme électrode de travail, d'une électrode auxiliaire fil de platine comme contre électrode et d'une électrode de référence Ag/AgCl/LiCl.

La solution analysée est une solution de DMF (N,N-Diméthylformamide) avec comme électrolyte support un sel d'hexafluorophosphate de tétrabutyl ammonium  $\text{Bu}_4\text{NPF}_6$  à 0,1M.

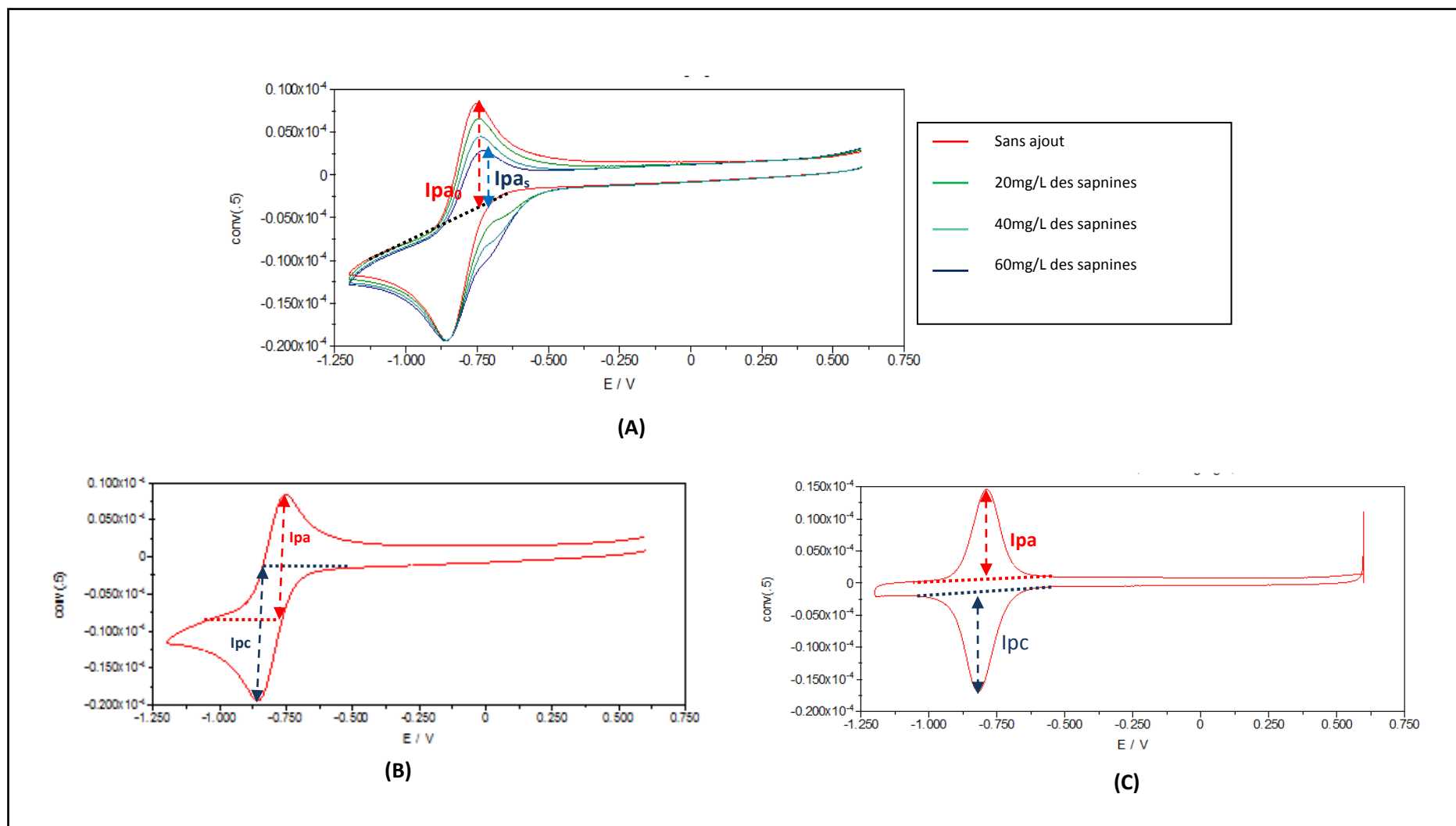
Les solutions des extraits ont été préparées à différentes concentrations dans le DMF (2 g.L<sup>-1</sup> pour les saponines et 1 g.L<sup>-1</sup> pour les caroténoïdes).

Le voltampérogramme cyclique est enregistré en premier lieu en absence d'ajouts des saponines ou des caroténoïdes des étoiles de mer étudiées et en deuxième lieu après les microajouts des extraits.

L'intensité du pic du courant anodique de réoxydation de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ( $I_{pa0}$ ) (**Fig. 18, courbe A**) et l'intensité du pic du courant anodique de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  pour une concentration donnée d'extrait testé ( $I_{pas}$ ) (**Fig. 18, courbe A**) sont mesurées.

Afin de faciliter la mesure de la hauteur des pics  $I_{pas}$  et  $I_{pa0}$ , les voltampérogrammes cycliques obtenus ont été convertis en courbes convoluées semi-dérivées. En effet, en utilisant les voltampérogrammes cycliques la mesure du courant du pic cathodique ( $I_{pc}$ ) est facile (**Fig. 18, courbe B**) par contre la mesure du courant du pic anodique ( $I_{pa}$ ) est délicate, car l'estimation de la ligne de base est difficile pour le balayage retour. Les lignes de bases sont plus simples à définir à partir des courbes convoluées car ces dernières présentent des pics symétriques en balayage aller-retour (**Fig. 18, courbe C**).

Les variations de  $(1 - I_{pas}/I_{pa0})$  en fonction de la concentration des saponines ou des caroténoïdes ajoutés sont représentées sous forme d'une courbe ce qui permet de déterminer une concentration en extrait capable de réduire de 30% ( $AI_{30}$ ) ou 50% ( $AI_{50}$ ) le courant de pic anodique.



**Figure 18:** Voltampérométries cycliques de la réduction d' $O_2$  dissout en absence (courbe B et C) et en présence (courbe A) des saponines de l'étoile de mer *Echinaster sepositus*. (A) et (B): courbes de voltampérométrie cyclique, (C): courbes convoluées semi-dérivées.  $v=100$  mV/s; DMF+N $Bu_4PF_6=0.1M$ .

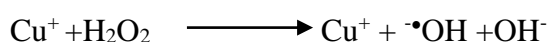
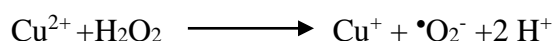
### III.1.3. Capacité de réduction de l'hémolyse oxydative par les saponines

Les globules rouges ou érythrocytes sont extrêmement susceptibles aux endommagements oxydatifs en raison de la richesse de leurs membranes en acides gras polyinsaturés et la concentration cellulaire élevée en oxygène et en l'hémoglobine. Elles sont un modèle adéquat pour l'étude du stress oxydant induit par une attaque radicalaire. Cette attaque conduit à la rupture des membranes plasmique et à la libération d'hémoglobine cellulaire (l'hémolyse).

L'objectif de cette partie est de mesurer la capacité des saponines d'*E.sepositus* et d'*O.ophidianus* à réduire l'hémolyse oxydative. le système d'initiateur des radicaux libres  $\text{Cu}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$  est utilisé pour provoquer l'hémolyse des globules rouges.

Le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) est un pro oxydant naturellement présent dans les cellules, et c'est l'espèce réactive d'oxygène (ERO) la plus abondante *in vivo*. La disproportion de sa concentration, dans certaines conditions, telles que: les fortes doses ou la présence d'ions métalliques peuvent engendrer des radicaux hydroxyle ( $\text{HO}^\bullet$ ) délétères pour les membranes et autres structures cellulaires. De ce fait, le sulfate de cuivre ( $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$ ) est utilisé dans notre travail pour entraîner l'oxydation de lipides et de protéines membranaire et amorcer l'hémolyse.

La génération des radicaux hydroxyle ( $\text{HO}^\bullet$ ) en présence de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et de sulfate de cuivre  $\text{CuSO}_4$  est gérée les réactions suivantes:



Pour évaluer la capacité des saponines à réduire l'hémolyse oxydative induite par le système d'initiateur de radicaux  $\text{Cu}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ , on a étudié dans un premier temps l'activité hémolytique des saponines pour déterminer les concentrations non hémolytiques. Puis nous avons évalué l'activité antioxydante de ces saponines aux concentrations non hémolytiques en suivant les étapes suivantes:

- **Étape 1:** consiste à évaluer l'effet de système ( $\text{Cu}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ ) sur les érythrocytes;
- **Étape 2:** consiste à évaluer l'effet de saponines aux concentrations non hémolytiques sur des érythrocytes préalablement traités par le système ( $\text{Cu}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ );

- **Étape 3:** consiste à évaluer l'effet combiné de la vitamine E (un antioxydant fort et stable) et des saponines (aux concentrations non hémolytiques) sur la réduction de l'hémolyse oxydative.

### III.1.3.1. Détermination des concentrations non hémolytique des saponines

Cette étape consiste à déterminer la capacité des saponines à provoquer la lyse des globules rouges et la libération d'oxyhémoglobine (HbO<sub>2</sub>).

Les saponines sont connues comme anti-nutriments en raison de leur activité hémolytique, cependant la toxicité des extraits naturels est dose dépendante. Par conséquent, il est crucial de déterminer l'effet toxique des saponines sur les globules rouges quantitativement en déterminant la EC50% et la concentration non hémolytique.

Le test de l'activité hémolytique des extraits de saponines a été effectué *in cellulo*, sur une suspension érythrocytaire à 2% de sang d'un volontaire sain, selon le protocole décrit par **Apers et al., (2001) et Amzal et al., (2008)** avec quelques modifications.

La solution d'érythrocyte à 2% est préparée comme suit: une quantité de sang brut citraté (10 ml) est lavée avec 40 ml d'une solution du tampon phosphate salin PBS (138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4) dans un flacon de 50 mL, puis centrifugée pendant 15 minutes à 10 000 tr.min<sup>-1</sup>. Le surnageant résultant est éliminé et la centrifugation est renouvelée jusqu'à ce que le surnageant devient clair et sans couleur. Chaque 1 mL du culot est récupéré dans de 49 mL de PBS pour donner une suspension d'érythrocytes à 2 %.

Pour réaliser le test d'hémolyse 500 µL de la suspension d'érythrocytes est mélangé avec 500 µL d'extrait de saponines de différentes concentrations (de 50 à 500 mg. L<sup>-1</sup>), dans des tubes eppendorf. Les tubes sont mélangés délicatement et incubés à 37°C. Après 2 h d'incubation les tubes sont centrifugés pendant 10 min à 1000 tr.min<sup>-1</sup>). Le surnageant est récupéré et sa densité optique est mesurée à 540 nm, en utilisant comme témoin un blanc sans extrait (PBS), à l'aide d'un spectrophotomètre (modèle 7305, JENWAY).

La capacité hémolytique a été exprimée en pourcentage d'érythrocytes lysés, et calculée selon l'équation suivante:

$$\text{Hémolyse (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{extrait}} - \text{Abs}_{\text{contrôle}}}{\text{Abs}_{\text{d'hemolyse totale}}} \times 100 \quad (12).$$

Avec:

**Abs<sub>extrait</sub>:** c'est l'absorbance de la solution formée de la suspension d'érythrocyte (500 µL) et d'extrait de saponines (500 µL);

**Abs contrôle:** c'est l'absorbance de la solution sans extrait de saponine, formée de la suspension d'érythrocyte (500  $\mu$ L) et de PBS (500  $\mu$ L);

**Abs d'hémolyse totale:** c'est l'absorbance de la solution formée de la suspension d'érythrocyte obtenue de contrôle négatif (500  $\mu$ L) et de l'eau bi-distillée (500  $\mu$ L);

La concentration de saponines requise pour lyser 50 % des érythrocytes (EC50%) et la concentration non hémolytique ont été déterminées à partir de la courbe de pourcentage d'hémolyse en fonction de concentration des saponines.

### III.1.3.2. Évaluation de l'activité anti-hémolytique des saponines

Cette étape consiste à évaluer l'effet de concentration non hémolytique des saponines sur les érythrocytes préalablement traités par l'initiateur des radicaux ( $\text{Cu}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Nous avons procédé comme suit pour évaluer cet effet:

**Dans un premier temps,** on procède au traitement des érythrocytes (500  $\mu$ L) avec 500  $\mu$ L de saponines à la concentration non hémolytique (préparée dans de PBS). Puis on ajoute à ce mélange 500 $\mu$ L de la solution d'initiateur de radicaux (formée de volume équivalent (v/v) d'une solution de sulphate pentahydrate  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  à 100  $\mu$ M et de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 30%). L'ensemble est incubé à 37°C pendant 15 min, 30 min, 1 h, 2 h et 6 h avec une agitation légère et continue. Après l'incubation le mélange est centrifugé à 1000  $\text{tr} \cdot \text{min}^{-1}$  pendant 10 min et l'absorbance du surnageant est déterminée à 540 nm.

Dans cette étape le contrôle négatif est préparé avec (500  $\mu$ L) d'érythrocyte et (500  $\mu$ L) de  $\text{CuSO}_4$  à 100 $\mu$ M;

**En deuxième temps,** les érythrocytes (500  $\mu$ l) sont traités avec (500  $\mu$ l) de la vitamine E à différentes concentrations (0.5  $\mu$ M à 2 mM) afin de déterminer la concentration non protectrice de la vitamine E.

Dans cette étape le contrôle négatif est préparé avec (500  $\mu$ L) d'érythrocyte et (500  $\mu$ L) de PBS (500  $\mu$ L);

**Dans un second temps,** les érythrocytes (500  $\mu$ l) sont traités simultanément avec la vitamine E à la concentration non protectrice (0.25  $\mu$ M) et les saponines à la concentration non hémolytique avant d'ajouter la solution d'initiateur des radicaux (500  $\mu$ l), afin de potentialiser l'effet protecteur des saponines étudiées contre l'hémolyse oxydative.

Pour l'ensemble de ces expériences les conditions d'incubation et de centrifugation sont identiques, et les pourcentages d'hémolyse sont calculés en utilisant **l'équation 12**.

#### IV. Identification structurale des saponines d'*Echinaster sepositus*

Comme mentionné précédemment dans l'introduction, en amont de cette recherche nous nous sommes intéressés aux saponines de l'étoile de mer *E. sepositus*. De ce fait, l'identification structurale des saponines est limitée à ceux d'*E. sepositus*.

Les techniques d'analyse les plus prépondérantes pour l'élucidation structurale des saponines sont la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire (RMN), ces deux techniques sont utilisées dans notre recherche.

##### IV.1. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (en anglais; mass spectrometry ou SM) est une technique utilisée dans pratiquement tous les domaines pour l'identification, l'analyse structurale, et la quantification des molécules, et même pour la localisation des molécules au sein d'un tissu par des techniques d'imagerie.

Les études de **Van Dyck *et al.* (2009, 2010a, 2010b); Demeyer *et al.* (2014) et Grauso *et al.* (2019)** ont montré que la spectrométrie de masse (SM et SM/SM) est une méthode efficace pour l'identification des saponines. Elle permet grâce au technique tandem (SM/SM) d'analyser un mélange de saponines tout en évitant les étapes de purification souvent délicates (**Schoepke *et al.*, 1996**).

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse basée sur la mesure de la masse d'ions dérivés d'une analyte en phase gazeuse. Dans le spectromètre de masse, les ions sont produits à partir de l'analyte dans la source d'ionisation et ils sont séparés selon leur rapport masse/charge ( $m/z$ ), puis ils sont détectés par un détecteur relié à un système informatique qui affiche les signaux en tant que spectre de masse montrant l'abondance relative des signaux en fonction de leurs rapports masse/charge.

Au cours de cette thèse, les expériences de masse à haute résolution (HR-ESI-SM et HR-ESI-SM/SM) ont été effectuées sur un spectromètre de masse de type thermo Fisher Scientifique Q-extractive équipé d'une source d'ionisation Electrospray (ESI +/-) au CRMPO de la plateforme SCANMAT de l'Université de Rennes 1.

Les saponines sont préparées dans le méthanol à une concentration de 10-20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , et injectées à un débit constant (5-10  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) dans le capillaire conducteur.

Les expériences SM et SM/SM ont été réalisées à la plus haute résolution de l'instrument (140 000 à  $m/z$  200) en mode positive et négative, et la composition élémentaire a été déterminée à l'aide du logiciel (Xcalibur).

Les conditions d'ionisation electrospray sont les suivantes: tension de pulvérisation 3-4 kV; température de capillaire 300 °C; gain de débit de gaz 10-80.

Le spectre global (SM; single-stage SM) est relevé dans la gamme de masse comprise entre  $m/z$  150 et  $m/z$  2000 afin de détecter tous les ions d'échantillons. L'abondance relative des ions est calculée en comparant l'intensité du pic de chaque ion avec l'intensité de pic d'ions le plus intense (fixé à 100%).

Les analyses de la spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) induisent la dissociation (CID, collision-induced dissociation) des ions parents en ions fragments qui seront relevés sur un spectre CID. Dans notre travail, des analyses (HR-ESI-SM/SM) sont réalisées sur les ions situés dans la gamme de masse comprise entre  $m/z$  800 et  $m/z$  1000 qui correspondent probablement à des saponines d'*E.sepositus*. Ces ions sont soumis à des collisions avec un gaz cible neutre (Argon) dans une cellule partiellement fermée (T-Wave), la pression à l'intérieur de cellule est entre 0.9 et 1 mbar et l'énergie de collision utilisé pour obtenir des ions fragment est située à 32 eV.

L'un des objectifs de cette recherche est la détermination de l'hétérogénéité inter-organe de la distribution des saponines en fonction du sexe et de la saison. De ce fait, les saponines issues de différents organes (CAE, GON, TEG ORL, TEG ABO et EST) des deux sexes (mâle et femelle) et collectées à différentes saisons (hiver, printemps, été et automne) ont été analysées par spectrométrie de masse. Ce serait ainsi une approche intéressante de point de vue biologique de déterminer la distribution qualitative des saponines dans les différents organes. Il est possible qu'une saponine ne soit présente que dans un organe cela permettrait une meilleure compréhension de l'activité métabolique associée à cette molécule.

#### ***IV.2. La Résonance Magnétique Nucléaire RMN***

La formule développée et la stéréochimie des composés sont élucidées par l'utilisation des techniques de résonance magnétique nucléaire (RMN) **du proton<sup>1</sup>H et du carbone <sup>13</sup>C à une dimension (RMN-1D)**, et à **deux dimensions (RMN-2D) homonucléaires: <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (Correlated SpectroscopY); <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY(Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY); <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H ROESY (Rotating frame Overhauser Effect SpectroscopY), <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY (Total Correlation SpectroscopY), et hétéronucléaires: <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation);<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC (Heteronuclear Multiple-Bound Correlation).**

La résonance magnétique nucléaire est une méthode basée sur les interactions magnétiques entre les noyaux voisins (magnétisme nucléaire). Elle fournit des spectres dont les pics sont

attribués aux différents noyaux, ce qui établit la correspondance entre le spectre et la structure chimique.

Les études antérieures sur l'élucidation structurale des saponines par RMN, nous ont permis de tirer des informations spécifiques pour la caractérisation de ces molécules (**Massiot et Lavaud, 1995**):

**Le spectre de RMN du proton** d'une molécule de saponine se présente aux trois zones de résonances:

- de 0.5 à 3 ppm: les protons de la génine, en particulier les méthyles;
- de 3 à 4.5 ppm: les protons osidiques sauf les anomères;
- de 4.5 à 6 ppm: les protons anomériques sous la forme de doublets ou de singulets élargis, et les protons éthyléniques de la génine.

**Le spectre de RMN du carbone** se présente dans les zones de résonance suivante:

- de 10 à 60 ppm: les carbones de la génine;
- de 60 à 90 ppm: les carbones osidiques sauf les anomères, et quelques carbones hydroxylés de la génine;
- au-delà de 90 ppm: les carbones anomériques des sucres.

**L'expérience NOESY** est importante pour:

- la caractérisation de stéréochimie des carbones asymétriques de l'aglycone;
- le séquençage des sucres et l'emplacement de la liaison sucres-génine.

Cette expérience fournit des informations spatiales pour tous les protons dans une seule expérience.

**L'expérience HSQC** permet:

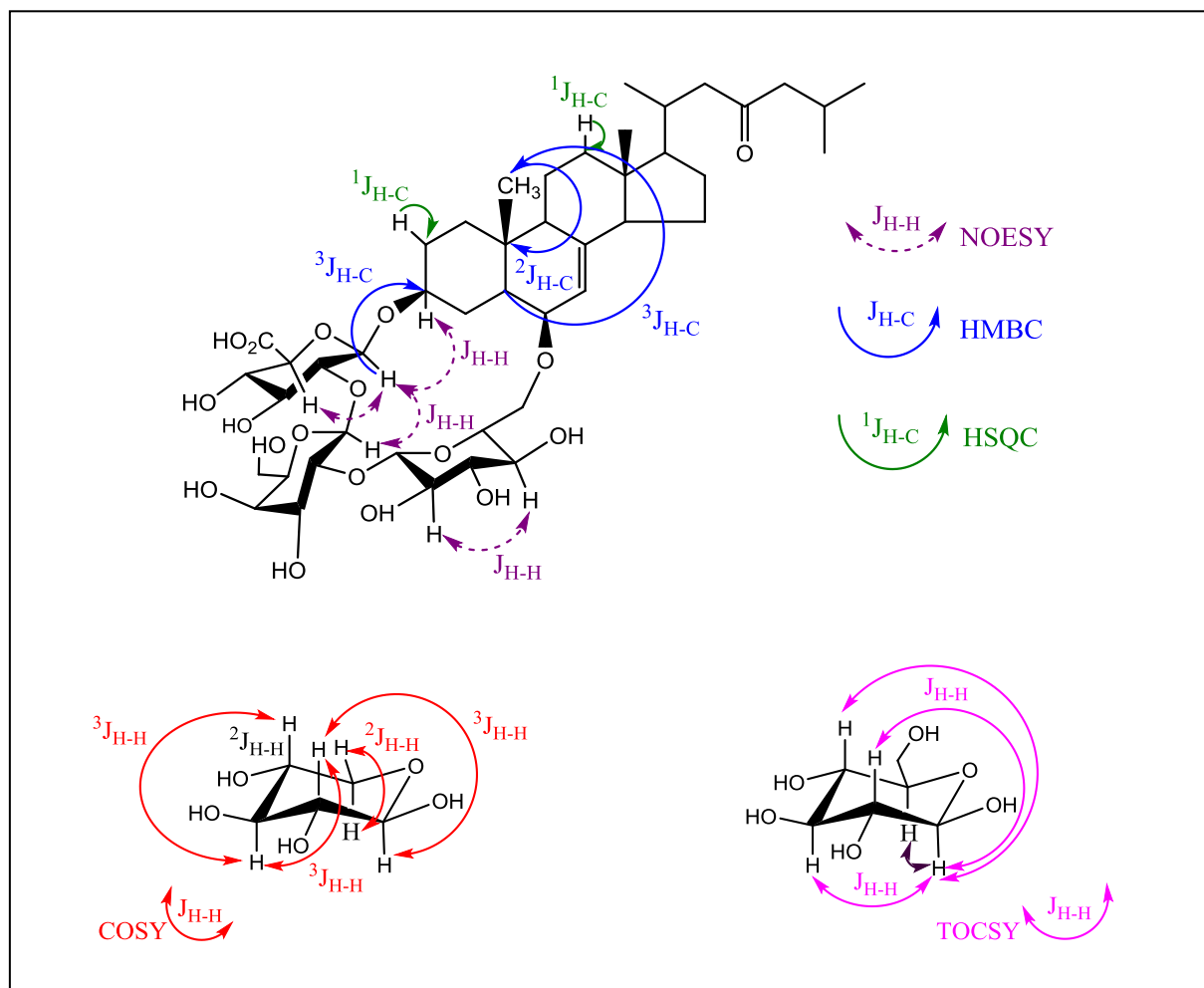
- de déterminer la majorité des carbones protonés;
- de mettre en évidence les couplages hétéronucléaires directs (H-C)  $^1J_{H-C}$  (**Fig. 19**).

**L'expérience HMBC** permet :

- de mettre en évidence les constantes de couplage hétéronucléaires à longues distances  $^2J_{H-C}$  ou  $^3J_{H-C}$  (**Fig. 19**);
- de déterminer la structure des sucres et de l'aglycone.

**L'expérience COSY et TOCSY** sont très importantes pour optimiser l'élucidation de la structure des sucres. L'expérience COSY est utilisée pour déterminer l'ordre des protons dans un squelette de sucre, car elle met en évidence les corrélations de tous les protons d'un même système de spin avec des couplages géminaux  $^2J_{H-H}$  et des couplages vicinaux  $^3J_{H-H}$ .

Les corrélations mises en évidence par l'expérience TOCSY sont les mêmes que celles de COSY, mais avec des constantes de couplages plus importantes (**Fig. 19**).



**Figure 19:** Les corrélations observées à l'aide de différentes expériences RMN bidimensionnelles.

Dans notre thèse les expériences RMN monodimensionnelles et bidimensionnelles ont été réalisées sur un appareil Bruker à une fréquence de 900MHz.

Nos extraits sont un mélange de saponines, et il est impossible d'identifier de manière non ambiguë toutes structures présentant dans un mélange. De ce fait, à ce stade de recherche, les expériences RMN sont réalisées pour valider les structures des molécules majoritaires élucidées par spectrométrie de masse (Sepositoside A, et luzonicoside A).

Pour effectuer l'analyse les saponines d'*E. sepositus* ont été préparées dans des tubes RMN en additionnant environ 15 mg de saponines à 500  $\mu$ L méthanol deutéré ( $CD_3OD$ ).

# *Partie II*

## *Résultats et discussions*

## I. Les caractères morphométriques d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus*

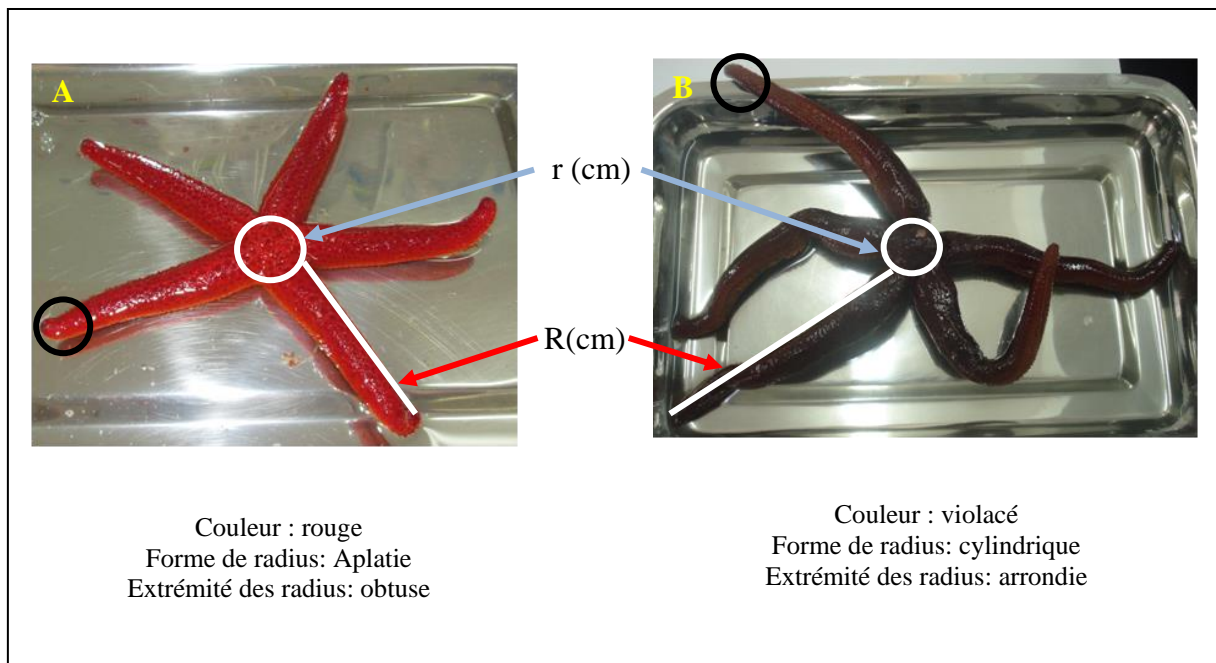
Les différentes sorties de terrain que nous avons réalisées dans la zone d'étude la pointe Pescade (Rais Hamidou) de la baie d'Alger, ont montré que l'étoile de mer *E. sepositus* était plus fréquente comparée à ses congénères *O. ophidianus* et *H. attenuata*.

La description de la morphologie externe est faite sur des étoiles de mer fraîche afin d'éviter une quelconque altération des formes et des couleurs.

La détermination d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus* est faite grâce à l'examen extérieur du corps (Boell, 1955) qui fournit des renseignements importants sur (voir tableau 1 de la partie synthèse bibliographique):

- La couleur;
- Le nombre et la taille des bras;
- La forme des bras (stellée, pentagonale, cylindrique ou aplatie);
- La disposition des tubes ambulacraires deux ou quatre rangées;
- Le développement des plaques.

La figure 20 montre les deux espèces étudiées.



**Figure 20:** Caractères morpho-métriques des étoiles de mer étudiées, *E. sepositus* (A) et d'*O. ophidianus* (B). (R: longueur des bras; r: rayon du disque central).

### a. Mensurations et pesés

Trois caractères métriques sont utilisés pour décrire la morphométrie des étoiles de mer étudiées: la longueur des bras (R); le rayon du disque central (r) et le rapport R/r.

La morphométrie des populations d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus* est représentée dans le **tableau 12**.

Le diamètre du disque central (r) des individus d'*E. sepositus* étudiés est de l'ordre de 2,2 cm ( $\pm 0,4$ ) en moyenne, et la longueur de leurs bras (R) est de 6,96 cm ( $\pm 0,8$ ) en moyenne. Le poids corporel moyen est de 53, 2 g ( $\pm 13,5$ ). Le rapport R/r varie entre 2,8 et 3,9 cm, avec une valeur moyenne de l'ordre de 3,12 ( $\pm 0,5$ ).

La grandeur moyenne de diamètre du disque central (r), de la longueur des bras (R) et de poids corporel des individus d'*O. ophidianus* prélevés est de 7,8 cm ( $\pm 0, 8$ ), 1.67 cm ( $\pm 0,1$ ) et 60,36 g ( $\pm 13,5$ ) respectivement. La valeur moyenne de rapport R/r est de 4.7 cm ( $\pm 0,5$ ) et il varie entre 4,1 et 4,8.

Les plus grands individus d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus* sont prélevés au mois de janvier et d'avril avec un poids corporel de l'ordre de 78,0 g et 93,6, respectivement. Ces individus sont caractérisés par une longueur des bras de l'ordre de 6,8 cm pour *E. sepositus* et 8,8 pour *O. ophidianus*, un diamètre du disque central de 2,5 cm et 1,7 cm pour *E. sepositus* et *O. ophidianus*, respectivement.

Les plus petits individus sont prélevés au mois de novembre et janvier avec un poids corporel de 13,0 g et 12,1 g une longueur des bras de l'ordre de 7,6 cm et 7,4 , un diamètre du disque central de 1,6 et 1,7 cm pour *E. sepositus* et *O. ophidianus*, respectivement.

**Tableau 12:** Les résultats des caractères métriques d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus*.

	<i>E. sepositus</i>								<i>O. ophidianus</i>							
	Hiver		Printemps		Été		Automne		Hiver		Printemps		Été		Automne	
	Ve	m	Ve	m	Ve	m	Ve	m	Ve	m	Ve	m	Ve	m	Ve	m
R	6.3-7.5	7.08±0.4	6.38-8.38	7.5±0.8	4.15-7.7	5.60±0.9	4.23-7.9	6.7±0.7	7-8.94	7.8±0.7	7.38-9.2	8.5±0.5	7.16-8.83	8.0±0.7	6.16-7.9	7.1±0.6
r	2-2.7	2.4±0.2	2.25-2.75	2.7±1.0	1.25-2.75	1.9±0.3	1.2-2.3	1.8±0.2	1.2-2.5	1.6±0.4	1.25-2.4	1.8±0.4	1.35-1.95	1.7±0.1	1.2-2	1.6±0.2
R/r	2.56-3.27	2.9±0.2	2.58-3.57	2.97±0.3	1.91-5.44	3.0±0.7	2.80-4.94	3.8±0.6	2.56-7.45	5.1±1.3	3.29-6.96	4.9±1.1	3.89-5.70	4.7±0.5	3.08-5.78	4.6±0.6
pds	41.41-78.02	58.8±15.8	45.99-76.59	65.6±9.1	19.15-70.58	45.7 ±17.0	13-76.2	38.0±14.8	12.12-78.4	56.6±17.6	58.45-93.58	75.0±6.8	47.18-75.81	61.2±9.6	15-67.79	42.4±13.5
IGS	0.01-0.07	0.04±0.02	0.03-0.08	0.06±0.01	0.01-0.08	0.04±0.02	0.01-0.07	0.03±0.02	0.01-0.05	0.02±0.02	0.02-0.08	0.05±0.02	0.01-0.04	0.02±0.01	0.00-0.02	0.01±0.01
N	44		45		47		64		23		20		19		32	

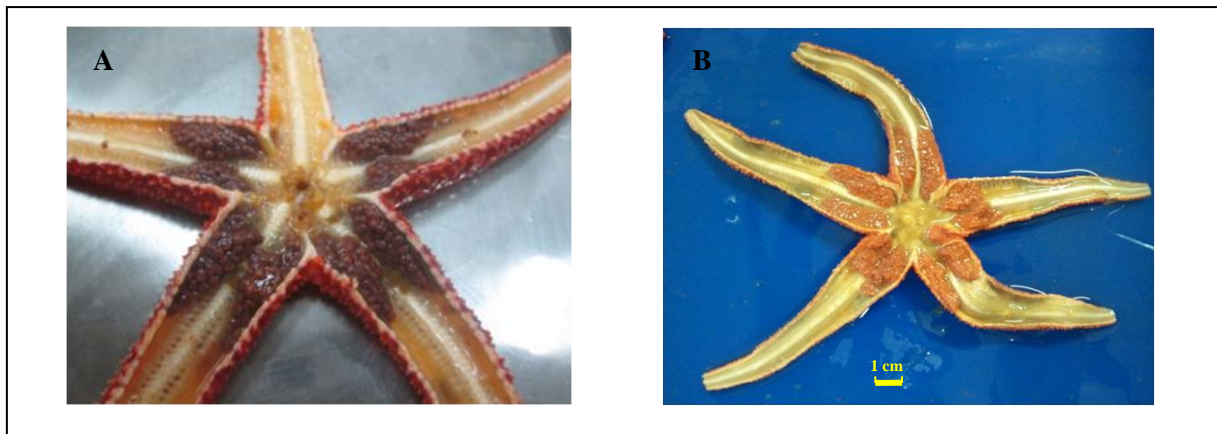
R : longueur des bras, r : rayon du disque central, N : effectif, Ve : valeurs extrêmes, m : moyenne.

**b. Rapport gonado-somatique (RGS) chez *E. sepositus***

L'un des objectifs de cette thèse est de mettre en relation les variations quantitatives et qualitatives de saponines d *E. sepositus* avec le stade de maturité sexuelle de cette espèce.

Le suivie de RGS qui correspond à la proportion du poids des gonades dans l'individu, permet de déterminer les stades de maturité sexuelle et la période préférentielle de ponte.

Lors du traitement des échantillons, nous avons déterminé le sexe des individus d' *E. sepositus* en se basant sur la coloration des gonades. Les gonades prennent une coloration rouge brique chez les femelles (**Fig. 21.A**) et elle est jaune chez les mâles (**Fig. 21.B**) (**Riesgo et al., 2011**). Il convient d'apporter une précision, la coloration jaune apparaît sur des ovaires conservés dans du formol mais à l'état frais la coloration est plutôt orange ou jaune orangé.

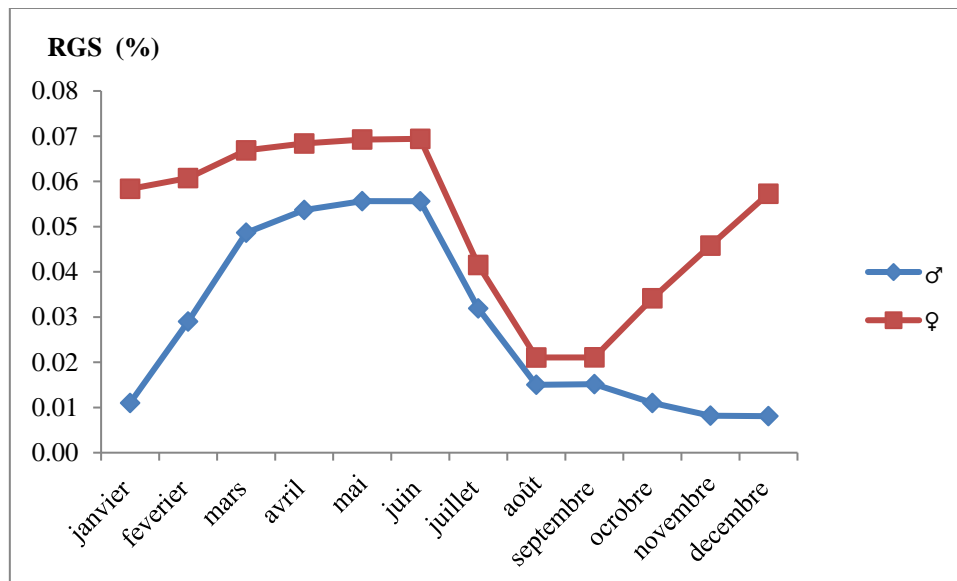


**Figure 21:** Les gonades de l'étoile de mer *E. sepositus*. **A:** gonade femelle; **B:** gonade mâle.

**La figure 22** rend compte de l'évolution du rapport gonado-somatique (**RGS**) au cours de la période d'échantillonnage.

Chez les femelles le rapport gonado-somatique augmente constamment d'octobre (0,03) à mai-juin où il atteint son maximum (0,07). Un effondrement s'observe de juillet à septembre, suivi d'une augmentation du RGS traduisant un accroissement pondéral progressif des gonades jusqu'à avril (**Fig. 22**).

Chez les mâles les valeurs moyennes mensuelles du RGS augmentent de janvier à mai-juin où on enregistre un maximum (0,06). La diminution du RGS entre juillet et septembre coïncide avec la diminution du RGS des femelles. D'octobre à janvier, le RGS ne présente pas de fluctuations significatives (**Fig. 22**).



**Figure 22:** Évolution mensuelle du rapport gonado-somatique d'*E. sepositus*.

D'une manière générale le suivi mensuel du RGS sur une année a permis de constater que:

- la maturation des produits génitaux mâles et femelles s'achève en printemps;
- *E. sepositus* présente une période de ponte étalée de l'été au début d'automne;
- Chez les mâles la saison de repos sexuel est limitée à trois ou quatre mois (octobre à janvier) tandis que les femelles fournissent des produits génitaux toute au long de l'année sans période de repos.

Plusieurs auteurs se sont intéressés à la reproduction d'*E. sepositus* (**Cognetti et Delavanl, 1960; Marsh et al., 1985 et Riesgo et al., 2011**). L'ensemble de leurs résultats indique que la maturité sexuelle de cette espèce est printanière et la ponte se fait en été et peut s'étendre jusqu'au début d'automne. Ces résultats sont en parfaite concordance avec les nôtres.

**Riesgo et al. (2011)** dans leurs travaux sur le cycle ovarien et testiculaire d'*E. sepositus*, il ressort que la spermatogenèse est limitée à cinq ou six mois (printemps ou été), et l'ovogenèse apparaît comme un phénomène continu à l'échelle annuelle. Ces résultats se recourent avec les nôtres.

## II. Optimisation de l'extraction des saponines et des caroténoïdes

Dans ce chapitre, pour chaque étoile de mer, nous avons cherché à optimiser l'usage de l'EAM et l'EAU pour l'extraction des saponines et des caroténoïdes par une approche de type plan d'expérience de Box et Behnken en faisant appel à la méthodologie des surfaces de réponse. Les facteurs impliqués dans les plans d'expérience ont été, la nature et le pourcentage de solvant, le temps, le ratio liquide-solide et la puissance pour l'EAM. Trois niveaux par facteur ont été utilisés. L'extraction par agitation magnétique a été utilisée comme méthode de référence pour évaluer le rendement d'EAM et d'EAU des saponines et des caroténoïdes.

### II.1. Extraction assistée par micro-ondes

#### II.1.1. Étude préliminaire

L'objectif de cette partie est d'étudier séparément l'influence des paramètres expérimentaux (nature et concentration de solvant, ratio liquide solide, la puissance des micro-ondes et le temps) sur le processus d'extraction des saponines, afin de pouvoir sélectionner les conditions opérationnelles favorables à l'extraction et de déterminer l'intervalle approprié de chaque paramètre (niveaux inférieurs et supérieurs des variables) dans le plan d'expérience.

##### II.1.1.1. Effet de solvant d'extraction

Les résultats de l'effet de la nature de solvant sur la teneur des saponines sont représentés dans le **tableau 13**. Ils montrent que le méthanol est le solvant le plus efficace parmi les trois solvants testés, et il produit un extrait micro-onde plus riche en saponines avec une teneur de  $24,0 \pm 0,6 \text{ mg.g}^{-1}$  de poids sec pour l'étoile de mer *E. sepositus* et de  $21,0 \pm 0,2 \text{ mg.g}^{-1}$  de poids sec pour l'étoile de mer *O. ophidianus*.

Pour pouvoir interpréter les résultats obtenus nous avons adopté la méthode de l'analyse de variance (ANOVA) à l'aide du logiciel minitab.17.

Nous allons présenter en détail cette analyse pour l'effet de la concentration de solvant (voir partie II.1.1.2. *Effet de la concentration de solvant d'extraction*), et c'est le même test statistique qui est appliqué pour les autres paramètres expérimentaux.

**Tableau 13:** Teneurs moyennes des saponines et probabilités calculées en fonction de la nature de solvant d'extraction pour *E. sepositus* et *O. ophidianus*.

	Methanol 70%	Ethanol 70%	Eau	P <sub>cal</sub>
saponines <i>d'E. sepositus</i> (mg.g <sup>-1</sup> )	24.0 ±0.6	19.7 ±0.6	12.0±0.6	0.00
saponines <i>d'O. Ophidianus</i> (mg.g <sup>-1</sup> )	21.0±0.2	17.6 ±0.6	10.3±0.2	0.00

Les résultats obtenus expliquent d'une part, l'interaction importante entre le méthanol et la matrice animale, et d'autre part, la grande sélectivité de méthanol pour l'extraction des saponines et sa grande capacité à solubiliser ces substances. De ce fait, le méthanol a été sélectionné comme solvant d'extraction pour les autres essais de l'étude préliminaire et pour l'optimisation par la méthodologie de surface de réponse.

Le méthanol est également le solvant utilisé par **Demeyer et al. (2014)** pour l'extraction des saponines de l'étoile de mer *Astéria rubens*. Cependant, **minale et al. (1979)** ont utilisé l'eau pour l'extraction des saponines de l'étoile de mer *E. sepositus*. D'autres auteurs ont utilisé l'éthanol, parmi ces auteurs on cite **Tang et al. (2005)** et **Tang et al. (2006)** qui ont utilisé l'éthanol à 95% pour extraire les asterosaponins de l'étoile de *Culcita novaeguineae*, **Kicha et al. (2010)** pour l'extraction des asterosaponines de *Archaster typicus* et **Ivanchina et al. (2011)** ont utilisé l'éthanol à 70% pour l'extraction des asterosaponins de *Diplasterias brucei*. Le méthanol est aussi le solvant utilisé pour l'extraction des saponines à partir des plantes, en étudiant les saponines de *Panax notoginseng*. **Kwon et al. (2003)** ont aussi utilisé le méthanol à 80% .

Le choix de solvant d'extraction influence directement la quantité et la qualité des composés à extraire. Et dans le cas d'EAM le choix de solvant ne repose pas seulement sur la capacité du solvant à mettre en solution les substances extraire mais aussi sur sa capacité à absorber l'énergie des micro-ondes (**Heng et al., 2013**), et étant donné que cette capacité dépend des caractéristiques diélectriques du solvant d'extraction (**Eskilson et Björklund, 2000**), le méthanol peut être considéré comme étant le solvant adéquat pour l'extraction des saponines des étoiles de mer par micro-onde, car il possède un facteur de dissipation ( $\tan \delta$ )  $6400 \cdot 10^{-4}$  beaucoup plus élevé que les autres solvants testés (l'éthanol avec  $\tan \delta = 2500$ ), et une constante diélectrique relativement élevée  $\epsilon'$  de 33,62 ( l'éthanol possède un  $\epsilon' = 24,3$ ) (**Eskilson et Björklund, 2000**).

### II.1.1.2. Effet de la concentration de solvant d'extraction

Afin de déterminer la meilleure concentration de méthanol (en proportion volumique méthanol-eau) et qui donne la quantité la plus élevée en saponines différentes concentrations ont été testées (20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% et 90%). Cette étape est primordiale, car il permet de trouver un équilibre adéquat entre la polarité du solvant et le coefficient de perte diélectrique.

La teneur maximale des saponines a été obtenue par les concentrations suivantes: 50%, 60%, 70%, 80% et 90% (**Tab.17**), et cela pour les deux espèces étudiées *E. sepositus* et *O. ophidianus*. Les teneurs des saponines obtenues en utilisant ces concentrations ne présentent pas une différence significative au seuil de signification  $\alpha = 0,05$ , elle est de l'ordre de  $24 \pm 0.6$  mg.g<sup>-1</sup> pour *E. sepositus* et elle varie entre  $20,80 \pm 0,6$  mg.g<sup>-1</sup> et  $21,04 \pm 0,2$  pour *O. ophidianus*. Par conséquent la concentration de 50% en proportion volumique méthanol-eau est fixée pour la suite de l'étude préliminaire et la gamme de 30% à 70% a été choisie pour l'optimisation de l'extraction.

- **Application de l'ANOVA pour l'analyse statistique des résultats**

L'analyse de variance (ANOVA) permet d'interpréter les résultats de la teneur des saponines en fonction de la concentration de solvant.

L'application de l'ANOVA pour les teneurs des saponines d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus* a donné les résultats rassemblés dans le tableau **14** suivant:

**Tableau 14:** Analyse de variance des teneurs des saponines au seuil de signification  $\alpha = 0,05$ .

Source de fluctuation	Saponine d' <i>Echinaster sepositus</i>					Saponine d' <i>Ophidiaster ophidianus</i>				
	DF	Ajust SS	Ajust SM	Valeur de F	Valeur de P	DF	Ajust SS	Ajust SM	Valeur de F	Valeur de P
Solvant	7	754.67	107.810	40.43	0.00	7	671.3	95.90	3.325	0.00
Erreur	16	42.67	2.667			16	0.46	0.029		
Total	23	797.33				23	671.76			

Les résultats du tableau révèlent que les probabilités calculées ( $P_{cal}$ ) pour les quantités des saponines en fonction de la concentration MeOH chez les deux espèces étudiées sont de 0,00 elle est inférieure au seuil de signification  $\alpha = 0,05$ . Donc la différence des teneurs des saponines en fonction de la concentration de MeOH est significative. De ce fait, un autre test est recommandé afin de chercher la concentration qui est à l'origine de cette différence, il

s'agit de test de Tukey. Les résultats de ce test sont présentés dans le **tableau 15** et le **tableau 16** pour les saponines d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus* respectivement.

**Tableau 15:** Test de la différence significative (HSD) de Tukey pour les différentes concentrations de MeOH (cas d'*E. sepositus*).

Difference of Levels	Difference of means	SE of Difference	95% CI	Adjustement	
				T-Value	P-value
30%-20%	5.33	1.33	(0.71;9.95)	4.00	0.018
40%-20%	10.67	1.33	(6.05;15.29)	8.00	0.000
50%-20%	16.00	1.33	(11.38;20.62)	12.00	0.000
60%-20%	14.67	1.33	(10.05;19.29)	11.00	0.000
70%-20%	16.00	1.33	(11.38;20.62)	12.00	0.000
80%-20%	16.00	1.33	(11.38;20.62)	12.00	0.000
90%-20%	14.67	1.33	(10.05;19.29)	11.00	0.000
40%-30%	5.33	1.33	(0.71;9.95)	4.00	0.018
50%-30%	10.67	1.33	(6.05;15.29)	8.00	0.000
60%-30%	9.33	1.33	(4.71;13.95)	7.00	0.000
70%-30%	10.67	1.33	6.05;15.29	8.00	0.000
80%-30%	10.67	1.33	6.05;15.29	8.00	0.000
90%-30%	9.33	1.33	(4.71;13.95)	7.00	0.000
50%-40%	5.33	1.33	(0.71;9.95)	4.00	0.018
60%-40%	4.00	1.33	(-0.62;8.62)	3.00	0.116
70%-40%	5.33	1.33	(0.71;9.95)	4.00	0.018
80%-40%	5.33	1.33	(0.71;9.95)	4.00	0.018
90%-40%	4.00	1.33	(-0.62;8.62)	3.00	0.116
60%-50%	-1.33	1.33	(-5.95;3.29)	-1.00	0.968
70%-50%	0.00	1.33	(-4.62;4.62)	0.00	1.000
80%-50%	0.00	1.33	(-4.62;4.62)	0.00	1.000
90%-50%	-1.33	1.33	(-5.95;3.29)	-1.00	0.968
70%-60%	1.33	1.33	(-3.29;5.95)	1.00	0.968
80%-60%	1.33	1.33	(-3.29;5.95)	1.00	0.968
90%-60%	0.00	1.33	(-4.62;4.62)	0.00	1.000
80%-70%	0.00	1.33	(-4.62;4.62)	0.00	1.000
90%-70%	-1.33	1.33	(-5.95;3.29)	-1.00	0.968
90%-80%	-1.33	1.33	(-5.95;3.29)	-1.00	0.968

L'interval de confiance individuel=99.68%.

**Tableau 16:** Test de la différence significative (HSD) de Tukey pour les différentes concentrations de MeOH (cas d'*O. ophidianus*).

Difference of Levels	Difference of means	SE of Difference	95% CI	Adjustement	
				T-Value	P-value
30%-20%	3.595	0.139	(3.115;4.076)	25.93	0.000
40%-20%	10.629	0.139	(10.149;11.110)	76.66	0.000
50%-20%	14.087	0.139	(13.606;14.567)	101.59	0.000
60%-20%	14.248	0.139	(13.767;14.728)	102.76	0.000
70%-20%	14.087	0.139	(13.606;14.567)	101.59	0.000
80%-20%	14.009	0.139	(13.529;14.489)	101.04	0.000
90%-20%	14.219	0.139	(13.739;14.700)	102.55	0.000
40%-30%	7.034	0.139	(6.554;7.515)	50.73	0.000
50%-30%	10.491	0.139	(10.011;10.972)	75.67	0.000
60%-30%	10.652	0.139	(10.172;11.133)	76.83	0.000
70%-30%	10.491	0.139	(10.011;10.972)	75.67	0.000
80%-30%	10.414	0.139	(9.33;10.894)	75.11	0.000
90%-30%	10.625	0.139	(10.144;11.105)	76.62	0.000
50%-40%	3.457	0.139	(2.977;3.983)	24.93	0.000
60%-40%	3.618	0.139	(3.138;4.098)	26.09	0.000
70%-40%	3.457	0.139	(2.977;3.938)	24.93	0.000
80%-40%	3.380	0.139	(2.899;3.860)	24.37	0.000
90%-40%	3.590	0.139	(3.109;4.070)	25.89	0.000
60%-50%	0.161	0.139	(-0.319;0.641)	1.16	0.932
70%-50%	0.000	0.139	(-0.480;0.480)	0.00	1.000
80%-50%	-0.078	0.139	(-0.558;0.403)	-0.56	0.999
90%-50%	0.133	0.139	(-0.348;0.613)	0.96	0.974
70%-60%	-1.161	0.139	(-0.641;0.319)	-1.16	0.932
80%-60%	-0.239	0.139	(-0.719;0.242)	-1.72	0.676
90%-60%	-0.028	0.139	(-0.509;0.452)	-0.20	1.000
80%-70%	-0.078	0.139	(-0.558;0.403)	-0.56	0.999
90%-70%	0.133	0.139	(-0.348;0.613)	0.96	0.974
90%-80%	0.210	0.139	(-0.270;0.691)	1.52	0.788

L'interval de confiance individuel=99.68%.

À partir des **tableaux 15 et 16** on peut émettre les conclusions suivantes pour les deux cas étudiés (saponines d'*E.sepositus* et saponines d'*O.ophidianus*).

- Le niveau de confiance individuel est de 99,68%;
- les intervalles de confiance pour les paires des concentrations de méthanol suivantes: (60%-50%, 70%-50%, 80%-50%, 90%-50%, 70%-60%, 80%-60%, 90%-60%, 80%-70%, 90%-70%, 90%-80%) comprennent tous la valeur de zero et sont caractérisées par une valeur de  $P_{cal} > 0,05$  ce qui indique que les différences dans les teneurs des saponines en fonction de ces concentrations ne sont pas statistiquement significatives.
- Les intervalles de confiance pour les paires restantes ne comprennent pas la valeur zéro, et sont caractérisés par un  $P_{cal} < 0,05$  ce qui indique que la différence des teneurs des saponines est statistiquement significative.

L'ensemble de ces informations est récapitulé **dans le tableau 17** caractérisé par des lettres. Les mêmes lettres dans la même colonne signifient qu'il n'y a pas de différence significative à au seuil de signification  $\alpha = 0,05$ .

**Tableau 17:** Information sur les groupements des teneurs des saponines en fonction de la concentration de MeOH au seuil de signification  $\alpha = 0,05$  pour les deux espèces étudiées d'*E.sepositus* et *O.ophidianus*. *n*: nombre de répétition de chaque expérience.

<i>Echinaster sepositus</i>				<i>Ophidiaster ophidianus</i>			
MeOH (%)	<i>N</i>	moyenne mg.g <sup>-1</sup>	Groupe	MeOH (%)	<i>n</i>	moyenne mg.g <sup>-1</sup>	Groupe
80	3	24.06	A	60	3	21.04	A
70	3	24.04	A	90	3	21.01	A
50	3	24.02	A	70	3	20.9	A
90	3	24.02	A	50	3	20.9	A
60	3	24.02	A	80	3	20.9	A
40	3	18.7	B	40	3	17.4	B
30	3	13.3	C	30	3	10.4	C
20	3	8.02	D	20	3	6.8	D

D'après le tableau ci-dessus on constate que la différence dans les teneurs des saponines obtenues par l'utilisation de MeOH à 50%, 60%, 70%, 80%, 90% est non significative et forme ainsi un seul groupe nommé A. Cependant la teneur des saponines obtenues par l'utilisation du MeOH à 20%, 30%, 40% et (50%, 60%, 80% ,70% ,80 et 90%) présente une différence significative et forme 4 groupes différents nommés respectivement D, C, B et A. Le groupe A renferme les teneurs les plus élevées.

### II.1.1.3. Effet de ratio liquide-solide

Les résultats obtenus (**Tab. 18 et 19**) montrent que la teneur des saponines augmente avec l'augmentation du volume du solvant, pour un volume de 10 mL de MeOH à 70% des quantités de l'ordre de  $12.00 \pm 0.01 \text{ mg.g}^{-1}$  et  $10,4 \pm 0,09 \text{ mg.g}^{-1}$  ont été obtenues à partir de l'étoile de mer *E. sepositus* et *O. ophidianus*, respectivement.

Cette quantité augmente pour atteindre des valeurs maximales à un volume de 40 mL avec des grandeurs de l'ordre de  $39,9 \pm 0.2 \text{ mg.g}^{-1}$  pour *E. sepositus* et  $34,8 \pm 0,2 \text{ mg.g}^{-1}$  pour *O. ophidianus*.

L'analyse de la variance montre que les différences enregistrées dans les teneurs des saponines en variant le volume de solvant méthanol de 10 mL à 40 mL est significative. En revanche, cette différence est non significative entre 40 et 50 mL et la teneur des saponines reste constante. Elle est de l'ordre de  $39 \text{ mg.g}^{-1}$  et  $34 \text{ mg.g}^{-1}$  pour *E. sepositus* et *O. ophidianus*, respectivement (**Tab. 18 et 19**).

Le volume de solvant utilisé pour une extraction doit être suffisant pour assurer une immersion totale de l'échantillon (**Eskilsson et Björklund, 2000**). Cependant, des volumes faibles sont préférés afin de réduire le temps d'évaporation et assurer des extraits concentrés en substance d'intérêts.

Par conséquent, le ratio  $40 \text{ mL.g}^{-1}$  est sélectionné pour les autres tests de l'étude préliminaire. Et la gamme  $20 \text{ mL.g}^{-1}$  à  $50 \text{ mL.g}^{-1}$  a été choisie pour l'optimisation par la méthodologie de surface réponse et cela pour les deux espèces étudiées.

**Tableau 18:** Résultats des analyses préliminaires pour l'extraction par micro-onde cas d'*E. sepositus*. Les mêmes lettres dans la même colonne signifient qu'il n'y a pas de différence significative à au seuil de signification  $\alpha = 0,05$ .

Nature de solvant		% de méthanol		Ratio		Puissance		Temps d'irradiation	
Solvant	Sap (mg.g <sup>-1</sup> )	MeOH (%)	Sap (mg.g <sup>-1</sup> )	Ratio mL.g <sup>-1</sup>	Sap (mg.g <sup>-1</sup> )	Puissance (W)	Sap (mg.g <sup>-1</sup> )	Temps (min)	Sap (mg.g <sup>-1</sup> )
Méthanol 70%	24 ± 0.6 <sup>A</sup>	20	8 ± 0.5 <sup>D</sup>	10	11.98 ± 0.2 <sup>D</sup>	100	39,79 ± 0,2 <sup>B</sup>	1	39.89 ± 0.2 <sup>E</sup>
Éthanol 70%	19.66 ± 0.6 <sup>B</sup>	30	13.33 ± 2.3 <sup>C</sup>	20	23.87 ± 0.1 <sup>C</sup>	200	46.63 ± 0.1 <sup>A</sup>	2	48.00 ± 0.4 <sup>C,B</sup>
Eau	12 ± 0.6 <sup>C</sup>	40	18.66 ± 2.3 <sup>B</sup>	30	36 ± 0.2 <sup>B</sup>	300	32.35 ± 0.2 <sup>C</sup>	3	55.85 ± 0,3 <sup>A</sup>
		50	24 ± 0.6 <sup>A</sup>	40	39.89 ± 0.2 <sup>A</sup>	400	24.67 ± 0.6 <sup>D</sup>	4	49.47 ± 0,2 <sup>B</sup>
		60	24 ± 0.7 <sup>A</sup>	50	39.48 ± 0.4 <sup>A</sup>	500	16.14 ± 0.5 <sup>E</sup>	5	42.97 ± 0.20 <sup>D</sup>
		70	24 ± 0.6 <sup>A</sup>					6	35.28 ± 0.7 <sup>F</sup>
		80	24 ± 0.6 <sup>A</sup>					8	22.34 ± 0.2 <sup>G</sup>
		90	22.66 ± 2.3 <sup>A</sup>						

**Tableau 19:** Résultats des analyses préliminaires pour l'extraction par micro-onde cas d'*O. ophidianus*. Les mêmes lettres dans la même colonne signifient qu'il n'y a pas de différence significative à au seuil de signification  $\alpha = 0,05$ .

Nature de solvant		% de méthanol		Ratio		Puissance		Temps d'irradiation	
Solvant	Sap (mg.g <sup>-1</sup> )	MeOH (%)	Sap (mg.g <sup>-1</sup> )	Ratio mL.g <sup>-1</sup>	Sap (mg.g <sup>-1</sup> )	Puissance W	Sap (mg.g <sup>-1</sup> )	Temps	Sap (mg.g <sup>-1</sup> )
Méthanol 70%	20.0 ± 0.2 <sup>A</sup>	20%	6.79 ± 0.02	10	10.43 ± 0.1 <sup>D</sup>	100	34.71 ± 0.1 <sup>B</sup>	1	34.80 ± 1.7 <sup>E</sup>
Éthanol 70%	17.6 ± 0.2 <sup>B</sup>	30%	10.39 ± 0.03	20	20.48 ± 0.1 <sup>C</sup>	200	40.67 ± 0.2 <sup>A</sup>	2	41.76 ± 0.13 <sup>C</sup>
Eau	10.3 ± 0.1 <sup>C</sup>	40%	17.42 ± 0.2	30	31.60 ± 0.2 <sup>B</sup>	300	28.19 ± 0.4 <sup>C</sup>	3	48.67 ± 0.23 <sup>A</sup>
		50%	20.88 ± 0,2 <sup>A</sup>	40	34.84 ± 0.2 <sup>A</sup>	400	21.30 ± 0.6 <sup>D</sup>	4	43.09 ± 0.10 <sup>B</sup>
		60%	21.04 ± 0,2 <sup>A</sup>	50	34.48 ± 0.3 <sup>A</sup>	500	14.21 ± 0.4 <sup>E</sup>	5	37.72 ± 0,68 <sup>D</sup>
		70%	20.88 ± 0,2 <sup>A</sup>					6	30.72 ± 0,68 <sup>F</sup>
		80%	20.80 ± 0,04 <sup>A</sup>					8	19.36 ± 0,21 <sup>G</sup>
		90%	21.01 ± 0,2 <sup>A</sup>						

Sap : saponine.

Les résultats sont rapportés en moyenne (en mg.g<sup>-1</sup>, n=3) ± l'écart type.

#### II.1.1.4. Effet de la puissance

Selon les résultats des tableaux **18 et 19** on constate que pour un temps d'extraction de 5 minutes la quantité de saponines augmente de 100 W à 200 W d'une manière significative, puis il diminue de 200W jusqu'à 500W avec une différence significative au seuil de signification  $\alpha=0,05$ .

La plus grande quantité des saponines est obtenue pour une puissance de 200W, et elle est de l'ordre de  $46,6 \pm 0,1 \text{ mg.g}^{-1}$  pour *E. sepositus* et de  $40,7 \pm 0,1 \text{ mg.g}^{-1}$  pour *O. ophidianus*.

Ces résultats indiquent que la puissance des micro-ondes influence d'une façon significative l'extraction des saponines des étoiles de mer.

La puissance des micro-ondes influence l'extraction des molécules bioactives par l'effet du chauffage et par conséquent une augmentation des phénomènes de transfert de masse, jusqu'à une certaine valeur de puissance des micro-ondes, puis, à la dégradation thermique des composés bioactifs à des puissances élevées.

Selon les résultats obtenus nous avons fixé la puissance de 200 W pour les autres essais préliminaires et la gamme 100 à 300 W pour l'optimisation par la méthodologie de surface réponse.

#### II.1.1.5. Effet de temps

Les résultats de tableau **18 et 19** indiquent que pour une puissance micro-onde les teneurs des saponines obtenues sont en fonction du temps d'irradiation. La quantité des saponines obtenues entre 1 et 3 minutes augmente et la différence dans les quantités obtenues est significative. Au-delà de 3 minutes (4min, 5min, 6min, 7min et 8min) la teneur des saponines diminue avec une différence significative ( $P_{\text{cal}}=0,00$ ). D'après ces résultats on constate que la prolongation de temps d'extraction au-delà de seuil optimal conduit à la dégradation des saponines.

Cette observation était en concordance avec des conclusions décrites par d'autres auteurs ayant utilisé l'EAM pour l'étude des saponines des plantes par micro-onde (**Joong et al., 2003; Zhuoyan et al., 2008 et Li et al., 2010**).

Il est à noter que le temps est un paramètre primordial et il offre deux possibilités dans le cas d'extraction par micro-onde, soit de travailler avec des puissances élevées et un laps de temps réduit de l'ordre de seconde, ou en revanche avec des puissances faibles et un laps de temps beaucoup plus important de l'ordre de minute.

Dans notre étude, nous avons préconisé de travailler avec des puissances faibles et la gamme choisie est de 200W à 300W pour l'optimisation. De ce fait, le temps d'extraction sera de l'ordre de la minute. Et selon les résultats obtenus (**tableau 18 et tableau 19**) la gamme de 1 à 5 minutes est sélectionnée pour l'optimisation d'extraction des saponines par micro-onde.

### II.1.2. Application de plan d'expérience

La conception expérimentale, l'analyse de la variance et la modélisation empirique sont menées par la méthodologie de surface de réponse basée sur le plan d'expérience de Box et Behnken.

Dans l'EAM vingt sept expériences ont été menées en faisant varier sur trois niveaux (-1,0,+1) (**Tab. 10** *partie II.3.2 de matériels et méthode*) les variables indépendantes (concentration méthanol (X1), temps d'extraction (X2) puissance (X3), et le ratio (X4)) influençant les réponses étudiées (la teneur des saponines et la teneur des caroténoïdes).

La base de données expérimentales obtenue est introduite dans le logiciel Minitab pour la construire un modelé multi-paramètres qui régit l'EAM des saponines et des caroténoïdes des étoiles de mer. Le modèle obtenu est utilisé pour chercher les conditions optimales d'EAM des saponines et des caroténoïdes.

#### II.1.2.1. La teneur des saponines

Les teneurs des saponines obtenues à partir des 27 essais dans les différentes conditions opératoires sont rassemblées dans **le tableau 20** pour *E. sepositus* et *O. ophidianus*.

**Tableau 20:** Valeurs expérimentales et prédites de la teneur des saponines en (mg.g<sup>-1</sup>) d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus* obtenus par l'EAM dans le cadre de plan d'expérience.

	Variables indépendantes				Caroténoïdes (mg.g <sup>-1</sup> ) d' <i>E. sepositus</i>		Caroténoïdes (mg.g <sup>-1</sup> ) d' <i>O. ophidianus</i>	
	MeOH (%)	Temps min	Puissance (W)	Ratio mL.g <sup>-1</sup>	Valeur* Expérimentale	Valeur Prédite	Valeur* Expérimentale	Valeur Prédite
1	30	1	200	35	16.78±0.00	16.75	15.25±0.40	15.06
2	70	1	200	35	40.70±0.20	40.59	35.46±0.28	35.65
3	30	5	200	35	22.34±0.05	22.43	19.86±0.42	19.65
4	70	5	200	35	36.71±0.49	36.73	32.30±0.42	32.49
5	50	3	100	20	28.74±0.08	28.70	24.95±0.21	25.10
6	50	3	300	20	34.47±0.10	34.32	29.84±0.34	29.93
7	50	3	100	50	54.00±0.00	54.13	47.71±0.28	47.61
8	50	3	300	50	46.50±0.71	46.52	41.24±0.28	41.08
9	30	3	200	20	17.20±0.00	17.17	15.05±0.12	15.01
10	70	3	200	20	30.68±0.17	30.93	27.35±0.28	27.12
11	30	3	200	50	30.90±0.29	30.68	27.15±0.00	27.24
12	70	3	200	50	55.00±0.00	55.06	48.65±0.07	48.56
13	50	1	100	35	34.39±0.18	34.39	30.31±0.04	30.19
14	50	5	100	35	39.86±0.00	39.78	35.03±0.14	34.98
15	50	1	300	35	37.76±0.00	37.87	33.50±0.23	33.42
16	50	5	300	35	34.27±0.00	34.30	30.07±0.10	30.05
17	30	3	100	35	28.57±0.14	28.67	25.5±0.35	25.41
18	70	3	100	35	48.25±0.00	48.14	41.72±0.37	41.68
19	30	3	300	35	27.97±0.00	28.07	23.93±0.53	24.11
20	70	3	300	35	46.85±0.00	46.75	41.30±0.14	41.28
21	50	1	200	20	22.31±0.13	22.33	19.80±0.00	19.84
22	50	5	200	20	23.15±0.07	23.12	20.38±0.26	20.37
23	50	1	200	50	41.00±0.00	41.03	36.33±0.10	36.48
24	50	5	200	50	42.08±0.11	42.06	37.29±0.33	37.39
25	50	3	200	35	55.94±0.00	55.94	48.75±0.07	48.85
26	50	3	200	35	55.94±0.00	55.94	48.85±0.07	48.85
27	50	3	200	35	55.94±0.00	55.94	48.96±0.06	48.85

X1: méthanol %; X2: temps (minutes); X3: puissance (X); ratio liquide-solide (mL.g<sup>-1</sup>). Sap: saponines.

\*valeur moyenne et écart type pour n=3.

Les modèles mathématiques pour l'évaluation de la quantité des saponines d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus* obtenus sont présentés par les équations **13** et **14**.

Les modèles sont des modèles polynomiaux de second degré qui déterminent les valeurs de coefficient constant  $B_0$ , des coefficients linéaires, des coefficients des interactions et quadratiques.

#### **Modèle mathématique d'EAM des saponines d'*Echinaster sepositus***

$$Y_{sap} \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = 191.66 + 3.5527X_1 + 26.56X_2 + 0.32X_3 + 3.65X_4 - 0.0597X_1X_2 - 0.0001X_1X_3 + 0.0089X_1X_4 - 0.0112X_2X_3 - 0.0022X_3X_4 - 0.03287X_1^2 - 3.5182X_2^2 - 0.0005X_3^2 - 0.0433X_4^2 \quad (13).$$

#### **Modèle mathématique d'EAM des saponines d'*Ophidiaster Ophidianus***

$$Y_{sap} \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = -163.53 + 3.0445X_1 + 22.72X_2 + 0.27X_3 + 3.13X_4 - 0.0485X_1X_2 - 0.0001X_1X_3 + 0.0077X_1X_4 - 0.0102X_2X_3 - 0.0019X_3X_4 - 0.02772X_1^2 - 3.0127X_2^2 - 0.0005X_3^2 - 0.0368X_4^2 \quad (14).$$

Les équations **13** et **14** expriment que l'augmentation de pourcentage de solvant MeOH % ( $X_1$ ), de temps ( $X_2$ ), de puissance ( $X_3$ ) et de ratio liquide-solide ( $X_4$ ) ainsi que l'augmentation simultanée de pourcentage de solvant et de ratio liquide-solide ( $X_1$ - $X_2$ ) conduit à des teneurs élevées de saponines. À l'inverse, les autres interactions doivent diminuer pour avoir des rendements importants en saponines.

L'analyse des effets des facteurs montre que l'interaction temps\*ratio ( $X_2$ \* $X_4$ ) n'opère pas significativement sur la teneur des saponines le P-value dépasse 0.05 (avec  $P_{cal} = 0,399$  et  $P_{cal} = 0,313$  pour les saponines d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus* respectivement). De ce fait, le terme ( $X_2$ \* $X_4$ ) ne figure pas dans les équations qui modélisent l'EAM des saponines d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus*.

#### **II.1.2.1.1. Analyse de la variance et effet des facteurs**

Les résultats de l'étude statistique sur l'effet des facteurs sont récapitulés dans le tableau **21** et **22** pour *E. sepositus* et *O. ophidianus*, respectivement. Cette étude est basée sur l'analyse de la variance (ANOVA) qui permet d'estimer la signification des variables à un niveau de confiance de 95 %. Les coefficients discutés sont les valeurs P (ou *P-value*) et le test de Fisher F (*F-value*). Le premier permet de valider la signification de l'effet de la variable si la valeur de *P-value* ne dépasse pas 0,05, et le second, compare la robustesse du modèle.

**Tableau 21:** Analyse de la variance (ANOVA) appliquée à la teneur des saponines obtenues par l'EAM à partir *E. sepositus*.

Source	Som Car ajust	DL	F-value	P-value	
<b>Modèle</b>	7612.25	14	14215.34	0.000	Significatif
X1-MeOH	2182.33	1	57054.95	0.000	
X2- Temps	4.98	1	130.30	0.000	
X3puissance	5.98	1	156.45	0.000	
X4-Ratio	2125.11	1	55558.80	0.000	
X1-X2	45.56	1	1191.06	0.000	
X1-X3	0.32	1	8.34	0.006	
X1-X4	56.445	1	1475.90	0.000	
X2-X3	40.20	1	1051.04	0.000	
X2-X4	0.03	1	0.73	0.399	
X3-X4	87.49	1	2287.44	0.000	
X1 <sup>2</sup>	1733.33	1	45316.06	0.000	
X2 <sup>2</sup>	2112.45	1	55227.86	0.000	
X3 <sup>2</sup>	298.24	1	7797.08	0.000	
X4 <sup>2</sup>	1011.67	1	26449.19	0.000	
Ereure	1.49	39			
Lack -of- fit	0.49	10	1.43	0.215	
Pur error	1.00	29			
Cor total	7613.74	53			
R <sup>2</sup> =0.9998	R <sup>2</sup> adj=0.9997	R <sup>2</sup> pred=0.9996			

**DL:** degré de liberté représente la quantité d'informations dans les données.

**Som Car ajust:** Les sommes des carrés ajustées sont des mesures de la variation des différentes parties du modèle.

**Tableau 22:** Analyse de la variance (ANOVA) appliquée à la teneur des saponines obtenues par l'EAM à partir d'*O. ophidianus*.

Source	Som Car ajust	DL	F-value	P-value	
<b>Modèle</b>	5819.09	14	5935.66	0.000	Significatif
X1-MeOH	1676.03	1	23934.53	0.000	
X2- Temps	3.05	1	43.58	0.000	
X3-puissance	4.32	1	61.73	0.000	
X4-Ratio	1699.81	1	24274.04	0.000	
X1-X2	30.14	1	430.47	0.000	
X1-X3	0.41	1	5.83	0.021	
X1-X4	42.46	1	606.33	0.000	
X2-X3	33.21	1	474.31	0.000	
X2-X4	0.07	1	1.04	0.313	
X3-X4	64.58	1	922.18	0.000	
X1 <sup>2</sup>	1311.78	1	18732.80	0.000	
X2 <sup>2</sup>	1549.00	1	22120.50	0.000	
X3 <sup>2</sup>	229.94	1	3283.70	0.000	
X4 <sup>2</sup>	731.62	1	10447.83	0.000	
Erreur	2.73	39			
Lack -of- fit	0.82	10	1.25	0.301	
Pur error	1.91	29			
Cor total	5821.82	53			
R <sup>2</sup> =0.9998	R <sup>2</sup> adj=0.9997	R <sup>2</sup> pred=0.9996			

**DL:** degré de liberté représente la quantité d'informations dans les données.

**Som Car ajust:** Les sommes des carrés ajustées sont des mesures de la variation des différentes parties du modèle.

D'après les résultats de **tableau 21 et 22**, les valeurs de P et de F obtenus par l'ANOVA montrent que les modèles mathématiques représentés en équation **12 et 13** sont hautement significatifs avec  $P\text{-value} < 0,05$  et  $0,01$  et  $F\text{-value} > 0,05$ .

Les coefficients statistiques sont reportés dans les tableaux **21 et 22**.

Les coefficients de régression R<sup>2</sup> obtenues sont de l'ordre de 0, 9998% et la valeur de coefficient de détermination ajustée R<sup>2</sup> adj est de 0,9997 trop proche de R<sup>2</sup>. La valeur de R<sup>2</sup> pred est de 0,9996 elle est en accord avec la valeur de R<sup>2</sup> adj ce qui confirme la haute signification des modèles **13 et 14**.

Le test de manque de l'ajustement ne détecte aucune inadéquation de l'ajustement au seuil de signification  $\alpha = 0,05$  car les valeurs de manque d'ajustement sont: 0,215 et 0,301  $> \alpha = 0,05$ , cela signifie que le modèle d'ajustement est adéquat pour décrire les données expérimentales.

### a. Effet linéaire

D'après les résultats présentés dans les tableaux 21 et 22 on constate que les facteurs étudiés (Concentration de solvant: X1; temps: X2; puissance: X3 et ratio:X4) influencent de manière hautement significative l'extraction des saponines des étoiles de mer étudiées par micro-onde avec une probabilité  $P_{cal} = 0,000$ .

### b. Effet quadratique

Les effets quadratiques  $X_1^2$  (solvant\*solvant),  $X_2^2$ (temps\*temps),  $X_3^2$  (puissance\*puissance), et  $X_4^2$ (ratio\*ratio) influencent d'une manière significative sur la teneur des saponines extraite à partir des étoiles de mer *Echinaster sepositus* et *Ophidiaster Ophidianus* par micro-onde avec des probabilités  $P_{cal} = 0,000$ .

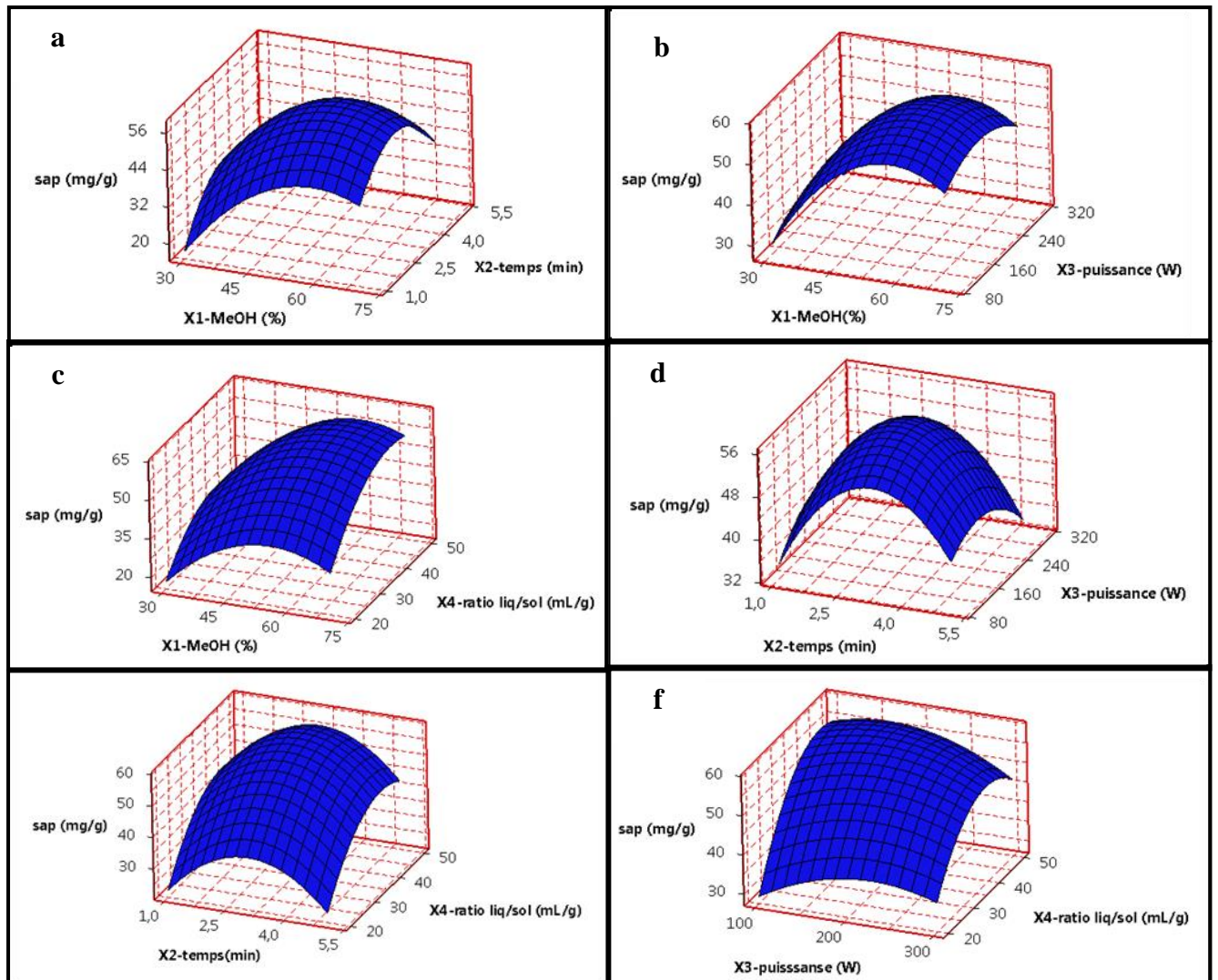
### c. Effet d'interaction

D'après les valeurs de  $P_{cal}$  obtenus (**Tab. 21 et 22**), on constate que l'interaction qui affecte moins la quantité des saponines par rapport aux autres est l'interaction  $X_1*X_3$  (solvant\*puissance) avec un  $P_{cal}= 0,006$  pour les saponines d'*E. sepositus* et  $P_{cal}=0,021$  pour les saponines d'*O.ophidianus*. Les autres interactions ( $X_1*X_2$ : solvant\*temps,  $X_1*X_4$ : solvant\*ratio,  $X_2*X_3$ : temps\*puissance et  $X_3*X_4$ : puissance\*solvant) présentent tout un  $P_{cal}=0,000$  ce qui les qualifie comme étant des interactions ayant un grand effet sur l'extraction des saponines à partir des étoiles de mer par micro-onde.

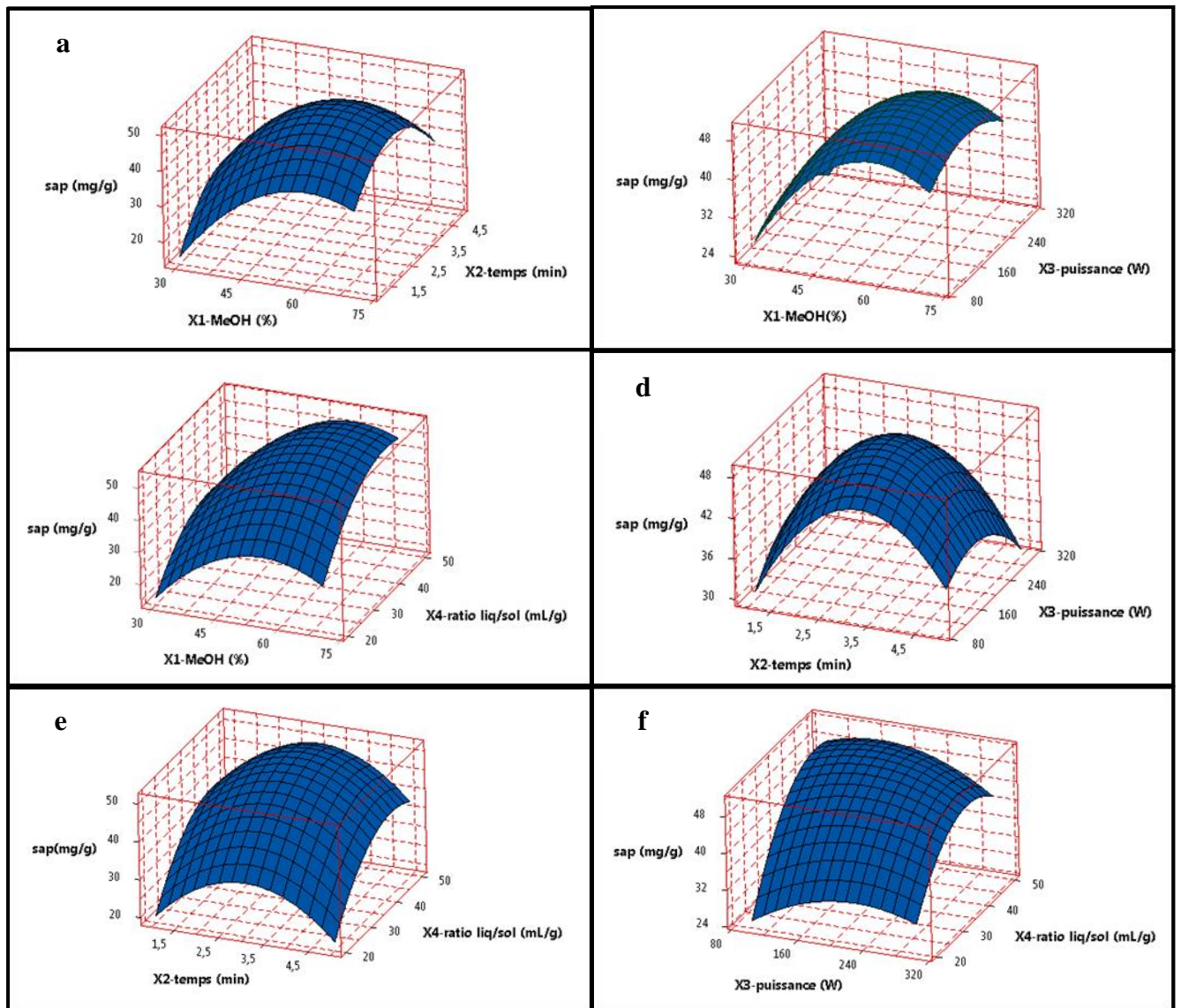
L'interaction  $X_2*X_4$  (temps \*ratio) n'a pas un effet significatif sur l'extraction des saponines à partir des étoiles de mer étudiées avec des probabilités de 0,339 et 0,313 pour les teneurs des saponines d'*E. sepositus* et d'*O. ophidainus*, respectivement.

Les surfaces de réponse (**Fig. 23 et Fig. 24**) de toutes les interactions sont obtenues à partir des équations **13 et 14**. Elles présentent la quantité des saponines obtenue en combinant deux variables et en maintenant les autres variables constantes à une valeur de zéro.

Les figures ci-après montrent les surfaces de réponse pour les différentes interactions sur l'extraction des saponines par micro-onde et il donne une idée générale des résultats exprimés en quantité de saponine en  $mg.g^{-1}$  de poids sec.



**Figure 23:** Surface de réponse pour les différentes interactions sur la teneur des saponines (cas de l'EAM d'*E. sepositus*). (a): solvant/temps, (b): solvant/puissance, (c): solvant/ratio, (d): puissance/temps, (e): ratio/temps, (f): puissance/ratio.



**Figure 24:** Surface de réponse pour les différentes interactions sur la teneur des saponines (cas de l'EAM d'*O. ophidianus*). (a): solvant/temps, (b): solvant/puissance, (c): solvant/ratio, (d): puissance/temps, (e): ratio/temps, (f): puissance/ratio.

La première lecture des figures **22** et **23** montre que les surfaces de réponse des différentes interactions ont les mêmes allures pour les deux cas étudiés.

D'après ces figures on constate que la quantité des saponines augmente significativement avec l'augmentation de la concentration de méthanol de 30% à 60%, puis elle diminue significativement avec l'augmentation de la concentration de méthanol de 60 à 70% et l'augmentation de temps d'irradiation de 1 à 3 min (**Fig. 22 a et Fig. 23 a**), de la puissance de 100 à 200 (**Fig. 22 b et Fig. 23 b**) et de volume de solvant de 20 à 45 mL (**Fig. 22 c et Fig. 23 c**). Ces résultats indiquent que la concentration de méthanol est un facteur primordial à prendre en considération dans l'extraction des saponines des étoiles de mer par les micro-ondes en raison de son implication dans l'interaction avec la matrice première, dans la solubilité des saponines et dans l'adsorption des énergies des micro-ondes.

La diminution de la quantité des saponines avec l'augmentation de la concentration de solvant au-delà de 60% peut être expliquée par le changement de la polarité de solvant qui diminue avec l'augmentation de sa concentration ce qui conduit davantage à l'extraction d'autres composés autres que les saponines résultant ainsi une diminution dans le rendement d'extraction des saponines. D'autre part, la présence d'une proportion d'eau appropriée dans le solvant facilite et améliore le rendement d'extraction en entraînant le gonflement de la matrice ce qui favorise la surface de contact entre le solvant et la matrice. La même conclusion a été établie par **Li et al. (2010)** dans leur travail sur les saponines triterpène de la plante *Xanthoceras sorbifolia Bunge*.

Les teneurs élevées des saponines obtenues avec l'augmentation de la puissance de 100 à 200W et le temps de 1min à 3 min (**Fig. 22 d et Fig. 23 d**) peuvent être expliquées par les températures engendrées dans ces conditions opératoires. Ces températures d'une part diminuent la tension superficielle et la viscosité de solvant ce qui améliore le mouillage de la matrice et la pénétration de solvant dans les sites actifs pour désorber les analytes, et d'autre part elles augmentent la capacité de solvant à solubiliser ces analytes (**Eskilson et al., 2000 et Li et al., 2010**).

Pour la gamme de puissance testée 100W à 300W on constate que des faibles teneurs des saponines sont obtenues à temps d'irradiation trop élevés (supérieurs à 3 min) (**Fig.22 d et Fig. 23 d**). Cela peut être attribué à l'augmentation de la température avec l'augmentation de temps d'irradiation ce qui provoque la dégradation thermique des saponines (**Zhuoyan et al.,2008; Li et al., 2010 et Eskilson et al.,2000**).

Le ratio liquide-solide adéquat pour l'extraction des saponines par micro-onde varie entre  $40\text{mL.g}^{-1}$  et  $45\text{mL.g}^{-1}$  pour un temps d'irradiation situé dans l'intervalle de 2 à 3min (**Fig. 22 e et Fig. 23 e**) et une gamme de puissance de 150W à 200W (**Fig. 22 f et Fig. 23 F**), dans ces conditions le volume de solvant permet une meilleure adsorption des énergies des micro-ondes par le méthanol et la matrice animale ce qui permet un chauffage simultané de l'ensemble, tout en restant dans une gamme des températures adéquates pour l'extraction et qui n'altère pas les saponines.

Une faible diminution de la quantité des saponines est enregistrée pour un ratio liquide-solide de  $50\text{ mL.g}^{-1}$  (**Fig. 22 e, Fig. 23 e et Fig. 22 f, Fig. 23 f**), cela peut être expliqué par le fait que la plus grande proportion des énergies des micro-ondes est adsorbée par le solvant ce qui diminuera la proportion adsorbée par la matrice, par conséquent la rupture de la paroi cellulaire sera empêchée et le transfert de masse de la matrice vers le solvant sera influencé négativement (**Li et al., 2010**).

#### II.1.2.1.2. Les conditions optimales et la validation de la méthode d'extraction des saponines par l'EAM

Les surfaces de réponses précédentes et les équations **13 et 14** permettent de déterminer les conditions optimales de l'extraction qui donnent la meilleure repense (ou teneur maximale de saponine). **Le tableau 23** indique la valeur optimale de chaque paramètre.

**Tableau 23:** Conditions optimales d'extraction des saponines par micro-onde.

% MeOH (X1)		Temps (min) (X2)		Puissance (w) (X3)		Ratio ( $\text{mL.g}^{-1}$ ) (X4)	
Ech	Oph	Ech	Oph	Ech	Oph	Ech	Oph
58	58	3	3	176	178	43	43

**Ech:** *E.sepositus*, **Oph:** *O. ophidianus*.

Les résultats reportés dans le tableau ci-dessus montrent que les conditions optimales sont obtenues dans le domaine d'étude avec des valeurs intermédiaires de concentration de méthanol, de temps et de la puissance d'irradiation, et de ratio liquide solide, ce qui indique, le bon choix des intervalles de chaque facteur.

La puissance optimale pour l'extraction des saponines est de l'ordre de 176 W pour *E. sepositus* et de 178 pour *O. ophidianus*, et le temps d'irradiation est de 3 minutes pour les deux cas étudiés.

D'une manière globale dans l'EAM la puissance appliquée et le temps d'irradiation sont étroitement liés. Selon **Eskilson et al. (2000)** les puissances et le temps utilisés doivent être

choisis correctement pour éviter les températures excessives, menant une éventuelle dégradation des composés.

D'après le **tableau 23** la concentration de 59% de MeOH à une puissance de 178W et un temps d'extraction de 3 minutes offre la pression de vapeur, la viscosité et la tension superficielle appropriée pour l'extraction des saponines des étoiles de mer par micro-onde.

Le volume de solvant adéquat pour l'extraction des saponines par micro-onde est de 44 mL ce volume dans des conditions de concentration de 58%, de puissance de 178 W et de temps de 3minutes permet une meilleure adsorption des énergies des micro-ondes par le méthanol et la matrice animale.

La validation d'une méthode d'extraction passe obligatoirement par des essais expérimentaux. Les résultats **de tableau 24** montrent les valeurs expérimentales des teneurs des saponines obtenues dans les conditions optimales d'extraction.

**Tableau 24:** Valeurs expérimentales et prédites des quantités des saponines dans les conditions optimales (EAM).

Quantités moyennes (en mg.g <sup>-1</sup> , n=3) pour l'extraction des saponines par micro-ondes			
<i>E. sepositus</i>		<i>O. ophidianus</i>	
Valeur expérimentale	Valeur prédite	Valeur expérimentale	Valeur prédite
60.3±0.6	60.8	52.1±0.3	53.3

Les résultats **de tableau 24** indiquent que les valeurs expérimentales des saponines des deux espèces étudiées sont proches des valeurs prédites ce qui valide les modèles mathématiques proposés par les équations **13 et 14** pour prédire les quantités de saponines à extraire par micro-onde.

Les valeurs rapportées sur le **tableau 24** montrent que les conditions optimales d'extraction des saponines d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus* sont de la même grandeur et cela concorde avec les surfaces de réponse des saponines des deux espèces qui présentent les mêmes allures (**Fig. 22 et Fig. 23**), ce qui indique l'efficacité de la méthode optimisée pour l'EAM des saponines des étoiles de mer.

### II.1.2.2. La teneur des caroténoïdes

Pour quantifier les caroténoïdes contenus dans les deux étoiles de mer étudiées nous avons utilisé les mêmes plans expérimentaux et les mêmes conditions opératoires que les saponines, car le but de travail comme déjà mentionner dans l'introduction est de valoriser un déchet d'isolement et de purification des saponines qui semble contenir des caroténoïdes.

Ces composés suscitent un intérêt croissant de la part de l'industrie alimentaire en raison de leur importance nutritionnelle et de leurs propriétés antioxydantes d'où l'intérêt porté à ces composés.

Le tableau 2 en annexe présente les résultats des teneurs en caroténoïdes (valeurs expérimentales et prédites) des deux étoiles de mer étudiées par l'EAM dans les différentes conditions opératoires.

Sur la base de ces résultats le modèle retenu pour l'EAM des caroténoïdes est déduit par les équations 15 et 16.

#### Modèle mathématique d'EAM des caroténoïdes d'*Echinaster sepositus*

$$Y_{card} \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = 17.213 + 0.59485X_1 + 3.2246 X_2 - 0.02603X_3 - 1.60824 X_4 - 0.03371 X_1X_2 - 0.0020 X_1X_3 - 0.00638 X_1X_4 - 0.0050X_2X_3 + 0.00012X_3X_4 + 0.0032X_1^2 - 0.1038 X_2^2 + 0.0003X_3^2 + 0.02219 X_4^2 \dots \dots \text{ (15)}.$$

#### Modèle mathématique d'EAM des caroténoïdes d'*Ophidiaster ophidianus*

$$Y_{card} \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = 16.403 + 0.5800X_1 + 2.669 X_2 - 0.02550X_3 - 1.5292 X_4 - 0.02936 X_1X_2 - 0.0019 X_1X_3 - 0.0059X_1X_4 - 0.0037X_2X_3 + 0.0037X_3X_4 + 0.00268X_1^2 - 0.0925 X_2^2 + 0.0003X_3^2 + 0.02102 X_4^2 \dots \dots \text{ (16)}.$$

Les équations 15 et 16 prédisent de meilleur rendement de caroténoïdes lorsque le pourcentage de solvant et la durée d'irradiation par micro-onde augmentent d'une part, et la puissance d'irradiation ainsi que le ratio liquide-solide décroît d'autre part.

Les effets quadratiques solvant\*solvant ( $X_1*X_1$ ), puissance\*puissance ( $X_3*X_3$ ) et ratio\*ratio ( $X_4-X_4$ ), ainsi que l'effet d'interaction puissance\*ratio ( $X_3*X_4$ ) doivent augmenter pour avoir des rendements élevés en caroténoïdes, contrairement les autres effets (quadratiques et d'interactions) doivent diminuer.

### II.1.2.2.1. Analyse de la variance et effet des facteurs

Pour estimer la signification des variables à un niveau de confiance de 95 %, un tableau d'analyse de la variance est établi (**Tab. 25 et 26**). Les conclusions de cette analyse sont les suivantes:

- Les valeurs de *P-value* et de *F-value* (**Tab. 25 et 26**) montrent que les quatre facteurs étudiés ont un incontestable effet linéaire, quadratique et d'interaction sur la teneur des caroténoïdes à un niveau de confiance de 95% (*P-value* <0,05 et *F-value* trop grande). Et seul l'interaction temps-ratio n'a pas d'effet significatif sur l'extraction des caroténoïdes avec un *P-value*=0,874 dans le cas d'*E.sepositus* et *P-value*=0,948 dans le cas d'*O. ophidianus*.
- Le  $R^2$  et le  $R^2$  ajusté associées aux équations **15 et 16** sont supérieurs à 99% et sont très proches ce qui indique la signification et la pertinence de modèle.

**Tableau 25:** L'analyse de la variance (ANOVA) appliquée à la teneur des caroténoïdes obtenus par l'EAM à partir d'*E. sepositus*.

Source	Som Car ajust	Df	<i>F-value</i>	<i>P-value</i>	
<b>Modèle</b>	1553.96	13	24576.03	0.000	Significatif
X1-MeOH	325.58	1	66938.60	0.000	
X2- Temps	0.69	1	138.93	0.000	
X3-puissance	4.40	1	905.29	0.000	
X4-Ratio	656.80	1	135036.38	0.000	
X1-X2	14.55	1	2991.38	0.000	
X1-X3	132.65	1	27272.21	0.021	
X1-X4	29.34	1	6031.74	0.000	
X2-X3	8.00	1	1644.77	0.000	
X2-X4	0.00	1	0.03	0.874	
X3-X4	0.28	1	57.52	0.000	
X1 <sup>2</sup>	17.59	1	3617.23	0.000	
X2 <sup>2</sup>	1.84	1	378.06	0.000	
X3 <sup>2</sup>	120.04	1	24678.85	0.000	
X4 <sup>2</sup>	266.04	1	54696.30	0.000	
Erreur	0.19	40			
Lack -of- fit	0.04	11	0.67	0.751	
Pur error	0.15	29			
Cor total	1554.16	53			
$R^2=0.9999$	$R^2_{adj}=0.9998$	$R^2_{pred}=0.9998$			

**DL:** degré de liberté représente la quantité d'informations dans les données.

**Som Car ajust:** Les sommes des carrés ajustées sont des mesures de la variation des différentes parties du modèle.

**Tableau 26:** L'analyse de la variance (ANOVA) appliquée à la teneur des caroténoïdes obtenus par l'EAM à partir d'*O.ophidianus*.

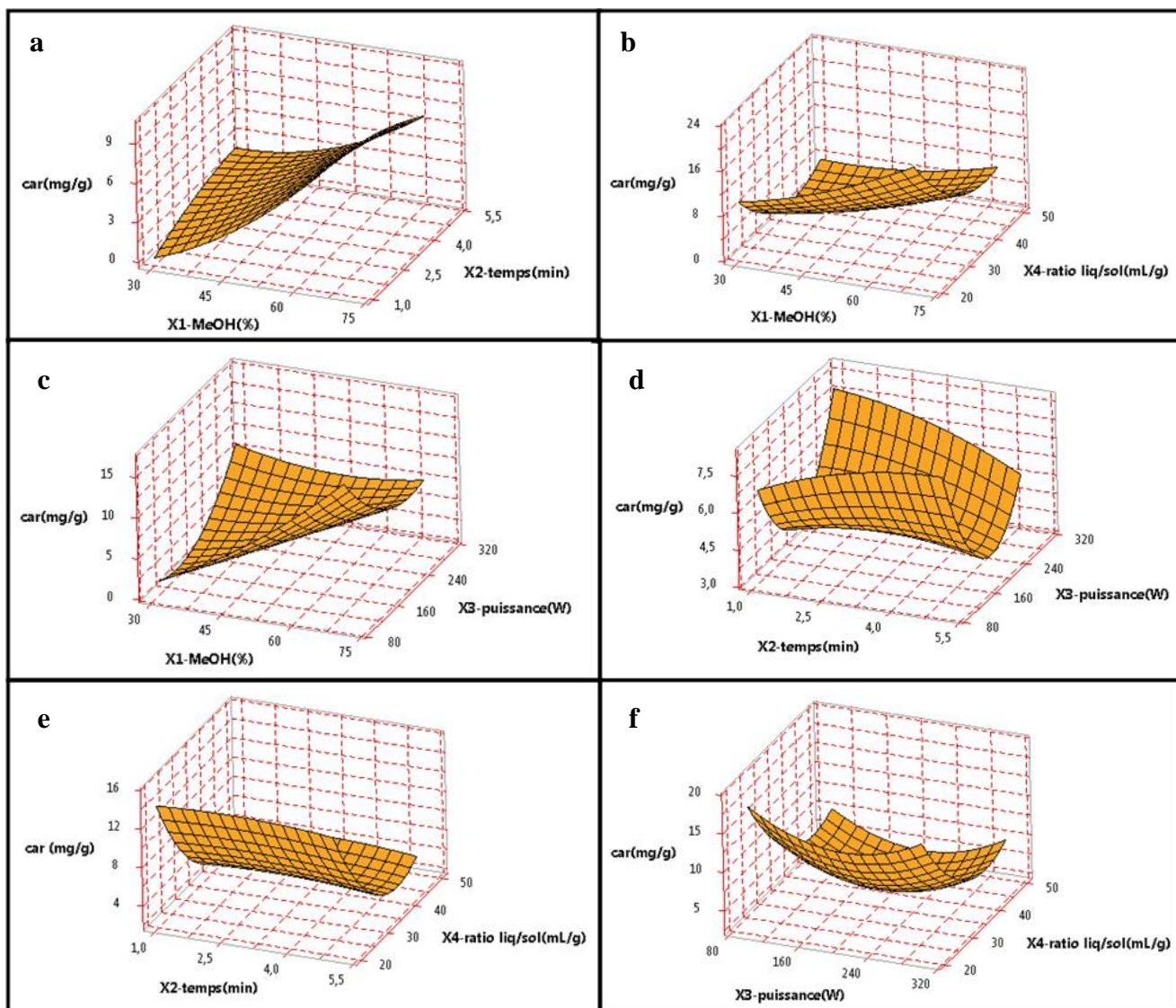
Source	Som Car ajust	Df	F-value	P-value	
<b>Modèle</b>	1362.75	13	3646.71	0.000	Significatif
X1-MeOH	280.80	1	9768.51	0.000	
X2- Temps	0.85	1	29.45	0.000	
X3-puissance	3.51	1	122.26	0.000	
X4-Ratio	582.61	1	20267.77	0.000	
X1-X2	11.04	1	383.97	0.000	
X1-X3	116.25	1	4044.13	0.00	
X1-X4	25.49	1	886.74	0.000	
X2-X3	4.38	1	152.40	0.000	
X2-X4	0.00	1	0.00	0.948	
X3-X4	0.31	1	10.91	0.000	
X1 <sup>2</sup>	1311.78	1	18732.80	0.000	
X2 <sup>2</sup>	1549.00	1	22120.50	0.000	
X3 <sup>2</sup>	229.94	1	3283.70	0.000	
X4 <sup>2</sup>	731.62	1	10447.83	0.000	
Erreur	2.73	40			
Lack -of- fit	0.82	11	1.38	0.235	
Pur error	1.91	29			
Cor total	5821.82	53			
R <sup>2</sup> =0.9998	R <sup>2</sup> adj=0.9997	R <sup>2</sup> pred=0.9996			

**DL:** degré de liberté représente la quantité d'informations dans les données.

**Som Car ajust:** Les sommes des carrés ajustés sont des mesures de la variation des différentes parties du modèle.

Les surfaces de réponse modélisées grâce aux prédictions du modèle **15** pour l'EAM des caroténoïdes sont présentées dans la **figure 25**.

Les surfaces de réponse de la teneur des caroténoïdes des deux espèces présentent les mêmes allures, de ce fait, seule celles d'*E. sepositus* sont reportées ci-après. Celles des caroténoïdes d'*O. ophidianus* sont présentées en annexe (**Fig. 1**).



**Figure 25:** Surface de réponse pour les différentes interactions sur la teneur des caroténoïdes (cas de l'EAM d'*E. sepositus*). (a): solvant/temps, (b): solvant/puissance, (c): solvant/ratio, (d): puissance/temps,(e): ratio/temps, (f): puissance/ratio.

Les figures 25. a.b.c indiquent que les meilleures performances d'extraction des caroténoïdes sont atteintes lorsque le pourcentage de MeOH est supérieur à 65% et que la durée d'irradiation diminue, la puissance appliquée et le ratio liquide solide tendent vers les niveaux inférieurs de domaine d'étude.

L'effet d'interaction temps puissance illustré dans la figure 25 d indique que les deux facteurs sont liés inversement, en effet, l'augmentation de la teneur des caroténoïdes est favorisée par l'augmentation de la puissance et la diminution de temps d'irradiation, ou à l'inverse par la diminution de la puissance des micro-ondes et l'augmentation de temps d'extraction. Ces résultats peuvent être expliqués par les fortes températures engendrées à des puissances et temps d'irradiation élevés qui engendre la dégradation des caroténoïdes thermosensibles.

La figure 25 c montre que les optimums des teneurs des caroténoïdes sont atteints pour toute la plage de temps testée à des faibles ratios liquide- solide ( $<25 \text{ mL.g}^{-1}$ ). À des ratios supérieurs à  $35 \text{ mL.g}^{-1}$  la surface de réponse est plane, associée à l'absence d'interaction temps-ratio et traduit par un *P-value* supérieure à 0,05 (Tab. 25 et 26).

Pour la gamme de puissance testée le ratio requis pour atteindre les quantités importantes de caroténoïdes doit être inférieur à  $25 \text{ mL.g}^{-1}$  (Fig. 25 d).

En conclusion, les surfaces de réponse montrent que plus la puissance, le temps et le ratio augmentent plus la teneur des caroténoïdes diminuent. De cela, on constate que l'EAM des caroténoïdes nécessite un temps d'extraction faible, de petites quantités de solvant et une puissance d'irradiation modérée. Cette conclusion concorde avec de nombreuses recherches sur l'EAM des caroténoïdes. Hiranvarachat et Dehahasti (2014) ont montré dans leur étude sur l'EAM des caroténoïdes des carottes que l'extraction de caroténoïdes nécessitait un temps d'extraction faible et de petites quantités de solvant. Pasquet *et al.* (2011) ont démontré aussi que l'EAM est une technique efficace pour extraire la fucoxanthine de *C. closterium* (bactérie) et cela à une faible puissance d'irradiation de 75 W. Ho *et al.* (2015) mentionnent dans leur travail sur les caroténoïdes des tomates que le rendement de caroténoïde augmente avec la diminution de ratio liquide-solide.

#### II.1.2.2.2. Les conditions optimales et la validation de la méthode d'extraction des caroténoïdes par l'EAM

L'examen des surfaces de réponse ainsi que les équations 14 et 15 permet de déterminer les conditions optimales d'extraction des caroténoïdes pour les deux étoiles de mer étudiée (Tab. 27).

**Tableau 27:** Conditions optimales d'extraction des caroténoïdes par micro-ondes.

% MeOH (X1)		Temps (min) (X2)		Puissance (w) (X3)		Ratio (mL.g <sup>-1</sup> ) (X4)	
Ech	Oph	Ech	Oph	Ech	Oph	Ech	Oph
70	70	1.77	1.33	100	100	20	20

**Ech:** *E. sepositus*, **Oph:** *O. Ophidianus*.

Le maximum des caroténoïdes est obtenu pour les conditions optimales d'une concentration méthanol de 70%, de temps d'irradiation d'environ 90 secs et d'une puissance de 100W avec un ratio de 20 mL.g<sup>-1</sup>.

Les conditions optimales d'extraction des caroténoïdes à partir d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus* sont identiques, cela implique la reproductibilité des résultats et confirme la fiabilité des modèles obtenus.

Une extraction des caroténoïdes à partir de chaque étoile de mer (*E. sepositus* et *O. ophidianus*) a été réalisée en triplet dans les conditions optimales décrites dans le **tableau 27**.

Les résultats expérimentaux et les valeurs prédictives données par le modèle sont reportés dans le **tableau 28**.

**Tableau 28:** Valeurs expérimentales des quantités des caroténoïdes dans les conditions optimales d'EAM.

Quantités moyennes (en mg.g <sup>-1</sup> , n=3) pour l'extraction des caroténoïdes par micro-ondes			
<i>E. sepositus</i>		<i>O. ophidianus</i>	
<u>Valeur expérimentale</u>	<u>Valeur prédite</u>	<u>Valeur expérimentale</u>	<u>Valeur prédite</u>
28.23±0.05	29.43	26.22±0.23	27.28

Pour les deux étoiles de mer, les valeurs expérimentales de la teneur des caroténoïdes sont en accord avec les teneurs estimées à partir des équations (**15 et 16**), les différences entre les deux valeurs n'étant pas significatives ce qui confirme une nouvelle fois les fiabilités des modèles obtenus.

## II.2. Extraction assistée par ultrasons

### II.2.1. Étude préliminaire

Dans cette étude, les influences de la nature et de la concentration du solvant, du ratio liquide-solide, de temps du sonication et du mode de pulsation ont été étudiées, séparément, pour définir pour chaque facteur la gamme de valeurs appropriée et à considérer par la suite dans les plans d'expérience. Les résultats de l'étude préliminaire sont présentés dans les tableaux **29 et 30**.

**Tableau 29:** Résultats des analyses préliminaires pour l'extraction des saponines par ultra-sons à partir d'*E. sepositus*. Les mêmes lettres dans la même colonne signifient qu'il n'y a pas de différence significative dans la teneur des saponines au seuil de signification ( $P=0,05$ ).

Nature de solvant		% de méthanol		Ratio		Temps	
Solvant	mg.g <sup>-1</sup>	MeOH (%)	Sap (mg.g <sup>-1</sup> )	Ratio (mL.g <sup>-1</sup> )	Sap (mg.g <sup>-1</sup> )	Temps (min)	Sap (mg.g <sup>-1</sup> )
<b>Méthanol 70%</b>	19.15±0.1 <sup>A</sup>	20%	10.39±0.1 <sup>H</sup>	1/10	9.27±0.1 <sup>E</sup>	5	10.74±0.1 <sup>F</sup>
<b>Éthanol 70%</b>	15.23±0.05 <sup>B</sup>	30%	12.73±0.1 <sup>G</sup>	1/20	13.49±0.1 <sup>D</sup>	10	13.56±0.1 <sup>E</sup>
<b>eau</b>	6.37±0.1 <sup>C</sup>	40%	14.78±0.1 <sup>F</sup>	1/30	17.60±0.2 <sup>B</sup>	15	16.24±0.2 <sup>D</sup>
		50%	16.63±0.2 <sup>E</sup>	1/40	18.77±0.2 <sup>A</sup>	20	18.67±0.2 <sup>B</sup>
		60%	18.01±0.2 <sup>D</sup>	1/50	15.12±0.1 <sup>C</sup>	25	19.10±0.1 <sup>A</sup>
		70%	19.31±0.1 <sup>A</sup>			30	19.15±0.2 <sup>A</sup>
		80%	19.12±0.1 <sup>B</sup>			35	18.11±0.2 <sup>C</sup>
		90%	18.30±0.2 <sup>C</sup>				

**Tableau 30:** Résultats des analyses préliminaires pour l'extraction des saponines par ultra-sons à partir d'*O. ophidianus*. Les mêmes lettres dans la même colonne signifient qu'il n'y a pas de différence significative dans la teneur des saponines au seuil de signification ( $P=0,05$ ).

Nature de solvant		% de méthanol		Ratio		Temps	
Solvant	mg.g <sup>-1</sup>	MeOH (%)	Sap (mg.g <sup>-1</sup> )	Ratio (mL.g <sup>-1</sup> )	Sap (mg.g <sup>-1</sup> )	Temps (min)	Sap (mg.g <sup>-1</sup> )
<b>Méthanol 70%</b>	16.78±0.1	20%	10.39±0.1 <sup>G</sup>	1/10	8.08±0.09 <sup>E</sup>	5	9.54±0.2 <sup>F</sup>
<b>Éthanol 70%</b>	13.24±0.1	30%	12.73±0.2 <sup>F</sup>	1/20	11.8±0.18 <sup>D</sup>	10	11.79±0.1 <sup>E</sup>
<b>eau</b>	5.56±0.1	40%	14.78±0.2 <sup>E</sup>	1/30	15.3±0.15 <sup>B</sup>	15	14.23±0.2 <sup>D</sup>
		50%	16.51±0.3 <sup>D</sup>	1/40	16.3±0.17 <sup>A</sup>	20	16.38±0.1 <sup>B</sup>
		60%	18.01±0.1 <sup>C</sup>	1/50	13.2±0.19 <sup>C</sup>	25	16.73±0.1 <sup>A,B</sup>
		70%	19.31±0.2 <sup>A</sup>			30	16.78±0.1 <sup>A</sup>
		80%	19.12±0.2 <sup>A</sup>			35	15.712±0.2 <sup>C2</sup>
		90%	18.30±0.2 <sup>B</sup>				

Sap : saponine.

Les résultats sont rapportés en moyenne (en mg.g<sup>-1</sup>, n=3) ± l'écart type.

Les mêmes lettres dans la même colonne signifient qu'il n'y a pas de différence significative dans la teneur des saponines au seuil de signification ( $P=0,05$ ).

### II.2.1.1. Effet de solvant d'extraction

Selon les résultats obtenus dans les tableaux **29** et **30**, l'eau le solvant le plus polaire donne les plus faibles teneurs en saponines (6, 36 mg.g<sup>-1</sup>) pour les deux espèces étudiées.

Les teneurs élevées enregistrées dans les extraits méthanoliques peuvent être expliquées par leur polarité et température d'ébullition qui permet une meilleure cavitation (**Philip et Christina, 2000**).

La différence significative enregistrée entre les quantités des saponines dans l'extrait méthanolique et éthanolique est expliquée par l'affinité moléculaire entre le solvant et le soluté. Selon les résultats obtenus les saponines d'*E. sepositus* ont une grande affinité au méthanol que l'éthanol. De ce fait le solvant choisi pour le reste de l'étude préliminaire et le méthanol.

Le méthanol est également le solvant utilisé par plusieurs auteurs pour l'EAU des saponines à partir des plantes à savoir: **Lau et al. (2003)** et **Li et al (2005)** pour l'étude des saponines de *Panax notoginseng*; **Ganzera et al. (2004)** pour l'étude des saponines de *Bacopa monnieri*; **Ha et al. (2006)** pour l'étude des saponines de *Platycodi Radix*; **Foubert et al. (2010)** pour l'étude des saponines de *Maesa lanceolata*; **Avula et al. (2011)** pour l'étude des saponines de *Caulophyllum thalictroides*; **Lian et Zhang (2013)** pour l'étude des saponines *Gleditsia sinensis*.

### II.2.1.2. Effet de la concentration de solvant d'extraction

La détermination de la concentration de solvant (en proportion volumique solvant-eau) est primordiale, car le mélange solvant-eau contribue à la création de la polarité adéquate pour l'extraction des composés d'intérêts.

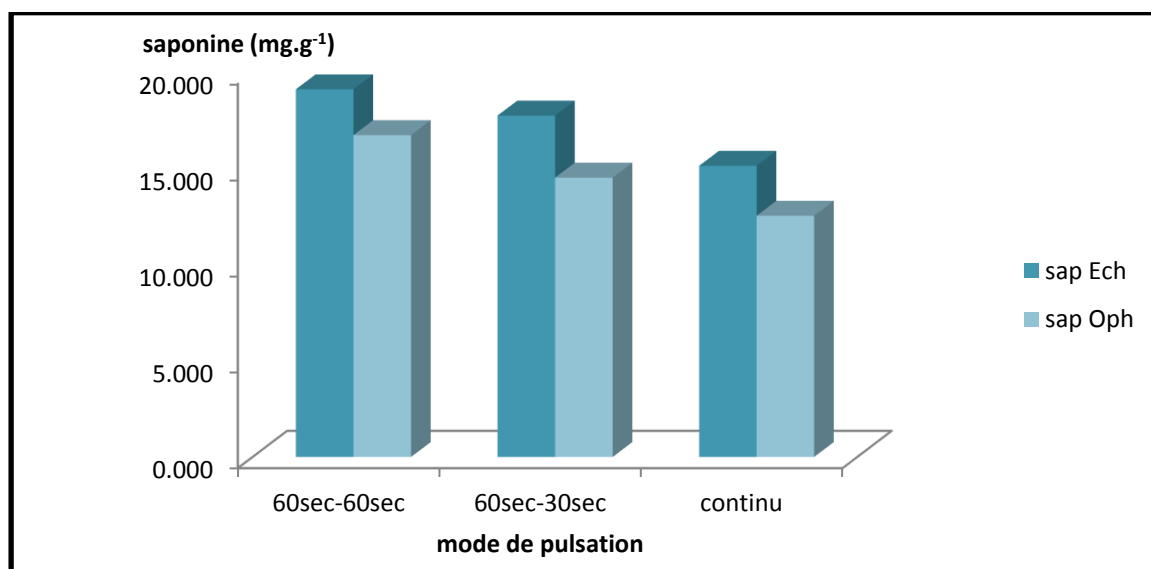
L'effet de la concentration de méthanol (en proportion volumique solvant-eau) sur l'extraction des saponines des deux étoiles de mer étudiées par ultrasons est significatif. La quantité la plus élevée est obtenue par le méthanol 70%, et la plus faible par le méthanol 20% (**Tab. 29 et 30**). De ce fait, le méthanol 70% a été choisi pour les expériences de l'étude préliminaire et les limites des variations adoptées pour concevoir le plan d'expérience sont 30% et 70%.

### II.2.1.3. Effet de ratio liquide-solide

Les résultats obtenus (**Tab. 29 et 30**) montrent que l'augmentation de ratio liquide-solide de 10 mL.g<sup>-1</sup> à 40 mL.g<sup>-1</sup> conduit à l'augmentation significative de la teneur des saponines. Et à partir de 40 mL.g<sup>-1</sup> la quantité des saponines diminue significativement. La gamme 20 mL.g<sup>-1</sup> à 50 mL.g<sup>-1</sup> est alors sélectionnée pour les plans d'expérience.

### II.2.1.4. Effet de mode de pulsation

L'influence de cycle de pulsation sur la teneur des saponines d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus* est illustrée sur la **figure 26**. Elle montre que le cycle de pulsation discontinue donne la teneur la plus élevée en saponine. Ce résultat peut être expliqué par l'effondrement de la bulle dans la sonication en mode continu qui génère une chaleur et une pression dégradant les composés sensibles (**Chavan et Singhal, 2013**). De ce fait, la sonication en mode discontinu est plus efficace que la sonication continue et elle est adoptée dans les plans d'expérience.



**Figure 26:** Effet du cycle de pulsation sur l'EAU des saponines d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus*.

### II.2.1.5. Effet de temps

L'effet de temps sur l'EAU des saponines d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus* selon les résultats des **tableaux 29 et 30** est caractérisé par une augmentation rapide est significative de taux d'extraction entre 5min et 15 min, c'est l'étape de la dissolution des composants solubles sur les surfaces de la matrice, cette étape est nommée «washing» (**Chavan et Singhal, 2013**).

Cependant le taux de saponine ne montre pas une amélioration significative entre 20 et 30min, c'est l'étape de transfert de masse de la matrice vers le solvant par diffusion et les processus osmotiques, cette phase est nommée «slow extraction» (Chavan et Singhal, 2013). La prolongation de temps d'extraction à 35 min induit une diminution significative de la teneur des saponines cela peut être expliqué par les températures élevées engendrées à des temps prolongés de sonication. En effet, Les températures élevées défavorisent la cavitation et dégradent les substances bioactives.

La plage de temps 10 à 30 min offre un apport énergétique nécessaire pour l'extraction des saponines, de ce fait elle est sélectionnée pour l'optimisation de l'EAU par SMR.

## II.2.2. Application de plan d'expérience

L'objectif de cette partie est de proposer un modèle permettant la description de la quantité des saponines et des caroténoïdes obtenus par l'EAU, en fonction des paramètres opératoires sélectionnés à savoir le pourcentage de méthanol (X1), le ratio liquide-solide (X2) et le temps (X3). Les domaines de variations des paramètres dans le plan d'expérience de BBD sont présentés dans le **tableau 11** de la partie II.3.2 de matériel et méthode.

La même démarche statistique de traitement des résultats de l'EAM est appliquée pour le traitement des résultats obtenus par l'EAU.

### II.2.2.1. La teneur des saponines

Les conditions opératoires des 15 expériences réalisées et les teneurs des saponines prédites et expérimentales sont regroupés dans le **tableau 31** pour *E. sepositus* et *O. ophidianus*.

Les modèles construits à partir des essais du plan d'expérience, représentent les quantités de saponines d'*E.sepositus* et d'*O.ophidianus* comme une fonction des 3 facteurs sélectionnés: le pourcentage de méthanol (X1), le ratio liquide-solide (X2) et le temps (X3).

Les modèles proposés sont des modèles polynomiaux du second ordre, caractérisés par les équations **17** et **18**.

#### Modèle mathématique d'EAU des saponines d'*Echinaster sepositus*

$$Y_{sap} \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = -19.951 + 0.3109X_1 + 1.005 X_2 + 0.6177X_3 - 0.001 X_1X_2 - 0.0016 X_1X_3 - 0.0019X_2X_3 - 0.0050X_2X_3 - 0.0012 X_1^2 - 0.0169X_2^2 - 0.00497 X_3^2 \dots \dots \text{ (17).}$$

#### Modèle mathématique d'EAU des saponines d'*Ophidiaster ophidianus*

$$Y_{sap} \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = -18.916 + 0.2874X_1 + 0.9262 X_2 + 0.5740 X_3 - 0.0009 X_1X_2 - 0.0014 X_1X_3 - 0.0017X_2X_3 - 0.0050X_2X_3 - 0.0012 X_1^2 - 0.0154X_2^2 - 0.00485 X_3^2 \dots \dots \text{ (18).}$$

**Tableau 31:** Valeurs expérimentales et prédites de la teneur des saponines en (mg.g<sup>-1</sup>) d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus* obtenue par l'EAU dans le cadre de plan d'expérience.

	Variables indépendantes			Saponine mg.g <sup>-1</sup> <i>E. sepositus</i>		Saponine mg.g <sup>-1</sup> <i>O. ophidianus</i>	
	MeOH (%)	Temps min	Ratio mL.g <sup>-1</sup>	Valeur* Expérimentale	Valeur Prédite	Valeur* Expérimentale	Valeur Prédite
1	30	10	35	9.56±0,00	9.53	8.13±0.28	8.12
2	70	10	35	14.37±0,04	14.40	12.30±0.00	12.28
3	30	30	35	14.20±0,28	14.17	12.55±0.28	12.58
4	70	30	35	18.20±0,28	18.24	15.96±0.03	15.97
5	30	20	20	9.60±0,00	9.66	8.40±0.00	8.41
6	70	20	20	15.08±0,08	15.07	13.00±0.28	13.02
7	30	20	50	15.17±0,04	15.18	13.20±0.00	13.18
8	70	20	50	18.76±0,05	18.71	16.14±0.28	16.13
9	50	10	20	8.78±0,02	8.76	7.37±0.28	7.38
10	50	30	20	13.60±0,00	13.57	12.00±0.00	11.97
11	50	10	50	13.89±0,08	13.92	11.80±0.28	11.83
12	50	30	50	17.56±0,05	17.58	15.42±0.00	15.40
13	50	20	35	16.37±0,05	16.27	14.20±0.28	14.28
14	50	20	35	16.10±0,15	16.27	14.29±0.00	14.28
15	50	20	35	16.33±0,00	16.27	14.34±0.00	14.28

X1: méthanol % ; X2: temps (minutes) ; X3: ratio liquide solide (mL.g<sup>-1</sup>) ; Sap: saponines (mg.g<sup>-1</sup>).

\*valeur moyenne et écart type pour n=3.

### II.2.2.1.1. Analyse de la variance et effet des facteurs

Comme dans le cas d'EAM, la pertinence des résultats du plan d'expérience a été vérifiée en utilisant l'analyse de la variance. La signification de chaque effet a été déterminée en utilisant l'analyse de la probabilité (*P-value*) et le test de Fisher (*F-value*).

Les tableaux **32** et **33** résument l'analyse de la variance pour l'EAU des saponines d'*E.sepositus* et d'*O.ophidinus*, respectivement et montrent que les valeurs de *P-value* sont inférieures à 0,05 démontrant la haute signification des effets linéaires, d'interactions et quadratiques dans le domaine d'étude sur l'EAU des saponines des étoiles de mer.

Le modèles de régression des saponines des deux étoiles de mer ont donné un coefficient de détermination ( $R^2=0,99$ ) et un coefficient de détermination ajusté de 0,99 ce qui indiquent que les modèles sont hautement significatifs (**Tab. 32 et 33**).

**Tableau 32:** Analyse de la variance (ANOVA) appliquée à la teneur de saponines obtenues par l'EAU à partir d'*E. sepositus*.

Source	Som Car ajust	Df	F-value	P-value		
<b>Modèle</b>	267.561	9	1889.22	0.000	Significatif	
X1-MeOH	97.941	1	5080.11	0.000		
X2- Temps	71.913	1	4569.91	0.000		
X3-Ratio	83.944	1	5334.49	0.000		
X1-X2	0.328	1	20.82	0.000		
X1-X3	1.780	1	113.11	0.000		
X2-X3	0.652	1	41.42	0.000		
X1 <sup>2</sup>	1.814	1	115.25	0.000		
X2 <sup>2</sup>	21.077	1	1339.37	0.000		
X3 <sup>2</sup>	9.258	1	588.36	0.000		
Lack -of- fit	0.026	3	0.50	0.685		Non significatif
Pur error	0.289	17				
Cor total	267.876	29				
$R^2=0.9988$	$R^2_{adj}=0.9983$	$R^2_{pred}=0.9974$				

**DL:** degré de liberté représente la quantité d'informations dans les données.

**Som Car ajust:** Les sommes des carrés ajustées sont des mesures de la variation des différentes parties du modèle.

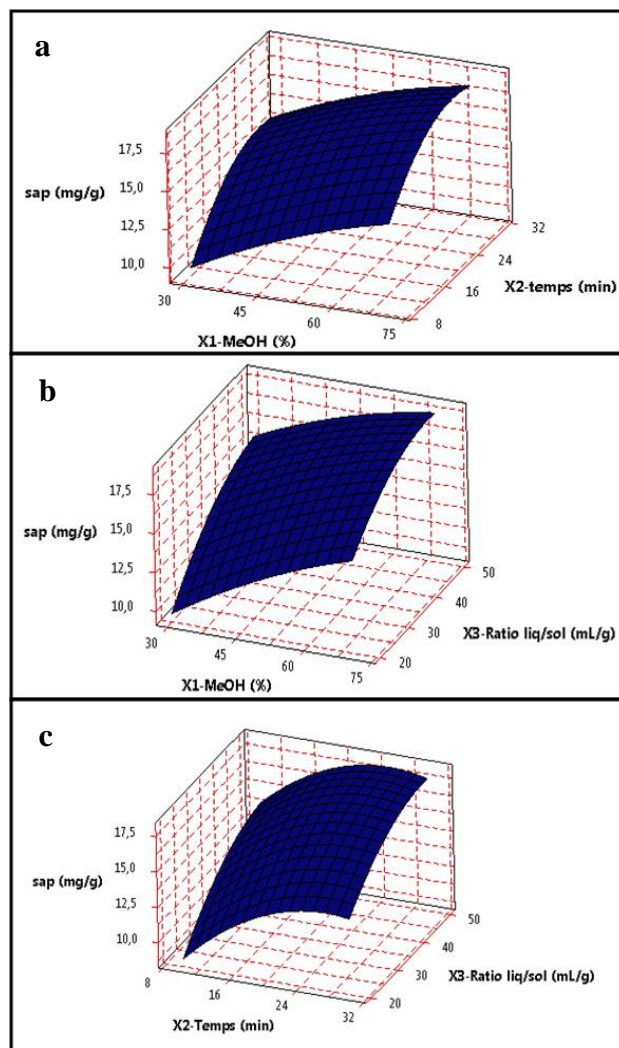
**Tableau 33:** Analyse de la variance (ANOVA) appliquée à la teneur de saponines obtenues par l'EAU à partir d'*O.ophidianus*.

Source	Som Car ajust	Df	F-Valeur	P-Valeur	
<b>Modèle</b>	213.292	9	805.65	0.000	Significatif
X1-MeOH	57.067	1	1939.99	0.000	
X2- Temps	66.536	1	2261.91	0.000	
X3-Ratio	62.252	1	2116.25	0.000	
X1-X2	0.289	1	9.83	0.000	
X1-X3	1.385	1	47.10	0.000	
X2-X3	0.515	1	17.49	0.000	
X1 <sup>2</sup>	1.857	1	63.14	0.000	
X2 <sup>2</sup>	17.490	1	594.58	0.000	
X3 <sup>2</sup>	8.789	1	298.67	0.000	
Lack -of- fit	0.010	3	0.10	0.960	
Pur error	0.578	17			
Cor total	213.881	29			
R <sup>2</sup> =0.9972	R <sup>2</sup> adj=0.9960	R <sup>2</sup> pred=0.9935			

**DL:** degré de liberté représente la quantité d'informations dans les données.

**Som Car ajust:** Les sommes des carrés ajustées sont des mesures de la variation des différentes parties du modèle.

À partir des équations **17 et 18** des surfaces de réponse en trois dimensions pour l'interaction des paramètres expérimentaux sont élaborées et représentées dans **la figure 27** pour *E. sepositus* et **la figure 2** en annexe pour *O. ophidianus*.



**Figure 27:** Surface de réponse pour les différentes interactions sur la teneur des saponines (cas de l'EAU d'*E. sepositus*). (a): solvant/temps, (b): solvant/ratation, (c): puissance /temps.

La réponse de modèle 17 est illustré dans la **figure 27**, et indique que la concentration de solvant est un facteur crucial dans l'extraction des saponines par ultrasons, les concentrations qui donnent de meilleur rendement sont reliées au temps d'extraction et le volume de solvant:

- Pour la plage des concentrations de MeOH étudiées (30% à 70%) l'augmentation de temps de sonication de 10 min à 25 min induit à une augmentation significative des teneurs des saponines, la prolongation de temps de sonication jusqu'à 30 min ne montre pas de fluctuations significatives (**Fig.27 a**);
- Pour des faibles concentrations de MeOH (30% à 40 M) des volumes compris entre 45 et 50 mL sont nécessaires pour avoir des meilleurs rendements, pour des concentrations de MeOH plus élevé de 50% à 70% les plus grandes quantités de saponines sont atteintes à partir d'un 40mL de MeOH.

Les résultats de la **figure 27 c** montrent que les teneurs en saponines augmentent avec l'augmentation de ratio liquide-solide et initialement le temps du sonication, puis elles ne montrent pas de variation significative en prolongeant le temps au-delà de 20 min.

D'après les observations réalisées lors de l'étude des surfaces de réponse, on peut conclure que pour une fréquence de 50 à 60 Hz et une puissance 195 W (voir les caractéristiques de bain significateur utilisé pour l'EAU) des plus grandes quantités de saponines sont obtenues en utilisant un temps de sonication qui varie entre 20 et 25 minutes une concentration de solvant de 70% et un volume fluctuant entre 40 et 50 mL.

### II.2.2.1.2. Les conditions optimales et la validation de la méthode d'extraction des saponines par l'EAU

Le meilleur rendement en saponines est obtenu pour une concentration de méthanol de 70%, un temps d'extraction de l'ordre de 25 min et un ratio liquide-solide de 46,4 mL.g<sup>-1</sup> pour *E. sepositus* et de 44,9 mL.g<sup>-1</sup> pour *O. ophidianus* (**Tab. 34**). Dans ces conditions la pression de vapeur et la tension superficielle de méthanol favorise la cavitation ce qui augmente l'efficacité de la rupture des cellules animale et du transfert de masse, menant ainsi à une performance optimale d'extraction des saponines des étoiles de mer.

Une étude répétable a été conduite en appliquant les conditions optimales afin d'évaluer la capacité prédictive du modèle. Les résultats expérimentaux obtenus sont de 18,2±0,2 mg.g<sup>-1</sup> pour *E. sepositus* et de 15,9±0,2 mg.g<sup>-1</sup> pour *O. ophidianus*, qui sont très proches des valeurs prédites (19,2 mg.g<sup>-1</sup> et 16,7 mg.g<sup>-1</sup>) d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus*, respectivement). Ceci démontre à nouveau l'adéquation des modèles obtenus.

**Tableau 34:** Conditions optimales, valeurs expérimentales et prédites d'EAU des saponines d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus*.

<i>E. sepositus</i>					<i>O. ophidianus</i>				
MeOH (%)	Temps (min)	Ratio mL.g <sup>-1</sup>	Saponine Ve*(mg.g <sup>-1</sup> )	Saponine Vp(mg.g <sup>-1</sup> )	MeOH (%)	Temps (min)	Ratio mL.g <sup>-1</sup>	Saponine Ve*(mg.g <sup>-1</sup> )	Saponine Vp (mg.g <sup>-1</sup> )
70	24.95	46.36	18.15±0.18	19.17	70	25.55	44.84	15.90±0.17	16.68

Ve: valeur expérimentale; Vp : valeur prédite.

\*valeur moyenne et écart type pour n=3.

### II.2.2.2. La teneur des caroténoïdes

Un plan identique à celui utilisé pour l'EAU des saponines a été employé pour les caroténoïdes. Les résultats des 15 essais plans d'expériences sont présentés dans le **tableau 3** en annexe.

Les modèles prédits pour l'EAU des caroténoïdes ont été décrits par les équations polynomiales, du second degré suivant:

#### Modèle mathématique d'EAU des caroténoïdes d'*Echinaster sepositus*

$$Y_{sap} \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = 17.930 - 0.4904X_1 - 0.6099 X_2 - 0.0440 X_3 - 0.0071 X_1X_2 - 0.0016 X_1X_3 + 0.0088X_2X_3 + 0.0076 X_1^2 + 0.0152X_2^2 \dots \dots \text{ (19).}$$

#### Modèle mathématique d'EAU des caroténoïdes d'*Ophidiaster ophidianus*

$$Y_{sap} \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = 9.340 - 0.2910X_1 - 0.3175 X_2 - 0.03771 + 0.0440 X_3 - 0.0070 X_1X_2 - 0.00085 X_1X_3 + 0.0049 X_2X_3 + 0.0053 X_1^2 + 0.0121X_2^2 \dots \dots \text{ (20).}$$

#### II.2.2.2.1. Analyse de la variance et effet des facteurs

Une analyse de la variance (ANOVA) a été réalisée sur les résultats obtenus (**Tab. 35 et 36**). Cette analyse permet de tester la pertinence des variables impliquées dans les modèles **19 et 20**, en identifiant les variables dont l'influence est la moins significative c'est-à-dire pour lequel *P-value* est le plus élevé.

Le facteur quadratique ratio\*ratio ( $X_3^2$ ) est le seul facteur qui n'a pas eu d'effet significatif sur l'EAU des caroténoïdes d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus* (*P-value* = 0,214, *P-value* = 0,07, respectivement), il est alors éliminé des modèles **19 et 20**. Les autres facteurs étant tous hautement significatives avec un *P-value* <0.001.

Les valeurs du coefficient de régression obtenues ( $R^2$  et  $R^2_{adj}$ ) (**Tab. 35 et 36**) indiquent que la qualité descriptive des modèles **19 et 20** est hautement significative.

**Tableau 35:** Analyse de la variance (ANVA) appliquée à la teneur de caroténoïdes obtenue par l'EAU à partir d'*E. sepositus*.

Source	Som Car ajust	Df	F-Valeur	P-Valeur		
<b>Modèle</b>	162.602	9	576.07	0.000	Significatif	
X1-MeOH	36.942	1	1177.91	0.000		
X2- Temps	2.707	1	86.32	0.000		
X3-Ratio	9.287	1	296.11	0.000		
X1-X2	15.658	1	499.25	0.000		
X1-X3	1.921	1	61.25	0.000		
X2-X3	14.017	1	446.95	0.000		
X1 <sup>2</sup>	69.162	1	2205.27	0.000		
X2 <sup>2</sup>	17.301	1	551.66	0.000		
X3 <sup>2</sup>	0.052	1	1.65	0.214		
Lack -of- fit	0.124	3	1.40	0.278		Non significatif
Pur error	0.503	17				
Cor total	163.230	29				
R <sup>2</sup> =0.9962	R <sup>2</sup> adj=0.9944	R <sup>2</sup> pred=0.9902				

**DL:** degré de liberté représente la quantité d'informations dans les données.

**Som Car ajust:** Les sommes des carrés ajustées sont des mesures de la variation des différentes parties du modèle.

**Tableau 36:** Analyse de la variance (ANOVA) appliquée à la teneur de caroténoïdes obtenue par l'EAU à partir d'*O. Ophidianus*.

Source	Som Car ajust	Df	F-Valeur	P-Valeur		
<b>Modèle</b>	95.3004	9	1292.94	0.000	Significatif	
X1-MeOH	31.5844	1	3856.56	0.000		
X2- Temps	0.2426	1	29.62	0.000		
X3-Ratio	1.0252	1	125.17	0.000		
X1-X2	15.6800	1	1914.58	0.000		
X1-X3	0.5305	1	64.77	0.000		
X2-X3	4.2778	1	522.33	0.000		
X1 <sup>2</sup>	33.1959	1	4053.33	0.000		
X2 <sup>2</sup>	10.7486	1	1312.44	0.000		
X3 <sup>2</sup>	0.0298	1	3.64	0.071		
Lack -of- fit	0.0013	3	0.81	0.987		Non significatif
Pur error	0.1625	17				
Cor total	95.4641	29				
R <sup>2</sup> =0.9983	R <sup>2</sup> adj=0.9975	R <sup>2</sup> pred=0.9974				

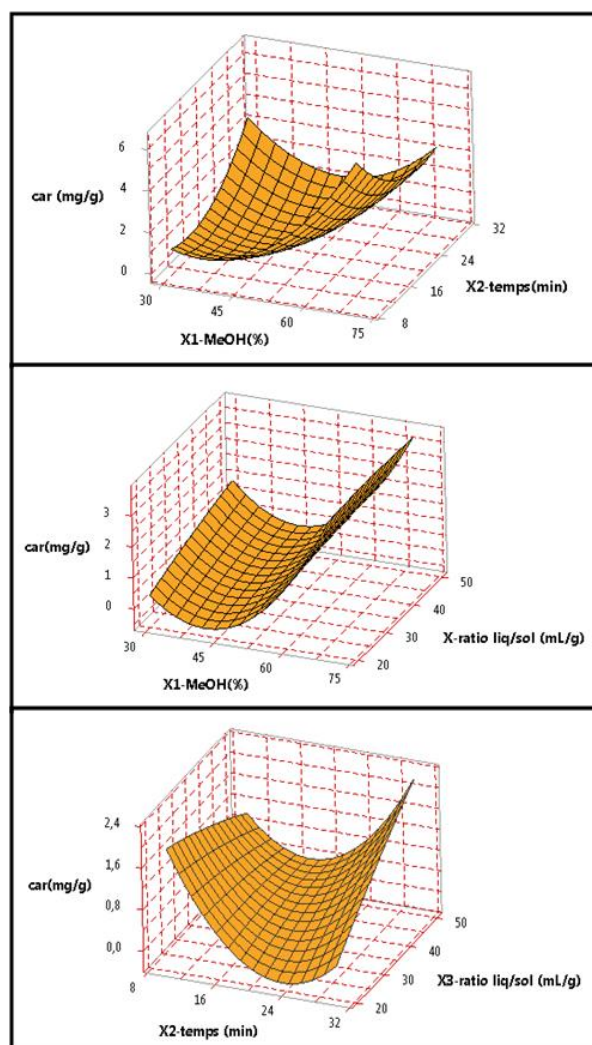
**DL:** degré de liberté représente la quantité d'informations dans les données.

**Som Car ajust:** Les sommes des carrés ajustées sont des mesures de la variation des différentes parties du modèle.

Les courbes tridimensionnelles (**Fig. 28** pour les caroténoïdes d'*E. sepositus* et **Fig. 3 en annexe** pour *O. ophidianus*) ont été utilisées pour représenter la réponse des modèles et l'interaction entre les différents paramètres associés à l'EAU des caroténoïdes.

La **figure 28** indique que la concentration de méthanol a un impact important sur l'EAU des caroténoïdes, les teneurs optimales sont obtenues lorsque 60 à 70% de MeOH sont utilisées pour des temps de sonication inférieure à 15 min (**Fig. 28 a**) et pour des ratios liquide-solide de 20 mL.g<sup>-1</sup> à 50 mL.g<sup>-1</sup> (**Fig. 28 b**).

L'effet d'interaction entre le temps de sonication et le ratio liquide solide (**Fig. 28 c**) indique que les meilleurs rendements sont obtenus avec des temps courts (inférieure à 15 min) associés des faibles ratios (inférieurs à 30 mL.g<sup>-1</sup>) ou avec des temps longs (supérieur à 25 min) associés à des ratios élevés (supérieurs à 40 mL.g<sup>-1</sup>).



**Figure 28:** Surface de réponse pour les différentes interactions sur la teneur des caroténoïdes (cas de l'EAU d'*E. sepositus*). (a): solvant/temps, (b): solvant/ration, (c): puissance /temps.

### II.2.2.2.2. Les conditions optimales et la validation de la méthode d'extraction des caroténoïdes par l'EAU

Les paramètres expérimentaux qui donnent les quantités optimales en caroténoïdes pour les deux espèces sont une concentration en méthanol de 70 %, un temps d'extraction de 10 min et un ratio liquide solide de 20 mL.g<sup>-1</sup>. Dans ces conditions les expériences de validation des modèles **19** et **20**, ont révélé l'adéquation du modèle pour les résultats expérimentaux, (valeurs expérimentales très proches des valeurs prédites) (**Tab. 37**).

L'ensemble des résultats obtenus indiquent que le rendement d'EAU des caroténoïdes à partir des étoiles de mer est maximisé lorsque le volume de MeOH est important, et le temps avec le ratio liquide-solide sont faibles.

Ces résultats sont accords avec les travaux de **Singh et al. (2015)** et **Jaeschke et al. (2017)** qui ont démontrés l'influence de ces paramètres et d'autres (la température et l'intensité des ultrasons) sur l'EAU des caroténoïdes des plantes.

**Tableau 37:** Conditions optimales, valeurs expérimentales et prédites d'EAU des caroténoïdes d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus*.

<i>E.sepositus</i>					<i>O.ophidianus</i>				
MeOH (%)	Temps (min)	Ratio mL.g-1	Caroténoïdes Ve*(mg.g-1)	Caroténoïdes Vp(mg.g-1)	MeOH (%)	Temps (min)	Ratio mL.g-1	Caroténoïdes Ve*(mg.g-1)	Caroténoïdes Vp(mg.g-1)
70	10	20	8.48±0.08	9.94	70	10	20	6.54±0.09	7.16

Ve: valeur expérimentale; Vp: valeur prédite.

\*valeur moyenne et écart type pour n=3.

- **Considération générale d'EAM et d'EAU des saponines et caroténoïdes**

Les modèles proposés ont permis de visualiser plus précisément l'impact des micro-ondes et des ultrasons sur l'extraction des saponines et sur l'extraction des caroténoïdes des étoiles de mer en fonction de la concentration de solvant, de temps d'extraction et de ratio liquide solide.

Le maximum d'EAM et d'EAU des saponines et des caroténoïdes à partir d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus* est obtenu en utilisant des conditions d'extraction optimales qui ne présentent pas de différences significatives entre les deux espèces, ce qui indique la reproductibilité des résultats et confirme la fiabilité des modèles obtenus.

L'effet des facteurs et des surfaces de réponse présentent des tendances similaires pour les deux espèces et confirme ainsi la reproductibilité des modèles élaborés pour l'EAM et l'EAU des saponines et des caroténoïdes des étoiles de mer.

Les conditions optimales d'EAM et d'EAU des caroténoïdes (**Tab. 27 et 37**, respectivement) sont situées à la limite des niveaux des facteurs, il semble ainsi que le domaine d'étude soit trop étendu par rapport à l'échelle des valeurs de caroténoïdes obtenus (**Tab. 10 et Tab. 11** dans la *partie II.3.2. de matériel et méthode*). Cela est expliqué par le fait que les niveaux supérieurs et inférieurs des paramètres employés pour l'optimisation, résultent d'une étude préliminaire permette une extraction efficace des saponines qui sont des composées stables et moins thermosensibles comparés aux caroténoïdes, et qui sont aussi des composés polaires de haute masse moléculaire, comparés aux caroténoïdes des astéries qui sont des composés moins polaires à masse moléculaire plus faible que les saponines. À ce stade du travail, nous n'avons pas envisagé de modifier le domaine d'étude des plans d'expérience car notre objectif était de valoriser un déchet de purifications des saponines.

Néanmoins, les modèles obtenus pour l'EAM et l'EAU des caroténoïdes sont d'une grande performance, appuyant d'une part sur les coefficients de régressions obtenus supérieur à 99%, (**Tab. 25 et 26** pour l'EAM et **Tab. 35 et 36** pour l'EAU) et d'autre part sur les résultats des expériences de validations des modèles (**Tab. 27** pour l'EAM et **Tab. 37** pour l'EAU).

Les conditions optimales de temps et de puissance d'irradiation micro-onde, et de temps de sonication situées aux bornes minimales de plan d'expérience peuvent être expliquées par la nature des caroténoïdes qui sont des molécules peu stables, trop réactive et facilement dégradées par de nombreux facteurs tels que la température, la lumière et l'oxygène. En effet, une exposition prolongée aux ondes ultrasons, et l'application de puissances élevées peuvent mener à la dégradation thermique et l'oxydation des caroténoïdes.

### **II.3. Comparaison des méthodes d'extraction: EAM, EAU et EC**

Une fois optimisées, les deux méthodes d'extraction développées (EAM et EAU) précédemment pour l'extraction des saponines et des caroténoïdes ont été comparées avec la méthode conventionnelle d'un point de vue quantitatif. Cela permet d'une part d'atteindre un objectif purement analytique qui consiste à développer une méthode d'extraction pour obtenir des rendements élevés en saponines et en caroténoïdes.

D'autre part, la méthode la mieux adaptée pour l'extraction de ces composés pourra être mise en place dans de nombreux domaines à savoir l'industrie pharmaceutique et l'industrie alimentaire.

**Les figures 29 et 30** montrent une comparaison de l'analyse quantitative de la teneur des saponines et des caroténoïdes des deux étoiles de mer étudiées.

Les résultats enregistrés dans les conditions optimales montrent que l'EAM est la méthode permettant d'obtenir les rendements les plus élevés en saponines et en caroténoïdes pour les deux espèces étudiées. L'EAM améliore le rendement de l'extraction des saponines et des caroténoïdes avec un facteur de l'ordre de 8 et 7, respectivement par rapport à l'extraction conventionnelle et d'un facteur de l'ordre de 3 et 4 par rapport à l'EAU (pour les deux espèces) (**Tab. 38**).

Mis à part le rendement, d'autres paramètres sont à prendre en compte lors d'un choix d'une méthode d'extraction tels que: le temps ou rapidité d'extraction et la consommation de solvant. Ces critères de choix ont été comparés pour les méthodes d'extraction utilisées dans cette étude pour l'extraction des saponines et des caroténoïdes des étoiles de mer (**Tab. 39**).

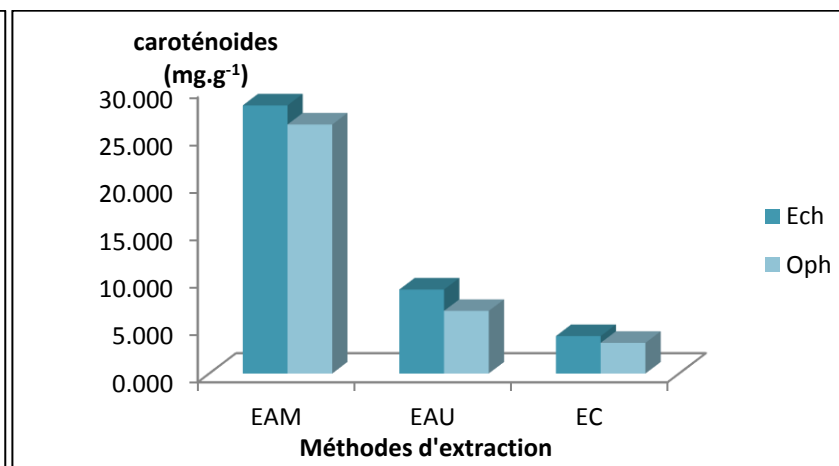
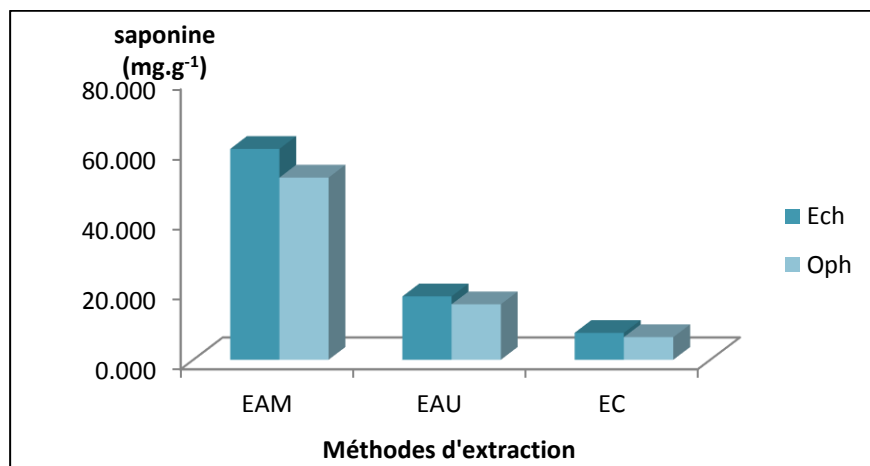
Les données de **tableau 38** facilitent la détermination de la méthode la mieux adaptée pour l'extraction des substances étudiées. En considérant les deux espèces l'EAM semble être la méthode la plus performante, car elle pourrait nettement réduire le temps d'extraction des saponines et de caroténoïdes de 24 h avec des méthodes conventionnelles d'extraction à quelques minutes tout en assurant les rendements les plus élevés.

La différence de teneurs de saponines et caroténoïdes obtenus par les trois procédés d'extraction peuvent être expliquées d'une part, par les observations (MEB) de matrices animales avant et après chaque procédé d'extraction. Ces observations montrent que l'effet des énergies ultrasons et de l'agitation magnétique sur la rupture de la paroi cellulaire est modéré comparé à l'effet des micro-ondes (**Fig. 31**), ce qui ne favorise pas la libération des substances d'intérêt dans le solvant d'extraction. Par ailleurs, des temps d'extraction élevés (plus de 20min pour l'EAU voire 24h pour l'EC) induisent une exposition prolongée des molécules aux conditions défavorables telles que la lumière et l'oxygène.

**Tableau 38:** Comparaison entre les méthodes d'extraction développées.

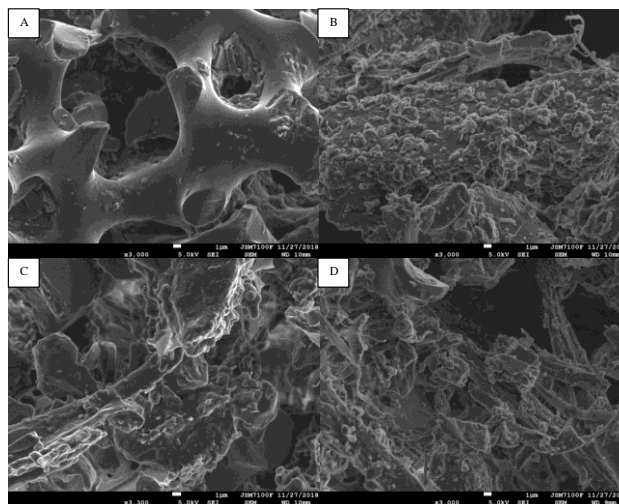
	Saponines										Caroténoïdes									
	<u>MeOH (%)</u>		<u>Temps (min)</u>		<u>Puissance (W)</u>		<u>Ratio (mL.g<sup>-1</sup>)</u>		<u>Rendement (mg.g<sup>-1</sup>)</u>		<u>MeOH (%)</u>		<u>Temps (min)</u>		<u>Puissance (W)</u>		<u>Ratio (mL.g<sup>-1</sup>)</u>		<u>Rendement (mg.g<sup>-1</sup>)</u>	
	<u>Ech</u>	<u>Oph</u>	<u>Ech</u>	<u>Oph</u>	<u>Ech</u>	<u>Oph</u>	<u>Ech</u>	<u>Oph</u>	<u>Ech</u>	<u>Oph</u>	<u>Ech</u>	<u>Oph</u>	<u>Ech</u>	<u>Oph</u>	<u>Ech</u>	<u>Oph</u>	<u>Ech</u>	<u>Oph</u>	<u>Ech</u>	<u>Oph</u>
<b>EAM</b>	59	59	3	3	176	178	43.63	43.93	60.9	52.1	70	70	1.8	1.3	100	100	20	20	28.2	26.2
<b>EAU</b>	70	70	24.95	25.55	/	/	46.36	44.84	18.2	16.7	70	70	10	10	/	/	20	20	8.5	7.2
<b>EC</b>	70	70	24 h	24h	/	/	50	50	7.7	6.5	70	70	24 h	24h	/	/	50	50	3.9	3.3
<u>EAM</u>									7.8	8.04									7.2	7.1
<u>EC</u>																				
<u>EAM</u>									3.3	3.3									3.2	4.0
<u>EAU</u>																				

**Ech :** *E. sepositus*, **Oph:** *O. ophidianus*.



**Figure 29:** Teneurs en saponines d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus* obtenues par MAE, UAE et EC.

**Figure 30:** Teneurs en caroténoïdes d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus* Obtenues par MAE, UAE et EC



**Figure 31:** Images au microscope électronique à balayage de lyophilisat d'*Echinaster sepositus* avant (A) et après extraction par extraction conventionnelle (B), extraction assistée par ultrasons (C) et extraction assistée par microonde (D).

**Les résultats de l'optimisation de l'EAM et EAU des saponines d'*E.sepositus* ont fait objet d'un article intitulé « Microwave assisted extraction of bioactive saponins from the starfish *Echinaster sepositus* : Optimization by response surface methodology and comparison with ultrasound and conventional solvent extraction ».**

- **EAM, rendement en extrait brut et pourcentage des saponines et des caroténoïdes**

Le **tableau 39** indique le pourcentage du solvant, la puissance des micro-ondes, le temps d'irradiation et le ratio (liquide-solide) qui permettent de maximiser les deux réponses (saponines et caroténoïdes) simultanément, les valeurs expérimentales et les valeurs prédites (obtenues par le logiciel) des teneurs des saponines et des caroténoïdes ; ainsi que le rendement en extrait brut.

Dans les conditions optimales, on constate que 52 % d'extrait méthanolique brute sont des saponines, cependant les caroténoïdes présentes 13 % et 14 % d'extrait brute pour *E. sepositus* et *O. ophidianus*, respectivement (**Fig. 32 et 33**). La grandeur de ces pourcentages confirme à nouveau l'efficacité des modèles obtenus pour l'EAM des saponines et des caroténoïdes des étoiles de mer.

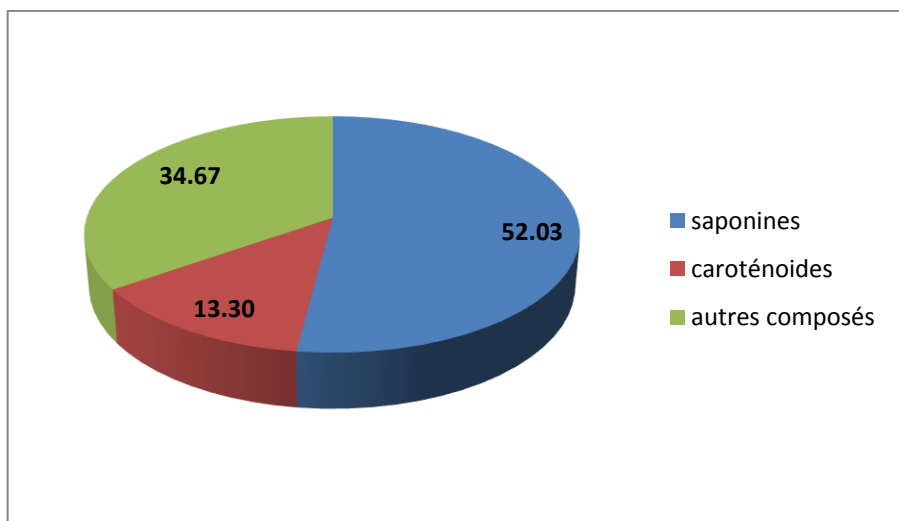
La différence dans les teneurs des saponines et des caroténoïdes entre les deux espèces étudiées est due probablement aux caractéristiques structurales de ces composés qui diffèrent d'une espèce à une autre (voir partie II.1.4 et II.1.5 de la partie synthèse bibliographique pour les saponines d'*E. sepositus* et *O. ophidianus* et partie II.2.6. Pour les caroténoïdes).

**Tableau 39:** Conditions optimales d'EAM des saponines et des caroténoïdes des étoiles de mer étudiées.

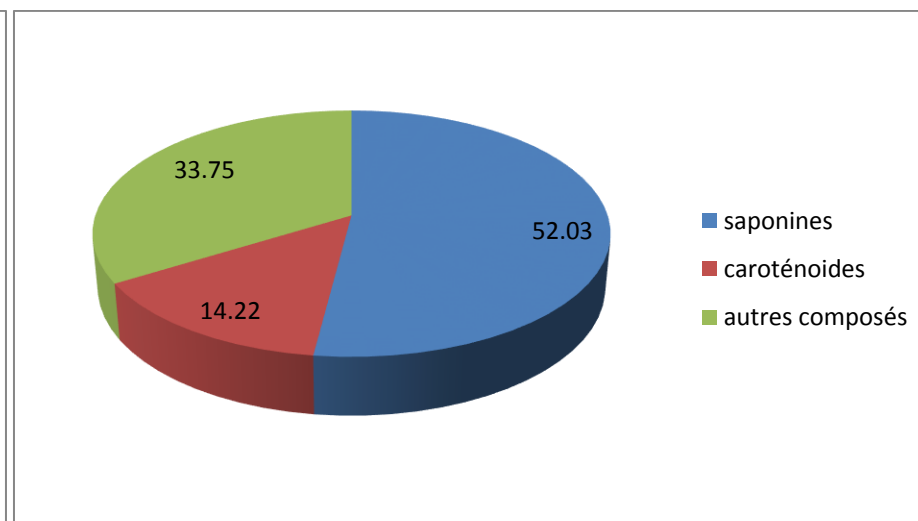
Conditions optimales				Teneur des saponines (mg.g <sup>-1</sup> )				Teneur en caroténoïdes (mg.g <sup>-1</sup> )				Rendement en extrait brute (mg.g <sup>-1</sup> )	
				<i>E. sepositus</i>		<i>O. ophidianus</i>		<i>E. sepositus</i>		<i>O. ophidianus</i>		<i>E. sepositus</i>	<i>O. ophidianus</i>
MeOH (%)	Temps (min)	Puissance (W)	Ratio (mL.g <sup>-1</sup> )	Ve*	Vp	Ve*	Vp	Ve*	Vp	Ve*	Vp	Ve	Ve
70	3	100	50	51.6±0.5	53.7	44.5±0.2	46.92	13.04±0.1	14.6	12.2±0.1	13.0	98.0	85.6

Ve: valeur expérimentale; Vp: valeur prédite.

\*valeur moyenne et écart type pour n=3.



**Figure 32:** Teneurs des saponines et des caroténoïdes exprimées en % et obtenues à partir d'*E. sepositus* par EAM.



**Figure 33:** teneurs des saponines et des caroténoïdes exprimées en % et obtenues à partir d'*O. ophidianus* par EAM.

## II.4. Étude quantitative des saponines d'*E. sepositus*

Les teneurs des saponines dans les différents organes (estomac, caecapylorique, gonade, tégument oral et aboral) d'*E. sepositus* ont été déterminées en utilisant le protocole d'EAM optimisé dans notre étude. Dans cette partie, il a été question de déterminer les disparités quantitatives des saponines d'*E. sepositus* en fonction d'organe, de sexe et de saison de récolte (**Fig.34**).

### II.4.1. Variabilité inter-organe

L'analyse statistique de la distribution quantitative des saponines dans les différents organes d'*E. sepositus* (**Fig. 34**) révèle des différences significatives qui peuvent être liées au rôle des saponines dans l'organe considéré et au cycle de développement de l'espèce (**Tab. 40**).

**Tableau 40:** Analyse de la variance (ANOVA) relative à la variabilité inter organe de la teneur des saponines d'*E. sepositus* (mg.g<sup>-1</sup>). Pour chaque sexe et chaque saison, les mêmes lettres dans la même colonne signifient qu'il n'y a pas de différence significative dans la teneur des saponines au seuil de signification.

	Hiver		Printemps		Été		Automne	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
OE	46.6±0.7	36.8±0.1	58.8±0.8	58.0±0.5	61.7±1.4	60.6±0.3	32.3±0.3	24.6±0.9
EST	10.3±0.3 <sup>B</sup>	9.4±0.2 <sup>A</sup>	9.8±0.3 <sup>B</sup>	9.1±0.4 <sup>C</sup>	8.5±0.3 <sup>D</sup>	8.2±0.1 <sup>D</sup>	9.2±0.1 <sup>A</sup>	8.6±0.4 <sup>A</sup>
CAE	7.6±0.5 <sup>C</sup>	7.1±0.1 <sup>B</sup>	7.7±0.4 <sup>C</sup>	7.1±0.2 <sup>D</sup>	7.3±0.3 <sup>E</sup>	7.1±0.2 <sup>E</sup>	6.6±0.5 <sup>B</sup>	5.6±0.5 <sup>C</sup>
GON	11.5±0.4 <sup>A</sup>	3.2±0.2 <sup>D</sup>	17.4±0.5 <sup>A</sup>	16.3±0.2 <sup>A</sup>	19.4±0.5 <sup>A</sup>	19.1±0.5 <sup>A</sup>	5.2±0.2 <sup>C</sup>	0.9±0.1 <sup>E</sup>
TEGORL	5.4±0.4 <sup>D</sup>	5.0±0.3 <sup>C</sup>	11.3±0.4 <sup>B</sup>	11.3±0.3 <sup>B</sup>	14.1±0.1 <sup>B</sup>	14.3±0.1 <sup>B</sup>	2.7±0.5 <sup>D</sup>	1.8±0.3 <sup>D</sup>
TEGABO	9.7±0.3 <sup>B</sup>	9.1±0.3 <sup>A</sup>	11.7±0.3 <sup>B</sup>	11.1±0.3 <sup>B</sup>	10.3±0.1 <sup>C</sup>	10.0±0.2 <sup>C</sup>	6.8±0.5 <sup>B</sup>	6.8±0.3 <sup>B</sup>

OE: organisme entier, EST: estomac; CAE: caeca pylorique; TEGORL: tégument oral; TEGABL: tégument aboral.

Considérant les deux sexes et les différentes saisons de prélèvement, les teneurs des saponines dans les différents organes d'*E. sepositus* se sont avérées statistiquement différentes (**Tab. 40**).

**Au stade de développement précoce en automne**, pour les mâles et les femelles, le contenu maximal en saponines est enregistré dans l'estomac.

**Au stade de développement avancé, en hiver**, la quantité de saponines dans les différents organes diffère selon le sexe considéré, elle varie pour les individus femelles dans l'ordre suivant: gonades > estomac = tégument aboral > caeca pylorique > tégument oral. Et pour les individus mâles elles sont décrites selon le classement décroissant suivant: estomac = tégument aboral > caeca pylorique > tégument oral > gonade.

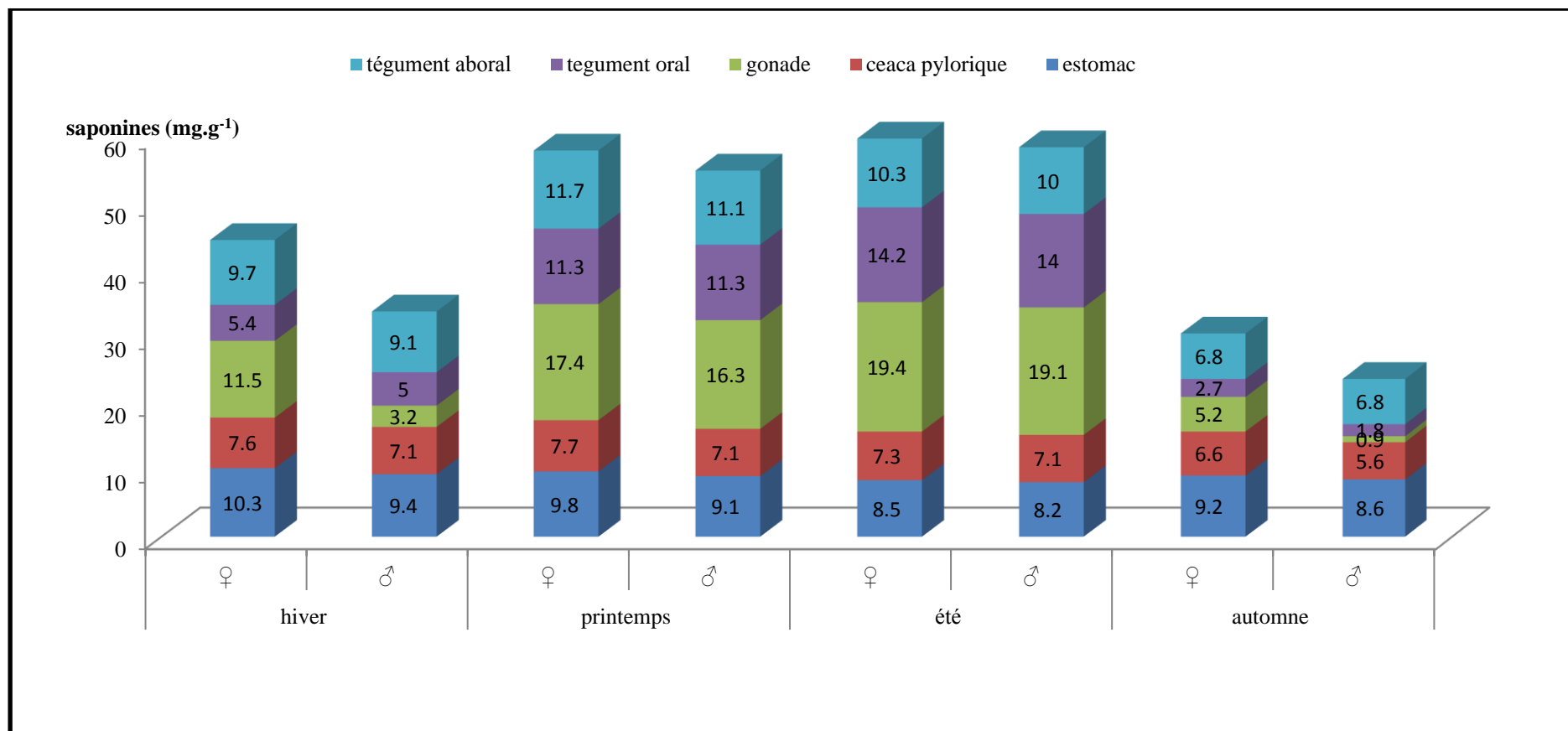


Figure 34: Variabilité inter-organe de la teneur des saponines d'*E. sepositus* en fonction de sexe et de saison.

Chez les étoiles de mer, les saponines de l'estomac sont impliquées dans la solubilisation du cholestérol (Mackie *et al.*, 1977), cela peut expliquer la concentration des saponines dans l'estomac au début de la croissance (automne et hiver) où la nutrition des étoiles de mer est culminante (Mackie *et al.*, 1977).

La nutrition des étoiles de mer est particulière, elles dévaginent leur sac stomacal et enveloppent complètement leur proie sur laquelle s'exerce l'action des sucs digestifs. De ce fait, Minale *et al.* (1993) et Ivanchina *et al.* (2017) suggèrent que les saponines d'estomac sont impliquées dans sa protection contre les prédateurs et les micro-organismes pathogènes au moment de la nutrition.

**Au stade de maturité, en printemps**, les gonades contiennent la plus forte teneur en saponine, suivi par le tégument oral et aboral.

Dans cette période de développement, les teneurs élevées de saponines dans le tégument peuvent être liées à leurs implications dans la défense chimique contre les prédateurs, les parasites et les micro-organismes.

**Durant la période de fraie, en été**, les plus grandes teneurs de saponines ont été relevées dans les gonades ce qui suggère leur implication dans la reproduction. L'un des rôles bien décrit des saponines des "étoiles de mer" est leur intervention dans la réaction acrosomique lors de la fécondation chez l'"étoile de mer" *Asterias amurensis*. Cette réaction fait intervenir 3 saponines, Co-ARIS I Co-ARIS II et Co-ARIS III qui se trouvent dans la zone pellucide des ovocytes (Naruse *et al.*, 2010).

#### II.4.2. Variabilité sexuelle et saisonnière

L'analyse de la variance relative à la variabilité sexuelle et saisonnière de la teneur des saponines d'*E. sepositus* est reporté dans **les tableaux 4 et 5** en annexe.

**Considérant la variation sexuelle** dans l'organisme entier, il ressort à travers l'analyse des résultats obtenus que la variation de la teneur en saponines en fonction du sexe dépende de la saison de prélèvement. En automne et en hiver, les taux des saponines montrent une différence significative entre les mâles et les femelles (ANOVA  $P$ -value=0,00). Néanmoins, en printemps et en été ces taux ne montrent pas de différences significatives ( $P$ -value = 0,187;  $P$ -value= 0,228 au printemps et en été respectivement) (**Tab. 4 en annexe**).

**Considérant la variation saisonnière**, les différences en teneurs sont significatives ( $P$ -value=0,00) chez les mâles et les femelles.

Les données relatives à la variation sexuelle et saisonnière des teneurs de saponines d'*E. sepositus* mettent en évidence les conclusions suivantes:

- Les gonades femelles enregistrent le maximum de saponines en été ( $19,4 \pm 0,5 \text{ mg.g}^{-1}$ ), et les gonades mâles enregistre le minimum en automne ( $9,1 \pm 0,1 \text{ mg.g}^{-1}$ );
- En automne et en hiver, le grand écart dans la teneur des saponines gonadiques enregistré entre les mâles et les femelles (**Fig. 34**), a créé une différence hautement significative entre les taux des saponines d'organisme entier des mâles et des femelles;
- Chez les deux sexes, l'estomac possède des quantités importantes de saponines dans toutes les saisons; cela peut être expliqué par le fait qu'*E. sepositus* est une espèce qui se nourrit activement tout au long du cycle de vie, et la présence des saponines dans l'estomac est importante pour la solubilisation du cholestérol d'origine alimentaire;
- Chez les deux sexes, la variation saisonnière des taux des saponines dans l'organisme entier, les gonades, le tégument oral et aboral est significatif, et les taux les plus élevés sont obtenus en été pendant la période de ponte;
- Chez les deux sexes, la variation des teneurs des saponines dans les gonades montre des fluctuations saisonnières dont les tendances de variations peuvent être liées aux stades de maturité de l'espèce. Le suivie de l'indice gonado-somatique peut confirmer cette hypothèse, en effet selon les résultats de *la partie I de chapitre résultats et discussions*:
  - la maturation des gonades femelle d'*E. sepositus* est précoce, elle débute en automne et s'achève en début d'été (début de frai), ces données justifient la présence des plus grandes quantités de saponines dans les gonades en été, qui peuvent être impliquées dans la reproduction et la protection des larves;
  - Chez les mâles la spermatogenèse a été limitée à 5 à 6 mois (printemps-été), ce qui explique les taux élevés des saponines gonadiques dans cette période, et les faibles taux dans la période de repos (automne et hiver).

Des fluctuations saisonnières dans la teneur des saponines des "étoiles de mer" ont été démontrées par plusieurs auteurs. **Voogt et Huiskamp (1979)** ont démontré que les saponines dans les gonades d'*Asterias rubens* sont de très faibles concentrations après la ponte, selon ces auteurs la concentration des saponines chez *Asterias rubens* est faible en été, augmente en automne, et elle est très haute en hiver jusqu'à la ponte. **Mackie et al. (1977)** ont montré que la concentration des saponines dans les gonades de *Martasterias glacialis* atteint son maximum en été durant la période de reproduction.

Comme montré dans la discussion des résultats, les disparités quantitatives des saponines dans les différents organes sont probablement liées à leurs rôles dans l'organe considéré à savoir leurs rôles dans la nutrition pour les saponines d'estomac, dans la reproduction pour les saponines des gonades, et la défense chimique pour les saponines de tégument. En relation avec ces différentes fonctions biologiques, plusieurs chercheurs ont suggéré que chaque organe possède son propre mélange de saponines (**Mackie *et al.*, 1977; Voogt et Van Rheenen, 1982; Voogt et Groot, 1983; Garneau *et al.*, 1989 et Kisha *et al.*, 2001**).

Les travaux de **Demeyer *et al.* (2014)** sur l'hétérogénéité inter-organes des saponines d'*Asterias rubens* ont confirmé cette hypothèse. Les résultats de notre étude ont montré également que chaque organe d'*E. sepositus* est caractérisé par un mélange spécifique de saponine (*voir plus loin partie IV*).

Le taux des saponines d'*E. sepositus* obtenu dans notre étude est très élevé par rapport aux taux des autres espèce d'étoiles de mer, rapportés dans la littératures (**Tab. 41**). Cette différence peut être liée:

- aux méthodes d'extractions employées;
- au stade de maturité de l'espèce;
- à l'effet genre ou variations inter-génériques;
- à l'effet espèce ou variations inter-spécifique;
- à l'effet site ou variation spatiale.

**Tableau 41:** Teneurs des saponines dans différents espèces d'étoiles de mer.

Espèce	Structure anatomique (poids humide)	Quantité des saponines mg.g-1	Bibliographie
<i>Asterias vulgaris</i>	Organisme entire	<b>1.5</b>	Gilgan <i>et al.</i> , 1976
<i>Asterias vulgaris</i>	Organisme entier	<b>0.17</b>	Owellen <i>et al.</i> , 1973
<i>Asterias amurensis</i>	Organisme entier	<b>1.4 4</b>	Yasumoto <i>et al.</i> , 1964
<i>Ophidiaster hemprichi</i>	//	<b>8</b>	Elyakov <i>et al.</i> , 1976
<i>Linckia laevigata</i>	//	<b>4</b>	Elyakov <i>et al.</i> , 1976
<i>Luidia sp.</i>	//	<b>2</b>	//
<i>Archaster angulatus</i>	//	<b>3</b>	//
<i>Asteropsis corinifera</i>	//	<b>15</b>	//
<i>Lysastrosoma anthosticta</i>	//	<b>5</b>	//
<i>Lethasterias fusca</i>	//	<b>0.3</b>	//
<i>Apiilasterias japonica</i>	//	<b>1</b>	//
<i>Coscinasterias calamaria</i>	//	<b>8</b>	//
<i>Evasterias retifera</i>	//	<b>2</b>	//
<i>Astropecten aurantiacus</i>	//	<b>0.12</b>	//
<i>Marthasterias glacialis</i>	//	<b>0.2</b>	//
<i>Asterias rubens</i>	Testicule	<b>2 à 5</b>	Voogt et Huiskamp, 1979
<i>Asterias rubens</i>	Ovaire	<b>6 à 27.5</b>	Voogt et Huiskamp, 1979
<i>Asterias rubens</i>	Oocyte*	<b>134 et 147</b>	Voogt et Van Rheenen, 1979
<i>Asterias amurensis</i>	Ovaire*	<b>0.96</b>	Ikegami et Kamiya, 1972a
<i>Asterias amurensis</i>	Ovaire*	<b>6.9</b>	Okano et Ikegami, 1981
<i>Asterias amurensis</i>	Ovaire*	<b>0.55</b>	Ikegami <i>et al.</i> , 1972b
<i>Echinaster sepositus</i>	Organisme entier	<b>62.29</b>	Présente étude
<i>Ophidaister ophidianus</i>	Organisme entier	<b>52.12</b>	Présente étude

(\* : Poids sec)

### III. Activité biologique des saponines et des caroténoïdes

L'extraction assistée par micro-onde est la méthode permettant d'obtenir les concentrations les plus élevées en saponine et caroténoïde, l'évaluation des activités biologique a donc été réalisée sur les composés obtenus par l'EAM.

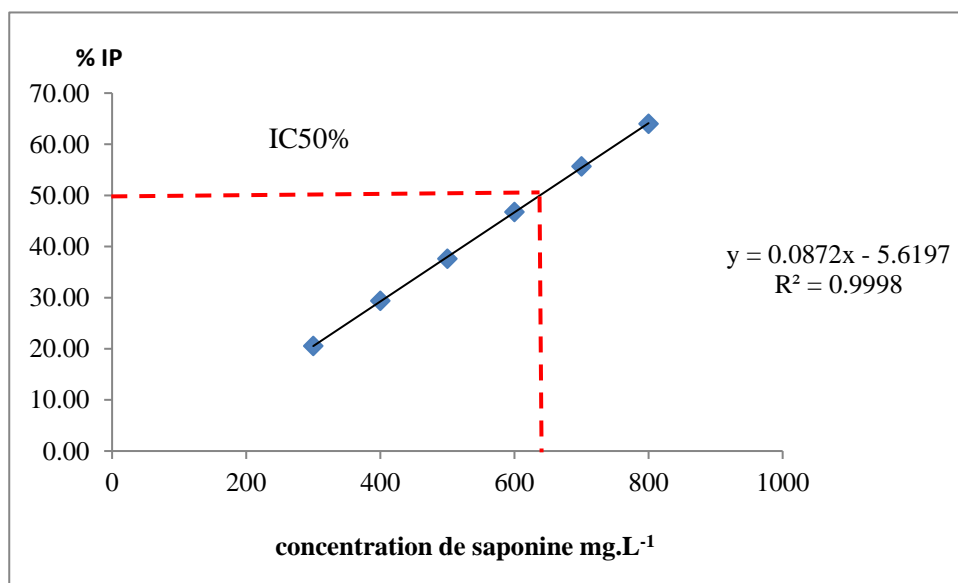
#### III.1. Activité anti-oxydante des saponines et des caroténoïdes

La capacité antioxydante des saponines et des caroténoïdes des deux espèces étudiées est évaluée par le test DPPH• et le test électrochimiques. Les résultats d'évaluation de la capacité antioxydante sont rassemblés dans le **tableau 43**.

##### III.1.1. Activité antioxydante déterminée par le test du DPPH•

La capacité des saponines et des caroténoïdes des deux étoiles de mer à piéger le radical DPPH• est évaluée par le calcul de l'indice IC50%, qui correspond à la quantité en mg de composé nécessaire pour obtenir 50% d'inhibition (**Tab. 42**). Rappelons que plus l'IC 50 est faible plus l'activité anti-radicalaire est importante.

Pour estimer la IC50% nous avons établi une courbe entre différentes concentrations et les pourcentages d'inhibition (% IP) (**Fig. 35 et Fig. 4 en annexe** pour les saponines d'*E. sepositus* et *O. ophidianus* respectivement, **Fig. 5, 6 et 7 en annexe** pour les caroténoïdes d'*E. sepositus*, d'*O. ophidianus* et vitamine C, respectivement). La régression linéaire est obtenue pour les saponines entre 20% et 60 % d'inhibition de DPPH• (**Fig. 35**).



**Figure 35:** Détermination de IC50% pour les saponines d'*E. sepositus* avec le test DPPH•.

Avec le test du DPPH, pour les saponines d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus*, on constate que l'activité anti-radicalaire est modérée. Pour les caroténoïdes des deux espèces, par comparaison aux témoins positifs, il apparaît que l'activité anti-radicalaire des caroténoïdes des deux espèces est importante. Le test statistique ne montre pas de différence significative entre les IC50% des caroténoïdes et de la vitamine C.

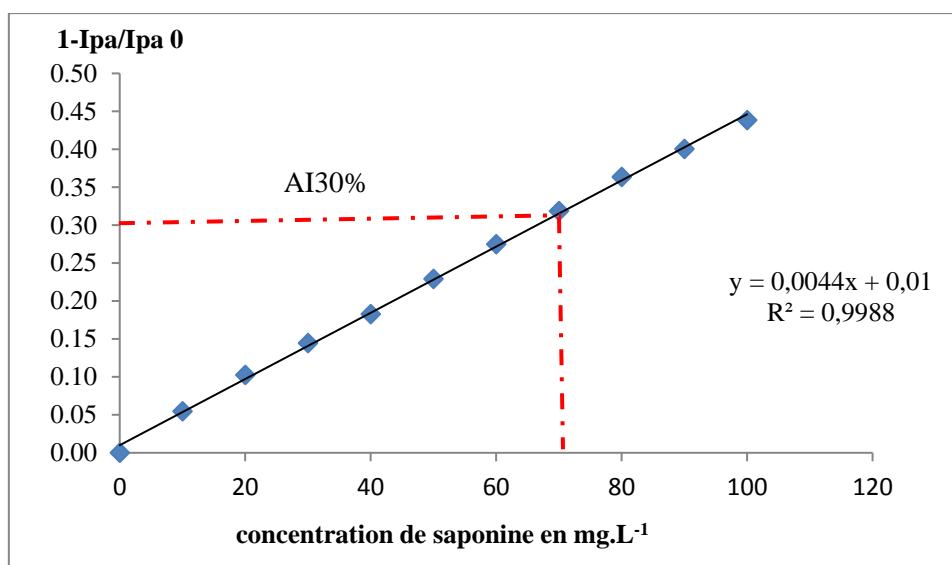
**Tableau 42:** Valeur des IC50% et AI50% des saponines et des caroténoïdes d'*E. sepositus* et *O. ophidianus*.

	Activité anti-oxydante	
	Inhibition de DPPH* (IC50% en mg.L <sup>-1</sup> )	Réduction de O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> (AI50% en mg.L <sup>-1</sup> )
Saponine d' <i>E. sepositus</i>	637.8 ±0.1	116.2±0.6
Saponines d' <i>O. ophidianus</i>	634.5±0.2	118.7±0.8
Caroténoïdes d' <i>E. sepositus</i>	106.0±0.1	56.9±0.2
Caroténoïdes d' <i>O. ophidianus</i>	105.8±0.1	81.9±0.6
Vitamine C	105.8±0.3	23.0±0.1

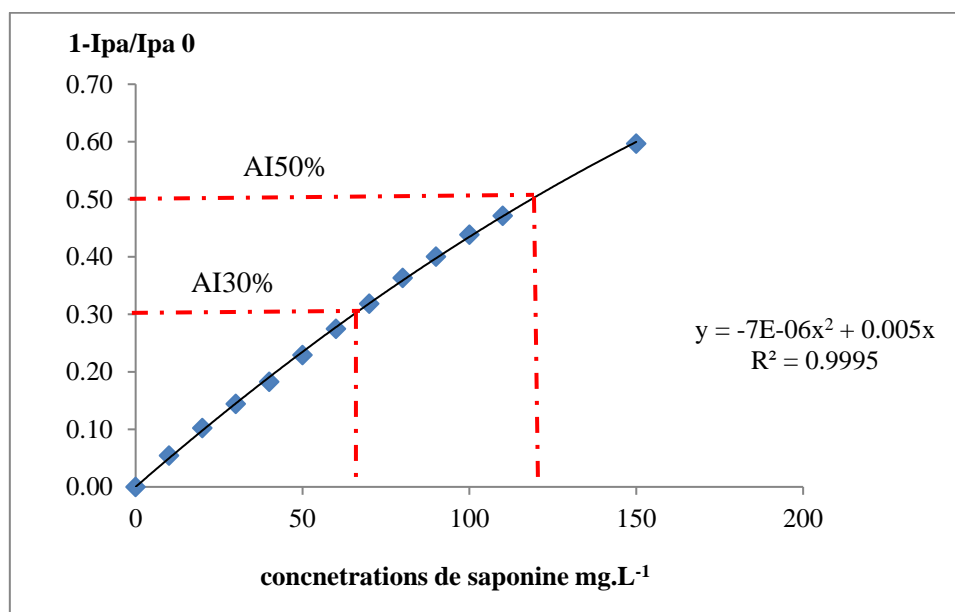
### III.1.2. Activité anti-oxydante déterminée par le test électrochimique

La réactivité de l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> vis-à-vis les saponines et les caroténoïdes des deux étoiles de mer étudiées est évaluée en déterminant les valeurs des indices AI<sub>30</sub> et AI<sub>50</sub>, définie comme étant la concentration de l'extrait nécessaire pour consommer 30% et 50% du radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> électrogénéré. Ces concentrations sont déterminées à partir des courbes représentant la variation de (1- I<sub>pa</sub>s/ I<sub>pa</sub>0) en fonction de la concentration de l'extrait.

La variation de (1- I<sub>pa</sub>s/ I<sub>pa</sub>0) en fonction de la concentration de l'extrait présente pratiquement un modèle linéaire pour les faibles concentrations (**Fig. 36**), mais pour les plus fortes concentrations, on se retrouve avec un modèle polynomial de degré 2 (**Fig. 37**). Afin de déterminer la valeur de AI<sub>30</sub> on utilise les deux modèles indifféremment, car l'écart pour les valeurs de AI<sub>30</sub> est négligeable (1 % en moyenne ± 0.81mg.L<sup>-1</sup>). En revanche, pour la détermination de AI<sub>50</sub> l'écart entre le modèle linéaire et le modèle polynomial est important (supérieur à 5 %) de ce fait l'utilisation du modèle polynomial qui est en bonne corrélation avec les points expérimentaux est recommandé (un exemple est illustré pour les saponines d'*E. sepositus* dans le **tableau 43**).



**Figure 36:** Détermination de la capacité anti-oxydante (AI<sub>30</sub>) à partir de la courbe 1- (Ipa<sub>s</sub>/Ipa<sub>0</sub>) en fonction de la concentration des saponines d'*E. sepositus*, en utilisant le modèle de régression linéaire.



**Figure 37:** Détermination de la capacité anti-oxydante (AI<sub>30</sub> et AI<sub>50</sub>) à partir de la courbe 1- (Ipa<sub>s</sub>/Ipa<sub>0</sub>) en fonction de la concentration des saponines d'*E. sepositus*, en utilisant le modèle de régression polynomial.

Les autres figures qui illustrent l'effet des saponines d'*O. ophidianus*, des caroténoïdes d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus* et de la vitamine C sur le radical super-oxyde électrogénère sont reportés en annexe (**Fig. 8, 9, 10 et 11**, respectivement).

**Tableau 43:** Valeur de AI30% et AI50% en utilisant la régression linéaire et polynomiale de second ordre (Cas des saponines d'*E. sepositus*).

	Régression linéaire	Régression polynomiale	Différences
AI30% (mg.L-1)	65.9	64.5	Non significative
AI50% (mg.L-1)	111.4	116.7	Significative

Les résultats illustrés dans le **tableau 42** montrent que le degré de la réactivité des saponines étudiées vis-à-vis du radical  $O_2^{\cdot-}$  est important, les saponines d'*E. sepositus* présentent un pouvoir *scavenger* du superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  légèrement supérieur par rapport à ceux d'*O. ophidianus* avec un AI50% de  $116,2 \pm 0,5$  mg.L<sup>-1</sup>.

Le pouvoir de *scavenger* du superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  par les caroténoïdes des étoiles de mer étudiés présente des différences significatives. La plus forte valeur donc la plus faible capacité antioxydante est observée pour les caroténoïdes d'*O. ophidianus* avec un AI50% de  $81,9 \pm 0,2$  mg.L<sup>-1</sup> contre une valeur de  $56,9 \pm 0,2$  pour *E. sepositus*.

Les témoins positifs (Vitamine C) possèdent l'activité anti-radicalaire la plus forte avec un AI50% =  $22,3 \pm 0,1$  équivalent de 0,13mM.

Globalement, l'ensemble des résultats sur l'activité antioxydante montre que les saponines d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus* ont la capacité de piéger les radicaux libres (**Tab. 42**). Le pouvoir *scavenger* de  $O_2^{\cdot-}$  par les saponines semble être aussi important que la vitamine C. En effet, si on considère une masse molaire moyenne d'environ 900 g.mol<sup>-1</sup> pour les saponines (voir partie IV.1) on aurait des valeurs pour les extraits de saponines comprises entre 0,12 et 0.13 mM. Une analyse mécanistique est recommandée pour la suite de travail afin de déterminer les principaux mécanismes réactionnels impliqués dans la réaction de réduction du radical superoxyde par les saponines.

En tenant compte des données fournies par notre étude, l'utilisation des tests électrochimiques pour l'étude de l'effet *scavenger* du radical anion superoxyde par les saponines des étoiles de mer paraît performante. Elle a permis de rapporter pour la première cet effet pour ce type de molécule.

Les caroténoïdes des étoiles étudiées révèlent des propriétés antioxydantes intéressantes vis-à-vis le DPPH<sup>•</sup> et qui se manifestent par des valeurs de IC50 proche à celle de la vitamine C.

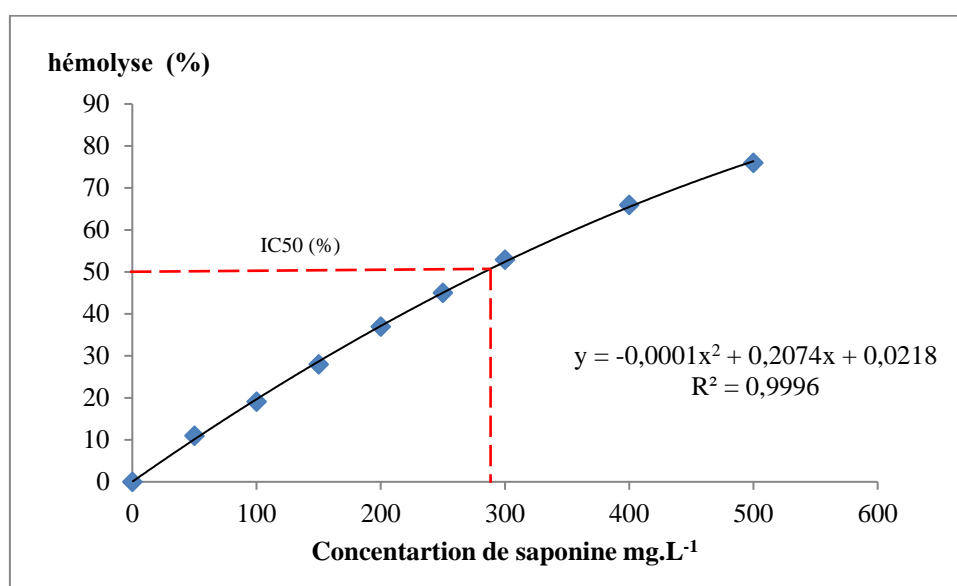
Il en est de même pour leur effet *scavenger* du superoxyde qui semble être plus important comparé à la vitamine C (en considérant une masse molaire moyenne de  $550 \text{ g.mol}^{-1}$  pour les caroténoïdes, on aurait des valeurs de AI50 de 0,10 et 0.15 mM respectivement pour *E. sepositus* et *O. ophidianus*). Les caroténoïdes sont en général connus pour leur activité antioxydante.

## III.2. Capacité de réduction de l'hémolyse oxydatif par les saponines

### III.2.1. Activité hémolytique

Dans le but d'évaluer la capacité des saponines d'*E. sepositus* et *O. ophidianus* à réduire l'hémolyse oxydative nous avons évalué dans un premier temps leur activité hémolytique vis-à-vis les globules rouges.

Les pourcentages d'hémolyse provoqués par les saponines d'*E. sepositus* et *O. ophidianus* sont présentés dans la **figure 38** et la **figure 12 en annexe**, respectivement.



**Figure 38:** Détermination de EC50% pour les saponines d'*E. sepositus*.

Les pourcentages d'hémolyse obtenus montrent que les saponines ont une activité dose dépendante sur les globules rouges. En général, on constate que plus la concentration des saponines est élevée plus l'effet hémolytique est important.

Les variations de pourcentage d'hémolyse en fonction de la concentration des saponines montrent que l'effet n'est pas linéaire mais plutôt polynomial de second ordre.

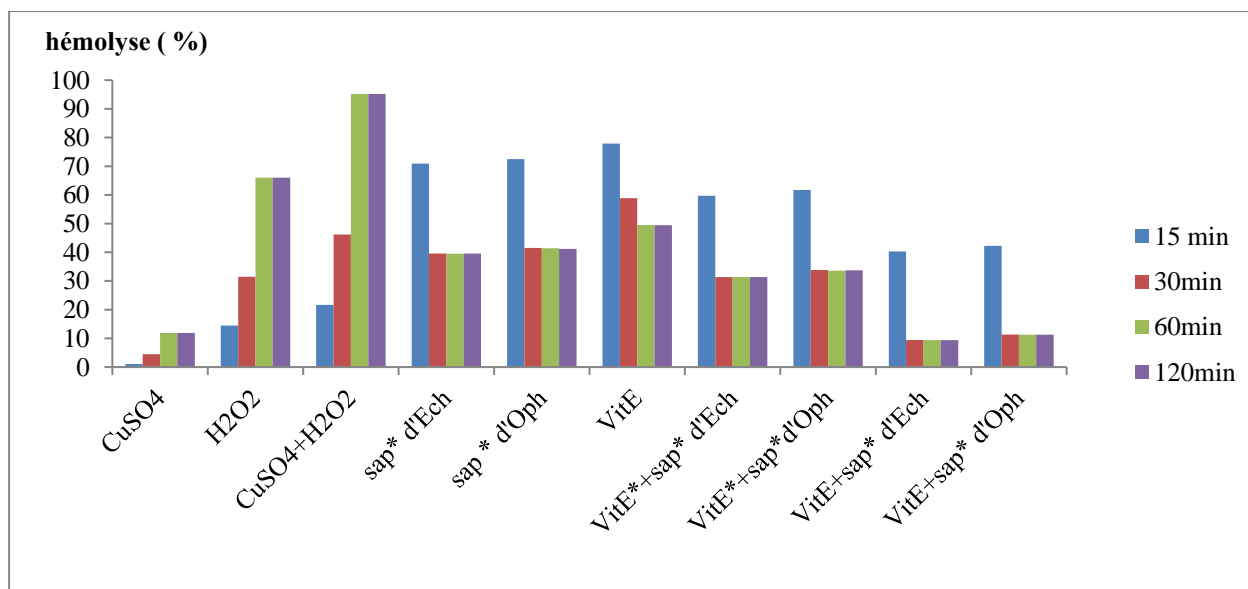
Ainsi, la concentration qui provoque l'hémolyse de 50% (EC50 %) des globules rouges est estimée selon la régression polynomiale d'ordre 2. Les valeurs d'EC50% sont de l'ordre de  $280,0 \pm 2,7 \text{ mg.L}^{-1}$  et  $299,1 \pm 1,2 \text{ mg.L}^{-1}$  pour les saponines d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus* respectivement. En effet, les saponines sont connues depuis très longtemps par leurs propriétés hémolytiques. Cette propriété lytique a conduit à la mise en place de tests hémolytiques permettant la détection de saponines dans les drogues ou les extraits de plantes (Sparg *et al.*, 2004).

L'effet hémolytique des saponines étudiées n'exclut pas les autres effets. D'après les résultats des tests électrochimiques pour le *scavenging* du superoxyde, il apparaît que les saponines étudiées possèdent également une activité antioxydante.

D'après les résultats enregistrés sur la **figure 38 (et la figure 12 en annexe)** la concentration de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  n'induit pas d'activité hémolytique significative, ainsi elle est retenue afin d'évaluer l'effet protecteur de saponine contre l'hémolyse oxydative.

### III.2.2. Réduction de l'hémolyse oxydatif

Dans cette partie nous avons cherché à évaluer la capacité des saponines à réduire l'hémolyse oxydative induite par le système d'initiateur des radicaux  $\text{Cu}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ . Une série d'expériences a été réalisée pour évaluer cette capacité (voir section III.1.3.2. du matériel et méthode), la **figure 39** récapitule l'ensemble des résultats obtenus.



**Figure 39:** l'effet de différents traitements (à différents temps d'incubation: 15, 30, 60 et 120 min) sur l'hémolyse oxydative des érythrocytes. [sap\* d'Ech, saponine d'*E.sepsoisitus* ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ); sap\* d'Oph, saponine d'*O.ophidainus* ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ); VitE, Vitamin E (60uM); VitE\*, (0,25uM)].

**La figure 39** montre que le traitement des globules rouges avec le peroxyde d'hydrogène en présence de  $\text{CuSO}_4$  ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) induit une augmentation de libération d'hémoglobine. Le pourcentage d'hémolyse après une incubation d'une heure, passe de 11,9 % et 66,0% pour les globules rouges traités avec le  $\text{CuSO}_4$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$ , respectivement, à 95, 2 % pour ceux traités avec le système  $\text{Cu}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ .

Cette cytotoxicité est réduite de  $55,7\% \pm 0,1\%$  et de  $53,8 \pm 0,2\%$  (**Fig. 39**) avec le traitement des globules rouges par les saponines (d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus*, respectivement) pendant 1h, avant leur exposition aux initiateurs de radicaux ( $\text{CuSO}_4$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Ce résultat suggère que l'effet protecteur des saponines des étoiles de mer aux concentrations non hémolytiques est intéressant.

Avant de tester l'effet combiné de la vitamine E et des saponines étudiées aux concentrations non hémolytiques, nous avons déterminé la concentration non protectrice de la vitamine E (**Fig. 13 en annexe**). Cette concentration est de  $0,25 \mu\text{M}$ , et la concentration qui inhibe l'hémolyse à 50 % est de  $60 \mu\text{M}$ .

**La figure 39** montre que le taux d'inhibition d'hémolyse après une heure d'incubation, est de l'ordre de  $63,8 \pm 0,01\%$  et  $61,4 \pm 0,1$  avec le traitement des érythrocytes par la vitamine E (à la concentration non-protectrice) et les saponines d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus*, respectivement (aux concentrations non hémolytiques), De même, la combinaison de la vitamine E à une concentration qui réduit l'hémolyse à 50 % ( $60 \mu\text{M}$ ) et les saponines aux concentrations non hémolytiques entraîne une diminution de la libération de l'hémoglobine de  $85,8 \pm 0,03\%$  et  $83,8 \pm 0,03\%$  (pour les saponines d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus*, respectivement). Cela suggère que les saponines des étoiles de mer sont susceptibles d'agir en synergie avec la vitamine E et réduire l'hémolyse induite par les radicaux hydroxyles.

On constate aussi à partir de **la figure 39** que le t'aux d'hémolyse diminue avec l'augmentation de temps de traitement des érythrocytes par les saponines et la vitamine E. Ce résultat suggère que le traitement des érythrocytes avec les saponines aux concentrations non hémolytiques entraîne un retardement d'hémolyse.

L'écart entre l'effet des saponines des deux étoiles de mer étudiées est de 2% en moyenne, elle est probablement due à la structure des saponines des deux espèces. Les saponines d'*E. sepositus* sont des saponines macrocycliques et celles d'*O. ophidianus* sont des asterosaponines.

La synthèse des résultats obtenus montre que les saponines des étoiles de mers étudiées présentent à forte concentration une activité hémolytique importante, et à faible concentration possèdent un effet protecteur contre l'hémolyse oxydative induit par les radicaux hydroxyles.

Afin d'expliquer le comportement des saponines contre l'attaque radicalaire des études de mécanismes fonctionnels s'impose. Cependant, dans le sang cette activité semble liée à la structure des molécules de saponines qui pourraient être impliquées dans de nombreuses réactions dans le milieu extracellulaire (plasma) et/ou le milieu intracellulaire (cytoplasme) et dans la membrane cellulaire grâce à leur groupement polaire hydrophile (sucre), et leur partie hydrophobe (sapogénine).

La synergie des saponines aux concentrations non hémolytiques avec la vitamine E est probablement liée à la capacité des saponines à former des complexes avec les stérols des membranes cellulaires (*voir section II.1.6 de la partie synthèse bibliographique*), ces complexes génèrent de petits pores qui facilitent la pénétration de la vitamine E dans les érythrocytes.

## IV. Identification structurale des saponines d'*E. sepositus*

### IV.1 Analyse par spectrométrie de masse (HR-ESI-SM)

L'un des objectifs de cette thèse est l'analyse du contenu en saponines d'étoile de mer *E. sepositus* par HR-ESI-SM. Les spectres de masse obtenus par ionisation par électro-nébuliseur de haute résolution (HR-ESI-SM), en mode positive et négative (ESI+/-), des extraits issus de différents organes (CAE, GON, TEG ORL, TEG ABO et EST) des deux sexes (mâle et femelle), et collectées à différentes saisons (hiver, printemps, été et automne) montrent la présence de plusieurs nombres d'ions qui peuvent correspondre à des saponines.

En comparant le spectre des ions positifs (**Fig. 40**) et des ions négatifs (**Fig. 41**), nous constatons que les deux modes peuvent être employés pour l'analyse des saponines, et qui ils relèvent les mêmes congénères. Les signaux obtenus lors de l'analyse single-stage SM des extraits de différents organes par ESI en mode positif (**Fig. 40**) correspondent, à des espèces obtenues par cationisation (addition de Na<sup>+</sup>) du sel de sodium des saponines et ceux obtenus au mode négatif sont associés à la masse neutre moins la masse d'un hydrogène (proton) (**Fig. 41**) des mêmes saponines obtenues en mode positif.

À partir des spectres ESI-SM obtenus pour les différents organes d'*E. sepositus* et par corrélation avec les données de la littérature on constate que gamme de masse comprise entre  $m/z$  800 et  $m/z$  1000 referme les ions de saponines attendus pour l'étoile de mer *E. sepositus* et pourrait correspondre aux saponines ionisées [M+Na<sup>+</sup>]. Un exemple typique des spectres obtenus est illustré dans la **figure 40**.

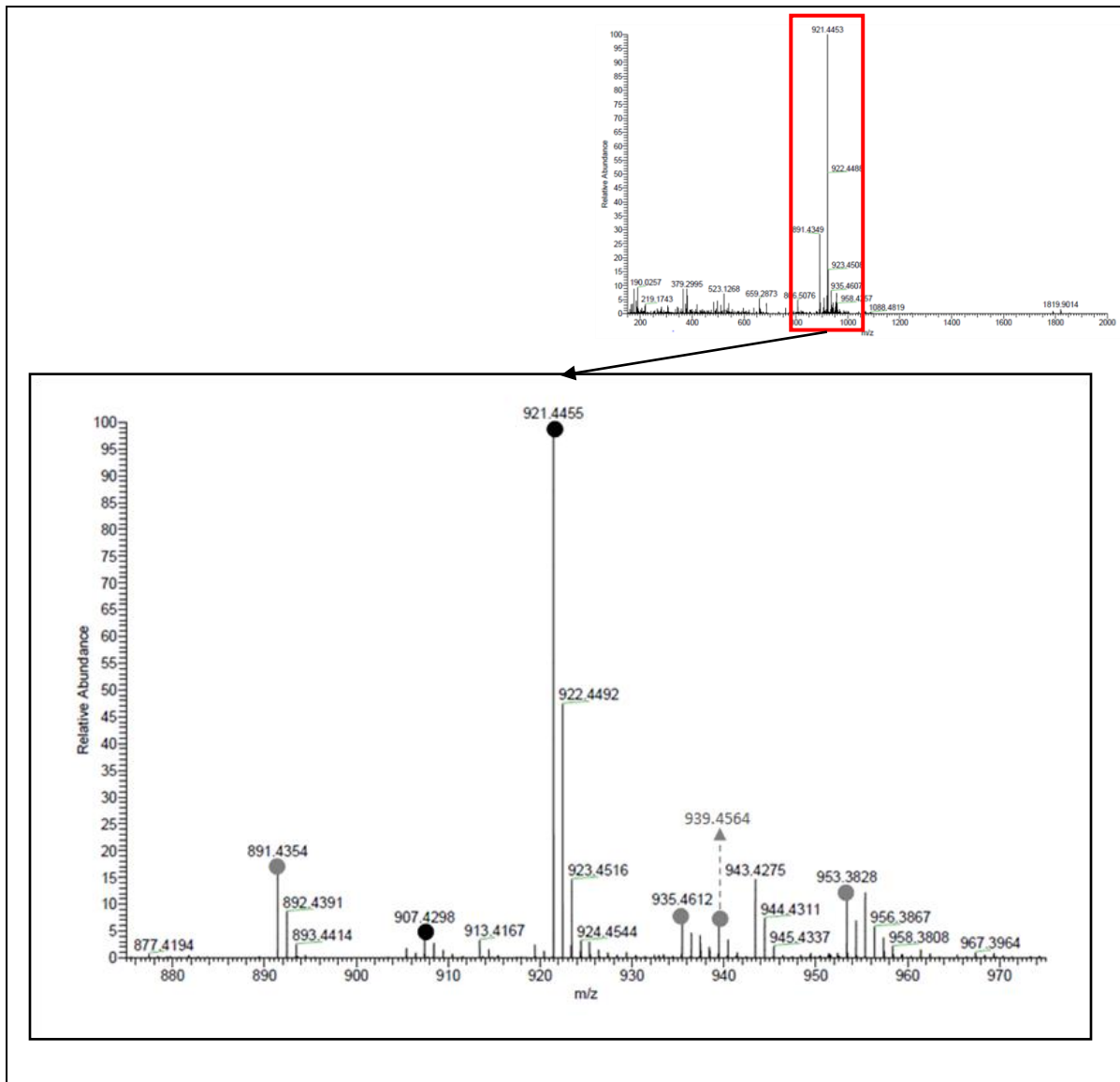
La **figure 40** représente les signaux obtenus lors de l'analyse HR-ESI en mode positif de l'extrait du tégument oral d'un individu femelle. En considérant l'agrandissement du spectre entre  $m/z$  800 et  $m/z$  1000, nous observant six signaux (à  $m/z$  891,4354,  $m/z$  907,4298,  $m/z$  921,4455,  $m/z$  935,4612,  $m/z$  939,4564 et  $m/z$  953,3867) qui peuvent correspondants à des ions de saponine.

Les ions marqués en cycle noir sur le spectre de masse ESI-SM (**Fig. 40**) sont susceptible de correspondre aux saponines déjà identifiées chez *E. sepositus* par (**Minale et al., 1978; Minale et al., 1979; Desimne et al., 1981 et al., et Riccio et al., 1981**), le signal  $m/z$  921.4455 [C<sub>45</sub>H<sub>70</sub>O<sub>18</sub>Na]<sup>+</sup> pourrait correspondre à la sepositoside A saponine majeure d'*E. sepositus*, et la masse  $m/z$  907,4298 [C<sub>44</sub>H<sub>68</sub>O<sub>18</sub> Na]<sup>+</sup> pourrait correspondre à la sepositoside B (**Fig. 8**).

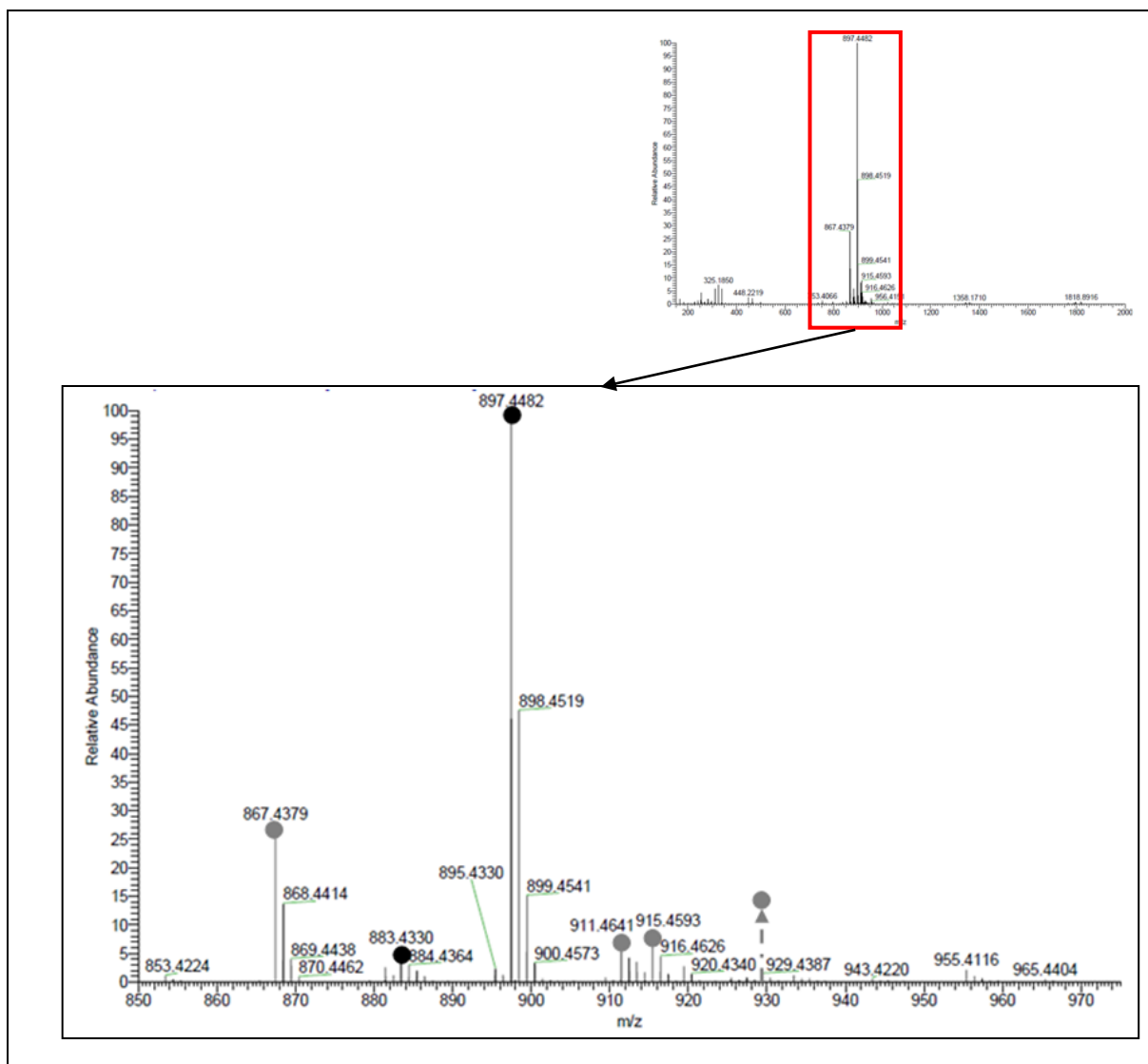
Les ions marqués en gris peuvent être associés à des nouvelles saponines. Par exemple, le signal  $m/z$  891,4354[ $C_{44}H_{68}O_{17}Na$ ]<sup>+</sup> pourrait être associé à une saponine jamais observée chez *E. sepositus*. Cette saponine possède la même masse et la même formule brute que la luzonicoside, saponine identifiée chez *E. luzonicus* par **Riccio et al., (1982)** et **Kicha et al., (2015)**. Pour cette masse trois structures sont possibles luzonicoside A, B et D (**Fig. 8**).

Les ions  $m/z$  935,4621,  $m/z$  939,4564, et  $m/z$  953,3867 ne correspondent à aucune des saponines connues pour *E. sepositus*.

Les signaux obtenus possèdent des intensités variables, ce qui suggère que les saponines sont présentes avec des proportions différentes dans le tégument oral. Le signal le plus intense est détecté à  $m/z$  921,4455 et les signaux les moins intenses sont détectés à  $m/z$  907,4298 et  $m/z$  939,4564.



**Figure 40:** Spectre de masse HR-ESI-SM en mode positif des saponines de tégument orale des femelles. Les signaux marqués en noir correspondent aux saponines déjà identifiées chez *E. sepositus*. Les signaux marqués en gris pourraient correspondre à des nouvelles saponines pour cette espèce



**Figure 41:** Spectre de masse HR-ESI-SM en mode négative des saponines de tégument orale des femelles. Les signaux marqués en noir correspondent aux saponines déjà identifiées chez *E. sepositus*. Les signaux marqués en gris pourraient correspondre à des nouvelles saponines pour cette espèce.

#### IV.1.1. Distribution des saponines dans les différents organes d'*E. sepositus*

Les extraits obtenus des cinq organes et des deux sexes d'*E. sepositus* (femelle et mâle) collectés à différentes saisons sont analysés par HR-ESI-SM, afin de déterminer les hétérogénéités de leurs distributions entre les organes, le sexe de l'espèce et les saisons de prélèvement.

À partir des spectres obtenus un tableau de la répartition des ions saponines répertoriés dans les différents organes est établi (**Tab. 44**).

**Tableau 44:** Les ions saponines détectés dans les différents organes d'*E. sepositus* (EST: estomac, CAE: caeca pylorique, GON: gonades, TEG ORL: tégument oral, TEG ABO: tégument aboral) des deux sexes (♀: femelle, ♂: mâle), collectés à différentes saisons.

[M+Na] <sup>+</sup> m/z	Hiver										Printemps										Eté										Automne									
	EST		CAE		GON		TEG ORL		TEG ABO		EST		CAE		GON		TEG ORL		TEG ABO		EST		CAE		GON		TEG ORL		TEG ABO											
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂						
891	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x						
907	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x						
909	x	x								x	x	x	x								x	x	x	x																
919	x	x	x									x	x								x	x																		
921	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x						
935					x	x	x	x							x	x	x	x																						
937	x	x	x	x					x	x	x	x									x	x																		
939	x	x	x	x					x	x	x	x									x	x	x	x																
953					x	x	x	x																																

Compte tenu du **tableau 44** plusieurs conclusions sont établies sur la répartition des ions saponines ( $m/z$ ) entre les cinq organes:

En plus des ions détectés dans le tégument oral (à  $m/z$  891,4354,  $m/z$  907,4298,  $m/z$  921,4455,  $m/z$  935,4612,  $m/z$  939,4564 et  $m/z$  953,3867), d'autres signaux sont observés (à  $m/z$  909,4455, 919,4298 et 937,4397) dans les spectres des extraits d'estomac, des caeca pyloriques des gonades et de tégument aboral, et pourraient correspondre à des ions de saponines;

Nous pouvons constater que l'ion  $m/z$  891,4354, l'ion  $m/z$  907,4289 et l'ion  $m/z$  921,4455 sont présents dans tous les organes des deux sexes collectés dans les différentes saisons;

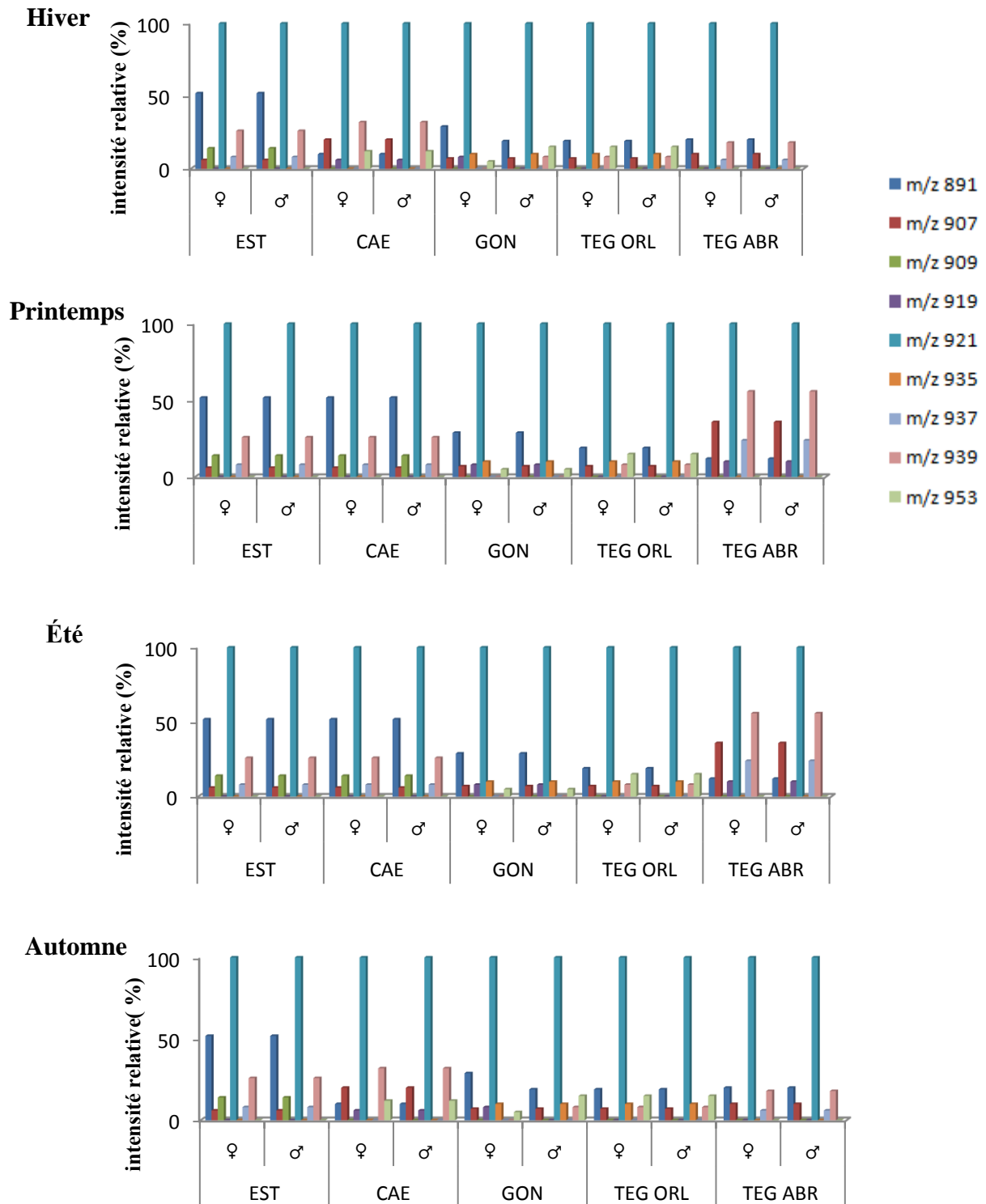
Par ailleurs, certains ions saponines ne sont présents que dans certains organes. Par exemple, l'ion  $m/z$  935,4612 et l'ion  $m/z$  953,3828 ne semblent présents que dans les gonades et le tégument oral. De même l'ion  $m/z$  909,4455 ne serait observé que dans l'estomac et les caeca pyloriques (des mâles et des femelles prélevés en printemps et été). Une fois que les saponines correspondant à ces ions sont identifiées, elles pourraient être associées spécifiquement au métabolisme de (s) l'organe (s) le (s) contenant (s);

En général, le recensement inter-organe des saponines montre que la distribution qualitative des ions saponines est hétérogène, et chaque organe semble comprendre un mélange particulier de saponines.

L'ensemble des signaux détectés présentent des intensités variables entre organes, sexes et saisons ce qui suggère des disparités dans l'abondance relative des saponines associées à ces signaux. **La figure 42** compare pour chaque saison les intensités relatives entre les ions saponines détectés dans les différents organes des deux sexes.

À première vue, **la figure 42** montre de différence importante entre les intensités relatives des ions saponines détectés dans les différents organes, à l'exception d'ion saponines  $m/z$  921,4455 qu'est l'ion le plus abondant dans tous les organes.

**En considérant la variation sexuelle**, on constate que la répartition de certains ions saponines entre les mâles et les femelles présente une différence qualitative et quantitative dans les gonades, l'ion  $m/z$  939,456 est détecté dans les gonades des individus femelles prélevés en hiver et automne. Les ions  $m/z$  891.4354 et 953.3828 sont détectés dans les gonades des individus mâles et femelles (en hiver en printemps) avec des abondances relatives variables (**Fig. 42**). Pour l'ion  $m/z$  891,4354 l'abondance relative est de 29% chez les femelles et 19% chez les mâles, l'abondance relative d'ion  $m/z$  953, 3828 est de 5% et 15 % chez les femelles et les mâles, respectivement.



**Figure 42:** Comparaison de la distribution et de l'intensité relative des ions saponines obtenus des cinq organes d'*E. sepositus*. EST: estomac, CAE: caeca pylorique, GON: gonades, TEG ORL: tégument oral, TEG ABO: tégument aboral, ♀: femelle, ♂: mâle.

**Considérant la variation saisonnière chez les deux sexes**, on constate que la composition et l'abondance relative des ions saponines ne présentent pas de différence significative entre les saisons dans l'estomac et le tégument oral. Cependant, les caeca pyloriques, les gonades et le tégument aboral sont caractérisés par deux compositions homogènes en ions saponines, la première composition est associée à la période de développement précoce et avancé (automne et hiver), et la deuxième est associée à la période de maturation sexuelle et de ponte (printemps, été).

Les deux compositions relatives aux gonades et caeca pyloriques présentent des variations qualitatives et quantitatives néanmoins ceux de tégument aboral présentent uniquement des disparités quantitatives (**Tab. 45 et Fig. 42**).

Les ions saponines à  $m/z$  921,4455 et 891,4353 présentent respectivement les abondances relatives les plus élevées quel que soit l'organe, le sexe et la saison considérés. L'ion  $m/z$  921,4455 est le plus abondant dans tous les organes. L'abondance relative de l'ion  $m/z$  891,4354 est plus élevée dans l'estomac et les caeca pyloriques.

En conclusion, l'ensemble des analyses HR-ESI-SM a permis de révéler des disparités inter-organe, sexuelle et saisonnière dans la distribution qualitative et quantitative (abondance relative des ions) des ions saponines détectés chez *E. sepositus*.

Les ions obtenus pourraient être associés aux saponines répertoriées chez *E. sepositus* ( $m/z$  921,4453, 907,4289), certains peuvent correspondre à des saponines d'une autre espèce de genre *Echinaster* à savoir *E. luzonicus* ( $m/z$  891,4349) et d'autres correspondre à des molécules inconnues ( $m/z$  909,4455; 919,4298; 935,4612; 937,4397; 939,456 et 953,3825).

**De Simone et al. (1981) et Riccio et al. (1981)** rapporte l'existence de 7 saponines chez l'étoile de mer *E. sepositus*: la sepositoside A ( $m/z$  921[C<sub>45</sub>H<sub>70</sub>O<sub>18</sub> Na]<sup>+</sup>) est la saponine majeure, la masse neutre 898 Da de cette saponine est associée à cinq isomères, et la sepositoside B ( $m/z$  907 [C<sub>44</sub>H<sub>68</sub>O<sub>18</sub> Na]<sup>+</sup>) (**Fig.8**). Les ions saponines détectés à  $m/z$  921.4453 et 907.4298 pourraient correspondre respectivement à la sepositoside A et B identifiées par ces auteurs.

Les travaux de **Riccio et al. (1982) et Kicha et al. (2015)** sur les saponines d'*E. luzonicus* montre que la masse [M+Na<sup>+</sup>]:  $m/z$  891 (soit la masse neutre 868 Da) correspondre à trois isomères qui sont la luzonicoside A, B et D, et la masse ([M+Na<sup>+</sup>]:  $m/z$  907) correspondre à la luzonicoside F (**Fig. 8**).

À partir des travaux antérieurs sur les saponines des espèces de genre *Echinater* (**De Simone et al., (1981)**; **Riccio et al., (1981)**; **Riccio et al., (1982)** et **Kicha et al., (2015)**) ont constaté que plusieurs structures sont possibles pour une même masse. De ce fait, à ce stade des recherches, il était impossible d'identifier de manière non ambiguë les saponines détectées et c'est pourquoi des analyses par ESI-SM/SM sont envisagées.

#### **IV.2. Analyses par spectrométrie de masse en tandem (HR-ESI-SM/SM) et identification de nouvelles saponines**

Afin de vérifier la structure des molécules connues et de déterminer celle des molécules inconnues, des analyses par spectrométrie de masse en tandem (HR-ESI-SM/SM) ont été réalisées. La spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) permet d'identifier les saponines grâce à leurs différentes fragmentations.

Les analyses HR-ESI-SM/SM sont réalisées en premier lieu sur les ions ( $m/z$  921,  $m/z$  907 et  $m/z$  891) qui correspondent probablement à des saponines identifiées par **Minale et al., (1978)**; **Minale et al., (1979)**; **Desimne et al., (1981) et al.,** et **Riccio et al., (1981)** chez *E. sepositus* et par **Riccio et al., 1982** et **Alla et al., 2015** chez *E. luzonicus*. Une telle approche permet de valider la présence des saponines déjà répertoriées en littérature, et d'identifier les fragments caractéristiques qui nous serviront ultérieurement à identifier de nouvelles saponines.

Compte tenu des structures de sepositoside et luzonicoside identifiées chez *E. sepositus* et *E. luzonicus*, respectivement, quelques règles régissent l'interprétation des spectres CID (collision-induced dissociation):

- La charge de ces saponines est localisée dans la partie glycone, du fait de la présence de l'acide glucuronique. Par conséquent tous les fragments obtenus par CID contiennent la partie glycone ou une part de la partie glycone;
- Au départ d'ions parents, les pertes successives des monosaccharides permettent d'obtenir la composition de la chaîne des sucres. Les pertes caractéristiques de 176 Da, 162 et 132 Da consiste en élimination de l'acide glucuronique, glucose ou galactose et l'arabinose, respectivement.

La difficulté majeure soulevée pour l'interprétation des résultats de CID révèle de la nature de l'échantillon à analyser qu'est un mélange de composés selon les résultats de HR-ESI-SM.

En effet, les ions fils obtenus peuvent correspondre aux fragmentations de plusieurs ions isomères. De ce fait, seules les fragmentations caractéristiques seront explicitées.

Un formalisme est appliqué pour clairement distinguer les schémas de fragmentation observés sur les spectres CID. Nous attribuons deux traits différents (plain et pointillé) pour les schémas de fragmentations qui aboutissent à la même structure, et une couleur différente pour les schémas de fragmentations issus des structures isomères.

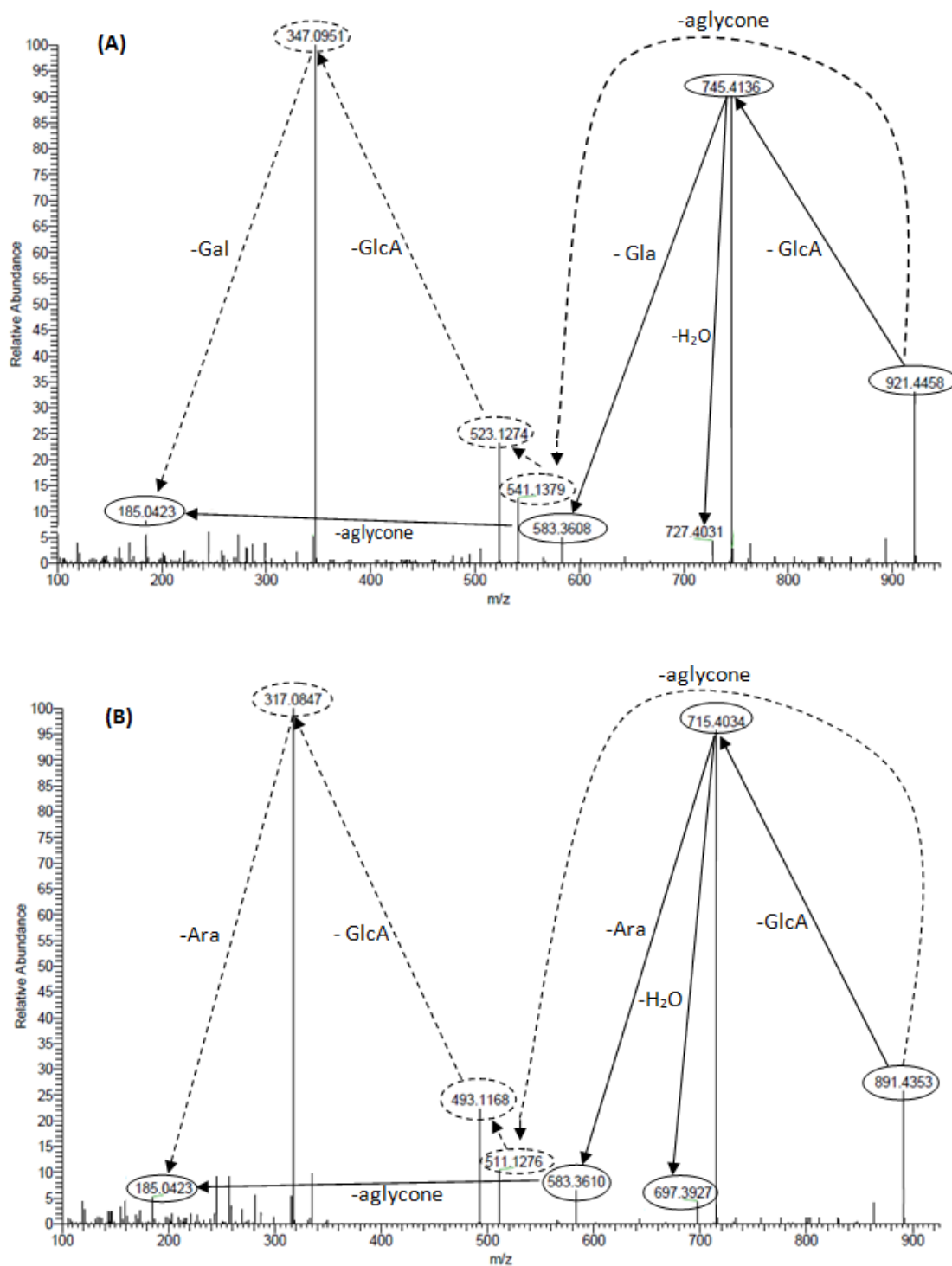
Lorsque l'identification des structures n'est pas possible, seules les masses moléculaires sont rapportées (**Tab. 46**). Les structures proposées pour les différents ions saponines, compte tenu des fragments obtenus par les analyses CID sont illustrés sur **la figure 48**.

#### a. Analyse de l'ion $m/z$ 921

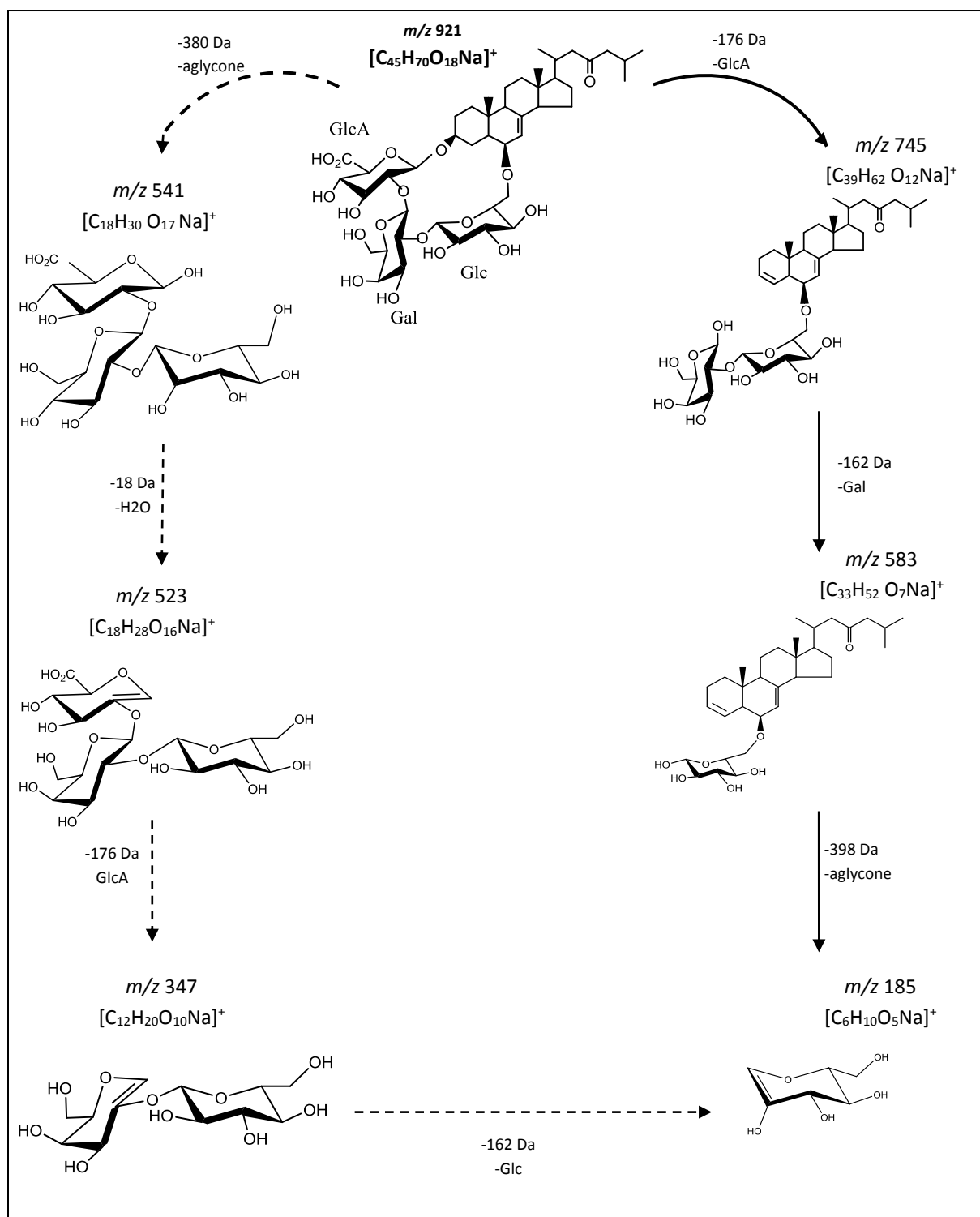
Le signal à  $m/z$  921,4455 est le pic de base du spectre HR-ESI-SM positif de tégument oral d'un individu femelle. Cet ion pourrait correspondre à la sepositoside A déjà identifiée par **Desimone et al., (1981)** chez *E. sepositus*. **La figure 43. A** représente le spectre CID des ions  $m/z$  921,4455. Deux schémas de fragmentation dominant clairement le spectre.

Le premier schéma représenté en trait plein (**Fig. 43. A**) est caractérisé par un pic intense à  $m/z$  745,4136  $[\text{C}_{39}\text{H}_{62}\text{O}_{12}\text{Na}]^+$  qui correspond à la perte d'un acide glucuronique ( $m/z$  176  $[\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6]$ ) au départ de l'ion parent. La masse ainsi obtenue peut perdre soit une molécule d'eau, soit un galactose ( $m/z$  162  $[\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]$ ) pour donner l'ion  $m/z$  727,403 et l'ion  $m/z$  583,3608. Ce dernier perd l'aglycone pour aboutir à l'ion de glucose à  $m/z$  185  $[\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5\text{Na}]^+$ . Dans le deuxième schéma de fragmentation représenté en trait noir pointillé (**Fig. 43. A**), nous observons un signal qui correspond à la chaîne tri-saccharidiques ( $m/z$  451,1379  $[\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_{17}\text{Na}]^+$ ) résultant de l'élimination de l'aglycone, après hydratation cette chaîne se fragmente pour former la chaîne di-saccharidique ( $m/z$  347,0951  $[\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_{10}\text{Na}]^+$ ) et cette dernière perd un galactose ( $m/z$  162  $[\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]$ ) pour donner un glucose à  $m/z$  185  $[\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5\text{Na}]^+$ .

L'ensemble des ions obtenus par ces fragmentations sont synthétisés et représentés dans **la figure 44**. La structure obtenue semble concorder avec celle de la sepositoside A identifiée par **Desimne et al., (1981)** dans *E. sepositus*.



**Figure 43:** Spectre CID des ions parent  $m/z$  921 (A) et  $m/z$  891 (B), et comparaison de leurs schémas de fragmentations en HR-ESI-MS/MS.



**Figure 44:** Schémas de fragmentation de l'ion  $m/z$  921 pouvant correspondre à la sepositoside

A.

### b. Analyse de l'ion $m/z$ 891

Le signal à  $m/z$  891,4354 pourrait correspondre à luzonicoside A d'*E. Luzonicus* par **Riccio et al., (1981)**.

La **figure 43. B** représente le spectre CID des ions  $m/z$  891,435. Deux schémas de fragmentation coexistent pour cet ion et présentent des tendances similaires aux schémas de fragmentation de l'ion  $m/z$  921.

Le schéma en trait plein présente comme première fragmentation l'élimination d'un acide glucuronique ( $m/z$  176 [C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>]) pour obtenir l'ion  $m/z$  715,4034 [C<sub>38</sub>H<sub>60</sub>O<sub>11</sub>Na]<sup>+</sup>. Ainsi l'ion  $m/z$  715,4034 peut perdre soit une molécule d'eau (18 Da) pour obtenir l'ion  $m/z$  697,3927 soit une molécule d'arabinose ( $m/z$  132 [C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>]) pour arriver à l'ion  $m/z$  583,3510. Cet ion élimine l'aglycone pour obtenir l'ion  $m/z$  185,0423.

Cependant pour le deuxième schéma de fragmentation en trait pointillé, la première fragmentation de l'ion parent correspond à la perte de l'aglycone menant à l'ion  $m/z$  511,1276 qui correspond à la chaîne tri-saccharidique  $m/z$  511 [C<sub>17</sub>H<sub>28</sub>O<sub>16</sub>Na]<sup>+</sup>. Ce dernier perd successivement un acide glucuronique et un arabinose (176 Da et 132 Da) pour obtenir la chaîne di-saccharidique à  $m/z$  317,0847 [C<sub>11</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>Na]<sup>+</sup> et un glucose à  $m/z$  185,0423.

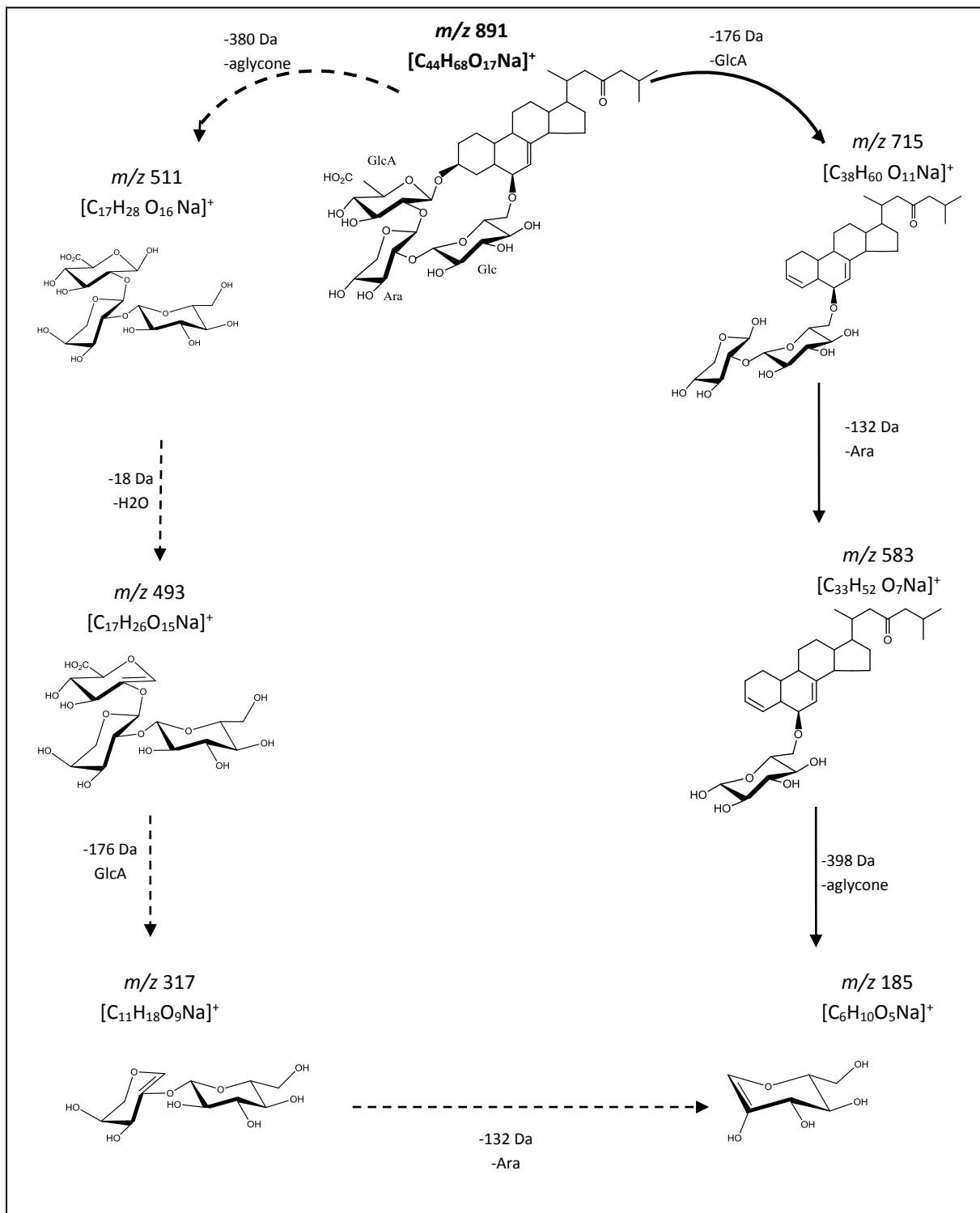
Les ions fragments obtenus par les deux schémas de fragmentation (**Fig .45**) sont caractéristiques de luzonicoside d'*E. luzonicus* établie par **Riccio et al., (1982)**.

En conclusion, les fragments obtenus lors de l'analyse par spectrométrie de masse en tandem des ions  $m/z$  921,4455 et  $m/z$  891,4353 permettent d'obtenir des signaux clefs ou des fragments caractéristiques de deux types de glycone:

- Les signaux à  $m/z$  541,1379 [C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>O<sub>17</sub>Na]<sup>+</sup> soit  $m/z$  **541** [C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub> + C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> + C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> + Na]<sup>+</sup>, à  $m/z$  523,1247 [541-18] et à  $m/z$  **347** [C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>Na]<sup>+</sup> soit  $m/z$  347 [C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> + C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> + Na]<sup>+</sup>. Ces fragments d'ions sont caractéristiques d'une chaîne oligosaccharidique de type: A-Glc-Gal -Glc ([A-Glc-Gal-Glc+Na<sup>+</sup>]): acide glucuronique-galactose-glucose.
- Les signaux à  $m/z$  511,1267 [C<sub>17</sub>H<sub>28</sub>O<sub>16</sub>Na]<sup>+</sup> soit  $m/z$  511 [C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub> + C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub> + C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> + Na]<sup>+</sup>, à  $m/z$  **493** [511-18], et à  $m/z$  **317** [C<sub>11</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>Na]<sup>+</sup> soit  $m/z$  **317** [C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub> + C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> + Na]<sup>+</sup>. Ces fragments d'ions sont caractéristiques d'une chaîne oligosaccharidique de type: A-Glc-Ara -Glc ([A-Glc-Ara-Glc+Na<sup>+</sup>]): Acide glucuronique-arabinose-glucose.

Les signaux correspondant à la chaîne tri-saccharidique permettent de suggérer la masse et la formule brute de la partie aglycone, car la chaîne tri-saccharidique est le résultat de

l'élimination de la partie aglycone. Sur cette base la masse et la formule brute de partie aglycones des saponines caractérisées par l'analyse CID des ions  $m/z$  921 et  $m/z$  981 est  $m/z$  382 [ $C_{27}H_{42}O$ ].

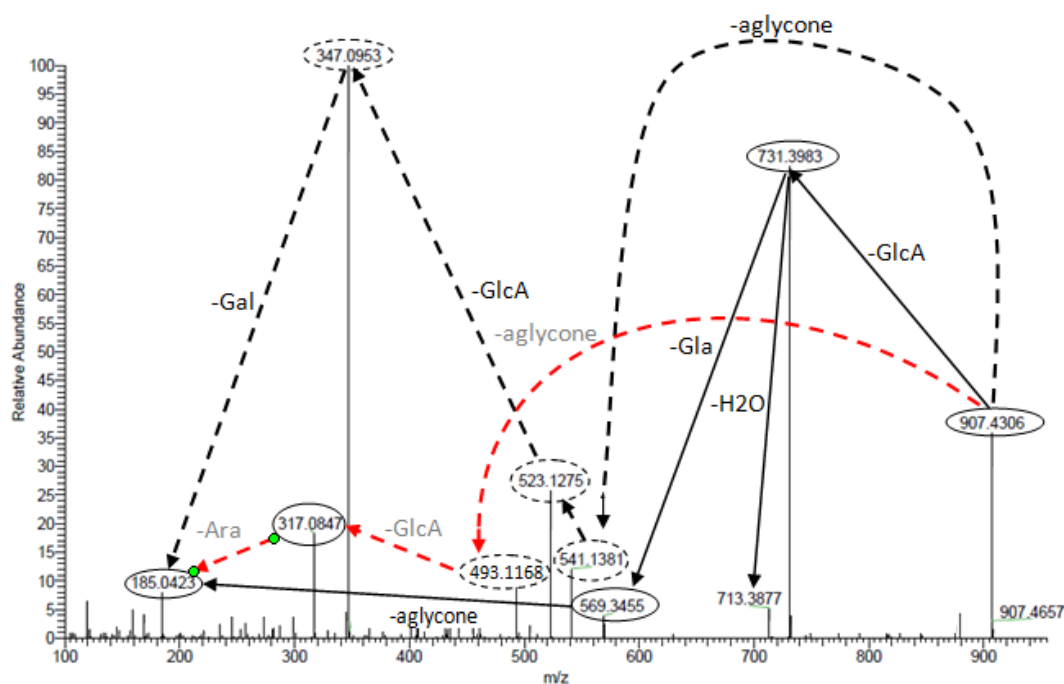


**Figure 45:** Schémas de fragmentation de l'ion  $m/z$  891 pouvant correspondre à la luzonicoside.

### c- Analyse de l'ion $m/z$ 907

L'ion  $m/z$  907,4306 pourrait correspondre à la sepositoside **B** et la luzonicoside **F** déjà identifiées chez *E. sepositus* et *E. lozonicus* respectivement (**Fig.8**). Les deux molécules sont des isomères, car elles ont la même composition mais des structures différentes telles que représentées sur **la figure 8** et la **Figure 48** structures **1** et **7**. Les structures de ces deux isomères est différentes à la fois au niveau de l'oligosaccharide et de l'aglycone. Il est envisageable de les distinguer grâce à leurs ions fragments.

**La figure 46** représente le spectre CID des ions  $m/z$  907,4367. Nous avons identifié trois schémas de fragmentation représentés respectivement en trait noir plein et pointillé, et en trait pointillé rouge sur la **Figure 46**, respectivement. Les deux schémas de fragmentation en noir correspondent probablement à la sepositoside B et l'autre en rouge à la luzonicoside F. l'ensemble des ions fragments sont synthétisés dans la **figure 47**.



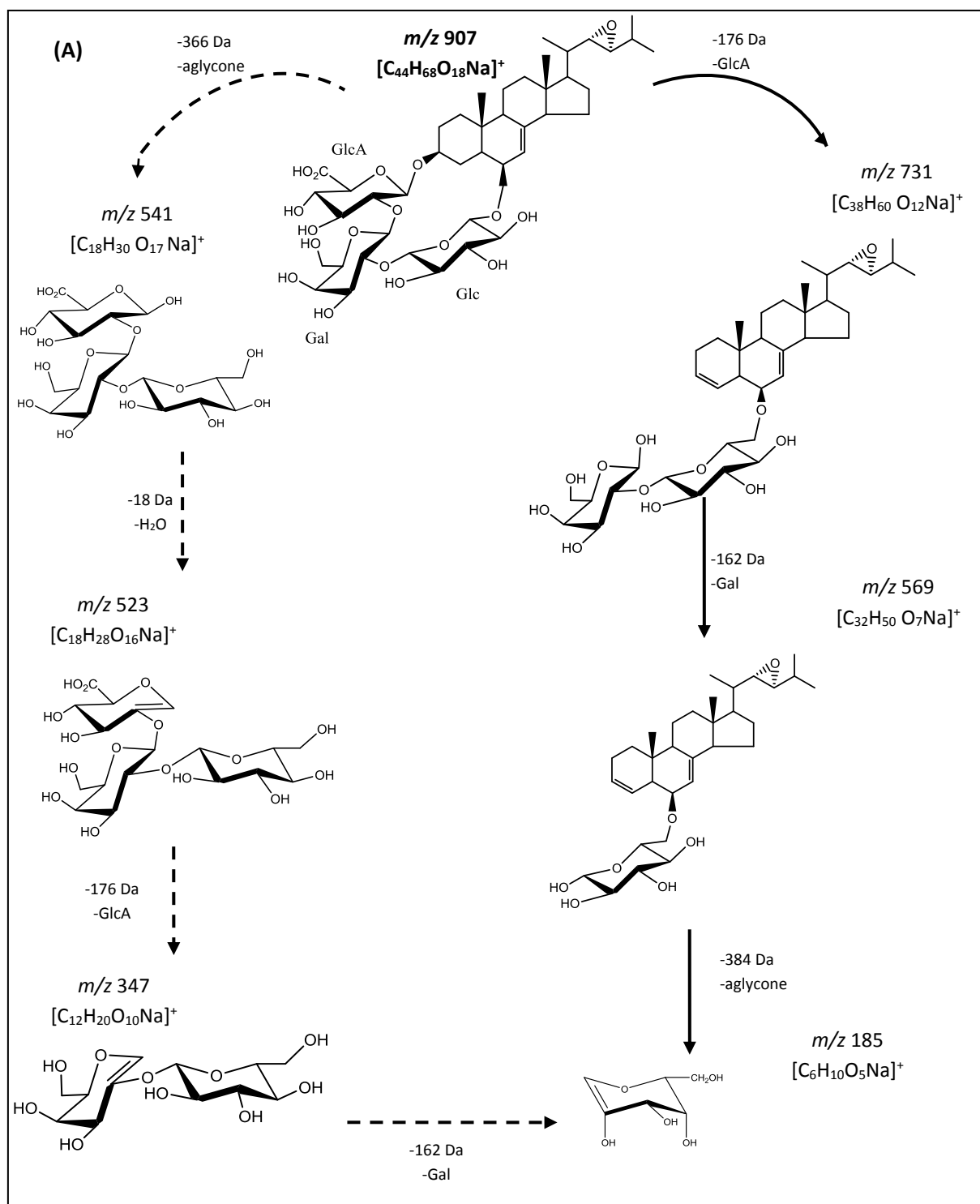
**Figure 46:** Spectre CID des ions parents  $m/z$  907.

Les décompositions représentées en trait plein noir sur le spectre relèvent des signaux à  $m/z$  731,3983, à  $m/z$  569,3455 et  $m/z$  185 qui sont dus à la perte successive de l'acide glucuronique, de galactose et de l'aglycone. Le schéma en trait noir pointillé donne les fragments suivants:  $m/z$  907,4306  $\rightarrow$   $m/z$  541,1381  $\rightarrow$   $m/z$  523,1275  $\rightarrow$   $m/z$  347,0953  $\rightarrow$   $m/z$  185,0423 qui sont dues à la perte successive de l'aglycone, d'une molécule d'eau, d'un glucuronique acide et d'un galactose.

La présence des signaux  $m/z$  523,1275 et  $m/z$  347,0953 concordes avec un glycone de type A-Glc-Gla-Glc. Avec ces schémas de fragmentation, nous pouvons établir la structure de la sepositoside B (**Fig.47. A**).

Le troisième schéma de fragmentation en trait rouge pointillé sur la **figure 46**, correspond à la perte initiale de l'aglycone, puis aux éliminations successives de l'acide glucuronique et de l'arabinose donnant l'ion  $m/z$  493,1168 et l'ion  $m/z$  317,0854. Ces ions attestent la présence d'un oligosaccharide de type A-Glc-Ara-Glc issue de la fragmentation de la luzonicoside F (**Fig. 47 B**).

En conclusion, les fragments obtenus lors de l'analyse par spectrométrie de masse en tandem de l'ion  $m/z$  921,  $m/z$  891 et  $m/z$  907 permettent de confirmer que les structures observées correspondent à celles des travaux de **De Simone et al., (1981)**; **Riccio et al., (1981)**; **Riccio et al., (1982)** et **Kicha et al., (2015)**.



**Figure 47:** Schémas de fragmentation de l'ion  $m/z$  907 pouvant correspondre à la sepositoside B (A), et la luzonicoside F (B).

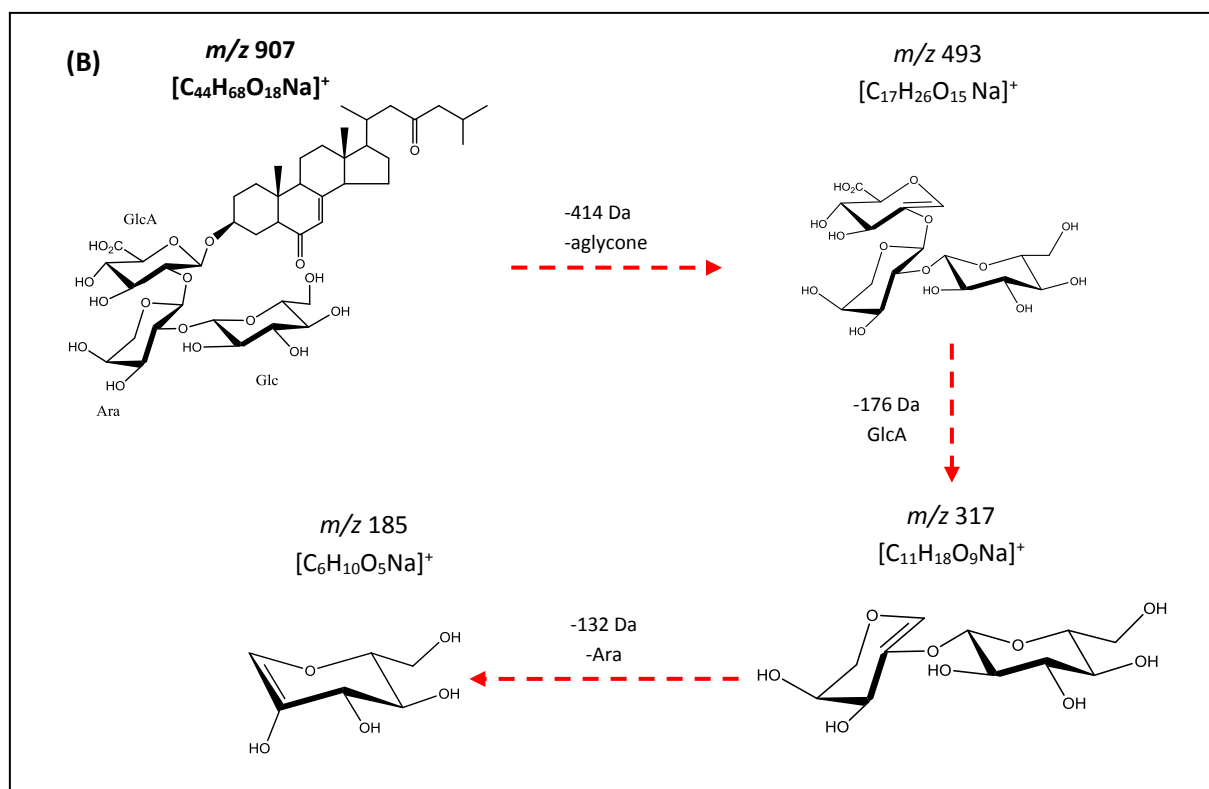


Figure 47 (suite).

Lors des Analyses HR-ESI-SM, nous avons identifiée d'autres signaux ( $m/z$  909,4455,  $m/z$  919,4298,  $m/z$  935,4612,  $m/z$  939,4564 et  $m/z$  953,3828) qui peuvent correspondre à des saponines qui n'ont pas été observées par les travaux antérieurs. Ces ions ont été analysés par spectrométrie de masse en tandem, et grâce aux fragments caractéristiques préalablement défini, et aux travaux ultérieurs (De Simone *et al.*, 1981; Riccio *et al.*, 1981; Riccio *et al.*, 1982 et Kicha *et al.*, 2015), des structures possibles pour ces ions ont été proposés (Fig. 48).

Les spectres CID obtenus ont été analysés et les ions fragments obtenus sont synthétisés dans le tableau 45.

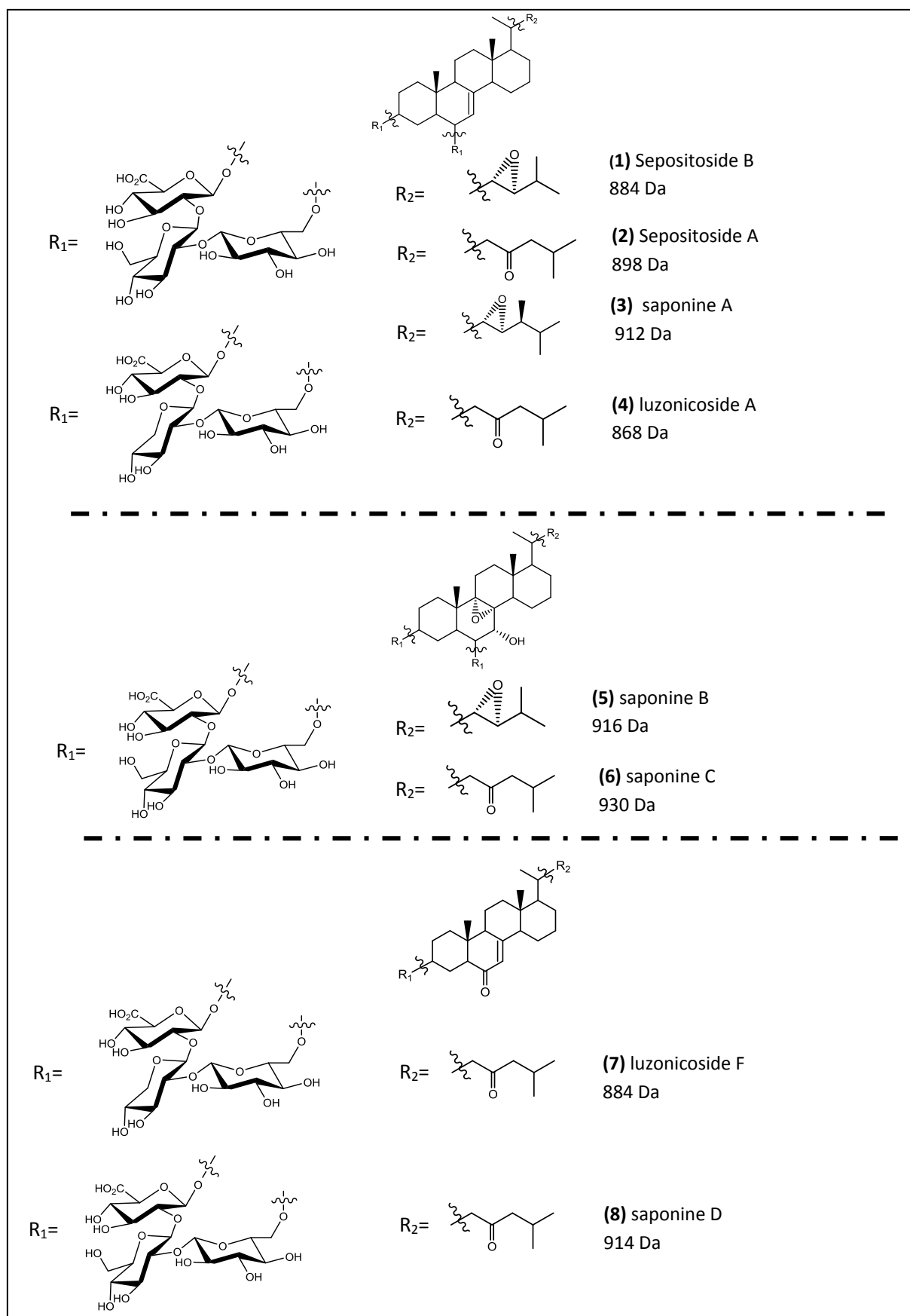
**Tableau 45:** Les congénères des saponines détectés dans les différents organes d'*E. sepositus* (EST: estomac, CAE: caeca pylorique, GON: gonades, TEG ORL: tégument oral, TEG ABO: tégument aboral) des deux sexe (♀: femelle, ♂: mâle), collectés à différentes saisons (tt: tout les saisons, hi: hiver, pr : printemps, ét: été, Au: automne). M: masse moléculaire, S: structure moléculaire.

Saponines	M (Da)	[M+Na] <sup>+</sup>	composition	S	Signaux clefs de fragmentation				Distribution				
					523	347	493	317	EST	CAE	GON	TEG ORL	TEG ABO
Luzonicoside A	868	891	C <sub>44</sub> H <sub>68</sub> O <sub>17</sub> Na	4			X	X	♀♂, tt	♀♂, tt	♀♂, tt	♀♂, tt	♀♂, tt
Sepositoside B				1	X	X			♀♂, tt	♀♂, tt	♀♂, tt	♀♂, tt	♀♂, tt
Luzonicoside F	884	907	C <sub>44</sub> H <sub>68</sub> O <sub>18</sub> Na	7			X	X	♀♂, tt	♀♂, tt	♀♂, tt	♀♂, tt	♀♂, tt
Non identifiée	886	909	C <sub>44</sub> H <sub>70</sub> O <sub>18</sub> Na						♀♂, tt	♀♂, pr, ét			
Non identifiée					X	X				♀♂, hi, Au	♀, hi, Au ♀♂, pr, ét		♀♂, pr, ét
Non identifié	896	919	C <sub>45</sub> H <sub>68</sub> O <sub>18</sub> Na				X	X		♀♂, hi, Au	♀, hi, Au ♀♂, pr, ét		♀♂, pr, ét
Sepositoside A	898	921	C <sub>45</sub> H <sub>70</sub> O <sub>18</sub> Na	2	X	X			♀♂, tt	♀♂, tt	♀♂, tt	♀♂, tt	♀♂, tt
Saponin A	912	935	C <sub>46</sub> H <sub>72</sub> O <sub>18</sub> Na	3	X	X					♀♂, tt	♀♂, tt	
Saponin B	914	937	C <sub>45</sub> H <sub>70</sub> O <sub>19</sub> Na	5	X	X			♀♂, tt	♀♂, tt			♀♂, tt
Saponin C	916	939	C <sub>44</sub> H <sub>68</sub> O <sub>20</sub> Na	6	X	X			♀♂, tt	♀♂, tt	♂, hi, Au	♀♂, tt	♀♂, tt
Saponin D	930	953	C <sub>45</sub> H <sub>70</sub> O <sub>20</sub> Na	8	X	X					♀♂, tt	♀♂, tt	

Les spectres CID des ions  $m/z$  935, 4612; 937,4167; 939,4564 et 953,3828 montrent des signaux à  $m/z$  523,1274 et à  $m/z$  347,0195. Ces fragments sont attribués à la présence de l'acide glucuronique, galactose et glucose (AGlc-Gal-Glc) dans la chaîne polysaccharidique, et suggèrent que les structures associées à ces ions diffèrent au niveau de l'aglycone, cependant leur oligosaccharide est identique. En se référant aux études antérieures qui portent sur les saponines de genre *Echinaster* (De Simone *et al.*, 1981; Riccio *et al.*, 1981; Riccio *et al.*, 1982 et Kicha *et al.*, 2015) nous avons proposé des structures pour la partie aglycone (Fig. 48).

La différence de masse moléculaire de 32 Da entre  $m/z$  907,4306 et 939,4564 suggère la présence de deux groupements supplémentaires (un groupement époxyde et hydroxyle) sur la partie aglycone de la sepositoside B. La structure proposée à l'ion  $m/z$  939.4564 est illustré dans la structure (5) de la figure 48. De même pour les ions  $m/z$  953.3828 qui suggère la présence de groupements époxyde et hydroxyle sur la partie aglycone de la sepositoside A (structure 6 de la figure 48).

L'ion saponines  $m/z$  935,4612 est séparé par 14 Da de l'ion  $m/z$  921.4455, ce qui concorde avec l'ajout d'un méthylène sur la chaîne latérale de l'aglycone de sepositoside A (structure 3 de la figure 48).



**Figure 48:** Les structures moléculaires prédites pour les ions saponines détectées chez *E. sepositus*.

L'ion saponines  $m/z$  937,4167 est séparé de 16 Da de l'ion  $m/z$  921,4455 ce qui suggère la présence d'une molécule d'oxygène supplémentaire sur l'aglycone de la sepositoside A (structure **8** de la **figure 48**).

Le spectre CID de l'ion  $m/z$  919,4292 (**Fig. 14 en annexe**) apparaît relativement simple et deux schémas de fragmentations sont observés. Le premier schème (en trait noir) présente les fragments caractéristiques ( $m/z$  523,1267 et  $m/z$  347,0948) d'une chaîne oligosaccharidique de type: A-Glc-Gal-Glc. Les fragmentations observées ( $m/z$  493,1161 et  $m/z$  317,0847) dans le deuxième schéma coïncide avec une chaîne oligosaccharidique de type: A-Glc-Ara-Glc. Nous pouvons donc supposer que l'ion  $m/z$  919 correspond à deux isomères qui ont deux structures différentes à la fois au niveau de l'oligosaccharide et de l'aglycone.

En conclusion, les analyses HR-ESI-SM/SM ont permis d'identifier certaines structures déjà décrites dans la littérature et de déterminer certains fragments caractéristiques qui sont utiles pour la mise en évidence de nouvelles structures et d'éventuel isomère.

En première approche, les résultats obtenus ont confirmé une grande diversité structurale des saponines d'*E. sepositus* car le nombre des structures détectées est supérieur au nombre déjà déterminé dans la littérature. Les saponines associées aux ions  $m/z$  935,4612; 937,0978; 939,456; et 953,3828 sont nommées provisoirement saponine, A, B, C, D, respectivement (**Tab. 45**) leurs structures sont illustrées dans la **figure 48**. Ces saponines ont des glycones identiques et différent dans la partie aglycone et ne correspondent à aucune des saponines connues pour *E. sepositus*. En plus à ces structures deux autres isomères sont associés à l'ion  $m/z$  907,4306 (la sepositoside B et la luzonicoside F). Aucune structure n'a été clairement attribuée à l'ion  $m/z$  919,4292 et l'ion  $m/z$  909,4455.

Sur l'ensemble des structures établies on distingue 6 structures macrocycliques (sepositoside A, Sepositoside B, Luzonicoside A, saponine, A, B, C) et 2 structures ouvertes (luzonicoside F et saponine D).

**Cette partie de thèse a été publié sous forme d'un article intitulé:**

**« Saponin contents in the starfish *Echinaster sepositus*: Chemical characterization, qualitative and quantitative distribution ».**

### IV.3. Analyse par résonance magnétique nucléaire

Compte tenu de la nature de nos extraits qui sont des mélanges de composés, on attend à obtenir des spectres RMN (proton et carbone) avec des signaux qui se chevauchent, et complique donc l'interprétation des spectres. Néanmoins, nos extraits comprennent deux composés majoritaires (sepositoside A et luzonicoside) et les autres sont mineurs. De ce fait, les signaux RMN attendus sont des signaux associés à la structure des composés majoritaires ce qui est susceptible de donner des spectres faciles à interpréter.

De plus, le couplage interatomique qui est visible par l'analyse des spectres bidimensionnels permet d'élucider aisément la structure chimique des composés majoritaires.

Il serait donc intéressant d'analyser les saponines par RMN. Cette approche permettra, d'une part, de valider la structure de l'aglycone, d'autre part, d'identifier les sucres de la chaîne saccharidique.

#### IV.2.1. Élucidation structurelle de la sepositoside A

Selon les résultats d'analyse par spectrométrie de masse la sepositoside A est le composé prédominant dans tous les organes. De ce fait, les différents extraits peuvent être utilisés pour élucider cette structure. Cependant, nous avons préconisé d'utiliser les saponines de tégument oral dont l'abondance relative des autres saponines est relativement faible, notamment l'ion  $m/z$  981 qui correspond à la luzonicoside (**Fig. 42**).

##### a. Détermination de l'aglycone

Le spectre RMN- $^{13}C$  a mis en évidence dans la zone d'aglycone **27** atomes de carbone, dont : **5 méthyles (CH<sub>3</sub>)**: CH<sub>3</sub>-18, CH<sub>3</sub>-19, CH<sub>3</sub>-21, CH<sub>3</sub>-26 et CH<sub>3</sub>-27; **9 méthylènes (carbones secondaires CH<sub>2</sub>)**: CH<sub>2</sub>-1, CH<sub>2</sub>-2, CH<sub>2</sub>-4, CH<sub>2</sub>-11, CH<sub>2</sub>-12, CH<sub>2</sub>-15, CH<sub>2</sub>-16, CH<sub>2</sub>-22, CH<sub>2</sub>-23; **9 Méthines (carbones tertiaires CH)**: CH-3, CH-5, CH-6, CH-7, CH-9, CH-14, CH-17, CH-20, CH-25; **2 carbones quaternaires (C)**: C10, C13.

Tous les signaux des carbones et des protons sont déterminés et attribués d'après l'analyse des spectres HSQC et HMBC, COSY, NOESY. Les signaux caractéristiques d'aglycone de tégument oral sont reportés dans **le tableau 46**.

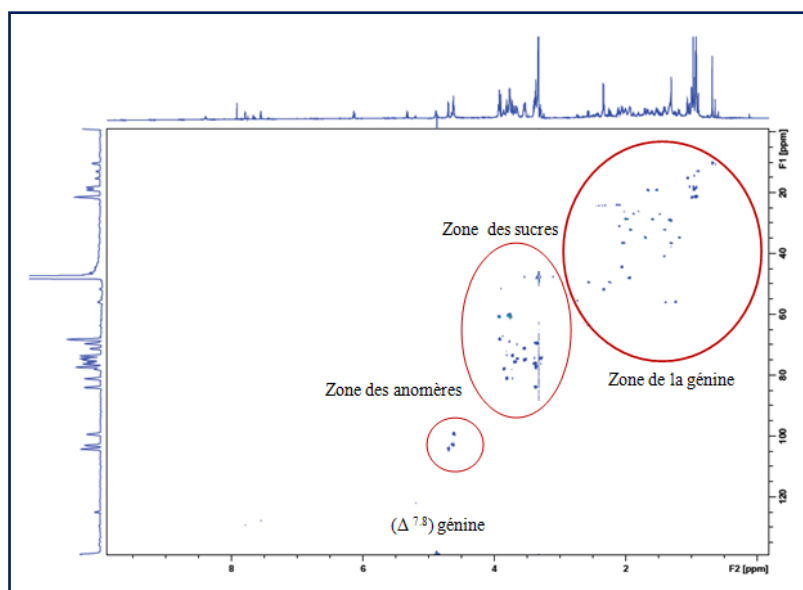
Dans l'aglycone deux méthines CH-3( $\delta_H$  3,87,  $\delta_C$  76,5) et CH-6( $\delta_H$  4,44,  $\delta_C$  76,9) attaché à l'oxygène; une double liaison 7(8) ( $\delta_H$  5,54,  $\delta_C$  117,6; 142,0) et une fonction cétone en C-23( $\delta_C$  212,6) ont été mises en évidence.

**Tableau 46:** Valeurs des déplacements chimiques RMN-1H (900 MHz) et -13C (150 MHz) de la génine (aglycone) d'extrait de tégument oral dans méthanol deutéré CD3OD.

Position	$\delta_C$	$\delta_H$
1	37.5 CH <sub>2</sub>	1.77
		1.09
2	28.1 CH <sub>2</sub>	1.78
		1.80
3	76.5 CH	3.87
4	29.3 CH <sub>2</sub>	1.93
		1.29
5	44.5 CH	1.42
6	76.9 CH	3.44
7	117.6 CH	5.54
8	142.0 CH	-
9	49.1 CH	1.66
10	33.7 C	-
11	21.5 CH <sub>2</sub>	1.65
		1.58
12	39.1 CH <sub>2</sub>	2.06
		1.32
13	43.2 C	-
14	54.6 CH	1.92
15	22.7 CH <sub>2</sub>	1.64
		1.53
16	27.5 CH <sub>2</sub>	2.07
		1.51
17	55.9 CH	1.32
18	11.1 CH <sub>3</sub>	0.65
19	14.1 CH <sub>3</sub>	0.91
20	32.5 CH	2.03
21	19.1 CH <sub>3</sub>	0.95
22	49.6 CH <sub>2</sub>	2.20
		2.51 dd (16.1, 3.8)
23	212.6 C	-
24	51.9 CH <sub>2</sub>	2.33 d (7.0)
25	24.2 CH	2.4
26	21.5 CH <sub>3</sub>	0.93
27	21.6 CH <sub>3</sub>	0.92

Le spectre HSQC a permis d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés entre eux par les corrélations  $^1J_{H-C}$ . Le spectre COSY permet de corréler les protons qui sont couplés scalairement, en d'autres termes celle-ci permet de visualiser les constantes de couplage  $^3J$  entre deux protons voisins.

Les valeurs des déplacements chimiques sont reportées dans le **tableau 46**. Et la **figure 49** représente le spectre HSQC d'extrait de tégument oral.



**Figure 49:** Spectre HSQC d'extrait du tégument oral.

**L'analyse du spectre HMBC** révèle les corrélations hétéro-nucléaires  $^2J_{H-C}$  et  $^3J_{H-C}$  suivantes:

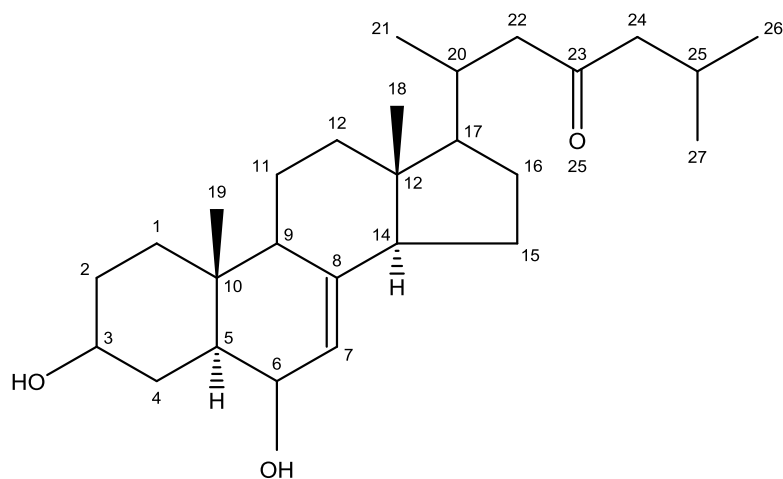
- Les protons CH<sub>3</sub>-18 à  $\delta_H$  0,65 corrélient avec les carbones C-12 à  $\delta_C$  39,1, C-13 à  $\delta_C$  43,2, C-14 à  $\delta_C$  54,6 et C-17 à  $\delta_C$  55,9.
- Les protons CH<sub>3</sub>-19 à  $\delta_H$  0,91 corrélient avec les carbones C-1 à  $\delta_C$  37,5, C-5 à  $\delta_C$  44,5, C-9 à  $\delta_C$  49,1, et C-10 à  $\delta_C$  33,7.
- Les protons CH<sub>3</sub>-21 à  $\delta_H$  0,95 corrélient avec les carbones C-17 à  $\delta_C$  55,9, C-20 à  $\delta_C$  32,5, et C-22 à  $\delta_C$  49,6.
- Les protons CH<sub>3</sub>-26 à  $\delta_H$  0,93 corrélient avec les carbones C-24 à  $\delta_C$  51,9, C-25 à  $\delta_C$  24,2, et C-27 à  $\delta_C$  21,5.
- Les protons CH<sub>3</sub>-27 à  $\delta_H$  0,92 corrélient avec les carbones C-24 à  $\delta_C$  51,9, C-25 à  $\delta_C$  24,2, et C-26 à  $\delta_C$  21,5.
- Les protons CH<sub>2</sub>-24 à  $\delta_H$  2,33 corrélient avec les carbones C-23 à  $\delta_C$  212,6, C-25 à  $\delta_C$  24,2, et C-27 à  $\delta_C$  21,6, permet d'attribuer une fonction cétone dans la position C-23.
- Les protons CH-7 à  $\delta_H$  5,54 corrélient avec les carbones C-5 à  $\delta_C$  44,5, C-9 à  $\delta_C$  49,1, et C-14 à  $\delta_C$  54,6 permet d'attribuer la double liaison  $\Delta^{7,8}$ .

**Le spectre ROESY**

La configuration de la molécule a été établie par analyse des pics de croisements du spectre ROESY. Des pics clefs ont permis de confirmer:

- La configuration  $\beta$  de 3-OH: pic entre  $\delta_H$  3,87 (H-3) et  $\delta_H$  1,42 (H-5) qui suggérer une orientation  $\alpha$ - équatoriale de H-3, donc une  $\beta$  orientation de 3-OH;
- La configuration de  $\beta$  de 6-OH: pic entre  $\delta_H$  3,44 (H-6) et  $\delta_H$  1,93 (H-4) qui suggérer une orientation  $\alpha$ - équatoriale de H-6, donc une  $\beta$  orientation de 6-OH;
- La configuration  $\alpha$ - équatoriale de H-14: pic entre  $\delta_H$  5,54 (H-7) et  $\delta_H$  1,92 (H-14) et entre  $\delta_H$  5,54 (H-7) et  $\delta_H$  1,62 (H-15);
- La configuration 20-R de la chaîne latérale: pic entre  $\delta_H$  0,85 (H-18) et  $\delta_H$  1,98 (H-20), entre  $\delta_H$  0,85 (H-18) et  $\delta_H$  0,95 (H-21), entre  $\delta_H$  0,95 (H-21) et  $\delta_H$  2,05 (H-12), entre  $\delta_H$  2,51 (H-22) et  $\delta_H$  2,05 (H-16). Cette configuration est confirmée aussi par la valeur de déplacements chimiques de H<sub>3</sub>-21 [ $\delta_H$  0,95 (H-21)] qu'est supérieure à 0,90.

Les résultats obtenus sont compatibles avec la structure de  $3\beta,6\beta$ -hydroxy- $5\alpha$ -cholesta-7-en-23-one établie par **De Simone *et al.* (1981)** pour la génine stéroïdique de la sepositoside A (**Fig. 50**).

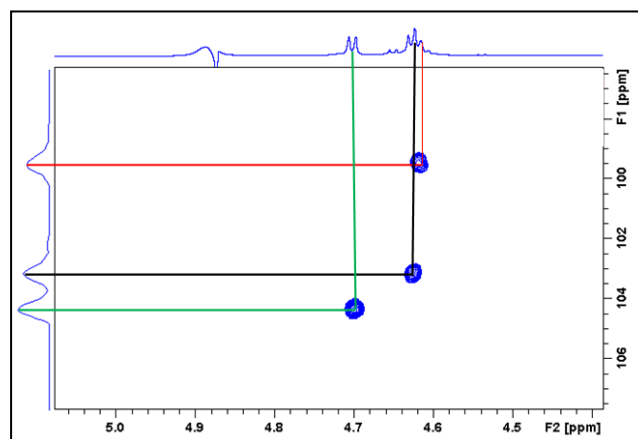


**Figure 50:** Génine (majeure) d'extrait de tégument oral.

**b. Détermination des sucres**

L'analyse du spectre HSQC de l'extrait de tégument oral a permis de distinguer 3 signaux de protons anomériques résonnant à  $\delta_H$  4,61, 4,62(1H, *d*,  $J = 6$  Hz) et 4,70 (1H,*d*,  $J = 6$  Hz)

corrélant avec les signaux de quatre carbones à  $\delta_C$  99,4; 103,2 et 104,3 ce qui prouve la présence de trois sucres (**Fig. 51**).



**Figure 51:** Spectre HSQC de la zone des anomères de composé majeur de l'extrait de tégument oral.

L'évaluation des couplages spin-spin et des valeurs de déplacements chimiques révélés sur les spectres de RMN-2D (COSY, TOCSY, NOESY et HSQC) permet l'identification de:

- Un  $\beta$ -D-Glucopyranosyl (Glc);
- Un  $\beta$ -D- Galactopyranosyl (Gal);
- Un  $\beta$ -D-Glucuronopyranosyl (A-Glc).

L'orientation  $\beta$  des protons anomériques de glucose et de galactose, sous leur forme pyranose, a été déduite de la constante de couplage relativement large des protons anomériques ( $J=6$ ) (**Tab. 47**).

**Tableau 47:** Déplacements chimiques en RMN<sup>1</sup>H (900 MHz) et RMN<sup>13</sup>C (150 MHz) des sucres des saponines de tégument oral dans le méthanol deutéré CD<sub>3</sub>OD ( $\delta$  en ppm,  $J$  en Hz).

	A-Glc		Gal		Glc	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$
1	99.4 CH	4.61	103.2 CH	4.62 d (6)	104.4 CH	4.68 d (6)
2	73.7 CH	3.73 d(1)	80.8 CH	3.81 dd (4.5, 6.7)	75.2 CH	3.21 t (8.7)
3	77.5 CH	3.80 t (8.5)	74.5 CH	3.65	78.4 CH	3.36 t (9.0)
4	71.3 CH	3.55 d (2)	69.7 CH	3.36	72.8 CH	3.02 t (9.4)
5	75.7 CH	3.70 d (2)	74.8	3.52	77.7 CH	3.41
6	175.5 C	-	60.42 CH <sub>2</sub>	3.72	73.6 CH <sub>2</sub>	4.25dd (1.4, 9.6)

### c. Détermination de l'enchaînement des sucres et leur fixation sur l'aglycone

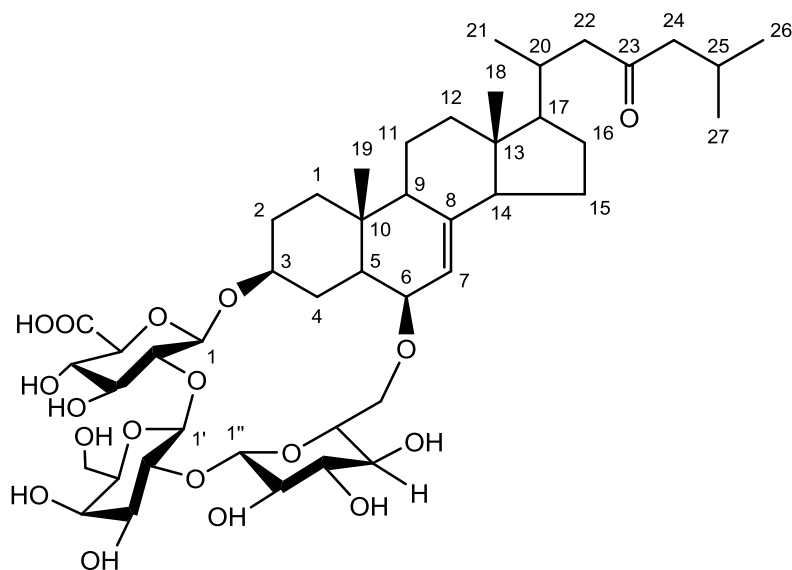
- la corrélation HMBC entre le proton à  $\delta_H$  4,61 (A-Glc H-1) et le carbone à  $\delta_C$  76,6 (Agly C-3), suggère que A-Glc est fixé sur la position 3 de la génine. Ceci est confirmé par la corrélation NOESY entre  $\delta_H$  4,61 (A-GlcI H-1) et  $\delta_H$  3,87 (Agly H-3).

- la corrélation HMBC entre le proton à  $\delta_H$  4,62 (Gal H-1) et le carbone à  $\delta_C$  73,7 (A-Glc 2), suggère que le Gal est liée à A-Glc par une liaison (1→2). Ceci est confirmé par la corrélation NOESY entre  $\delta_H$  3,73 (AGlc-H-2) et 4.62 (Gal H-1).

- Les corrélations HMBC  $\delta_H$  4,68 (Glc- H-1)/ $\delta_C$  80,8 (Gal- C-2) et NOESY  $\delta_H$  3,81 (Gal H-2)/ $\delta_H$  4,68 (Glc H-1), montrent que le galactose est lié au glucose par une liaison (1→2).

- la corrélation HMBC entre le proton à  $\delta_H$  4,23 (Glc H-6) et le carbone à  $\delta_C$  76,9 (Agly C-6), suggère que Gal est fixé sur la position 6 de la génine. Ceci est confirmé par la corrélation NOESY entre  $\delta_H$  4,23 (Gal H-6) et  $\delta_H$  3,44 (Agly H-6).

A la vue des résultats d'analyse détaillées de tous les spectres, le composé a été identifié comme étant: **3-O-[6-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1→2)-B-D-Galactopyranosyl-(1→2)- $\beta$ Dglucuronopyranosyl]- 3 $\beta$ ,6 $\beta$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -cholest-7-en-23-one (Fig. 52). Un composé déjà isolé d'*E.sepositoistus* et nommé **sepositoside A (De Simone *et al.* (1981).****



**Figure 52:** Structure établie à partir de l'extrait de tégument oral.

#### IV.2.2. Éluclation structurelle de la luzonicoside A

L'ion  $m/z$  981 qui correspond à la luzonicoside A est très intense dans l'estomac avec intensité relative de 52 % (**Fig. 42**) de ce fait les saponines d'estomac sont analysées par RMN pour valider la structure de la luzonicoside A.

##### a. Détermination de l'aglycone

Une comparaison des spectres RMN-1D et 2D de la partie aglycone du cet extrait avec l'extrait de tégument oral a montré que la totalité des signaux et des déplacements chimiques de ces deux composés sont superposables (**Tab. 48**).

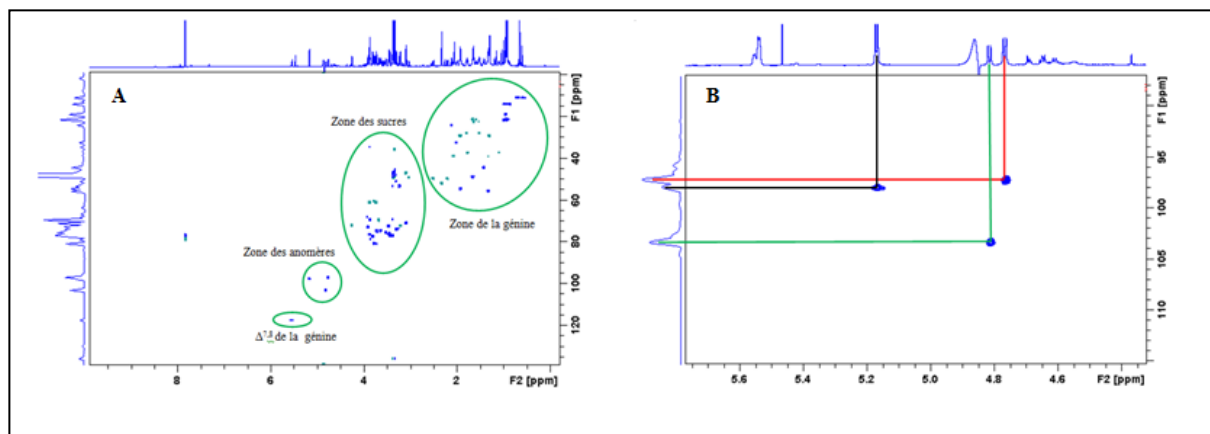
En conséquence la structure de la génine est identique à celle de la sepositoside A, elle est de type :  $3\beta,6\beta$ -hydroxy- $5\alpha$ -cholesta-7-en-23-one (**Fig. 50**).

**Tableau 48:** Valeurs des déplacements chimiques RMN-1H (900 MHz) et -13C (150 MHz) de l'extrait d'estomac dans méthanol deutéré CD3OD ( $\delta$  en ppm,  $J$  en Hz).

Génine			Sucre		
Position	$\delta_C$	$\delta_H$	Position	$\delta_C$	$\delta_H$
1	37.5 CH <sub>2</sub>	1.77		<b>Glc</b>	
		1.09	1	103.2 CH	4.81 d (8.1)
2	28.2 CH <sub>2</sub>	1.78	2	74.0 CH	3.29 dd (8.1, 9)
		1.80	3	77.1 CH	3.38 t (9)
3	76.6 CH	3.87	4	71.2 CH	t (9.7)
4	29.4 CH <sub>2</sub>	1.93	5	76.3 CH	3.08 dd (9.4, 9.1)
		1.29	6	72.3 CH <sub>2</sub>	3.45 d (9.4) 4.25 t (9.1, 9.4)
5	44.5 CH	1.42		<b>Ara</b>	
6	76.9 CH	3.44	1	97.9 CH	5.16 d (7.7)
7	117.7 CH	5.54	2	80.9 CH	3.78 dd (7.7, 9.7)
8	142 C(q)	-	3	74.7 CH	3.72 dd (9.3, 3.2)
9	49.1 CH	1.66	4	69.6 CH	3.86 dd (11.5, 3.8)
10	33.9 C (q)	-	5	61.3 CH <sub>2</sub>	3.73 dd (11.5, 4.5)
11	21.8 CH <sub>2</sub>	1.65		<b>A-Glc</b>	
12	39.1 CH <sub>2</sub>	1.58	1	97.2 CH	4.77 d (8.5)
		2.05	2	73.1 CH	3.90 t (8.5)
13	43.4 C	-	3	77.5 CH	7.80 t (8.5)
14	54.7 CH	1.92	4	72.7 CH	3.46 t (9.0)
15	21.6 CH <sub>2</sub>	1.58	5	74.7 CH	3.63 d (9.8)
		1.64	6	175.7 C	-
16	29.4 CH <sub>2</sub>	2.05			
		1.51			
17	55.6 CH	1.31			
18	11.8 CH <sub>3</sub>	0.65			
19	14.2 CH <sub>3</sub>	1.98			
20	32.7 CH	2.03			
21	19.8 CH <sub>3</sub>	0.95			
22	50.1 CH <sub>2</sub>	2.51 dd (16.4, 3.8)			
23	213.4 C	-			
24	52.0 CH <sub>2</sub>	2.31 d (7)			
25	24.3 CH	2.11			
26	21.9 CH <sub>3</sub>	0.92			
27	21.7 CH <sub>3</sub>	0.93			

**b. Détermination des sucres**

L'analyse du spectre HSQC d'extrait d'estomac a permis de distinguer trois signaux de protons anomériques sous forme de doublets résonnant à  $\delta H$  4,76 (1H,  $d$ ,  $J = 6,0$  Hz), 5,16 (1H,  $d$ ,  $J = 6,0$  Hz), 4,81 (1H,  $d$ ,  $J = 6,1$  Hz), corrélant avec les signaux de quatre carbones 97,2, 97,9 et 103,3, ce qui prouve la présence de trois sucres.



**Figure 53:** Spectre HSQC de l'extrait d'estomac, (A): spectre complet, B : Zone des anomères.

L'analyse approfondie des spectres RMN-2D a permis d'identifier la même unité trisaccharidique que celle de la luzonicoside établi par **Kicha *et al.* (2015) (Tab. 47)**. Cette unité est formée de:

- Un  $\beta$ -D-Glucopyranosyl (Glc)
- Un  $\alpha$ -L-Arabinosyl (Ara)
- Un  $\beta$ -D-Glucuronopyranosyl (A-Glc).

Dans les spectres RMN<sup>1</sup>H de ce composé, les relatives grandes valeurs des constantes de couplage  $^3J_{H-1, H-2}$  des protons anomériques  $\delta_H$  4,76 (1H, *d*,  $J = 6,0$  Hz), 5,16 (1H, *d*,  $J = 6,0$  Hz), 4,81 (1H, *d*,  $J = 6,1$ Hz) ont indiqué une orientation  $\beta$  pour l'acide glucuronique et le glucose.

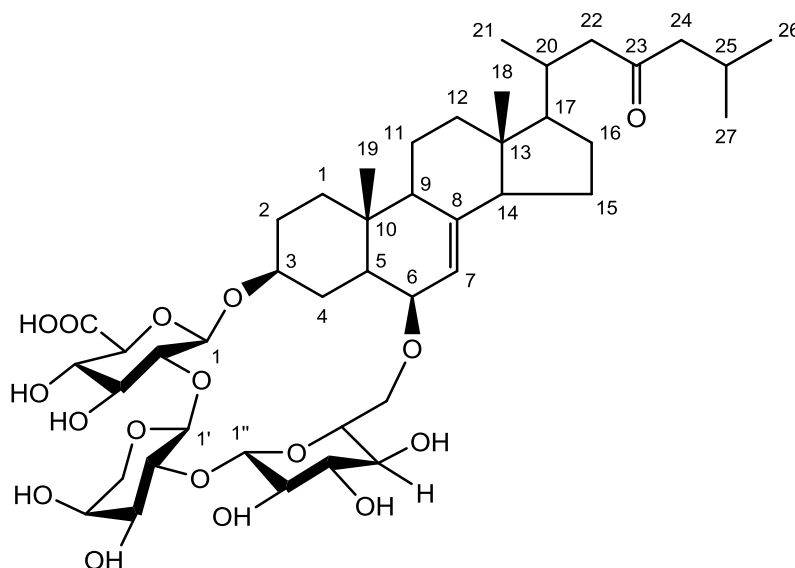
L'orientation de l'arabinose 5.16 (1H, *d*,  $J = 6.0$  Hz) est déterminé  $\alpha$  et les configurations absolues des sucres ont été déterminées D pour le glucose et L pour l'arabinose en se référant à la littérature (**Riccio *et al.*, 1982; Kicha *et al.*, 2015 et Manase *et al.*, 2014**).

### c. Détermination de l'enchaînement des sucres et leur fixation sur l'aglycone

- la corrélation HMBC entre le proton à  $\delta_H$  4,77 (A-Glc H-1) et le carbone à  $\delta_C$  76,6 (Agly C-3), ce qui suggère que A-Glc est fixé sur la position 3 de la gémine. Ceci est confirmé par la corrélation NOESY entre  $\delta_H$  4,77 (A-GlcI H-1) et  $\delta_H$  3,87 (Agly H-3).
- la corrélation HMBC entre le proton à  $\delta_H$  5,16 (Ara H-1) et le carbone à  $\delta_C$  73,1 (A-Glc 2), suggère que le Ara est liée à A-Glc par une liaison(1→2). Ceci est confirmé par la corrélation NOESY entre  $\delta_H$  3,90 (AGlc-H-2) et 5,16 (Ara H-1)

- Les corrélations HMBC  $\delta_H$  4,81 (Glc- H-1)/ $\delta_C$  80,9 (Ara- C-2) et NOESY  $\delta_H$  3,78 (Ara H-2)/ $\delta_H$  4,81 (Gal H-1), montrent que le galactose est lié à l'arabinose par une liaison (1→2).
- la corrélation HMBC entre le proton à  $\delta_H$  3,21 (Gal H-6) et le carbone à  $\delta_C$  76,9 (Agly C-6), ce qui suggère que A-Gac est fixé sur la position 6 de la génine. Ceci est confirmé par la corrélation NOESY entre  $\delta_H$  3,21 (Gal H-6) et  $\delta_H$  3,44 (Agly H-6).

L'ensemble des résultats obtenus permet d'identifier cette saponine comme étant **3-O-[6-O-( $\beta$ -D-glucoopyranosyl)-(1→2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1→2)- $\beta$ -Dglucuronopyranosyl]-3 $\beta$ ,6 $\beta$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -cholest-7-en-23-one (Fig. 54). Un composé déjà isolé d'*E. luzonicus* et nommé Luzonicoside (Ricchio *et al.*, 1982 et Kicha *et al.*, 2015), et il est mis en évidence pour la première fois chez *E. sepositus*.**



**Figure 54:** Structure établie à partir de l'extrait de l'estomac.

En conclusion, les expériences RMN-1D et RMN-2D ont permis de confirmer la structure de deux saponines (Sepositoside A et luzonicoside) déjà établie sur la base des analyses HR-ESI-SM/SM. La présence de la luzonicoside chez *E. sepositus* peut indiquer une relation chimiotaxonomique étroite entre *E. sepositus* et d'autres espèces de ce genre.

Il est important de souligner que la haute résolution dans les expériences RMN (900MHz) est de grandes utilités pour caractériser les composés majeurs dans un mélange de saponines. En effet dans un premier temps nous avons analysé les saponines de tégument oral par RMN (400MHz) mais en raison de la limite en champ et en résolution de la RMN 400MHz l'attribution du déplacement chimique s'est avérée trop délicate, surtout pour l'identification des sucres.

*Conclusion*

## Conclusion

---

Dans le cadre de ce travail, nous avons étudié les saponines et les caroténoïdes de deux étoiles de mer *E. sepositus* et *O. ophidianus* avec un accent particulier mis sur leur extraction par deux technologies, l'extraction assistée par micro-ondes (EAM) et l'extraction assistée par ultrasons.

La méthode retenue consiste, dans un premier temps, à étudier l'impact de plusieurs facteurs (la nature et la concentration de solvant, le temps, le ratio liquide-solide, la puissance des micro-ondes et le mode de pulsation des ultrasons) sur l'extraction des saponines et des caroténoïdes par micro-onde et ultrasons, et dans un deuxième temps à optimiser l'EAM et l'EAU par la méthodologie de Surface de Réponse (MSR) basée sur le plan d'expérience Box et Behnken.

L'optimisation d'EAM et d'EAU des saponines et des caroténoïdes d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus* par la méthodologie de surface réponse (MSR) a permis de modéliser les deux méthodes d'extraction par des équations polynomiales de second ordre. Les modèles polynomiaux obtenus sont hautement significatifs avec des coefficients de régression ( $R^2$ ) et des coefficients de détermination ajustée ( $R^2_{\text{ajustée}}$ ) de l'ordre <sup>de</sup> 0,99 pour les deux méthodes.

Les conclusions sur les surfaces de réponses, et les conditions optimales d'extraction des caroténoïdes et des saponines paraissent cohérentes et reproductibles en considérant les deux espèces. Ce résultat indique que les procédés optimisés sont efficaces, performants et peuvent être employés pour l'extraction des substances d'intérêt aussi bien dans les travaux de recherche que dans le domaine industriel à des fins technologiques et pharmaceutiques.

Les résultats de l'étude comparative montrent que les méthodes innovantes (MAE et UAE) améliorent le rendement, réduisent le temps d'extraction et consomment moins de solvant, et que le procédé le plus prometteur pour l'extraction des saponines et des caroténoïdes à partir des deux étoiles de mer étudiées est l'EAM. Il est possible d'extraire des quantités accrues de saponine ( $60,3 \pm 0,6$  pour *E. sepositus* et  $52,1 \pm 0,3$  pour *O. ophidianus*) et de caroténoïde ( $28,2 \pm 0,05$  pour *E. sepositus* et  $26,22 \pm 0,23$  pour *O. ophidianus*) en 3 min et 2 min respectivement. Les observations réalisées au Microscopique Électronique à Balayage suggèrent que la rupture de la paroi cellulaire est plus efficace quand la matrice animale est soumise à une extraction par micro-ondes.

## Conclusion

---

Dans les conditions optimales d'EAM les pourcentages élevés des saponines (52% d'extraits bruts) et des caroténoïdes (12% à 13 % d'extraits bruts) obtenus chez *E. sepositus* et *O. ophidianus* permettaient de répondre à l'objectif général qui était d'optimiser un procédé d'extraction tout en produisant un extrait riche en saponines et caroténoïdes à partir de faible quantité de la matière première.

Les extraits de saponines et des caroténoïdes des deux espèces semblent présenter un intérêt réel et potentiel par leurs activités antioxydantes qui ont été établies *in vitro* par des tests anti-radicalaires.

L'évaluation des propriétés antioxydantes des saponines d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus* révèle que ces saponines peuvent piéger le radical DPPH•, et elles sont très actives comme piègeurs du radical anion superoxyde(O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) électrogénéré avec des valeurs de AI50% d'ordre de 116,2±0,5 mg/g et 118,7±0,3 pour les saponines d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus*, respectivement, cette activité n'a jamais été répertoriée auparavant dans la littérature.

De plus, les saponines des deux espèces présentent à forte concentration une activité hémolytique, et à faible concentration une activité antioxydante qui empêche l'hémolyse des globules rouges induite par les radicaux hydroxyles. Ils sont aussi capables d'agir en synergie avec la vitamine E pour réduire l'hémolyse oxydative.

L'étude de l'activité antiradicalaire (test du scavenger du radical DPPH• et de scavenger de l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) des caroténoïdes en confirme la capacité antioxydante de ces composés. La capacité antioxydante vis-à-vis de radical DPPH• est similaire à celle de la vitamine C, les IC50% des caroténoïdes d'*E. sepositus* (106,0±0,1 mg.g<sup>-1</sup>), des caroténoïdes d'*O. ophidianus* (105,9±0,1mg/g) et de la vitamine C (105,8±0,3 mg.g<sup>-1</sup>) ne montre pas de différence significative.

Les teneurs élevées des saponines et des caroténoïdes chez *E. sepositus* et *O. ophidianus* ainsi que les activités antioxydantes de ces substances donnent à ces espèces un intérêt particulier.

De nombreuses analyses par spectrométrie de masse ont été effectuées sur le contenu en saponines de l'étoile de mer *E. sepositus*.

Les extraits des cinq organes et des deux sexes (mâle et femelle) collectés à différentes saisons ont été analysés en HR-ESI-MS. Les résultats obtenus attestent la présence de 9 ions saponine (*m/z* 891,4354; *m/z* 907,4298; *m/z* 909,4455; 919,4298; *m/z* 921,4455, *m/z* 935,4612; *m/z* 937,4397*m/z*; 939,4564 et *m/z* 953,3867) dont 3 ions correspond à des saponines déjà répertoriées dans la littératures (*m/z* 891,4354; *m/z* 907,4298; *m/z* 921,4455

## Conclusion

---

sont associés respectivement à la luzonicoside, la sepositoside B et la sepositoside A), et les autres présentent de nouvelles ions saponines. Par conséquent, nous avons conclu que les extraits analysés semblent comprendre un mélange particulier de saponines déjà connues et de nouvelles saponines.

Nous avons constaté aussi des différences significatives dans la répartition et l'abondance relative des ions saponines entre les organes (chaque organe semble comprendre un mélange particulier de saponines), entre le sexe et entre les saisons de prélèvement ce qui indique que la distribution qualitative et quantitative des saponines est caractérisée par des hétérogénéités inter-organes, sexuelles et saisonnières. Cependant, les composés majoritaires sont la sepositoside A et la luzonicoside car l'abondance des ions  $m/z$  921 et  $m/z$  981 qui correspond à ces saponines respectivement est relativement élevée dans les différents extraits.

Des analyses HR-ESI-MS/MS ont été effectuées, afin d'attribuer des structures aux ions saponines détectées. Les résultats obtenus ont permis d'une part, d'identifier des structures déjà décrites dans les littératures (Sepositoside A et B et luzonicoside) et déterminer certains fragments caractéristiques. Grâce aux spectres CID et aux fragments caractéristiques, six nouvelles saponines ont été identifiées chez *E. sepositus* ce qui indique que la diversité en molécules est bien supérieure à celle déterminée dans les travaux antérieurs.

D'autre part, lors des analyses par HR-ESI-MS/MS, nous avons acquis de nombreuses informations sur la structure de la partie glycone mais peu d'informations sur la partie aglycone. C'est pourquoi des analyses par RMN mono et bidimensionnelle ont été effectuées pour vérifier les structures élucidées. Les résultats obtenus ont confirmé la structure des composés majeurs (sepositoside et luzonicoside) grâce notamment à la RMN 900 MHz.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude ne constitue qu'une ébauche dans le domaine de recherche des substances actives des étoiles de mer. Ces espèces peuvent être valorisées pour leur contenu en d'autres molécules par exemple: les stérols, les quinones et anthraquinones, les alcaloïdes, les mélanines, les porphyrines. Cependant, il serait intéressant d'étayer ce travail par:

- L'étude structurale des saponines d'*O. ophidianus* (en les comparant à ce qui a été fait avec *E. sepositus*) et des caroténoïdes d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus*;
- La séparation chromatographique de différents composés de saponines d'*E. sepositus* pour valider la structure de composés mineurs et pour réaliser un screening biologique;

## Conclusion

---

- L'étude de mécanismes réactionnels entre les saponines et le radical super oxyde et hydroxyle pour expliquer l'activité anti-radicalaire de ces molécules;
- L'étude *in vivo* de l'activité anti-radicalaire pour mieux évaluer le pouvoir antioxydant des saponines et des caroténoïdes isolés;
- L'évaluation d'autres activités biologiques des saponines et des caroténoïdes notamment l'activité anti-tumorale avec des études approfondies sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamique des composés actifs pour la détermination des doses préventives et thérapeutiques;
- L'étude des relations structure-fonction afin de mieux comprendre et expliquer la variabilité inter-organe de la distribution des saponines;
- L'étude de l'aspect toxicologique des saponines isolées des astéries et la détermination de leur mode d'action sur les communautés benthiques marines qui sont des études d'actualité en écologie chimique;

# *Bibliographie*

## Bibliographie

---

**Apers S., Baronikova S., Sindambiwe J.-B., Witvrouw M., Clercq E.-D., Berghe D.-V., Marck E.-V., Vlietinck A. et Pieters L., 2001.** Antiviral, Haemolytique and molluscidal activities of triterpénoïde saponins from *Maesa lanceolata*. Establishment of structure-Activity relationships. *Planta Medica*, 67: 528–532.

**Amzal H., Alaoui K., Tok S., Errachidi A., Charof R., Cherrah Y. et Benjouad A. 2008.** Protective effect of saponins from *Argania spinosa* against free radical-induced oxidative haemolysis. *Fitoterapia*, 79(5): 337–344.

**Andersson L., Nasir A. et Bohlim L., 1987.** Studies of Swedish marine organisms, IX. Polyhydroxylated steroidal glycosides from the starfish *Porania pulvillus*. *Natural Products*, 50: 128-131.

**Allard J.-P., Royall D., Kurian, R., Muggli R. et Jeejeebhoy, K.-N., 1994.** Effects of beta-carotene supplementation on lipid peroxidation in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 59: 884–890.

**Amnisimov .M., Prokofeva N.-G., Korotkikh L.-Y. Kapustina I.-I. et Stonik A.-V., 1980.** Comparative study of cytotoxic activity of triterpène glycosids from marine organisms. *Toxicom*, 18: 221–223.

**Amorim-Carrilho K.-T., Cepeda A., Fente C. et Regal P., 2014.** Review of methods for analysis of carotenoids. *Trends in Analytical Chemistry*, 56: 49-73.

**Augier H., 2010 .** Guide des fonds marins de la méditerranée. Ecologie, flore, faune, plongées. *Ed. Delachaux et Nestlé, Neuchâtel.*

**Authi K.-S., Rao G.-H.-R., Evenden B.J. et Crawford N., 1988.** Action of goanosine 50-(Beta- thiol) diphosphate on thrombin-induced activation and calcium mobilization in saponin permeabilized and intact human platelets. *Biochemical*, 255: 885–894.

**Avula B., Wang Y.-H., Rumalla C.-S., Ali Z., Smillie T.-J. et Khan I.-A., 2011.** Analytical methods for determination of magnoflorine and saponins from roots of *Caulophyllum thalictroides* (L.) Michx. Using UPLC, HPLC and HPTLC. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 5: 895–903.

## Bibliographie

---

- Bacher A., Cazzonelli C., Cuttriss A., Fischer M., Hadher J., Li S., Noctor G., Pogson B., Rapal-Mazila M., Smith A.G., Webb M.E. et Wurtzek E.T., 2011.** Carotenoids. *Advances in Botanical Research*, 58: 1–36.
- Bährle-Rapp M., 2007.** Saponins. Springer Lexikon Kosmetik und Körperpflege. *Ed. Springer, Berlin Heidelberg.*
- Berry A., Janssens D., Hümbelin M., Jore J.-P.-M., Hoste B., Cleenwerck I., Marc Vancanneyt M., Bretzel W., Mayer A.F., Lopez-Ulibarri R., Shanmugam B., Swings J. et Pasamontes L., 2003.** *Paracoccus zeaxanthinifaciens* sp. nov., a zeaxanthin-producing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 231–238.
- Blake D. B., 1990.** Adaptive zones of the class Asteroidea (Echinodermata). *Bulletin of Marine Science*, 46(3): 701–718.
- Blanc N., Hauchard D., Audibert L. et Ar Gall E., 2011.** Radical-scavenging capacity of phenol fractions in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*: an electrochemical approach". *Talanta*, 84: 513.
- Boell E.J., 1955.** The invertebrates: Echinodermata. The Coelomate Bilateria. *Editions McGraw-Hill, New York.*
- Boumediene H. et Bouras D., 2014.** First observation of the macrozoobenthos biodiversity of Oran coastal area, Algeria. *Biodiversity and Environmental Sciences*, 5: 625–637.
- Bourvelec C., Hauchard D., Darchen A., Burgot J.-L. et Abasq, M.-L., 2008.** Validation of a new method using the reactivity of electrogenerated superoxide radical in the antioxidant capacity determination of flavonoids. *Talanta*, 75: 1098–1103.
- Boon C. S., McClements D., Weiss J. et A Decker, E., 2010 .** Factors Influencing the Chemical Stability of Carotenoids in Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(6): 515–532.
- Bozkurt H. et Icier F., 2010.** Ohmic cooking of ground beef: Effects on quality. *Journal of Food Engineering*, 96(4): 481–490.

## Bibliographie

---

- Brahmi F., Hauchard D., Guendouze N., Madani K., Kiendrebeogo M., Kamagaju L., Stevigny C., Chibane M. et Duez P., 2015.** Phenolic composition, in vitro antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species. *Industrial Crops and Products*, 74: 722–730.
- Britton G., 1995.** Structure and proprieties of carotenoids in relation to function. *FASEB Journal*, 9(15): 1551–1558.
- Britton G. et Khachik F., 2009.** Carotenoids in food. In: Britton G., Pfander H., Liaaen-Jensen S. (eds) Carotenoids. Carotenoides, Vol 5 BirkHause Basel.
- Bruneton J., 2009.** Pharmacognosie – Phytochimie, Plantes médicinales, Tec & Doc, Médicales Internationales (Eds.), 4e édition.
- Bruno I., Minale L. et Riccio R., 1990.** Starfish Saponins, Part 43. Structures of Two New Sulfated Steroidal Fucofuranosides (Imbricosides A and B) and Six New Polyhydroxysteroids from the Starfish *Dermasterias imbricate*. *Journal of Natural Products*, 53 (2): 366–374.
- Camel V., 2000.** Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 19 (4): 229–248.
- Chan S., Lee C., Yap C., Aida W. et Ho C., 2009.** Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal*, 16 (2): 203–213.
- Cardoso L.-A., Karp S.-G., Vendruscolo F., Kanno K.-Y.-F., Zoz L.-I.-C. et Carvalho J.-C., 2007.** Biotechnological Production of Carotenoids and Their Applications in Food and Pharmaceutical Products. *Carotenoids*, 8:126–141.
- Cendres A., 2011.** Procédé novateur d'extraction de jus de fruits par micro-onde: viabilité de fabrication et qualité nutritionnelle des jus. Thèse, Université D'AVIGNON, France.
- Chavan Y. et Singhal R.-S., 2013.** Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactives from arecanut (*Areca catechu L.*) and optimization study using response surface methodology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 17: 106–113.

## Bibliographie

---

- Chemat F. et Lucchesi M.-E., 2005.** Extractions assistées par micro-ondes des huiles essentielles et des extraits aromatiques. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 20: 77–99.
- Chemat F., Rombaut N., Sicaire A.-G., Alice Meullemiestre A., Anne-Sylvie Fabiano-Tixier A.-S.-F. et Abert-Vian M., 2017.** Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34: 540–560.
- Chludil H.-D., Seldes A.-M. et Maier M.-S., 2002.** Antifungal steroidal glycosides from the patagonian starfish *Anasterias minuta*: structure-activity correlations. *Journal of Natural Products*, 2: 153–157.
- Chio S., Jung S.-y., Kim H.-S., Rhim H., Kim S.-C. et Nah, S.-Y., 2001.** Effect of ginsenosides on voltage-dependent  $Ca^{2+}$  Channel subtype in bovine chromaffin cells. *Ethnopharmacologie*, 74: 75–81.
- Chwalek M., Lalun N., Bobichon H., Ple K. et Voutquenne-Nazabadioko L., 2006.** Structure–activity relationships of some hederagenin diglycosides: haemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction. *Biochemical Biophysical. Acta*, 1760: 141–1427.
- Clark A.-M. et Downey E.-M., 1992.** Starfishes of the Atlantic. *Edition Chapman and Hall*, London.
- Cognettl G. et Delavanlt P., 1960.** Recherches sur la sexualité d'*Echinaste sepositus*. *Cahiers de Biologie Marine*, 1:421–432.
- Cole B.-R., 1997.** Electrospray ionization mass spectrometry, *Edition Wiley- Blackwell*, États-Unis.
- Clark A.-M. et Rowe F.-W.-E., 1971.** Monograph of Shallow-water Indo-West Pacific Echinoderms. *Bulletin of the British Museum (Natural History)*, 238: 1–31.
- Clark A.-M. et Downey E.-M., 1992.** Starfishes of the Atlantic. *Ed. Chapman and Hall*, London.
- Czczuga B., 1983.** Caroteno-protein Complexes in Four Species of Echinodermata from the Adriatic. *Biochemical Systematics and Ecology*, 11(2):123–125.

## Bibliographie

---

- Cognetti G. et Delavanlt P., 1960.** Recherches sur la sexualité d'*Echinaste sepositus*. *Cahiers de Biologie Marine*, 1: 421–432.
- D' Auria M.-V., Minale L. et Riccio, R., 1993.** Polyoxygenated steroids of marine origin. *Chemical Reviews*, 93:1839–1895.
- Datta A.-K. et Anantheswaran R.-C., 2001.** Handbook of Microwave Technology for Food Applications. *Ed. Marcel Dekker, New York, United States*.
- De Hoffmann E. et Stroobant V., 2005 .** Spectrométrie de masse, 3e édition. *Dunod, Paris*.
- De Marino S., Iorizzi M., Palagiano E., Zollo F. et Roussakis C., 1998.** Starfish Saponins. 55. Isolation, Structure Elucidation, and Biological Activity of the Steroid Oligoglycosides from an Antarctic Starfish of the Family *Asteriidae*. *Journal of Natural Products*, 61: 11.
- Demeyer M., De Winter J., Caulier G., Eeckhaut I., Flammang P. et Gerbaux P., 2014.** Molecular diversity and body distribution of saponins in the sea star *Asterias rubens* by mass spectrometry. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 168: 1–11.
- Dong G., Xu T., Yang B., Lin X., Zhou X., Yang X. et Liu Y., 2011.** Chemical constituents and bioactivities of starfish. *Chemistry & biodiversity*, 8(5): 740–791.
- De Simone F., Dini A., Finamore E., Minale L., Pizza C., Rucci R., Riccio R. et Zollo F., 1981.** Starfish saponins. Part 5. Structure of seposituside A, a novel steroidal Glycoside from the starfish *Echinaster sepositus*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Trans, I*: 1855–1862.
- Di Pietro N. et Di Tonno P., 2016.** Pandolfi, A. Carotenoids in cardiovascular disease prevention. *JSM Atheroscler*, 1:1002.
- Dressen M., 2009.** Microwave heating in fine chemical applications: role of heterogeneity. Thesis of Eindhoven University of Technology, Netherlands.
- Duc L.-H., Fraser P.D., Tam N.-K.-M et Cutting S.-M., 2006.** Carotenoids present in halotolerant *Bacillus* spore formers. *Fems Microbiology Letters*, 255(2): 215–224.
- El-Adawi H., Abdel-Fattah Y. et El-Wahab A.-A., 2011.** Application of numerical modeling for optimization of selective hot water extraction of taxifolin from 'milk thistle' seeds. *African Journal of Biotechnology*, 10 (48): 9804–9811.

## Bibliographie

---

- Elaheh A., Mohammad N., Javad B., Kazem P. et Javad A., 2014.** Hemolytic and cytotoxic effects of saponin like compounds isolated from Persian. Gulf brittle star (*Ophiocoma erinaceus*). *Journal of Coastal Life Medicine*, 2 (10): 762–768.
- Elyakov G.-B., Levina, E.-V., Levin,-V. S. et Kapustina I.-I., 1976.** Glycosides of marine invertebrates—V. A comparative study of glycoside fractions from starfish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 55 (1): 57–60.
- Eskilsson C.-S. et Bjorklund E., 2000.** Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902: 227–250.
- Faure, H. (2006).** Les vitamines. *Cahiers de formation Biologie Medicale, Bioforma*, 38: 29–39.
- Ferreres F., Pereira D.M., Gil-Izquierdo A., Valentão P., Botelho J., Mouga T. et Andrade P.-B., 2010.** HPLC-PAD-atmospheric pressure chemical ionization-MS metabolite profiling of cytotoxic carotenoids from the echinoderm *Marthasterias glacialis* (spiny sea-star). *Journal of Separation Science*, 33: 2250–2257.
- Fei C.-Y. et Salimon J., Said M., 2010.** Optimisation of urea complexation by Box- Behnken design. *Sains Malaysia*, 39(5): 795–803.
- Foubert K., Cuyckens F., Vleeschouwer K., Theunis M., Vlietinck A., Pieters L. et Apers S., 2010.** Rapid quantification of 14 saponins of *Maesa lanceolata* by UPLC–MS/MS. *Talanta*, 81: 1258–1263.
- Friess S.-I., 1972.** Mode of action of marine saponins on neuromuscular tissues. Federation Product. *Federation American Society for experimental biology*, 31: 1146–1153.
- Galasso C., Corinaldesi C. et Sansone C., 2017.** Carotenoids from Marine Organisms: Biological Functions and Industrial Applications. *Antioxidants*, 6(4): 96.
- Ganzera M., Gampenrieder J., Pawar R.-S., Khan I.-A. et Stuppner H., 2004.** Separation of the major triterpenoid saponins in *Bacopa monnieri* by high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 516: 149–154.
- Garneau F.-X., Harvey C., Simard S.-L., Apsimon J., Burnell D. et Himmelman, J., 1989.** The distribution of asterosaponins in various body components of starfish *Leptasterias polaris*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 92: 411–416.

## Bibliographie

---

**Gao S., Qin T., Liu Z., Caceres M.-A., Ronchi C.-F., Chen C.-Y.-O. et Shang F., 2011.** Lutein and zeaxanthin supplementation reduces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in human lens epithelial cells. *Molecular Vision*, 17: 3180–3190.

**Gauthier C., Legaul J., Piochon M., Lavoie S., Tremblay S. et Pichette A., 2009.** Synthesis, cytotoxicity, and haemolytic activity of chacotrioside lupane-type neosaponins and their germanicane-type rearrangement products. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19: 2310–2314.

**Gilgan M.-W., Pike R.-K. et Apsimon J.-W., 1976.** Quantification of saponin steroid from the starfish *Asterias vulgaris*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 41(4): 561–563.

**Gonzalez S., Gilabert Y., Philips N. et Juarranz A., 2011 .** Current Trends in Photoprotection-A New Generation of Oral Photoprotectors. *Open Dermatology Journal*, 5: 6–14.

**Goupy J. et Creighton L., 2001 .** Introduction aux plans d'expériences, 3e édition Dunod, France.

**Granato D., Branco G.-F. Araújo Calado, et V.-M., 2010.** WITHDRAWN: Experimental design and application of response surface methodology for process modelling and optimization: A review. *Food Research International*, 12: 0–08.

**Grauso L., Yegdaneh A., Sharifi M., Mangoni A., Zolfaghari B. et Lanzotti, V., 2019.** Molecular networking-based analysis of cytotoxic saponins from sea cucumber *Holothuria atra*. *Marine Drugs*, 17 (2): 86.

**Grimes S., Boutiba Z., Bakalem A., Bouderbala M., Boudjellal B., Boumaza S., Boutiba M., Guedioura A., Haffessas A., Hemida F., Kaidi N., Khelifi H., Kerzabi F., Merzoug A., Nouar A. et Sellali B. (2004).** Biodiversité Marine et Littorale Algérienne. *Edt, Djazair, Alger, Sonatrach, Alger*.

**Grimas S., (2010).** Peuplements benthiques des substrats meubles de la côte algérienne. Thèse de doctorat. *Université d'Oran*.

## Bibliographie

---

**Guang C, Xiang Z., Hai-Feng T., Yun Z., Xin-Hai Z., Wei D.-C., Da-Kuan G.-O., Xiling W. et Bo-quan J., 2006.** Asterosaponin 1, a cytostatic compound from the starfish *Culcita novaeguineae*, functions by inducing apoptosis in human glioblastoma U87MG cells. *Journal of Neurooncology*, 79(3): 235–241.

**Guendouze B.-N., Madani K., Chibane M., Boulekbache M.-L., Hauchard D., Kiendrebeogo M., Stevign Y.-C., Okusa P.-N. et Duez P., 2015.** Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities of three Ericaceae from Algeria. *Industrial Crops and Products*, 70: 459–466.

**Guido J. Rio., Martin F., Stempien J.-R., Ross F., Nigrelli R.-F., George D. et Ruggieri G.-D., 1965.** Echinoderm toxins-some biochemical and physiological properties of toxins from several species of asteroidean. Osborn Laboratories of Marine Sciences, New York Aquarium, *Zoological Society*, (3): 147–155.

**Ha Y.-W., Na Y.- C., Seo, J. -J., Kim, S.-N., Linhardt R.-J. et Kim Y. S., 2006.** Qualitative and quantitative determination of ten major saponins in *Platycodi Radix* by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection and mass spectrometry. *Chromatography A*, 1135: 27–35.

**Harmelin J.- G. et Ruitton S., 2010.** The thermophilic Asteroidea *Ophidiaster ophidianus* on the NW Mediterranean coasts: evidence of frequency increase. *Scientific reports of the Port-Cros national. Park*, 24: 127–137.

**Harvey C., Garneau F.-X., Himmelman J. et 1987.** Chemodetection of predatory seaster *Leptasterias polaris* by whelk *Buccinum undatum*. *Marine Ecology Progress Series*, 40: 79–86.

**Heng M.-Y., Tan S.-N. et Hong Yong J.W., 2013.** Ong, E.S. Emerging green technologies for the chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *Trends in Analytical Chemistry*, 50: 1–10.

**Heo S.-J. et Jeon Y.-J., 2009.** Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage. *The Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 95: 101–107.

## Bibliographie

---

**Hiranvarachat B. et Devahastin S., 2014.** Enhancement of microwave-assisted extraction via intermittent radiation: Extraction of carotenoids from carrot peels. *Journal of Food Engineering*, 126: 17–26.

**Ho K.- H.-Y., Ferruzzi M.-G., Liceaga A.-M. et San Martín-González M.-F., 2015.** Microwave-assisted extraction of lycopene in tomato peels: Effect of extraction conditions on all-trans and cis-isomer yields. *Food Science and Technology*, 62: 160–168

**Hostettmann K. et Martson A., 1995 .** Chemistry & Pharmacology of Natural Products, Saponins. *Cambridge University Press*, New York.

**Hussei G., Nakamura M., Zhao Q., Iguchi T., Goto H., Sankawa U., Watanabe, H. et 2005.** Antihypertensive and neuroprotective effects of astaxanthin in experimental animals. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28: 47–52.

**Hyman L.-H., 1955.** The Invertebrates: Echinodermata. Volume IV. *Edition McGraw-Hill*, New York.

**Ikegami S. et Kamiya Y., 1972a.** Isolation and identification of spawning ovaries of the starfish, *Asterias amuren*, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 36 (6): 1078–1089.

**Ikegami S., Kamiya Y. et Tamura S., 1972b.** Isolation and characterization of spawning inhibitors in ovary of the starfish. *Astérias amurensis*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 38 (11): 2005-2011

**Ivanchina N.-V., Kicha A.-A., Kalinovsky A.-I., Dmitrenok P.-S., Stonik V.-A., Riguera, R., et Jiménez C., 2000.** Hemolytic Polar Steroidal Constituents of the Starfish *Aphelasterias japonica*. *Journal of Natural Products*, 63(8): 1178–1181.

**Ivanchina N.-V., Malyarenko T.-V., Kicha A.-A., Kalinovsky A.-I., Dmitrenok, P.-S. et Ermakova S.-P., 2011.** Structures and Cytotoxic Activities of Two New Asterosaponins. *Bioorganic Chemistry*, 37 (4): 499–506.

**Ivanchina N.-V., Kicha, A.-A., Malyarenko T.-V. et Stonik V.- A., 2017 .** Recent studies of polar steroids from starfish: structures, biological activities and biosynthesis. In: Gomes, R., Rocha-Santos, T., Duarte, A. *Advances in Natural Products Discovery*. Nova Sci., New York, NY, USA, pp. 191–224.

## Bibliographie

---

**Jaeschke D.-P., Rech, R., Marczak L.-D.-F. et Mercali G.-D., 2017.** Ultrasound as an alternative technology to extract carotenoids and lipids from *Heterochlorella luteoviridis*. *Bioresource Technology*, 224: 753–757.

**Jomova K. et Valko M., 2013 .** Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **70**: 102–110.

**Joong H., Jacqueline M.-R., Belanger J.-R., Jocelyn J.-P.-R. et Yaylayan V.-A., 2003.** Application of the microwave-assisted process (MAPTM§) to the fast extraction of ginseng saponins. *Food Research International*, 36: 491–498.

**Jorg M., Augusti., Vera K., Sven B., Andersen. et Soren B., 2011.** Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, 72:435-457.

**Jyonouchi H., Sun S., Iijima K. et Gross M.-D., 2002.** Antitumoractivity of astaxanthin and its mode of action. *Nutrition Cancer*, 36: 59–65.

**Kalinin V.-I., Prokofieva N.-G., Likhatskaya G.-N., Schentsova E.-B., Agafonova I.-G., Avilov S.-A. et Drozdova O.-A., 1996.** Hemolytic activities of triterpene glycosides from the holothurians order dendrochirotida: some trends in the evolution of this group of toxins. *Toxicol*, 34: 475–483.

**Kjartansson G.-T., Zivanovic S., Kristbergsson K. et Weiss J., 2006.** Sonication-assisted extraction of chitin from shells of fresh water prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(9): 3317–3323.

**Kisha A.-A., Ivanchina N.-V., Kalinovsky A.-I., Dmitrenok P.-S. et Stonik V.-A., 2001.** Sulfated steroid compounds from the starfish *Aphelasterias japonica* of the Kuril population. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 128: 43–52.

**Kicha A.-A., Ivanchina N.-V. , Huong T.-T.-T., Kalinovsky A.-I., Dmitrenok P.-S. et Longb P.-Q., 2010a.** Minor asterosaponin archasteroside C from the starfish *Archaster typicus*. *Russian Chemical Bulletin, International Edition*, 59(11): 2133–2136.

## Bibliographie

---

**Kicha A.-A., Ivanchina N.-V., Huong T.-T.-T., Kalinovsky A.-I., Dmitrenok P.-S., Fedorov S.-N. et Stonik V.-A., 2010.** Two new asterosaponins, archasterosides A and B, from the Vietnamese starfish *Archaster typicus* and their anticancer properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20 (12): 3826–3830.

**Kicha A.-A., Kalinovsky A.-I., Malyarenko T.-V., Ivanchina N.-V., Dmitrenok P.-S., Menchinskaya E.-S., Yurchenko E.-A., Pislyagin E.-A., Aminin D.-L., Huong T.-T.-T., Long F.-Q. et Stonik V.-K., 2015.** Cyclic steroid glycosides from the starfish *Echinaster luzonicus*: structures and immunomodulatory activities. *Journal Natural Products*, 78 (6): 1397–1405.

**Koehler R., 1969.** Faune de France échinodermes. *Edition Nendeln Ile htenstein*. Paris.

**Kornprobst J.-M., 2005.** Substances naturelles d'origine marine: chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologie. 1 Généralité. Micro-organismes. Algues. *Edition Tec & Doc Lavoisier*.

**Kotake-Nara E., Asai A. et Nagao A., 2005.** eoxanthin and fucoxanthin induce apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. *Cancer Letter*, 220: 75–84.

**Kwon J.-H., Bélanger J.-M. R., Pare J.-R.-J. et Yaylayan V.-A., 2003.** Application of the microwave-assisted process (MAP™) to the fast extraction of ginseng saponins. *Food Research International*, 36: 491–498.

**Lau A.-J., Woo S.-O. et Koh H.-L., 2003.** Analysis of saponins in raw and steamed Panax notoginseng using high-performance liquid chromatography with diode array detection. *Chromatography A*, 1011: 77–87.

**Laugier F., 2007.** Les ultrasons en procédés polyphasiques: transfert gaz-liquide et réaction liquide-liquide. Thèse de génie des procédés et de l'environnement, l'institut national polytechnique de Toulouse.

**Lee C.-C., Tsai W.-S., Hsieh H.-J. et Hwang, D.F. 2013.** Hemolytic activity of venom from crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* spines. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 19(1): 22.

**Lepoint T. et Mullie F., 1994.** What exactly is cavitation chemistry. *Ultrasonics Sonochemistry*, S13–S22.

## Bibliographie

---

- Letellier M. et Budzinski H., 1999.** Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analysis*, 27(3): 259–270.
- Lian X.-Y. et Zhang Z., 2013.** Quantitative analysis of gleditsia saponins in the fruits of *Gleditsia sinensis* Lam. by high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 75: 41–46.
- Li J., Zu Y.-G, Fu F.-J., Yang Y.-C., Li S.-M., Li Z.-N. et Wink M., 2010.** Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11: 637–643.
- Lide D.-R., 2009.** CRC Handbook of Chemistry and Physics: a Ready-Reference Book of Chemical and Physical Data, Edition. CRC Press, London.
- Machmudah S., et Goto M., 2013.** Methods for extraction and analysis of carotenoids K.G Ramawat, J.M. Mérllion (eds). Natural products. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Mah C.-L., 2003.** Astrosarkus idipi, a new Indo-Pacific genus and species of Oreasteridae (Valvatida; Asteroidea) displaying extreme skeletal reduction. *Bulletin of Marine Science*, 73(3): 685–698.
- Mah C.-L. et Blake D.-B., 2012.** Global Diversity and Phylogeny of the Asteroidea (Echinodermata). *PLoS ONE*, 7(4): e35644.
- Mah C.-L., 2000.** Preliminary phylogeny of the Forcipulatacean Asteroidea. *American Zoologist*, 40: 375381.
- Mah C.-L., 2020.** Base de données mondiale sur les astéroïdes. Consulté sur <http://www.marinespecies.org/asteroidea> le 2020-10-19.
- Mackie A.-M., Lasker R. et Grant P.-T., 1968.** Avoidance reactions of mollusc *Buccinum undatum* to saponin-like surface-active substances in extracts of the starfish *Astérias rubens* and *Martasterias glacialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 26: 415–428.
- Mackie A.-M. et Turner A.-B., 1970.** Partial characterization of biologically active steroid glycoside isolated from the starfish *Marthasterias glacialis*. *Biochemical*, 117: 543–550.

## Bibliographie

---

**Mackie A.-M., Singh H.-T. et Fletcher T.-C., 1975.** Studies on the Cytolytic effects of seastar (*Martastérias glacialis*) Saponins and Synthétic Surfactants in the plaice *Pleuronectes platessa*. *Marine biology*, 29: 307–314.

**Mackie A.-M., Singh H. et Owen J., 1977.** Studies on the distribution, biosynthesis and function of steroidal saponins in echinoderms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 56: 9–14.

**Maier M., 2008.** Biological activities of sulfated glycosides from echinoderms. *Studies natural products chemistry*, 35: 311–354.

**Malyarenko T.-V., Kicha A.-A., Ivanchina N.-V., Kalinovsky A.-I., Popov R.-S., Vischuk O. et Stonik., 2014.** Asterosaponins from the Far Eastern starfish *Leptasterias ochotensis* and their anticancer activity. *Steroids*, 87: 119–127.

**Malyarenko T.-V., Kicha A.-A., Ivanchina N.-V., Kalinovsky A.-I., Dmitrenok, P.-S. et Stonik V.-A., 2016.** Unusual steroid constituents from the tropical starfish *leiaSTER sp.* *Natural Product Communications*, 11 (9): 1251–1252.

**Mandal V., Mohan Y. et Hemalatha S., 2007.** Microwave assisted extraction – an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1): 7 –18.

**Maoka T., 2011.** Carotenoids in Marine Animals. *Marin Drugs*, 9: 278–293.

**Marsh A.-G., Watts S.-A., Chen C.-P. et McClintock J.B., 1985.** The effect of high salinity on development, mortality and ray number of *Echinaster sepositus* (echinodermata: asteroidea) at different developmental stages. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 83: 229–231.

**Matsumoto M., Hosokawa M., Matsukawa N., Hagio M., Shinoki A., Nishimukai M. et Hara H., 2010.** Suppressive effects of the marine carotenoids, fucoxanthin and fucoxanthinol on triglyceride absorption in lymph duct-cannulated rats. *European Journal of Nutrition*, 49: 243–249.

**Mason T., Paniwnyk L. et Lorimer J.-P., 1996.** The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3: 253–260.

## Bibliographie

---

- Massiot G. et Lavaud C., 1995.** Structural elucidation of saponins, Atta-Ur- Rahman (Eds.), Structure and chemistry (Part 3): Studies in natural products chemistry, *Elsevier*, Amsterdam.
- Merzoug F., Nouar A. et Sellali B., 2004.** Biodiversité Marine et Littorale Algérienne. Edition, *Djazair, Alger, Sonatrach*, Alger.
- Minale L., Ruccio R., De Simone F., Dini A., Pizza C. et Ramundo., 1978.** Starfish saponins I.  $3\beta$ -HYDROXY-5- $\alpha$ -CHOLESTA-8, 14-DIEN-23-ONE, the major genin from STARFISH *Echinaster sepositus*. *Tetrahedron letters*, 29: 2609–2612.
- Minale L., Ruccio R., Dini A. et Pizza C., 1979.** Starfish saponins II. 22,23-EPOXYSTERIODS, Minor genins from the starfish *Echinaster sepositus*. *Tetrahedron letters*, 20: 645–684.
- Minale L., Pizza C., Ruccio R. et Zolla F., 1982.** Stéroidal Glycoside from starfishes. *Pure and Applied Chemistry*, 54: 1935–1950.
- Minale L., Riccio R. et Zollo F., 1993.** Steroidal oligoglycosides and polyhydroxysteroids from echinoderms. In: Herz, W., Kirby, G.W., Moore, R.E., Steglich, W., Tamm, C. (Eds.), Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, vol. 62. Springer, Vienna, pp. 75–308.
- Moreton B., 2012.** Foregut anatomy and predation by *Charonia lampas* (Gastropoda: Prosobranchia: Neotaenioglossa) attacking *Ophidiaster ophidianus* (Asteroidea: Ophidiasteridae) in the Açores, with a review of triton feeding behaviour. *Journal of Natural History*, 46 (41- 42): 2621–2637.
- Naruse M., Suetomo H., Matsubara T., Sato T., Yanagawa H., Hoshi M., Matsumoto. et M., 2010.** Acrosome reaction-related steroidal saponin, Co-ARIS, from the starfish induces structural changes in microdomains. *Developmental Biology*, 20: 1–7.
- Nigrelli R.F., Stempien M.F., Ruggieri G.D., Liguori V.R. et Cecil J.T., 1967.** Substances of potential biomedical importance from marine organisms. *American Society for experimental biology*, 26:1197.
- Nobuhiro F., Yuko K., Kanhisa. et H., 1984.** Biological activity of asterosaponins with special reference to structure- activity relationships. *Natural Products*, 47: 997–1002.

## Bibliographie

---

**Okano K. et Ikegami S., 1981.** Separation of Ovarian Asterosaponins in the Starfish *Asterias amurensis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45 (3): 801–803.

**Owells R. J., Owells R. G., Gorog M. A. et Klein, D., 1973.** Cytolytic saponin fraction from *Asterias vulgaris*. *Toxicon*, 11 (4): 319–323.

**Palagiano E., Zollo F., Minale L., Gomez Paloma L., Iorizzi M., Bryan P., McClintock J., Hopkins T., Riou D. et Roussakis C., 1995.** Downeyosides A and B, two new sulfated steroid glucuronides from the starfish *Henricia downeyae*. *Tetrahedron*, 51 (45): 12293–12300.

**Palagiano E., Zollo F., Minale L., Iorizzi M., Bryan P., McClintock J. et Hopkins T., 1996.** Isolation of 20 glycosides from the starfish *Henricia downeyae*, collected in the Gulf of Mexico. *Journal of Natural Products*, 59: 348–354.

**Palozza P., Maggiano N., Calviello G., Lanza P., Piccioni E., Ranelletti F.O. et Bartoli G.M., 1998.** Canthaxanthin induces apoptosis in human cancer cell lines. *Carcinogenesis*, 19: 373–376.

**Paré J.-R.-J., Sigouin M. et Lapointe J., 1990.** Extraction de produits naturels assistée par micro-ondes. *Brevet européen*, EP 398798.

**Pasquet V., Chérouvrier J. R., Farhat F., Thiéry V., Piot J.-M., Bézar J.-B. et Picot, L., 2011.** Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process Biochemistry*, 46(1): 59–67.

**Perez-Galvez A. et Minguez-Mosquera M.-I., 2001.** Structure-reactivity relationship in the oxidation of carotenoid pigments of the pepper (*Capsicum annuum L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (10): 4864–4869.

**Pérès J.-M. et Picard J., 1964.** Nouveau manuel de bionomie benthique de la mer Méditerranée. *Recueil des Travaux de la Stations Marine d'Endoume*, 31(47): 1–137.

**Pétrier C., Gondrexon N. et Boldo P., 2008.** Ultrasons et sonochimie. *Techniques de l'ingénieur*, AF6310: 1–14.

**Philip S. et Christina A., 2000.** Organic chemistry. California: Prentice Hall.

## Bibliographie

---

**Plock A., Sokolowska-Kahler W. et Presber W., 2001.** Application of flow cytometry and microscopic methods to characterize the effect of herbal drugs on *leishmania spp.* *Experimental Parasitology*, 97: 141–153.

**Popov R.S., Ivanchina N.V., Kalinovsky A.I., Kharchenko S-D., Kicha A.-A., Malyarenko T.-V., Ermakova S.-P. et Dmitrenok P.-S., 2016.** Aphelasteroside F, a new asterosaponin from the Far Eastern starfish *Aphelasterias japonica*. *Natural Product Communications*, (11): 1247–1250.

**Prokof'eva N.G., Chaikina E.L., Kicha A.A. et Ivanchina N.-V., 2003.** Biological activities of steroid glycosides from starfish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 134: 695–701.

**Pasquet V., Chérouvrier J.-R., Farhat F., Thiéry V., Piot J.-M., Bézar J.-B. et Picot, L., 2011.** Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process Biochemistry*, 46(1): 59–67.

**Prior R.-L., Wu X. et Schaich K., 2005.** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290–4302.

**Rahman M., et Lamsal B.-P., 2021.** Ultrasound-assisted extraction and modification of plant-based proteins: Impact on physicochemical, functional, and nutritional properties. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, 20:1457–1480.

**René A., Abasq M. L., Hauchard D. et Hapiot P., 2010.** How do phenolic compounds react toward superoxide? A simple electrochemical method for evaluating antioxidant capacity. *Analytical Chemistry*, 82: 8703–8710.

**Riccio R., De Simone F., Dini A., Minale L., Pizza C., Senatore F. et Zollo F., 1981.** Starfish saponins VI-unique .22, 23-epoxysteroids, cyclic glycoside, minor constituents from *Echinaster sepositus*. *Tetrahedron Letter*, 22 (16): 1557–1560.

**Riccio R., Dini A., Minale L., Pizza C., Zollo F. et Sevenet T., 1982.** Starfish saponins VII. Structure of luzoncoside, a further steroidal cyclic glycoside from the pacific starfish *Echinaster luzonicus*. *Experientia*, 38: 68–70.

## Bibliographie

---

**Riccio R., Pizza C., Squillace-Greco O. et L. Minale., 1985.** Starfish Saponins. Part 17. Steroidal Glycoside Sulphates from the Starfish *Ophidiaster ophidianus* (Lamarck) and *Hacelia attenuata* (Gray). *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 1: 655.

**Riesgo A., Villamor A. et Becerr M., 2011.** Ultrastructure of the gametogenesis of the common Mediterranean starfish, *Echinaster (Echinaster) sepositus*. *Invertebrate Reproduction & Development*, 55: 138–151.

**Rivera S. et Canela R., 2012.** Influence of Sample Processing on the Analysis of Carotenoids in Maize. *Molecules*, 17(9), 11255–11268.

**Rochebrochard A.-S., De L., Blais J.-F. et Naffrechoux E., 2010.** Comparison of characterization methods in high frequency sonochemical reactors of differing configurations. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(3): 547–554.

**Rodriguez-Amaya D.-B., 2001.** A guide to carotenoid analysis in food (1st ed). Washington: International Life Science Institute Press.

**Rodriguez-Amaya D.-B et Kimura M., 2004.** HarvestPlus handbook for carotenoids analysis. HarvestPlus technical monograph 2. Washington, DC and Cali : International Food Policy Research Institut (IFPRI) and International Center for Tropical Agriculture (CIAT).

**Rokkaku T., Kimura R., Ishikawa C., Yasumoto T., Senba M., Kanaya F. et Mori N., 2013.** Anticancer effects of marine carotenoids, fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, on osteosarcoma. *Journal of Oncology*, 43:1176–1186.

**Roussy, G. et Pearce, J.A., 1995.** Foundations and Industrial Applications of Microwave and Radio Frequency Fields. Physical and Chemical Processes, John Wiley & Sons, Chichester.

**Sanchez-Moreno C., 2002.** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology*, 8: 121–137.

**Sandvoss M., Huong Pham L., Levsen K. et Preiss A., 2000.** Isolation and structural elucidation of steroid oligoglycosides from the starfish *Asterias rubens* by means of direct online LC-NMR-MS Hyphenation and One- and Two-Dimensional NMR investigations. *European Journal Organic Chemistry*, 31 (23): 1253–1262.

## Bibliographie

---

**Sandvoss M., Weltring A., Preiss A., Levsen K. et Wuensch G., 2001.** Combination MSPD and LCNMR- MS as a new efficient approach for rapid screening of natural products: Application to the total asterosaponin fraction of the starfish *Asterias rubens*. *Chromatography A*, 917: 75–86.

**Sandvoss M., Preiss A., Levsen K. et Weisemann R., 2003.** Two new asterosaponins from the starfish *Asterias rubens*: application of a cryogenic NMR probe head. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 41: 949–954.

**Serpone N. et Colarusso P., 1994.** *Sonochemistry* I. Effects of ultrasounds on heterogeneous chemical reactions – a useful tool to generate radicals and to examine reaction mechanisms. *Research on Chemical Intermediates*, 20(6): 635–679.

**Sharoni Y., Agemy L., Giat U., Kirilov E., Danilenko M. et Levy J., 2002.** Lycopene and astaxanthin inhibit human prostate cancer cell proliferation induced by androgens. In Proceedings of the 13th International Symposium on Carotenoids, Honolulu, HI, USA, 6–11 January.

**Shklar G. et Schwartz J., 1988.** Tumor necrosis factor in experimental cancer regression with alphatocopherol, beta-carotene, canthaxanthin and algae extract. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 24: 839–850.

**Shi J., Le Maguer M., Bryan M. et Kakuda Y., 2003.** Kinetics of lycopene degradation in tomato puree by heat and light irradiation. *Journal of Food Process Engineering*, 25 (6): 485–498.

**Singh D., Barrow C.-J., Mathur A.-S., Tuli D.-K. et Puri, M., 2015.** Optimization of zeaxanthin and  $\beta$ -carotene extraction from *Chlorella saccharophila* isolated from New Zealand marine waters. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(2): 166–173.

**Spar Eskilsson, S. et Bjorklund E., 2000.** Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902: 227–250.

**Sparg S.-G., Light M.-E., Staden J. et Van J., 2004.** Biological activities and distribution of plant saponins. *Ethnopharmacology*, 94: 219–243.

**Stahl W. et Sies H., 2012.** Carotene and other carotenoids in protection from sunlight. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 96: 1179S–1184S.

## Bibliographie

---

- Stonik V., Kalinin V. et Avilov S., 1999.** Toxins from sea cucumbers (holothuroids): chemical structures, properties, taxonomic distribution, biosynthesis and evolution. *Natural Toxins*, 8(2): 235-247.
- Suslick K.-S., 1989.** The chemical effects of ultrasound. *Scientific American*, 260: 80–86.
- Suguna A., Bragadeeswaran S., Natarajan E. et Mohanra M., 2014.** Studies on antioxidant properties of starfish *Luidia maculata* (Muller & Troschel, 1842) off Parangipettai, Southeast coast of India. *Journal of Coast Life Medicine*, 2(6): 466-470.
- Schoepke T., Hiller K., Wray V. et Nimtz M., 1996.** Application of MSMS for the rapid, comparative analysis of saponin mixtures as exemplified by the deacylated and partially deacylated triterpenoid saponins of *Bellis annua*. *Planta Medica*, 62 (4):336–340.
- Sillanpää M., 2011.** Ultrasound Technology in Green Chemistry. *SpringerBriefs in Molecular Science*.
- Tang H.-F., Yi Y.-H., Li L., Sun P., Zhang S.-Q., et Zhao Y.-P., 2005.** Bioactive asterosaponins from the starfish *Culcita novaeguineae*. *Natural products*, 68: 337–34.
- Tang H.-F., Yi Y.-H., Li L., Sun P., Zhang S.-Q. et Zhao Y.-P., 2006.** Asterosaponins from the starfish *Culcita novaeguineae* and their bioactivities. *Fitoterapia*, 77(1): 28–34.
- Thao N.-P., Cuong N.-X., Luyen B.-T. -T., Thanh N.-V., Nhiem N.-X., Koh Y.-S. et Kim Y.-H., 2013.** Anti-inflammatory Asterosaponins from the Starfish *Astropecten monacanthus*. *Journal of Natural Products*, 76 (9): 1764–1770
- Thomas G.-E. et Gruffydd L.-L.-D., 1971.** The types of escape reactions elicited in the scallop *Pecten maximus* by selected sea-star species. *Marine Biology*, 10: 87–93.
- Thompson J.-E., Walker R.-P., Faulkner D.-J., 1985.** Screening and bioassays for biologically-active substances from forty marine sponge species from San Diego, California, USA. *Marine Biology*, 88:11–21.
- Tyssandier V., Reboul E., Dumas J.-F., Bougteloup-Demange C, Armand M., Marcand J., Sallas M. et Borel P., 2003.** Processing of vegetable-borne carotenoids in the human stomach and duodenum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 284: G913–G923.

## Bibliographie

---

**Tsushima M. et Matsuno T., 1990.** Comparative biochemical studies of carotenoids in sea-urchins-I. *Comp. Biochem. Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 96: 801–810.

**Tang H F., Cheng G., Wu J., Chen X.-L Zhang S.-Y., Wen A.-D. et Lin H.-W., 2009.** Cytotoxic asterosaponins capable of promoting polymerization of tubulin from the starfish *Calcita novaeguineae*. *Journal of Natural Product*, 72: 284–289.

**Tinsson W., 2010.** *Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques* (Vol. 67), Springer Science & Business Media.

**Van Dyck S., Gerbaux P. et Flammang P., 2009.** Elucidation of molecular diversity and body distribution of saponins in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata) by mass spectrometry. *Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 152: 124–134.

**Van Dyck S., Gerbaux P. et Flammang P., 2010a.** Qualitative and quantitative saponin contents in five sea cucumbers from the Indian Ocean. *Marine Drugs*, 8: 173–189.

**Van Dyck S., Flammang P., Meriaux C., Bonnel D., Salzet M., Fournier I. et Wisztorski M., 2010b.** Localization of secondary metabolites in marine invertebrates: contribution of MALDI MSI for the study of saponins in cuvierian tubules of *H. forskali*. *PLOS One*, 5 (11): e13923.

**Vilkhu K., Mawson R., Simons et L., Bates D., 2008.** Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9:161–169.

**Vinatoru M., 2001.** An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8: 303–313.

**Voogt P.A. et Huiskamp R., 1979.** Sex –dependence and seasonal variation of saponins in the gonads of star-fish: their relation to reproduction. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 62: 1049–1055.

## Bibliographie

---

- Voogt P. A. et Rheenen A.-V., 1982.** Carbohydrate content and composition of asterosaponins from different organs of the sea star *Astérias rubens*: relation to their haemolytic activity and implications for their biosynthesis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **72**:683–688.
- Voogt P.A. et Groot B. F., 1983.** Stimulation of germinal vesicle breakdown in zebrafish oocytes by ovarian asterosaponins from the sea star *Astérias rubens*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **74**: 419–429.
- Voutquenne L., Lavaud C., Massiot G. et le Men-Olivier L., 2002.** Structure-activity relationships of haemolytic saponins. *Pharmaceutical Biology*, **40**: 253–262.
- Wang J.-Y. Lee Y.-J. Chou, M.-C. Chang R., Chiu C.-H., Liang Y.-J. et Wu L.-S., 2015.** Astaxanthin Protects Steroidogenesis from Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in Mouse Leydig Cells. *Marine Drugs*, **13**: 1375–1388.
- Wu T., Guo N., Teh CY., et Hay J.-X.-W., 2013.** Theory and Fundamentals of Ultrasound. *Advances in Ultrasound Technology for Environmental Remediation*: Springer.
- WoRMS., 2020.** World register of marine species. Consulté sur <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=123080> le 2020-10-19.
- Xia J., Miao Z., Xie C., Zhang J., et Yang X., 2020.** Chemical Constituents and Bioactivities of Starfishes: An Update. *Chemistry & Biodiversity*, **17**: e1900638.
- Yamanouchi T., 1955. On the poisonous substance contained in holothurians. *Seto Marine Biological Laboratory*, **4**:183–203.
- Yasumoto T., Tanaka M. et Hashimoto Y., 1966.** Distribution of saponin in echinoderms. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, **32**: 673–676.
- Yoshida H., Yanai H., Ito K., Tomono Y., Koikeda T., Tsukahara H. et Tada N., 2010.** Administration of natural astaxanthin increases serum HDL-cholesterol and adiponectin in subjects with mild hyperlipidemia. *Atherosclerosis*, **209**: 520–523.
- Yue X., Xu Z., Prinyawiwatkul W., et King J.-M., 2006.** Improving Extraction of Lutein from Egg Yolk Using an Ultrasound-Assisted Solvent Method. *Journal of Food Science*, **71**(4): C239–C241.

## Bibliographie

---

**Zang L.-Y, Sommerburg O. et Van Kuijk F.-J.-G.-M., 1997.** Absorbance Changes Of Carotenoids In Different Solvents. *Free Radical Biology & Medicine*, 23:1086–1089.

**Zhang T., Liu H., Liu X.-T., Xu De R., Chen X.-Q. et Wang, Q., 2010.** Qualitative and quantitative analysis of steroidal saponins in crude extracts from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and *P. polyphylla* var. *chinensis* by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51:114–124.

**Zhang W. et Wang J., 2013.** The antioxidant activities and neuroprotective effect of polysaccharides from the starfish *Asterias rollestoni*. *Carbohydrate polymers*, 95(1): 9–15.

**Zhuoyan H., Ming C. et Han-Hua L., 2008.** Desirability function approach for the optimization of microwave-assisted extraction of saikosaponins from *Radix Bupleuri*. *Separation and Purification Technology*, 61: 266–275.

**Ziemski F. et André F., 2017.** *Ophidiaster ophidianus* (Lamarck, 1816). Etoile de mer violette. in DORIS, Données d'Observations pour la reconnaissance et l'Identification de la faune et de la flore Subaquatique. CNEBS-FFESSM. Fiche publiée le 17/04/2008 ; Dernière modification 21/03/2017: [http://doris.ffessm.fr/fiche2.asp?fiche\\_numero=670](http://doris.ffessm.fr/fiche2.asp?fiche_numero=670), Consulté le 21/03/2017.

*Annexe*

## Liste des tableaux

### Titres

---

**Tableau 1 :** Diversité taxonomique et répartition de la diversité des asteroidea. n: nombre; " " entre guillemets: les groupes qui n'étaient pas acceptés comme monophylétiques; le caractère gras indique des groupes avec un grand nombre de taxons; \*: indique les groupes qu'ont des membres dans les eaux profondes.

**Tableau 2:** Valeurs expérimentales et prédites de la teneur des caroténoïdes en (mg.g<sup>-1</sup>) d'*E.sepositus* et d'*O.ophidianus* obtenus par l'EAM dans le cadre de plan d'expérience.

**Tableau 3:** Valeurs expérimentales et prédites de la teneur des caroténoïdes (mg/g) d'*E.sepositus* et d'*O. ophidianus* obtenue par l'EAU dans le cadre de plan d'expérience.

**Tableau 4:** Analyse de la variance (ANOVA) relative à la variabilité sexuelle de la teneur des saponines d'*E. sepositus*. Pour chaque saison et chaque orange, les mêmes lettres dans la même ligne signifient qu'il n'y a pas de différence significative dans la teneur des saponines au seuil de signification.

**Tableau 5:** Analyse de la variance (ANOVA) relative à la variabilité saisonnière de la teneur des saponines d'*E. sepositus*. Pour chaque sexe et chaque organe, les mêmes lettres dans la même ligne signifient qu'il n'y a pas de différence significative dans la teneur des saponines au seuil de signification.

Annexe

**Tableau 1:** Diversité taxonomique et répartition de la diversité des asteroidea. n: nombre; " " entre guillemets: les groupes qui n'étaient pas acceptés comme monophylétiques; le caractère gras indique des groupes avec un grand nombre de taxons; \*: indique les groupes qu'ont des membres dans les eaux profondes.

Super-ordre	Ordre	Famille	n Genre	n Espèce	Répartition géographique
Forcipulatacea	Forcipulatida	<b>Asteriidae*</b>	<b>35</b>	<b>178</b>	En l'occurrence des régions tempérées, froides et tropicales.
		Heliasteridae	2	9	En l'occurrence des régions tempérées, froides et tropicales.
		Stichasteridae	9	28	En l'occurrence des eaux tempérées et froides
		"Pedicellasteridae"	7	32	Exclusive des régions froides (eau profonde >200 m).
		Zoroasteridae	7	36	Exclusive des régions froides (eau profonde >200 m).
		<i>Total Forcipulatida</i>	60	283	
	Brisingida	Brisingidae	10	63	Exclusive des régions froides (eau profonde >200 m).
		Freyellidae	7	47	Exclusive des régions froides (eau profonde >200 m).
		<i>Total Brisingida</i>	17	110	
		<b>Totale Forcipulatacea</b>	<b>77</b>	<b>393</b>	
	Spinulosida	Echinasteridae*	8	133	En l'occurrence des régions tempérées, froides et tropicales.
		<i>Total Spinulosida</i>	8	133	
Valvatacea		<b>Poraniidae*</b>	<b>7</b>	<b>22</b>	des régions froides
Valvatacea	Valvatida	Acanthasteridae	1	2	Exclusive des eaux tropicales peu profondes
		Archasteridae	1	3	Exclusive des eaux tropicales peu profondes
		<b>"Asterinidae"*</b>	<b>25</b>	<b>147</b>	En l'occurrence des régions tempérées, froides et tropicales.
		Asterodiscididae	4	20	Majoritaire des eaux tropicales, avec des membres minoritaires des eaux froides
		Asteropseidae	5	6	Majoritaire des eaux tropicales, avec des membres minoritaires des eaux froides
		Chaetasteridae*	1	4	En l'occurrence des eaux tempérées et froides
		Ganeriidae*	9	21	des régions froides
		<b>Goniasteridae*</b>	<b>65</b>	<b>256</b>	Majoritaire des eaux froides avec des membres minoritaires des eaux tropicales peu profonde et des eaux tempérée.
		Leilasteridae	2	4	Exclusive des régions froides (eau profonde >200 m).
		Mithrodiidae	2	7	Exclusive des eaux tropicales peu profondes
		Odontasteridae*	6	28	des régions froides
		<b>Ophidiasteridae*</b>	<b>27</b>	<b>106</b>	Majoritaire des eaux tropicales, avec des membres minoritaires des eaux froides
		<b>Oreasteridae</b>	<b>20</b>	<b>74</b>	Majoritaire des eaux tropicales, avec des membres minoritaires des eaux froides
		Podospherasteridae	1	6	Exclusive des régions froides (eau profonde >200 m).
		Solasteridae*	9	51	Majoritaire des eaux froides avec des membres minoritaires des eaux tropicales peu profonde et des eaux tempérée.
		Caymanostellidae	2	6	Exclusive des régions froides (eau profonde >200 m).
		<i>Total Valvatida</i>	187	763	
	Paxillosida	<b>Astropectinidae*</b>	<b>26</b>	<b>243</b>	Majoritaire des eaux froides avec des membres minoritaires des eaux tropicales peu profonde et des eaux tempérée.
		Benthopectinidae	8	69	Exclusive des régions froides (eau profonde >200 m).
		Ctenodiscidae	1	5	Exclusive des régions froides (eau profonde >200 m).
		Goniopectinidae	3	10	Exclusive des régions froides (eau profonde >200 m).
		Luidiidae	1	49	En l'occurrence des régions tempérées, froides et tropicales.

**Tableau 1(suite):** Diversité taxonomique et répartition de la diversité des asteroidea. n: nombre; " " entre guillemets: les groupes qui n'étaient pas acceptés comme monophylétiques; le caractère gras indique des groupes avec un grand nombre de taxons; \*: indique les groupes qu'ont des membres dans les eaux profondes.

Super-ordre	Ordre	Famille	n Genre	n Espèce	Répartition géographique
		Porcellanasteridae	12	30	Exclusive des régions froides (eau profonde >200 m).
		Radiasteridae	1	5	Exclusive des régions froides (eau profonde >200 m).
		Pseudarchasteridae*	4	29	des régions froides
		<i>Total Paxillosida</i>	56	439	
		<i>Total Valvatacea</i>	243	1224	
	Velatida	Korethrasteridae	3	7	Exclusive des régions froides (eau profonde >200 m).
		Myxasteridae	<b>3</b>	<b>9</b>	Exclusive des régions froides (eau profonde >200 m).
		<b>Pterasteridae*</b>	<b>8</b>	<b>116</b>	Majoritaire des eaux froides avec des membres minoritaires des eaux tropicales peux profonde et des eaux tempérée.
	Concentricycloidea	Xyloplacidae	1	3	Exclusive des régions froides (eau profonde >200 m).
		<i>Total</i>	343	1890	

Annexe

**Tableau 2:** Valeurs expérimentales et prédites de la teneur des caroténoïdes en (mg.g<sup>-1</sup>) d'*E.sepositus* et d'*O.ophidianus* obtenus par l'EAM dans le cadre de plan d'expérience.

	Variables indépendantes				Caroténoïdes (mg/g) d' <i>E.sepositus</i>		Caroténoïdes (mg/g) d' <i>O.ophidianus</i>	
	<u>MeOH</u> (%)	<u>Temps</u> min	<u>Puissance</u> (W)	<u>Ratio</u> g/ml	<u>Valeur*</u> <u>Expérimentale</u>	<u>Valeur</u> <u>Prédite</u>	<u>Valeur*</u> <u>Expérimentale</u>	<u>Valeur</u> <u>Prédite</u>
1	30	1	200	35	0,09± 0.01	0,13	0,04±0.00	0,10
2	70	1	200	35	10,18±0.02	10,19	9,14±0.14	9,09
3	30	5	200	35	2,46±0.00	2,49	1,94±0.06	1,87
4	70	5	200	35	7,15±0.02	7,16	6,34±0.01	6,36
5	50	3	100	20	18,29±0.00	18,32	16,88±0.05	16,92
6	50	3	300	20	17,14±0.00	17,08	15,98±0.75	15,76
7	50	3	100	50	7,39±0.36	7,48	6,58±0.16	6,67
8	50	3	300	50	6,99±0.04	7,00	6,47±0.02	6,31
9	30	3	200	20	10,03±0.05	10,03	8,99±0.07	9,13
10	70	3	200	20	21,22±0.00	21,23	19,50±0.05	19,54
11	30	3	200	50	3,44±0.04	3,40	2,83±0.10	2,84
12	70	3	200	50	6,96±0.00	6,94	6,20±0.02	6,11
13	50	1	100	35	6,68±0.03	6,66	6,16±0.09	6,15
14	50	5	100	35	8,35±0.00	8,32	7,31±0.11	7,25
15	50	1	300	35	7,79±0.05	7,80	6,75±0.07	6,86
16	50	5	300	35	5,46±0.00	5,46	4,94±0.06	5,01
17	30	3	100	35	1,46±0.03	1,43	0,94±0.02	0,91
18	70	3	100	35	16,97±0.00	16,94	15,41±0.17	15,38
19	30	3	300	35	8,70±0.07	8,72	7,66±0.05	7,77
20	70	3	300	35	7,92±0.02	7,94	6,88±0.14	6,99
21	50	1	200	20	14,10±0.03	14,10	13,06±0.08	13,08
22	50	5	200	20	13,74±0.00	13,76	12,70±0.11	12,70
23	50	1	200	50	3,66±0.00	3,64	3,14±0.06	3,22
24	50	5	200	50	3,31±0.02	3,30	2,79±0.08	2,85
25	50	3	200	35	4,09±0.00	4,12	3,57±0.06	3,60
26	50	3	200	35	4,13±0.06	4,12	3,61±0.11	3,60
27	50	3	200	35	4,14±0.00	4,12	3,62±0.06	3,60

X1: méthanol %; X2: temps (minutes); X3: puissance (X); ratio liquide solide (mL/g); Sap: saponines.

\*valeur moyenne et écart type pour n=3.

**Tableau 3:** Valeurs expérimentales et prédites de la teneur des caroténoïdes (mg/g) d'*E. sepositus* et d'*O. ophidianus* obtenue par l'EAU dans le cadre de plan d'expérience.

	Variables indépendantes			Saponine mg/g <i>E. sepositus</i>		Saponine mg/g <i>O. ophidianus</i>	
	concentration de MeOH (v/v)	Temps min	Ratio g/ml	Valeur Expérimentale	Valeur Prédite	Valeur Expérimentale	Valeur Prédite
1	30	10	35	2,97±0.01	3,05	0,84±0.00	0,81
2	70	10	35	8,81±0.01	8,88	6,46±0.01	6,42
3	30	30	35	5,02±0.01	5,02	3,39±0.01	3,37
4	70	30	35	5,26±0.02	5,26	3,41±0.00	3,38
5	30	20	20	1,22±0.00	1,26	0,34±0.00	0,37
6	70	20	20	5,24±0.02	5,28	3,66±0.09	3,69
7	30	20	50	3,88±0.00	3,76	1,37±0.00	1,39
8	70	20	50	5,94±0.01	5,82	3,65±0.00	3,68
9	50	10	20	3,65±0.74	3,47	1,94±0.05	1,97
10	50	30	20	0,09±0.05	0,00	0,24±0.00	0,26
11	50	10	50	2,34±0.00	2,35	0,98±0.02	1,02
12	50	30	50	4,10±0.02	4,17	2,20±0.01	2,23
13	50	20	35	0,92±0.01	0,98	0,38±0.03	0,16
14	50	20	35	0,93±0.00	0,98	0,38±0.03	0,16
15	50	20	35	0,92±0.00	0,98	0,38±0.03	0,16

X1 : méthanol % ; X2 : temps (minutes) ; X3 : ratio liquide solide(mL/g); Sap : saponines (mg/g).

\*valeur moyenne et écart type pour n=3.

Annexe

**Tableau 4:** Analyse de la variance (ANOVA) relative à la variabilité sexuelle de la teneur des saponines d'*E. sepositus*. Pour chaque saison et chaque organe, les mêmes lettres dans la même ligne signifient qu'il n'y a pas de différence significative dans la teneur des saponines au seuil de signification.

	Hiver		Printemps		Été		Automne	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
OE	46.6±0.7 <sup>A</sup>	36.8±0.1 <sup>B</sup>	58.8±0.8 <sup>A</sup>	58.0±0.5 <sup>A</sup>	61.7±1.4 <sup>A</sup>	60.6±0.3 <sup>A</sup>	32.3±0.3 <sup>A</sup>	24.6±0.9 <sup>B</sup>
EST	10.3±0.3 <sup>A</sup>	9.4±0.2 <sup>B</sup>	9.8±0.3 <sup>A</sup>	9.1±0.4 <sup>A</sup>	8.5±0.3 <sup>A</sup>	8.2±0.1 <sup>A</sup>	9.2±0.1 <sup>A</sup>	8.6±0.4 <sup>A</sup>
CAE	7.6±0.5 <sup>A</sup>	7.1±0.1 <sup>A</sup>	7.7±0.4 <sup>A</sup>	7.1±0.2 <sup>A</sup>	7.3±0.3 <sup>A</sup>	7.1±0.2 <sup>A</sup>	6.6±0.5 <sup>A</sup>	5.6±0.5 <sup>A</sup>
GON	11.5±0.4 <sup>A</sup>	3.2±0.2 <sup>B</sup>	17.4±0.5 <sup>A</sup>	16.3±0.2 <sup>B</sup>	19.4±0.5 <sup>A</sup>	19.1±0.5 <sup>A</sup>	5.2±0.2 <sup>A</sup>	0.9±0.1 <sup>B</sup>
TEGORL	5.4±0.4 <sup>A</sup>	5.0±0.3 <sup>A</sup>	11.3±0.4 <sup>A</sup>	11.3±0.3 <sup>A</sup>	14.1±0.1 <sup>A</sup>	14.3±0.1 <sup>A</sup>	2.7±0.5 <sup>A</sup>	1.8±0.3 <sup>B</sup>
TEGABO	9.7±0.3 <sup>A</sup>	9.1±0.3 <sup>A</sup>	11.7±0.3 <sup>A</sup>	11.1±0.3 <sup>A</sup>	10.3±0.1 <sup>A</sup>	10.0±0.2 <sup>A</sup>	6.8±0.5 <sup>A</sup>	6.8±0.3 <sup>A</sup>

OE: organisme entier, EST: estomac; CAE: caeca pylorique; TEGORL: tégument oral; TEGABL: tégument aboral

**Tableau 5:** Analyse de la variance (ANOVA) relative à la variabilité saisonnière de la teneur des saponines d'*E. sepositus*. Pour chaque sexe et chaque organe, les mêmes lettres dans la même ligne signifient qu'il n'y a pas de différence significative dans la teneur des saponines au seuil de signification.

	Les individus femelles				Les individus males			
	Hiver	printemps	Été	Automne	Hiver	printemps	Été	Automne
OE	46.6±0.7 <sup>C</sup>	58.8±0.8 <sup>B</sup>	61.7±1.4 <sup>A</sup>	32.3±0.3 <sup>D</sup>	36.8±0.1 <sup>C</sup>	58.0±0.5 <sup>B</sup>	60.6±0.3 <sup>A</sup>	24.6±0.9 <sup>D</sup>
EST	10.3±0.3 <sup>A</sup>	9.8±0.3 <sup>A,B</sup>	8.5±0.3 <sup>C</sup>	9.2±0.1 <sup>B,C</sup>	9.4±0.2 <sup>A</sup>	9.1±0.4 <sup>A,B</sup>	8.2±0.1 <sup>C</sup>	8.6±0.4 <sup>B,C</sup>
CAE	7.6±0.5 <sup>A</sup>	7.7±0.4 <sup>A</sup>	7.3±0.3 <sup>A</sup>	6.6±0.5 <sup>A</sup>	7.1±0.1 <sup>A</sup>	7.1±0.2 <sup>A</sup>	7.1±0.2 <sup>A</sup>	5.6±0.5 <sup>B</sup>
GON	11.5±0.5 <sup>C</sup>	17.4±0.5 <sup>B</sup>	19.4±0.5 <sup>A</sup>	5.2±0.2 <sup>D</sup>	3.2±0.2 <sup>C</sup>	16.3±0.2 <sup>B</sup>	19.1±0.5 <sup>A</sup>	0.9±0.1 <sup>D</sup>
TEGORL	5.4±0.4 <sup>C</sup>	11.3±0.4 <sup>B</sup>	14.2±0.1 <sup>A</sup>	2.7±0.5 <sup>D</sup>	5.0±0.3 <sup>C</sup>	11.2±0.3 <sup>B</sup>	14.0±0.1 <sup>A</sup>	1.8±0.3 <sup>D</sup>
TEGABO	9.7±0.3 <sup>B</sup>	11.7±0.3 <sup>A</sup>	10.3±0.1 <sup>B</sup>	6.8±0.5 <sup>C</sup>	9.1±0.3 <sup>C</sup>	11.1±0.3 <sup>A</sup>	10.0±0.2 <sup>B</sup>	6.8±0.3 <sup>D</sup>

OE: organisme entier, EST: estomac; CAE: caeca pylorique; TEGORL: tégument oral; TEGABL: tégument aboral

## Listes des figures

### Titres

---

**Figure 1:** Surfaces de réponses pour les différentes interactions sur la teneur des caroténoïdes (cas de l'EAM d'*O.ophidianus*). (a): solvant/temps, (b): solvant/puissance, (c): solvant/ratio, (d): puissance/temps, (e): ratio/temps, (f): puissance/ratio.

**Figure 2:** Surface de réponse pour les différentes interactions sur la teneur des saponines (cas de l'EAU d'*O.ophidianus*). (a): solvant/temps, (b) : solvant/ration, (c): puissance /temps.

**Figure 3:** Surface de réponse pour les différentes interactions sur la teneur des caroténoïdes (cas de l'EAU d'*O.ophidianus*). (a): solvant/temps, (b) : solvant/ration, (c): puissance /temps.

**Figure 4:** Détermination de IC50% pour les saponines d'*O.ophidianus*.

**Figure 5:** Détermination de IC50% pour les caroténoïdes d'*E. sepositus*.

**Figure 6:** Détermination de IC50% pour les caroténoïdes d'*E. sepositus*.

**Figure 8:** Détermination de la capacité anti-oxydante ( $AI_{50}$ ) à partir de la courbe  $1-(I_{pas}/I_{pa0})$  en fonction de la concentration des saponines d'*O. ophidianus*, en utilisant le modèle de régression polynomial.

**Figure 9:** Détermination de la capacité anti-oxydante ( $AI_{50}$ ) à partir de la courbe  $1-(I_{pas}/I_{pa0})$  en fonction de la concentration des caroténoïdes d'*E. sepositus*, en utilisant le modèle de régression polynomial.

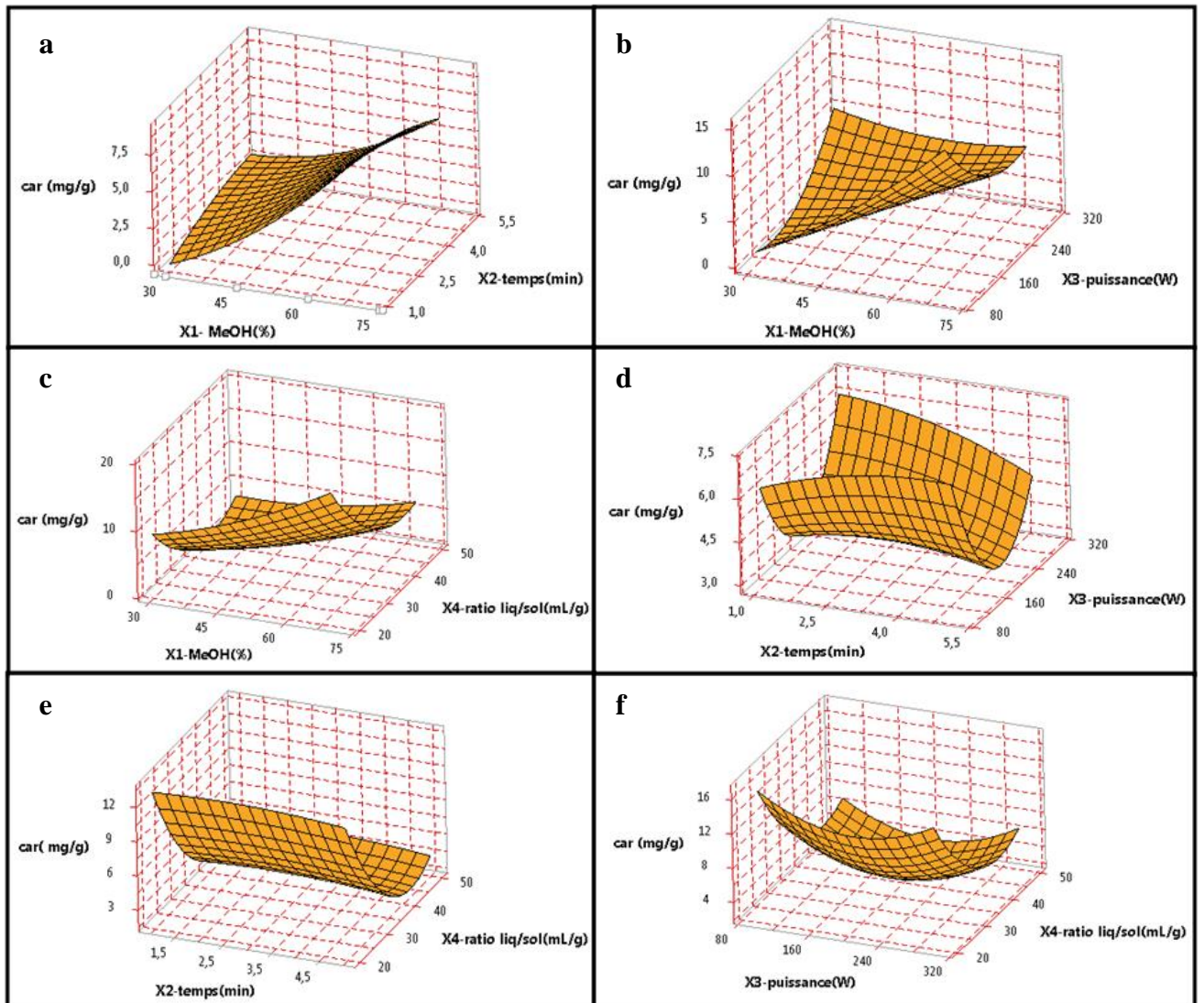
**Figure 10:** Détermination de la capacité anti-oxydante ( $AI_{50}$ ) à partir de la courbe  $1-(I_{pas}/I_{pa0})$  en fonction de la concentration des caroténoïdes d'*E. sepositus*, en utilisant le modèle de régression polynomial.

**Figure 11:** Détermination de la capacité anti-oxydante ( $AI_{50}$ ) à partir de la courbe  $1-(I_{pas}/I_{pa0})$  en fonction de la concentration de la vitamine C, en utilisant le modèle de régression polynomial.

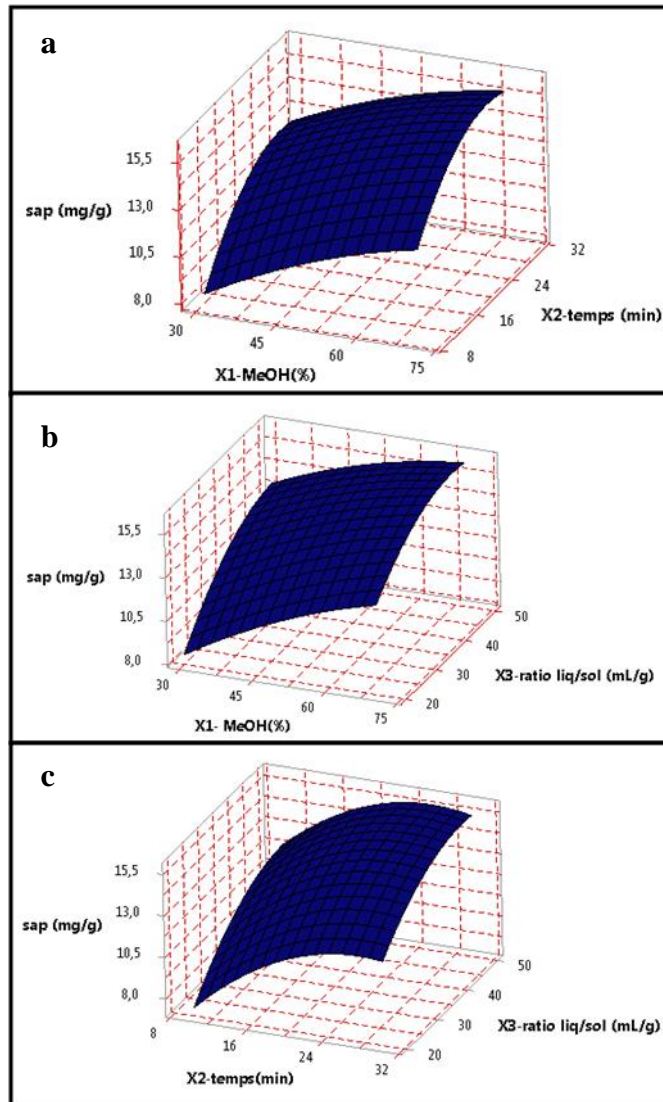
**Figure 12:** Détermination de EC50% pour les saponines d'*O. ophidianus*.

**Figure 13:** Détermination de la concentration non protectrice de la vitamine E.

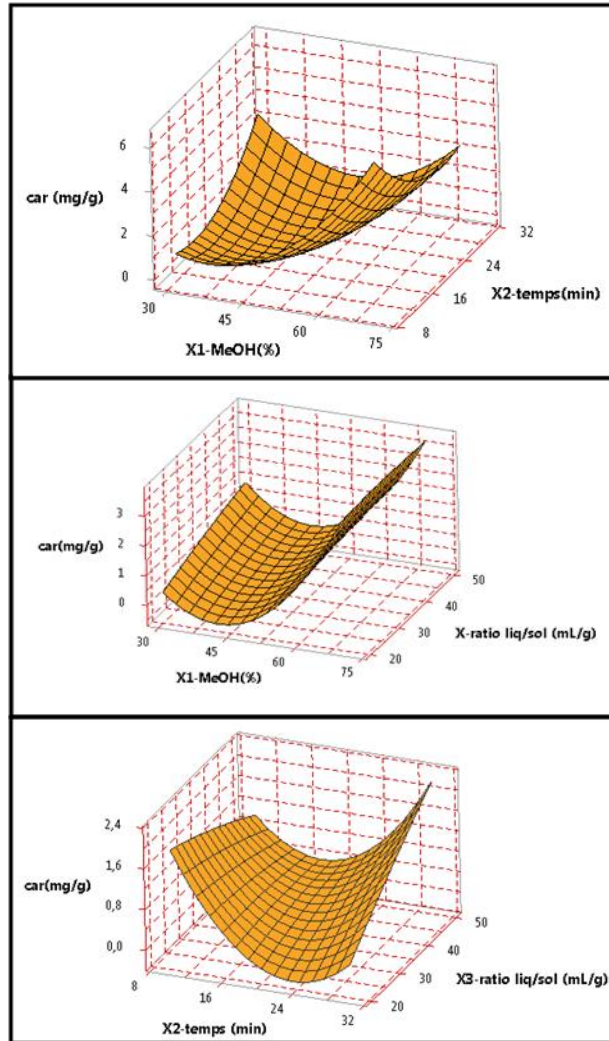
**Figure 14:** Spectre CID des ions parents m/z 919.



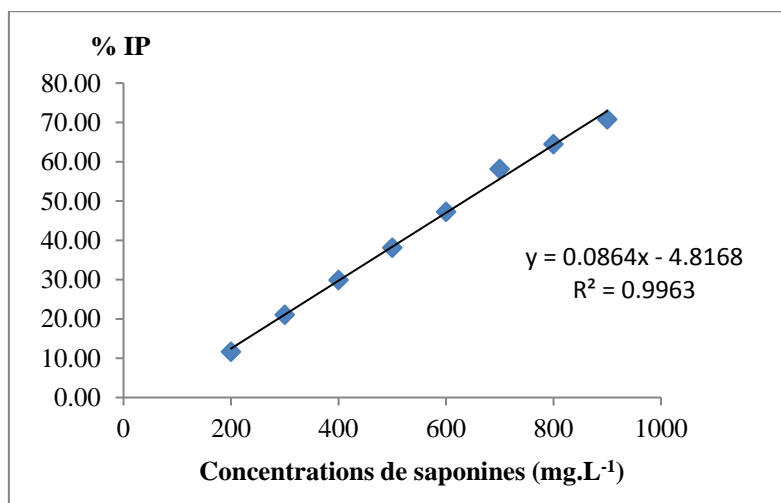
**Figure 1:** Surfaces de réponses pour les différentes interactions sur la teneur des caroténoïdes (cas de l'EAM d'*O.ophidianus*). (a): solvant/temps, (b): solvant/puissance, (c): solvant/ratio, (d): puissance/temps, (e): ratio/temps, (f): puissance/ratio.



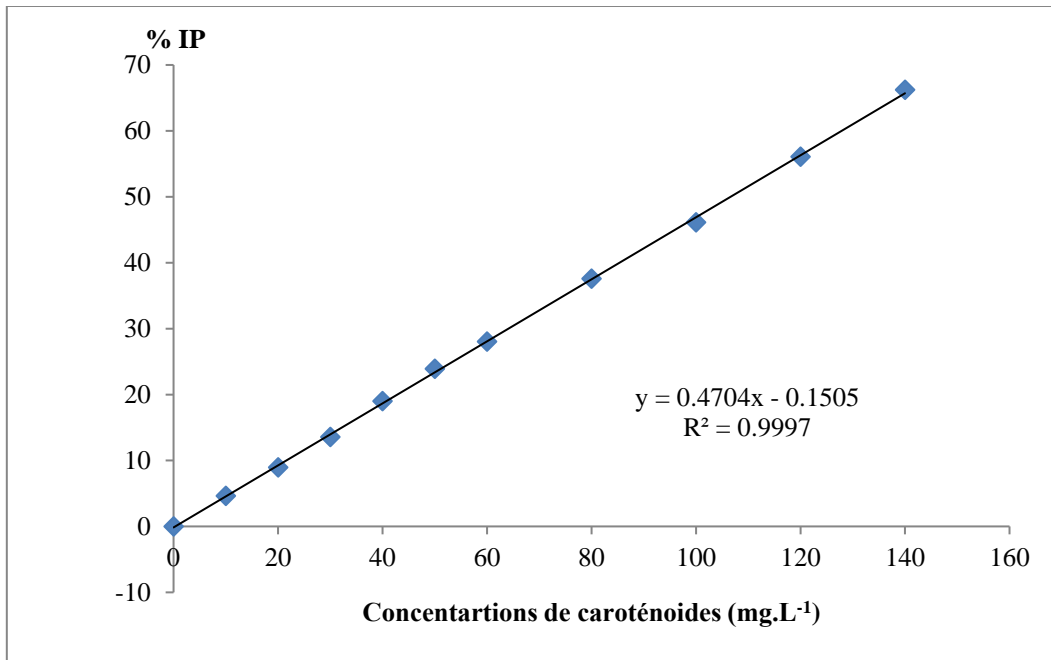
**Figure 2:** Surface de réponse pour les différentes interactions sur la teneur des saponines (cas de l'EAU d'*O.ophidianus*). (a): solvant/temps, (b) : solvant/ration, (c): puissance /temps.



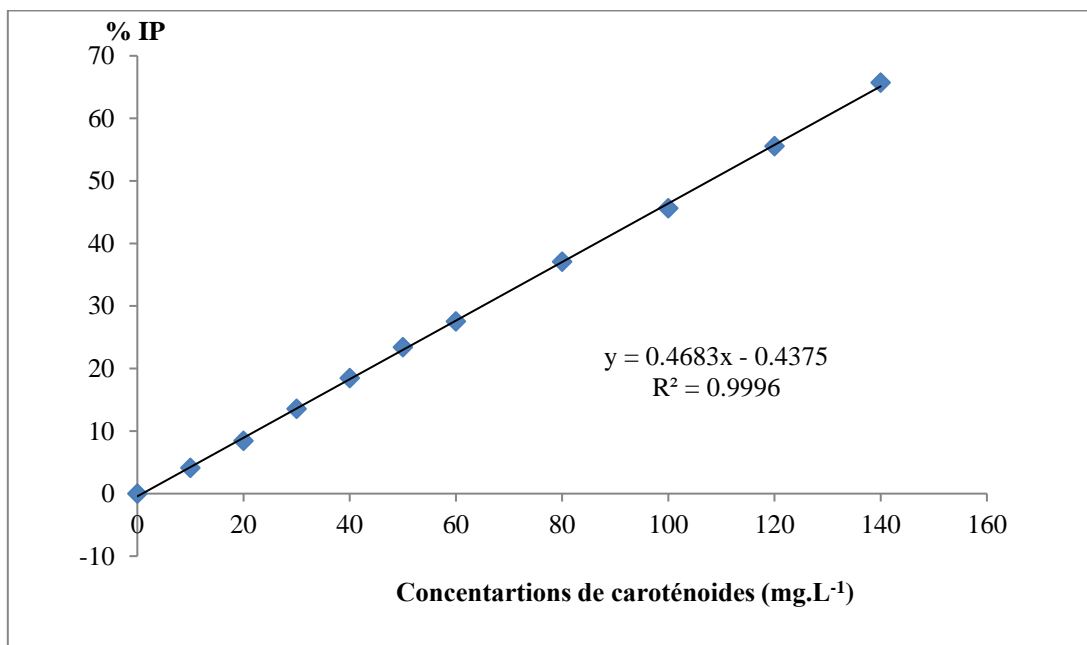
**Figure 3:** Surface de réponse pour les différentes interactions sur la teneur des caroténoïdes (cas de l'EAU d'*O.ophidianus*). (a): solvant/temps, (b) : solvant/ration, (c): puissance /temps.



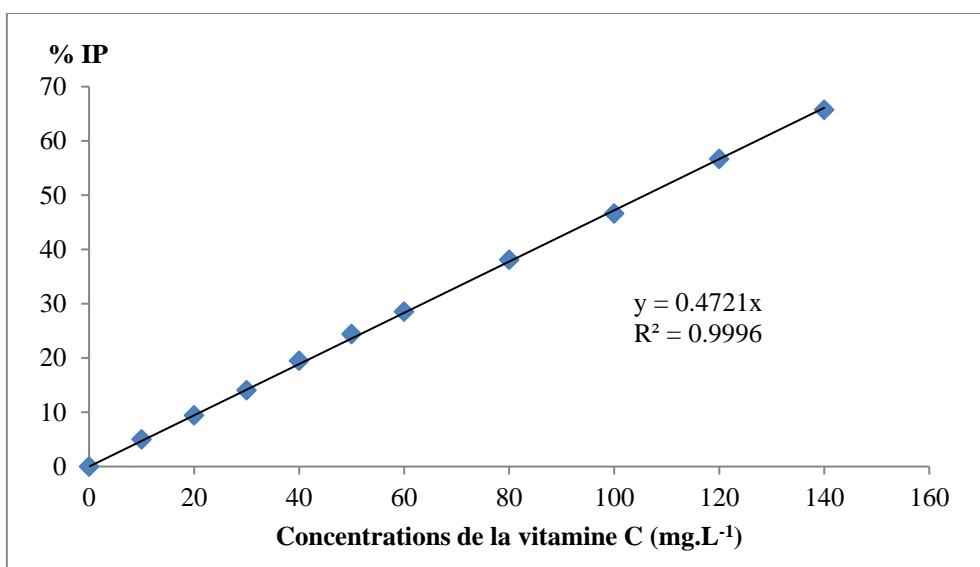
**Figure 4:** Détermination de IC50% pour les saponines d'*O.ophidianus*.



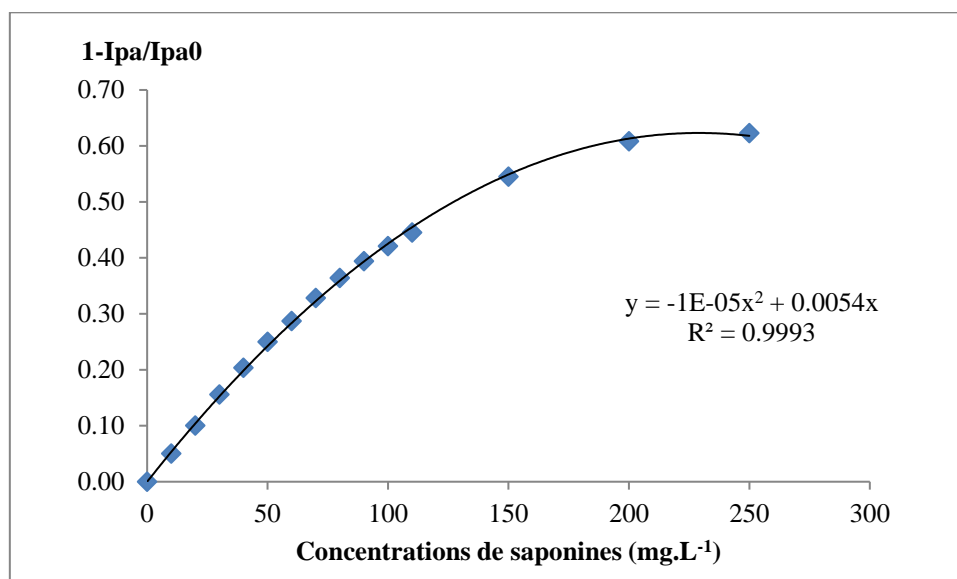
**Figure 5:** Détermination de IC50% pour les caroténoïdes d'*E. sepositus*.



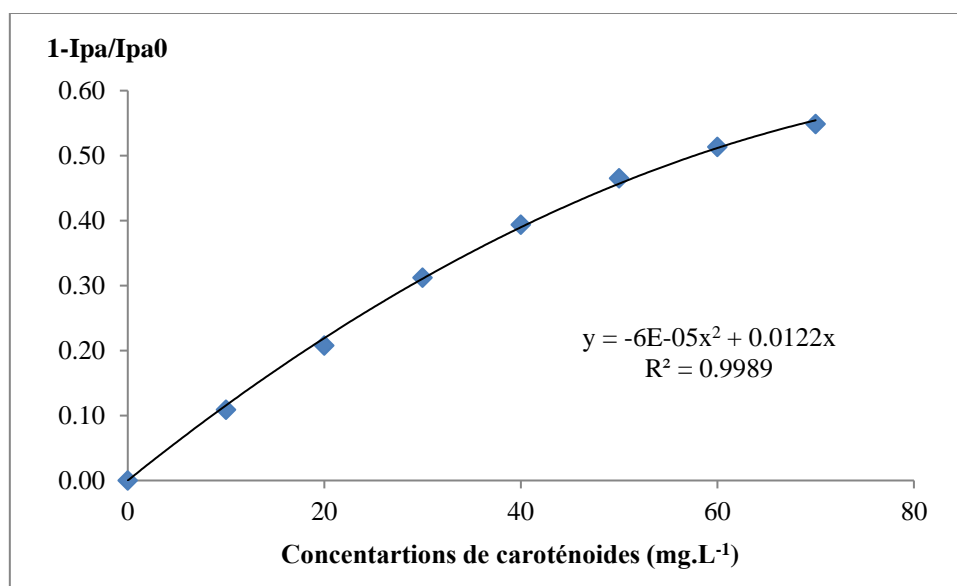
**Figure 6:** Détermination de IC50% pour les caroténoïdes d'*E. sepositus*.



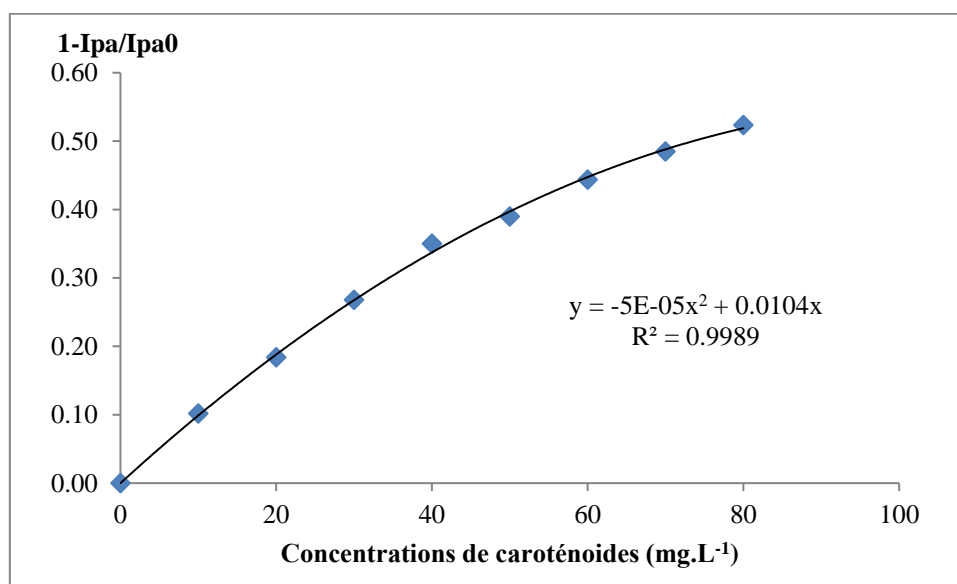
**Figure 7:** Détermination de IC<sub>50</sub>% pour la vitamine C.



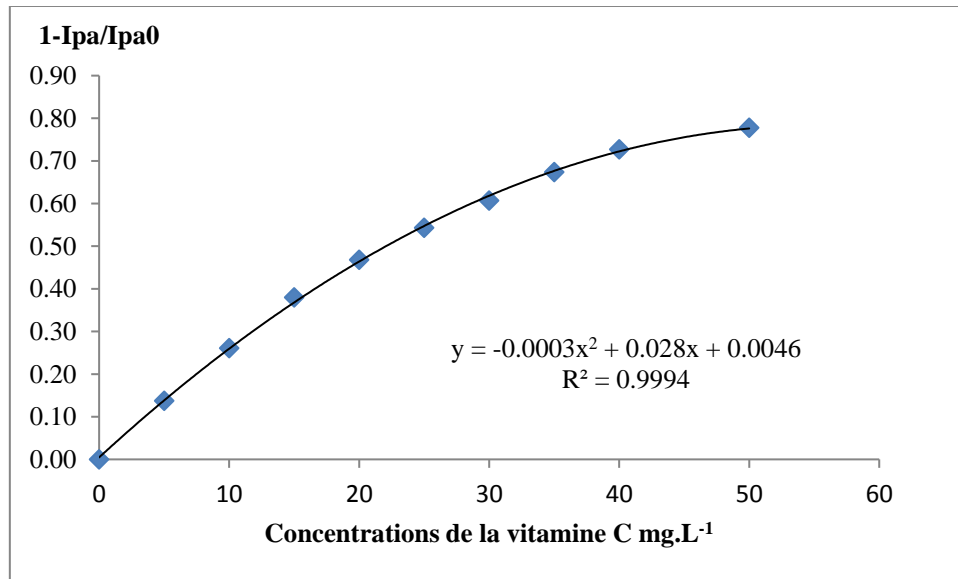
**Figure 8:** Détermination de la capacité anti-oxydante (AI<sub>50</sub>) à partir de la courbe 1-(Ipa<sub>s</sub>/Ipa<sub>0</sub>) en fonction de la concentration des saponines d'*O. ophidianus*, en utilisant le modèle de régression polynomiale.



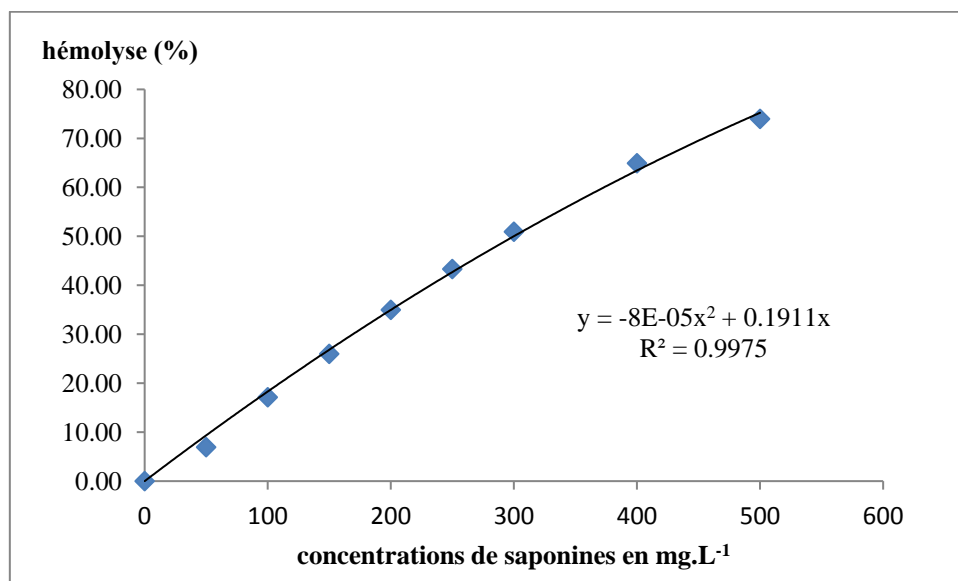
**Figure 9:** Détermination de la capacité anti-oxydante (AI<sub>50</sub>) à partir de la courbe 1-(I<sub>pa</sub>/I<sub>pa0</sub>) en fonction de la concentration des caroténoïdes d'*E. sepositus*, en utilisant le modèle de régression polynomial.



**Figure 10:** Détermination de la capacité anti-oxydante (AI<sub>50</sub>) à partir de la courbe 1-(I<sub>pa</sub>/I<sub>pa0</sub>) en fonction de la concentration des caroténoïdes d'*E. sepositus*, en utilisant le modèle de régression polynomial.



**Figure 11:** Détermination de la capacité anti-oxydante ( $AI_{50}$ ) à partir de la courbe  $1-Ipa/Ipa_0$  en fonction de la concentration de la vitamine C, en utilisant le modèle de régression polynomial.



**Figure 12:** Détermination de  $EC_{50\%}$  pour les saponines d'*O. ophidianus*.

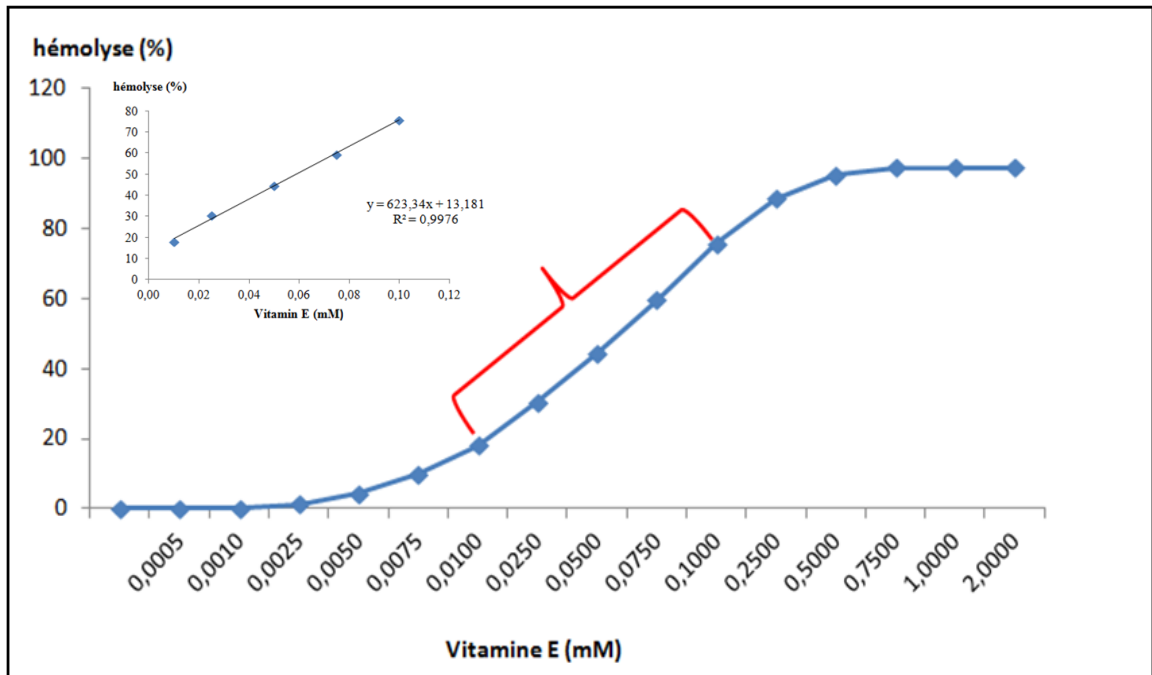


Figure 13: Détermination de la concentration non protectrice de la vitamine E.

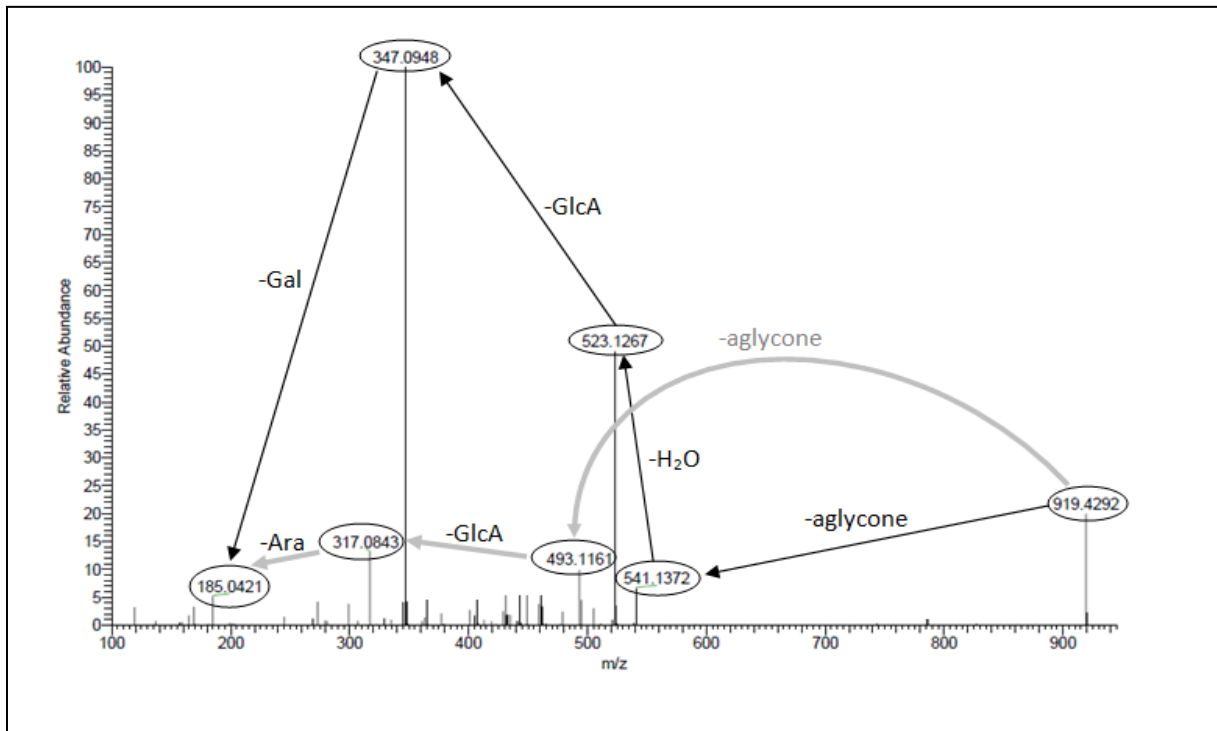


Figure 14: Spectre CID des ions parents m/z 919.

*Production  
Scientifique*

## **Communications**

**Avril, 2019:** Participation aux journées scientifiques de la société Française de chimie de la Section Régionale Bretagne et Pays de Loire (JS-BPL 2019) qui s'est déroulé du 1-3 Avril 2019 à Tregastel, France. Une communication affichée a été présentée : Saponines macrocycliques d'*Echinaster sepositus* Extractions et caractérisations par RMN, UPLC/MS, MS/MS.

**Novembre, 2017:** participation au séminaire international « Environnement, Agriculture et Biotechnologie (SIEAB-2017); Bouira, qui s'est déroulé du 27 - 28 Novembre 2017, Bouira, Algérie. Une communication orale a été présentée: Etude de l'activité biologique des caroténoïdes et des saponines de l'étoile de mer *Ophidiaster Ophidianus*.

**Juin, 2016:** Participation au troisième séminaire doctoral de l'ENSSMAL qui s'est déroulé le 8 juin 2016 à l'École National Supérieur des Sciences de la Mer et de l'Aménagement de Littoral, Alger, Algérie Une communication orale a été présentée : «Valorisation de la chimio biodiversité marine algérienne (cas des astéries)».

**Février, 2016 :** Participation au : 4<sup>th</sup> Biotechnology World Congress qui s'est déroulé du 15-18 février 2016, Sharjah, UAE. Une communication orale a été présentée: « Hemolytic power and CLHP analysis of content of steroidal glycoside of *Echinaster sepositus*».

**Mai, 2015:** Participation à la Deuxième Conférence Internationale, ATEM ii: Les Microbes et les Ecosystèmes: La force universelle cachée qui s'est déroulé du 8-10 Mai 2015 Hammamet, Tunisia. Une communication affichée a été présentée: « Phenolytic characterization of Multidrug- resistant, *Psodomonas Aeruginosa* isolated from algérian hospital associated to biofilm formation».

## **Articles**

- 1- "Microwave assisted extraction of bioactive saponins from the starfish *Echinaster sepositus*: Optimization by response surface methodology and comparison with ultrasound and conventional solvent extraction" .

Journal: Chemical Engineering and Processing - Process Intensification.  
<https://doi.org/10.1016/j.cep.2021.108359>.

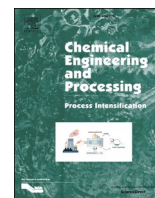
- 2- "Saponin contents in the starfish *Echinaster sepositus*: Chemical characterization, qualitative and quantitative distribution".

Journal: Biochemical Systematics and Ecology.  
<https://doi.org/10.1016/j.bse.2021.104262>.



Contents lists available at ScienceDirect

# Chemical Engineering and Processing - Process Intensification

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cep](http://www.elsevier.com/locate/cep)

## Microwave assisted extraction of bioactive saponins from the starfish *Echinaster sepositus*: Optimization by response surface methodology and comparison with ultrasound and conventional solvent extraction

Bouchra Dahmoune<sup>a,b,c,\*</sup>, Fouzia Houma-Bachari<sup>a</sup>, Mohamed Chibane<sup>b</sup>, Cherifa Akroure-Aissou<sup>a</sup>, Jean-Paul Guégan<sup>c</sup>, Thomas Vives<sup>c</sup>, Philippe Jéhan<sup>d</sup>, Farid Dahmoune<sup>e</sup>, Lotfi Mouni<sup>b</sup>, Vincent Ferrières<sup>c</sup>, Didier Hauchard<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Marine and Coastal Ecosystems, École Nationale des Sciences de la mer et de l'aménagement du littoral ENSSMAL, Dély Ibrahim, Alger, 16320, Algeria

<sup>b</sup> Laboratory for the Management and Valorisation of Natural Resources and Quality Assurance, Akli Mohand Oulhadj university of Bouira, Rue Freres Boussemdah, Algeria

<sup>c</sup> Univ Rennes, École Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, CNRS, UMR 6226 - Institut Sciences Chimiques Rennes, Rennes, France

<sup>d</sup> SCANMAT UMS 2001, CRMPO, Université de Rennes 1, Rennes, France

<sup>e</sup> Laboratoire de Biomathématique, Biophysique, Biochimie, et Scientométrie (L3BS), faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, Bejaia, 06000, Algeria

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Microwave assisted extraction  
Saponins  
Optimization  
*Echinaster sepositus*

### ABSTRACT

Microwave assisted extraction (MAE) was investigated for the extraction of total saponins compounds from the starfish *Echinaster sepositus*. In order to achieve optimization of microwave extraction and to determine the influence of each operational variable (the solvent concentration (X1), irradiation time (X2), microwave power (X3), and liquid-solid ratio (X4)) on the extraction of saponins, response surface methodology (RSM) coupled with a Box-Behnken design (BBD) was applied. The optimized experimental conditions were 58.7 % aqueous methanol as solvent, 177 W as microwave power for 3 min irradiation time at 43.6 mL g<sup>-1</sup> of liquid-solid ratio. The extraction yield under these conditions was 60.3 ± 0.6 mg g<sup>-1</sup>. The optimized MAE was compared with other methods, ultrasound assisted extraction (UAE) and with conventional solvent extraction (CSE). It was demonstrated that microwave produced saponins extraction 7.8 times as more as that produced by CSE and 3.3 as more as UAE has produced.

From the *in vitro* hemolytic tests and electro-generated O<sub>2</sub><sup>-</sup> quenching tests, we have noted that the microwave saponins extract was the most active one comparing with both UAE and CSE extracts.

### 1. Introduction

Microwave assisted extraction (MAE) is a green technology which provides rapid energy transfer and simultaneous heating of the biological material and solvent assembly [1]. These characteristics, improve the extraction yield, the reduction of extraction time and the quantity of solvent used [1,2]. These advantages over conventional extraction techniques make it alternative techniques to extract bioactive natural products. The MAE was used during the past few years as a strategy to improve the recovery of the bioactive natural products. In this regard, the microwave is employed to increase polyphenols, saponins, vegetable

oils yield, etc [2–5].

The marine biotechnology seeks for sustainable ways for utilization of marine bioresources (flora and fauna) to produce new high added-value biomolecules. In this context and to limit the impact of the extraction processes on the environment, the green extraction could satisfy the increasing demand for alternative sources of bioactive compounds.

Actually, different alternative techniques or quantitative methods are needed, in the case of marine drugs concerning the sampling difficulty and the type of used matrixes often endemic. These particularities require the adoption of quantitative methods in studies in order to

\* Corresponding author at: Bouchra Dahmoune at Laboratory of Marine and Coastal Ecosystems, École nationale des sciences de la mer et de l'aménagement du littoral ENSSMAL, Campus Universitaire de Dely Ibrahim Bois des Cars, Dély Ibrahim, Alger, 16320, Algeria.

E-mail address: [bouchra.dahmoune@yahoo.fr](mailto:bouchra.dahmoune@yahoo.fr) (B. Dahmoune).

<https://doi.org/10.1016/j.cep.2021.108359>

Received 11 October 2020; Received in revised form 19 February 2021; Accepted 23 February 2021

Available online 28 February 2021

0255-2701/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

obtain the maximum yield from the low amount of the primary matrix. In this regard, this study aims at enhancing the extraction yield of saponins mixture, from the starfish *Echinaster sepositus* collected in Algerian coasts, through applying microwave-assisted extraction (MAE) technique and optimizing its conditions.

The interest in saponins of this species is justified by their unusual structure, belonging to a rare structure group of marine glycosides which discovered by Italian scientists more than 40 years ago [6,7]. This unique compound containing a trisaccharide chain cyclized between C-3 and C-6 of the  $\Delta^7$ - $3\beta,6\beta$ -dihydroxysteroid aglycone (Fig. 5). On the other hand, starfish saponins are of high pharmaceutical interest due to their anti-bacterial, anti-fungal, anti-viral and anti-tumor properties [8–12].

To optimize the parameters affecting the MAE of saponins from starfish, the Box–Behnken experimental design (BBD) using response surface methodology (RSM) was applied. BBD is one of the most efficient experiment designs, because it does not allow the combinations for which all factors are simultaneously at their highest or lowest levels. Thus, it is used to avoid experiments performed under extreme conditions. In this study, the following factors have been evaluated: the solvent concentration (X1), irradiation time (X2), microwave power (X3) and liquid-solid ratio (X4). Based on the response surfaces, optimal conditions of the microwave pretreatment have been determined. Finally, the study has been complemented with a variance analysis (ANOVA), to determine the statistically significant factors.

To the best of our knowledge, there is no available literature detail with the optimization of green procedure for the extraction of total saponins compound (TSC) from starfish.

Therefore, the main objectives of the current study can be listed as follows:

- Optimization of MAE procedure by response surface methodology (RSM) for the extraction of total saponins compounds from *E. sepositus*;
- Studying comparatively the optimized MAE, UAE and the reference CSE methods;
- Using high-resolution mass spectrometry (HR-ESI-MS) to identify the saponins mixture obtained by MAE method.
- Evaluation of the hemolytic power of the three saponins extracts (MAE, UAE and CSE).
- Evaluation of the antioxidant capacity power of the three saponins extracts (MAE, UAE and CSE) by their ability to scavenge electrochemically-generated superoxide radical ( $O_2^{\cdot-}$ ).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Biological material

*E. sepositus* (Retzius, 1783) individuals were collected in summer 2018 from Algerian sea coast between 5–10 m of depth. In total, 28 individuals as samples weighed about 1724 g were collected and were

transported in plastic bags containing sea water. In the laboratory, the starfish individuals were freeze-dried (Alpha-1-2 LD plus freeze-dryer). The lyophilized samples obtained were ground with an electrical grinder and they were stored in dark waterproof tubes inside a desiccator until use.

### 2.2. Experimental work design and statistical modelling

The type of solvent, solvent concentration, irradiation time, microwave power and liquid-to-solid ratio were firstly studied separately in single-factor experiments to reduce the number of the total experiments work, and to determine the appropriate interval for each parameter in the design of experiment for microwave assisted extraction - MAE (Table 1). In this preliminary study, the experimental work has been carried out by varying an experimental parameter while all the other parameters were kept constant at their middle values.

In the MAE, the type and concentration of solvent effect were studied for a constant value of liquid-solid ratio ( $20 \text{ mL g}^{-1}$ ), microwave power (200 W) and irradiation time (5 min). The irradiation time effect was evaluated for a MeOH concentration of 50 %.

The irradiation time was set at 3 min in the trials to investigate the microwave power influence. This latter was set at 200 W in the trials to investigate the ratio liquid-to-solid parameter. The response surface methodology (RSM) based on Box–Behnken design (BBD) of three-levels-four-factor experimental was assessed to maximize the saponins yield extracted from *E. sepositus* using MAE process (Table 2). The design requires a number of experiment trials according to  $N = 2k(k - 1) + C_0$ , where  $k$  is the number of factors and  $C_0$  is the number of center points and each independent factor is studied at three level (-1, 0 and +1) reference.

The data was analyzed by Minitab.17 with a standard least square in order to obtain RSM. The ANOVA F test was assessed to adjust models and the coefficient significance at a p-value less than 0.05 (Table 3).

The model used for data regression analysis is corresponding to a second-order polynomial equation (Quadratic model) (Eq. (1)). This equation is then used to predict the optimal extraction conditions.

$$Y = B_0 + \sum_{i=1}^k B_i X_i + \sum_{i=1}^k B_{ii} X_i^2 + \sum_{i>j}^k B_{ij} X_i X_j + E \quad (1)$$

where  $Y$  represents the total saponin compounds (TSC);  $\beta_0$  is a constant coefficient;  $B_i$ ,  $B_{ii}$  and  $B_{ij}$  are the coefficients of the linear, quadratic and interactive terms, respectively, and  $X_i$  and  $X_j$  represent the actual independent variables (i–j),  $E$  is an error.

Additional experiments of extraction were carried out at the optimal conditions, and the results obtained were compared to the values predicted by the regression model in order to validate the model.

Finally, the extract obtained at the optimal conditions was compared to ultrasound assisted extraction (UAE) and conventional solvent extraction method (CSE). The effects of microwave, ultrasonic and

**Table 1**

Single-factor experiment results for MAE of saponins from *E. sepositus*. Results are reported as means  $\pm$  SD. Same letters in the same column refer to means not statistically different according to ANOVA and Tukey's test. TSC, total saponin compound;  $T_{\text{sap}}$ , saponin total; SP, starfish powder.

Solvent		Methanol concentration (%)		Irradiation time (min)		Microwave power (W)		Liquid-to-solid ratio (mL/g)	
Type	TSC (mg <sub>Tsap</sub> /g <sub>SP</sub> )	% (V/V)	TSC (mg <sub>Tsap</sub> /g <sub>SP</sub> )	min	TSC (mg <sub>Tsap</sub> /g <sub>SP</sub> )	W	TSC (mg <sub>Tsap</sub> /g <sub>DM</sub> )	ml/g	TSC (mg <sub>Tsap</sub> /g <sub>SP</sub> )
70 % MeOH	24 $\pm$ 0.00 <sup>A</sup>	20	8.00 $\pm$ 0.00 <sup>D</sup>	1	39.89 $\pm$ 0.18 <sup>E</sup>	100	39.79 $\pm$ 0.18 <sup>B</sup>	10	11.98 $\pm$ 0.01 <sup>D</sup>
	19.66 $\pm$ 0.57 <sup>B</sup>	30	13.33 $\pm$ 2.30 <sup>C</sup>	2	48.00 $\pm$ 0.00 <sup>C,B</sup>	200	46.63 $\pm$ 0.12 <sup>A</sup>	20	23.87 $\pm$ 0.14 <sup>C</sup>
H <sub>2</sub> O	12 $\pm$ 0.00 <sup>C</sup>	40	18.66 $\pm$ 0.30 <sup>B</sup>	3	55.85 $\pm$ 0.26 <sup>A</sup>	300	32.35 $\pm$ 0.20 <sup>C</sup>	30	36.00 $\pm$ 0.25 <sup>B</sup>
		50	24.00 $\pm$ 0.00 <sup>A</sup>	4	49.47 $\pm$ 0.23 <sup>B</sup>	400	24.67 $\pm$ 0.58 <sup>D</sup>	40	39.89 $\pm$ 0.18 <sup>A</sup>
		60	24.00 $\pm$ 0.00 <sup>A</sup>	5	42.97 $\pm$ 0.20 <sup>D</sup>	500	16.14 $\pm$ 0.47 <sup>E</sup>	50	39.48 $\pm$ 0.45 <sup>A</sup>
		70	24.00 $\pm$ 0.00 <sup>A</sup>	6	35.28 $\pm$ 0.68 <sup>F</sup>				
		80	24.00 $\pm$ 0.00 <sup>A</sup>	8	22.34 $\pm$ 0.10 <sup>G</sup>				
		90	22.6 $\pm$ 2.3 <sup>A</sup>						

**Table 2**

Box–Behnken design (BBD) with the observed responses and predicted values for yield of total saponin compounds (TSC) referred to starfish powder (SP) of *E. sepositus* using MAE.

Run	X <sub>1</sub> - Methanol concentration (% v/v)	X <sub>2</sub> -Irradiation time	X <sub>3</sub> - Microwave power (W)	X <sub>4</sub> - Liquid-to-solid ratio (mL g <sup>-1</sup> )	TSC (mg <sub>sapT</sub> /g <sub>SP</sub> )	
					Observed responses	Predicted values
1	30	1	200	35	16.78 ± 0.00	16.75
2	70	1	200	35	40.70 ± 0.20	40.59
3	30	5	200	35	22.34 ± 0.05	22.43
4	70	5	200	35	36.71 ± 0.49	36.73
5	50	3	100	20	28.74 ± 0.08	28.70
6	50	3	300	20	34.47 ± 0.10	34.32
7	50	3	100	50	54.00 ± 0.00	54.13
8	50	3	300	50	46.50 ± 0.71	46.52
9	30	3	200	20	17.20 ± 0.00	17.17
10	70	3	200	20	30.68 ± 0.17	30.93
11	30	3	200	50	30.90 ± 0.29	30.68
12	70	3	200	50	55.00 ± 0.00	55.06
13	50	1	100	35	34.39 ± 0.18	34.39
14	50	5	100	35	39.86 ± 0.00	39.78
15	50	1	300	35	37.76 ± 0.00	37.87
16	50	5	300	35	34.27 ± 0.00	34.30
17	30	3	100	35	28.57 ± 0.14	28.67
18	70	3	100	35	48.25 ± 0.00	48.14
19	30	3	300	35	27.97 ± 0.00	28.07
20	70	3	300	35	46.85 ± 0.00	46.75
21	50	1	200	20	22.31 ± 0.13	22.33
22	50	5	200	20	23.15 ± 0.07	23.12
23	50	1	200	50	41.00 ± 0.00	41.03
24	50	5	200	50	42.08 ± 0.11	42.06
25	50	3	200	35	55.94 ± 0.00	55.94
26	50	3	200	35	55.94 ± 0.00	55.94
27	50	3	200	35	55.94 ± 0.00	55.94

**Table 3**

Analysis of variance (ANOVA) for the experimental results obtained by MAE.

Source	Sum of squares	Df	F-Value	P-Value	
<b>Model</b>	7612.25	14	14215.34	0.000	Significant
X1-MeOH	2182.33	1	57054.95	0.000	
X2-Temps	4.98	1	130.30	0.000	
X3-Power	5.98	1	156.45	0.000	
X4-Ratio	2125.11	1	55558.80	0.000	
X1X2	45.56	1	1191.06	0.000	
X1X3	0.32	1	8.34	0.006	
X1 × 4	56.445	1	1475.90	0.000	
X2 × 3	40.20	1	1051.04	0.000	
X2X4	0.03	1	0.73	0.399	
X3 × 4	87.49	1	2287.44	0.000	
X1 <sup>2</sup>	1733.33	1	45316.06	0.000	
X2 <sup>2</sup>	2112.45	1	55227.86	0.000	
X3 <sup>2</sup>	298.24	1	7797.08	0.000	
X4 <sup>2</sup>	1011.67	1	26449.19	0.000	
Error	1.49	39			
Lack of fit	0.49	10	1.43	0.215	Not significant
Pur error	1.00	29			
Cor total	7613.74	53			
R <sup>2</sup> =	R <sup>2</sup> adj =	R <sup>2</sup> pred =			
0.9998	0.9997	0.9996			

magnetic agitation on the microstructure of the samples powder (before and after the different extraction processes) were observed by scanning electron microscopy (SEM).

### 2.3. Extraction procedures

#### 2.3.1. Microwave-assisted extraction (MAE)

Microwave-assisted extraction (MAE) was carried out using a multimode microwave oven (NN-S674MF, Samsung, Malaysia) equipped with a digital control system for irradiation time and microwave power. The apparatus is characterized by a frequency of 2450 kHz; a

maximum output power of 1000 W with an increment of 100, and a heating cavity dimensions is 22.5 cm × 37.5 cm × 38.6 cm. In order to condensate the vapors generated during extraction, the heating cavity was modified.

Briefly, 1 g of starfish powder was placed in a flask and an adequate volume of extraction solvent is added. The suspension was irradiated at regular intervals of power and time according to the operation in progress (Tables 1 and 2). The solvent concentration (X1), irradiation time (X2), microwave power (X3), and liquid-solid ratio (X4) for each trial performed are listed in Table 1 for the preliminary study and Table 2 for extraction optimization.

The extract obtained after microwave irradiation was filtered under vacuum with a Büchner flask through No. 1 Whatman paper. Then the filtrate was evaporated at low pressure in a double boiler at 30 °C using a rotary evaporator (RE301 – Stuart, UK). The residues were recovered and dissolved in milli-Q water (crude extract) to undergo different purification steps as reported in Section 2.4.

#### 2.3.2. Ultrasound-assisted extraction (UAE)

Ultrasonic-assisted extraction (UAE) was carried out by an ultrasonic bath apparatus (SELECTA type) working at 50/60 Hz and 195 W frequency and power respectively.

Briefly, 1 g of starfish powder and 46 mL of 70 % methanol were placed in a glass bottle. The suspension was exposed to acoustic waves for 25 min. The extract was recovered and analyzed as reported in Section 2.4.

The UAE extraction conditions were selected from a series of 15 experiments including extraction time, solvent concentration in distilled water and liquid-to-solid ratio independent parameters, designed by Response Surface Methodology (RSM) to optimize the recovery of the saponin extraction from *E. sepositus*.

#### 2.3.3. Conventional solvent extraction (CSE)

The saponins extract from starfish powder was extracted using a conventional extraction technique. 1 g of starfish powder was mixed

with 50 mL of 70 % (v/v) methanol-water solvent in a 150 mL glass flask. The mixture was subjected to a magnetic agitator for 24 h at room temperature.

#### 2.4. Saponins purification

The crude extracts obtained by different extraction methods (MAE, UAE and CSE) were purified in order to remove all impurities according to the method reported in the literature [13].

The aqueous crude extract was partitioned by using the liquid-liquid extraction method. Three organic solvents, *n*-hexane (0.09 D), dichloromethane (1.60 D) and chloroform (1.04 D) were conducted respectively to partition crude extract. Saponins were maintained in methanol phase for each one of these extractions [14]. In fact, the aqueous crude extracts were dried by using rotary evaporation (RE301 – Stuart, UK). Then dry extracts were solubilized in 20 mL of methanol 90 % followed by liquid-liquid partitioning in *n*-hexane (v/v) to eliminate lipids and fatty acid. The methanol fractions were recovered and adjusted with water corresponding to 20 % of the methanolic volume. After that, this later was mixed with an equal volume of dichloromethane. After decantation, the dichloromethane fraction was removed and the hydromethanolic phase was adjusted with 40 % of water. Then, the liquid-liquid partitioning procedure for a remaining hydromethanolic phase was continued by adding in a separatory funnel a chloroform (v/v) that was stirred and left at rest for three hours minimum. After the sample decantation process, the lower phase was removed and the resulting hydromethanolic upper phase was evaporated under rotary evaporation to evaporate the solvents. Then, the obtained dry extracts were dissolved in 5 mL distilled water which was transferred to chromatography column packed with Amberlite XAD-4 (Sigma- Aldrich St. Louis, MO, USA). The column was then washed with 100 mL of distilled water to remove any organic salts. The absorbed fraction saponins were eluted with 100 mL of methanol.

Finally, the obtained methanolic fractions were evaporated to remove the methanol solvent, the dry extracts were then dissolved in 5 mL of distilled water. The resulting aqueous solution obtained previously was mixed in a separatory funnel with 5 mL *iso*-butanol solvent that was blended and left at rest for 2 h. After this period, the upper saponins-rich phase was separated from lower phases, then, the *iso*-butanol solvent was evaporated in a rotary evaporator. Finally, the dry recovered extract was dissolved in distilled water and lyophilized.

#### 2.5. Determination of total saponins compound yield

The saponins amount of each extract was determinate according to the Food Standard Code [15]. In fact, the round bottom flask was dried at 105 °C, cooled in desiccator, and weighed to a constant weight before its freeze-drying. Once the lyophilization was completed, the flasks were weighed for a second time; the difference in weights corresponds to the total saponin amount in the sample (mg  $T_{sap}$ ). The saponins were recovered in the form of white residues. The total saponins compound yield (TSC) is expressed in mg g<sup>-1</sup> and calculated from the total saponin amount ( $T_{sap}$ ) and the initial dried starfish powder dry, according to the following equation (Eq. (2)):

$$TSC \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{mg } T_{sap}}{\text{g starfish powder}} \quad (2)$$

#### 2.6. Hemolytic activity

The hemolytic power of saponins obtained from MAE, UAE and CSE was evaluated according to the method described by Apers et al. [16]. Citrated blood from the horse was used in this experiment. Erythrocytes were isolated from the various constituents of the blood by washing four times in cold PBS buffer (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4) and centrifuged during 15 min (10 000 rpm)

until the supernatant was clear and colorless. The supernatant was removed and two milliliters of packed cells were diluted to 100 mL with the PBS buffer to obtain erythrocyte suspension at 2%. A volume of 1980 μL of the erythrocyte suspension was added to 20 μL of saponins extract in a microtube. The suspension was mixed, incubated for 6 h at room temperature and centrifuged (1000 rpm) for 10 min. The supernatant was recovered and its absorbance was measured at 540 nm using a spectrophotometer (model 7305, JENWAY).

The hemolytic capacity was expressed as percentage of lysed erythrocytes, and calculated according to the following equation (Eq. (3)):

$$\% \text{ hemolysis} = \frac{Abs_{sample} - Abs_{control}}{Abs_{total \text{ hemolysis}}} \times 100 \quad (3)$$

where  $Abs_{sample}$  is the absorbance of erythrocyte suspension (1980 μL) + sample extract (20 μL);  $Abs_{control}$  is the absorbance of negative control solution containing erythrocyte suspension (1980 μL) + PBS buffer (20 μL);  $Abs_{total \text{ hemolysis}}$  is the absorbance of 20 μL erythrocyte suspension obtained from negative control solution + milli-Q water (1980 μL).

From data elaboration (% hemolysis plotted versus saponins concentration), the concentration of TSC required to lyses 50 % of erythrocyte ( $IC_{50}$ ) was calculated.

#### 2.7. Antioxidant activity by electro-generated O<sub>2</sub><sup>-</sup> quenching

The antioxidant activity of the extracts (MAE, UAE, CSE) was measured *in-vitro* using electro-generated O<sub>2</sub><sup>-</sup> (superoxide radical anion).

This method has been developed by Le Bourvelec et al. [17]. It was applied to different plant extracts as phenolic compounds [18–21]. In this study, we applied it for marine animal extract, for the first time.

This method is based in a kinetic reaction of the antioxidant substrate, present in the extract, with the superoxide radical O<sub>2</sub><sup>-</sup> generated by oxygen reduction in an aprotic medium

(*N,N*-dimethylformamide (DMF) extra dry).

The redox system O<sub>2</sub>/O<sub>2</sub><sup>-</sup> is reversible under these conditions. The addition of increasing amounts of antioxidant decreases the peak oxidation of O<sub>2</sub><sup>-</sup>, showing a tendency to loose the reversibility of the redox system. The reactivity of the radical O<sub>2</sub><sup>-</sup> is directly measured at the backward scan by the decay of the anodic current from its oxidation in the presence of extract (Fig. S.1).

All electrochemical assays were carried out by a cyclic voltammetric technique using a dual potentiostat-galvanostat (PGSTAT 30, Autolab instrument, Eco Chemie B.V., Utrecht, The Netherlands), controlled by a GPES software (version 4.9, Eco Chemie B.V.). All measurements were carried out on a three-electrode thermostated cell. The following electrodes were used: a glassy carbon disk working electrode (diameter 2 mm), a platinum wire counter electrode, and a reference electrode Ag/AgCl in EtOH saturated with KCl. The reference electrode was separated from the solution by a salt bridge containing 0.2 mol L<sup>-1</sup> of tetrabutylammonium hexafluorophosphate (Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub>) in DMF.

To perform analysis the electrochemical cell was adjusted at 20.0 ± 0.2 °C. This cell contains 10 mL of an extra dry DMF containing the supporting electrolyte 0.1 mol L<sup>-1</sup> Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub> saturated by dry air during 10 min. The cyclic voltammogram (CV) of the oxygen reduction was then recorded at a scan rate 0.1 V/s, with the initial potential at 0.6 V and the reverse one at -1.23 V versus reference electrode, in order to obtain the intensities of the initial cathodic and anodic peak currents ( $I_{pc0}$  and  $I_{pa0}$ , respectively) before addition of antioxidant in the cell (Fig. S.1).

To the 10 mL oxygen solution an aliquot of saponins solutions (1 mg mL<sup>-1</sup>) were successively added to get an increasing of saponins concentration. After each addition, the CV plot of the cell solution was recorded to obtain a precise and significant evolution of the intensities of the anodic peak current ( $I_{pa_s}$ ).

In this study, ascorbic acid, well known for its antioxidant properties,

was used as a positive control and the antioxidant index used to evaluate the antioxidant activity is  $AI_{50}$ , defined as extract concentration needed to consume 50 %, of the electro generated radical corresponding to  $(I_{pa0} - I_{pa5})/I_{pa0} = 0.5$ . To estimate  $AI_{50}$  the variation of  $(1 - I_{pa5}/I_{pa0})$  were plotted according to the concentration of added saponins (Fig. 3).

For the measurements of the decreasing of oxidation peak current of  $O_2^{\cdot-}$  in presence of extract we adopted the method used by Guendouze et al. [21] which aims at exploiting the convolution time semi-derivative transformation of cyclic voltammograms. Indeed, for convolution curves, the baselines are easier to define automatically in comparison with the asymmetric cyclic voltammetric curves and the oxidation peak current values, before and after extract additions, can be more accurately measured (Fig. S.1).

## 2.8. Identification of saponins by ESI-HR-MS measurements

In order to confirm the molecular weight of saponins, extract by MAE from *E. sepositus*, high resolution mass spectrometry experiments (HR-ESI-MS) were performed on a Thermo Fisher Scientific Q-Exactive mass spectrometer, in both positive and negative ionization modes by direct infusion. MS experiments were performed at the higher resolution of the instrument (140,000 at  $m/z$  200). Elementary compositions of the ions were determined using instrument software (Xcalibur).

The MAE extract was prepared using a concentration of 10–20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and the flow rate was 5–10  $\mu\text{L min}^{-1}$ . ESI parameters were as follows: spray voltage 3–4 kV, capillary temperature 300 °C, sheath gas flow rate 10–80, auxiliary gas flow 0–10, SLens RF Level 100.

The single-stage ESI-MS spectra were recorded by scanning 150–2000  $m/z$  mass range.

## 2.9. Statistical analysis

In our work, all experiments were carried out in triplicate and the results have been reported as means  $\pm$  SD.

The analysis of the influence of the single-factor experiment, of the data obtained from the BBD trials and the influence of extraction technique (MAE, UAE or CSE) on total saponins compound (TSC) yield, was statistically assessed by ANOVA and Tukey's posthoc test for means discrimination (95 % confidence level).

To test the model significance for the MAE the data obtained from BBD for the response variable were statistically analyzed using ANOVA. The model was taken significant and highly significant at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.

The Minitab software was used to construct the BBD experimental design and to analyze all the results.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Microwave-assisted extraction

#### 3.1.1. Single-factor experiments

The saponins recovery and the experimental conditions of the various TSC values are summarised in Table 1. It can be observed, that the higher values of TSC correspond to the aqueous methanol (24  $\text{mg g}^{-1}$ ).

Table 1 shows, that TSC yield increase when methanol percentage increases from 20 to 50 % at constant microwave power, extraction time and liquid-solid ratio. These results mean that at higher methanol concentrations, absorbed microwave energy increases, consequently, the solvent power to dissolve saponins also increases.

Esilsson et al. (2000) reported that the differences of TSC yield are attributed to the difference in dielectric properties of the solvent which significantly influence the ability of a solvent to absorb microwave energy [1].

Methanol has a high dissipation factor ( $\tan \delta = 6400 \cdot 10^{-4}$ ), and a relatively high dielectric constant ( $\epsilon' = 33.62$ ) [1]. Hence, the aqueous

methanol can be considered as appropriate solvent for saponins extraction from starfish by MAE.

A methanol 50 % (v/v) was set for the next single-factor experiments and the range of 30–70 % (v/v) was selected for the optimization of MAE by the RSM.

Concerning the effect of irradiation, the TSC increased significantly from 39 to 55  $\text{mg g}^{-1}$  between 1–3 min, and decreases at longer irradiation times (4–8 min) with a highly significant difference (Table 1). In fact, longer irradiation by microwave induces probably thermal degradation of bioactive compounds [15,22]. The range of 1–5 min has been selected for the optimization of saponins extraction by MAE.

In case of microwave power, the TSC yield increased significantly as microwave power has increased from 100 to 200 W, then decreased with rising microwave power in tested conditions (Table 1). This effect of microwave power on TSC yield could be due to its heating effect, which induces increase of mass transfer phenomena, up to a certain microwave power value, and then thermal degradation of bioactive compounds at higher microwave power [15,22]. According to the obtained results, the 200 W power have been used for the last single-factor trials, while the range 100–300 W was selected for the RSM study.

Table 1 shows that the ratio liquid-solid significantly affected the TSC values, in way that as increasing liquid-solid ratio from 10 to 40  $\text{mL g}^{-1}$ , the TSC yield raised significantly, however higher volumes failed to increase TSC yield. This result can be explained by the fact that, the solvent volume must be just sufficient to immerse the entire sample [1]. The adequate volume of solvent increases the concentration gradient to drive the mass transfer. Based on statistical analysis, the range of 20 to 50  $\text{mL g}^{-1}$  was selected for the RSM optimization.

#### 3.1.2. Response surface methodology optimization of operating parameters

The response surface methodology (RSM) optimization has been directed to the TSC compounds involved in this present work. The experimental values of the TSC obtained from BBD trials and the corresponding predicted values according to the applied second-order regression model are shown in Table 2. The statistical analysis (ANOVA) appropriate to the second order model (Eq. (1)) is reported in Table 3.

The ANOVA analysis demonstrated that the interaction term extraction time and ratio ( $X_2 X_4$ ) was not significant ( $p > 0.399$ ), the other linear terms, quadratic and interaction was highly significant ( $p < 0.01$ ), hence the mathematical model (Eq. (4)) correlating the recovery of TSC with MAE process variables is given below excluding non-significant terms:  $\text{mg g}^{-1}$ .

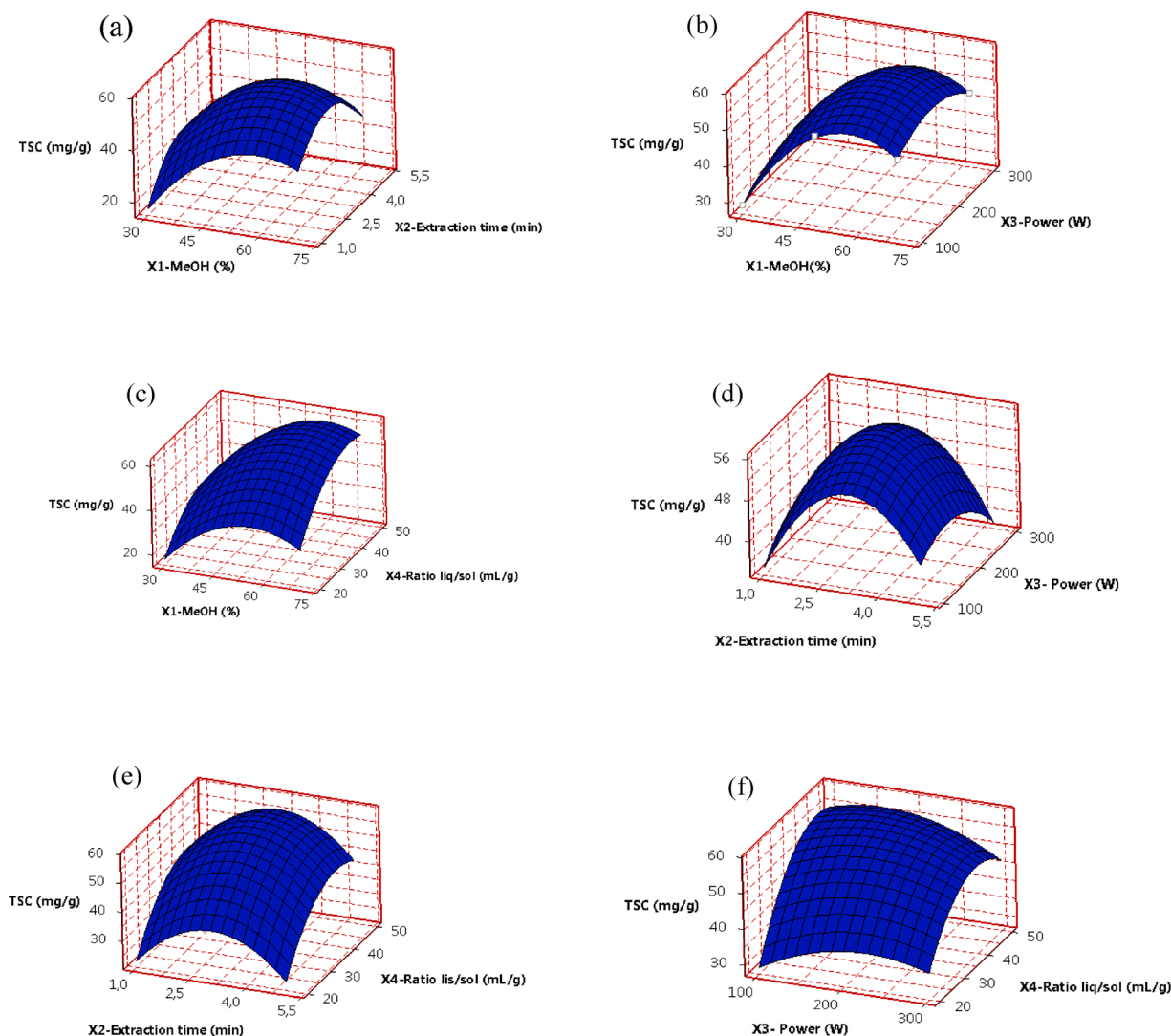
$$Y_{sap} (\text{mg g}^{-1}) = 191.66 + 3.5527X_1 + 26.56X_2 + 0.32X_3 + 3.65X_4 - 0.0597X_1X_2 - 0.0001X_1X_3 + 0.0089X_1X_4 - 0.0112X_2X_3 - 0.0022X_3X_4 - 0.03287X_1^2 - 3.5182X_2^2 - 0.0005X_3^2 - 0.0433X_4^2 \quad (4)$$

To determine whether the accuracy of mathematical model, the ANOVA analysis was conducted. The results of the statistical analysis of the second order model fitting are illustrated in Table 3. The ANOVA demonstrated that the model was highly significant.

The determination coefficient ( $R^2$ ) value of 0.9998 indicates that only 0.02 % of the total variations was not explained by the model. In addition, the adjusted determination coefficient ( $R^2 \text{ adj} = 0.9997$ ) is too close to  $R^2$ . Moreover, the value of  $R^2$  predicted is 0.9996, it is in agreement with the value of  $R^2 \text{ adj}$ . All of these figures confirm that the model is highly significant.

The lack of fit test indicates that the fitting model is adequate to describe the experimental data with the value of lack of fit test of 0.215 higher than 0.05 and not significant relative to the pure error.

Eq. (4) was used to generate the three-dimensional response surface plots (Fig. 1). The plots were obtained by plotting the in the Z-axis the



**Fig. 1.** Response surface analysis for the total saponin compound from *Echinaster sepositus* by MAE with respect to (a): methanol percentage and irradiation time, (b): methanol percentage and microwave power, (c): methanol per percentage and ratio liquid to solid, (d) microwave power and irradiation time, (e): ratio liquid to solid and irradiation time, (f): microwave power and ratio liquid to solid.

TSC against two independent variables drawn in X and Y-axes, respectively, while keeping the other independent variables at their zero level.

The amount of saponins increased significantly with the increasing methanol concentration from 30 % to around 60 %, then decreased significantly as methanol concentration increased from 60 to 70 % at all time in the range from 1 to 6 min (Fig. 1a), as microwave power increased from 100 to 200 W (Fig. 1b) and as liquid-solid ratio increased from 20 to 45 mL g<sup>-1</sup> (Fig. 1c). These results indicate that methanol concentration is a critical factor to be taken in the extraction of saponins from starfish by MAE because of its implications on the solubility of target compounds, on the microwave absorbing properties and on the interaction between solvent and matrix. The decrease in the TSC with the increase in solvent polarity which leads to the extraction of other compounds than saponins, which may give lower recoveries of saponins. Additionally, the presence of a suitable water proportion in solvent facilitates and improves extraction efficiency by promoting swelling of matrix, which is favorable to increase the contact surface area between the matrix and the solvent [23].

The important amount of saponins obtained by increasing microwave power from 100 to 200 W and the time from 1 to 3 min (Fig. 1d) can be explained by the temperature generated under these operating

conditions. These temperature improved extraction efficiency. In fact, with increasing temperature the solvent capacity to solubilize analytes increase, while surface tension and solvent viscosity decrease, such conditions improve sample wetting and matrix penetration of solvent to desorb analytes from active sites in the matrix [1,23].

Using the power range 100–300 W and higher irradiation time than 3 min, we obtained the lower amount of saponins (Fig. 1d). This result can be attributed to the increase in temperature induces by increment power and irradiation time. Higher induced temperature causes thermal degradation of saponins [1,22,23].

The adequate liquid-solid ratio for the extraction of saponins by MAE varies between 40 and 45 mL g<sup>-1</sup> for an irradiation time within the range from 2 to 3 min (Fig. 1e) and a power range of 150–200 W (Fig. 1f). On the other hand, the response surface (Fig. 1e and f) indicated that in the same conditions the extraction yields decreased for a ratio of solvent to material of 50 mL g<sup>-1</sup>. This result can be explained by the fact that solvent absorb more microwave irradiation power, leading to the dissipation of microwave energy [23].

The optimal conditions obtained for MAE process of saponins were: methanol concentration, ratio liquid-to-solid, microwave power and irradiation time of 58 %, 43 mL g<sup>-1</sup>, 176.8 W and 3 min, respectively.

The predicted saponins content under these conditions was 60.83 mg

$\text{g}^{-1}$ . The results suggested that methanol in this condition could offer the suitable vapor pressure, viscosity and surface tension of extraction solvent for the saponin-enriched extract.

In conclusion, carrying out the optimized MAE produced a saponins yield of  $60.3 \pm 0.6 \text{ mg g}^{-1}$ , that is very close to the value predicted which confirms the validity of the model (Eq. (4)).

### 3.2. Comparison between MAE, UAE and CSE

The efficiency of extraction using MAE was compared to other emerging extraction techniques (UAE and CSE).

Considering the optimal conditions, the results show that MAE was able to give a higher yield of saponins ( $60.3 \pm 0.6 \text{ mg g}^{-1}$ ), followed by the UAE with ( $18.5 \pm 0.2 \text{ mg g}^{-1}$ ), and the CSE ( $7.7 \pm 0.2 \text{ mg g}^{-1}$ ) ( $<0.005$ ). In addition, the extraction duration of MAE (3 min) was shorter than that of UAE (25 min) or CSE (24 h). From the results we can deduce that extraction efficiency by microwave was 3.3 times more than UAE extraction and was 7.8 times more than CSE extraction.

According to SEM observations after MAE, UAE and CSE (Fig. 2), we found that the three extraction processes produced changes with different extent on the physical structure of all samples. The sample after MAE was greatly destroyed suggesting that microwave irradiation played an important role in breaking up animal cell walls, rapidly releasing its content.

The low saponin yields obtained by UAE and CSE can be explained by the moderate effect of ultrasound energies and magnetic agitation on cell wall rupture (Fig. 2), this suggests that no severe fracture on starfish powder was caused during the extraction processes. In addition, the surface of the samples after UAE and CSE could be not destroyed suggesting an insignificant role in breaking up starfish cell walls.

The longer extraction time in UAE and CSE submits the extract to unfavorable conditions such as light, and oxygen. Moreover, the ultrasonication could induce free radicals formation within the liquid medium, thus causing oxidation and degradation of the active compounds

[24].

From the *in vitro* hemolytic tests, we noted that MAE extract is the most active with lower  $\text{IC}_{50}$  ( $\text{IC}_{50} = 279.9 \pm 2.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) followed by UAE saponins extracts ( $\text{IC}_{50} = 303.5 \pm 1.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and the CSE saponins extract ( $\text{IC}_{50} = 323.1 \pm 1.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Fig. S. 2). This result showed that MAE as the best technology to extract hemolytic active saponins from *E. sepositus*.

The radical quenching of  $\text{O}_2^-$  represent second-order polynomial model. A determination example of  $\text{AI}_{50}$  by electrochemistry methods was represented in Fig. 3.

The concentrations of MAE, UAE, CSE extract required to quench 50 % of  $\text{O}_2^-$  radicals, Increase in the following order: CSE ( $166.7 \pm 0.5 \text{ mg L}^{-1}$ )  $<$  UAE ( $139.8 \pm 0.6 \text{ mg L}^{-1}$ )  $<$  MAE ( $116.2 \pm 0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ).

These results indicated that as the potential antioxidant agent *E. sepositus* saponins exhibited the marked scavenging against superoxide radical and could be widely applied to decrease oxidant forces and increase antioxidant capacity. This activity is never recorded in the literature for these molecules.

### 3.3. Identification of saponins by mass spectrometry

The mass spectra of MAE extract was operated in both positive and negative ion modes by HR-ESI-MS to confirm molecular weight of saponins. Identification of saponins was more evident in the positive ion mode than in the negative one (spectra not shown), they were detected with greater sensitivity and showed intense signals in the  $m/z$  800 and 1000 range which could correspond to ionized  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  saponins (Fig. 4).

More saponins components were detected in *E. sepositus*. The saponin ions presenting the highest relative intensity in the mass spectrum was observed at  $m/z$  921.4453, followed by  $m/z$  891.4349. The  $m/z$  921.4453  $[\text{C}_{45}\text{H}_{70}\text{O}_{18}\text{Na}]^+$  (Fig. 5, (1): A, B, C) may correspond to the sepositoside A, major saponin of *E. sepositus*. The structural characteristics of sepositoside A are the presence of three saccharides in the

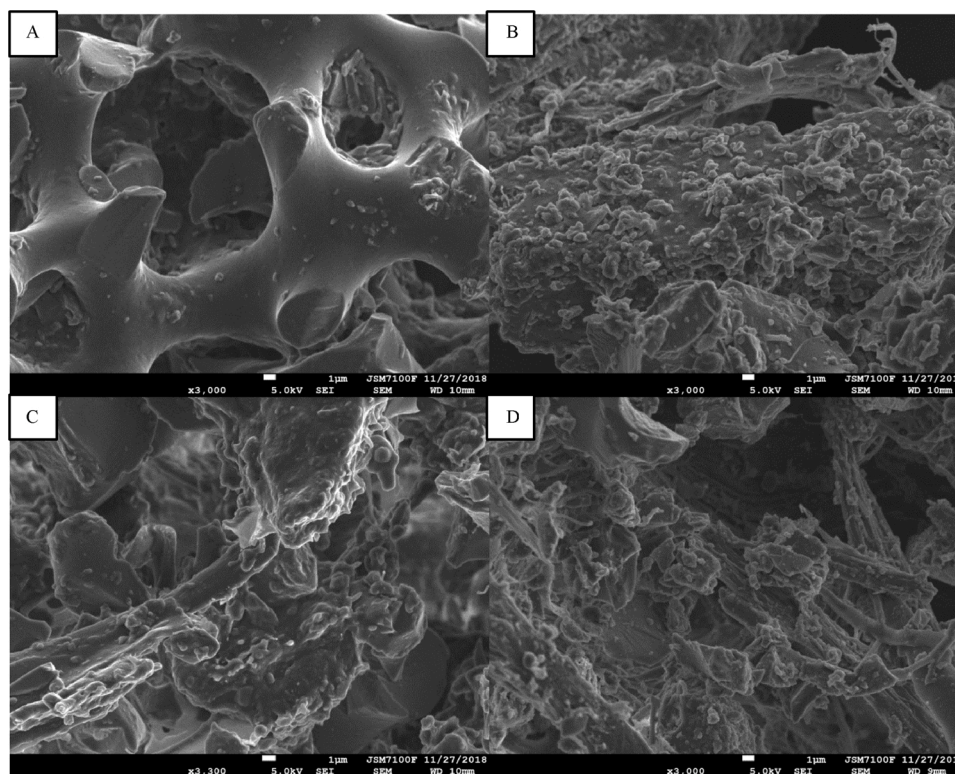


Fig. 2. Scanning electron microscope images of *Echinaster sepositus* powder before (A) and after extraction by conventional solvent extraction (B), ultrasound assisted extraction (C) and microwave assisted extraction (D).

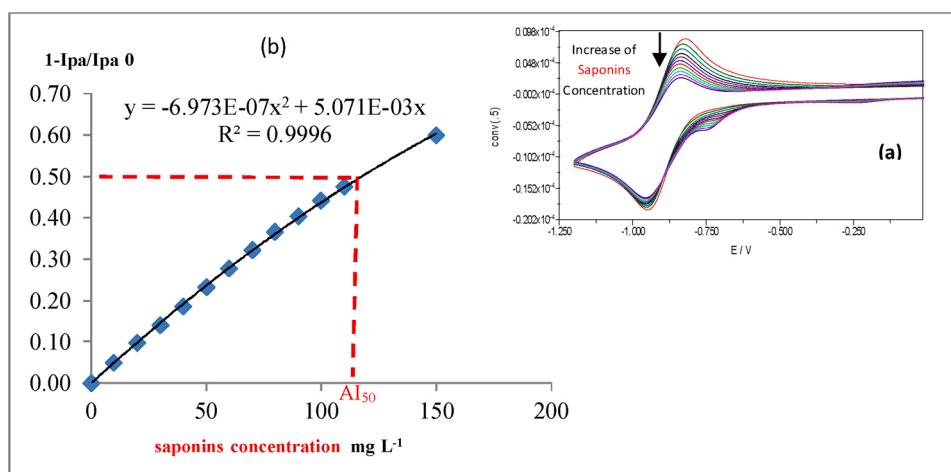


Fig. 3. Determination of  $AI_{50}$  for MAE saponins of *Echinaster sepositus* by cyclic voltmetry of  $O_2$  at a glassy carbon disk electrode in DMF/0.1 M  $Bu_4NPF_6$ . Scan rate  $0.1 \text{ Vs}^{-1}$ . (a) Cyclic voltammograms with increasing saponins concentrations; (b)  $(1-I_{pa}/I_{pa0})$  versus increasing concentrations of the saponins extract.

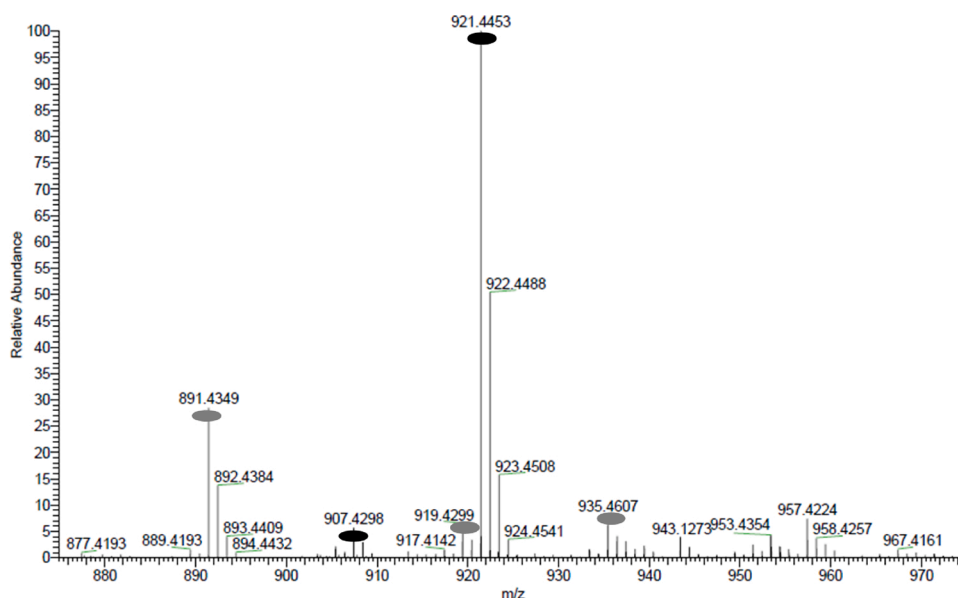


Fig. 4. ESI-MS mass spectrum (in the  $m/z$  800 and 1000 range) obtained for the MAE saponin extract from *E. sepositus*. MS signals marked by a black dot correspond to saponin congeners already identified in *E. sepositus*, while signals identified by gray dots could represent new saponins for this species.

glycone part cyclized between C-3 and C-6 of the aglycone; the presence of a glucuronic acid on the oligosaccharide unit to the aglycone moiety and the omnipresence of an aglycone of type  $\Delta^7,8-3\beta,6\beta$ -dihydroxysteroid  $\Delta^7,8-3\beta,6\beta$ -dihydroxysteroid (8-hydroxy-6-cholesta-8,14-dien-23-one) [25].

The signal  $m/z$  891.4349  $[C_{44}H_{68}O_{17}Na]^+$  could be associated to a saponin never observed for *E. sepositus*. This saponin possesses the same mass ( $m/z$ ) and raw formula as the luzonicoside saponin identified in *E. luzonicus* [26,11] (Fig. 5, (3): A, B, C). Luzonicoside A is different from sepositoside A in the glycone moiety composed of glucuronic acid, arabinose, and galactose [26].

The mass  $m/z$  907.4298  $[C_{44}H_{68}O_{18}Na]^+$  could correspond to the minor saponin of *E. sepositus* (Fig. 5, (2)). Other, additional signals,  $m/z$  935.4607  $[C_{46}H_{72}O_{18}Na]^+$ ,  $m/z$  919.4299  $[C_{45}H_{68}O_{18}Na]^+$  could correspond to a new saponin composition never observed before in *E. sepositus*.

#### 4. Conclusion

The optimization of MAE for extracting saponins from *E. sepositus* by response surface methodology achieves a significant second-order polynomial models, with regression coefficient of 0.99.

The comparative study demonstrated that the alternative methods MAE and UAE appeared to be better than CSE, allowing higher recovery yield with a shorter extraction time and a lower solvent consumption. MAE was found to be the most efficient method for the extraction of saponins from *E. sepositus* with enhanced and increased yield in 3 min extraction time. According to the SEM observation it seems that microwave irradiation causes intense tissue degradation.

From hemolytic test and antioxidant activity by electro-generated  $O_2^-$  quenching, it could be concluded that MAE extract exhibited superior in vitro activity comparing to UAE and CSE extract.

The HR-ESI-MS was successfully used to analyze the MAE crude saponins, intense signals are observed, some of them ( $m/z$  921.4453) could correspond to the compositions already identified in *E. sepositus* and the others ( $m/z$  891.4349) may refer to new saponins (not observed

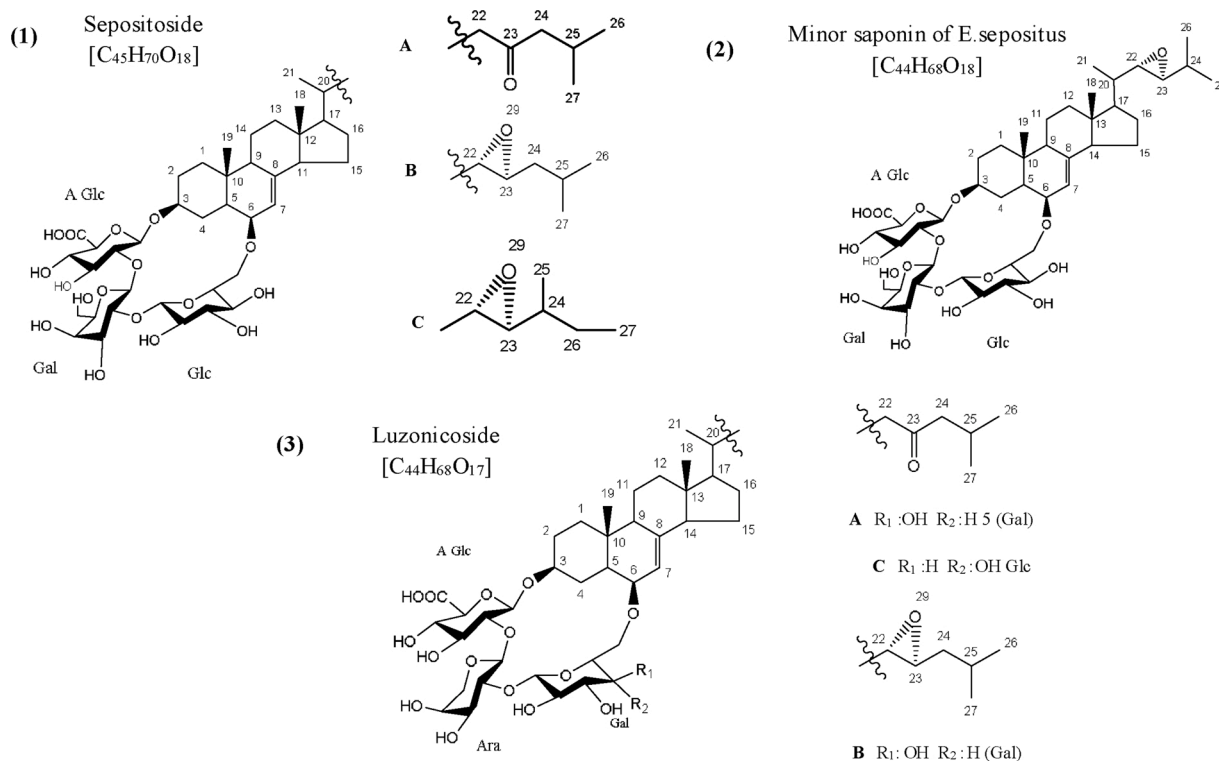


Fig. 5. Macrocyclic saponins of *Echinaster sepositus* ((1): A, B, C), minor saponin (2) of *Echinastre sepositus* [6,7]; and luzonicoside ((2): A, B, C) of *Echinastre luzonicus* [11,26].

before in *E. sepositus*).

Finally, it should be noted that it is the first time that a study on the optimization and comparison of MAE procedure for the extraction of saponins compounds from starfish.

#### Author contributions

Fouzia Houma Bachari, Didier Hauchard, Mohamed Chibane and Vincent Ferrières designed the study. Bouchra Dahmoune, Jean-Paul Guégan, Thomas Vives, and Philippe Jehan performed the experiments. Farid Dahmoune and Lotfi Mouni participated in study design, data collection and analysis. Bouchra Dahmoune and Farid Dahmoune wrote the manuscript Cherifa Akrou Aissou with the authors revised the manuscript.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

#### Acknowledgments

We would like to express our sincerest thanks to the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research, and Campus France for their scholarship within the framework of Algerian-French cooperation PROFAS B+.

We thank the staff of the laboratories who participated in the realization of this works particularly Isabelle Soutrel for their valuable technical assistance and support, and for providing facilities to realize this search.

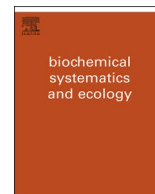
#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.cep.2021.108359>. [1]

#### References

- [1] C.S. Eskilsson, E. Bjorklund, Analytical-scale microwave-assisted extraction, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 227–250, doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00921-00923.
- [2] J.H. Kwon, J.M.R. Bélanger, J.R.J. Pare, V.A. Yaylayan, Application of the microwave-assisted process (MAP™) to the fast extraction of ginseng saponins, *Food Res. Int.* 36 (2003) 491–498, [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00197-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00197-7).
- [3] F. Dahmoune, L. Boulekbachea, K. Moussia, O. Aouna, G. Giorgia Spignob, K. Madani, Valorization of Citrus limon residues for the recovery of antioxidants: evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction, *Ind. Crops Prod.* 50 (2013) 77–88, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.013>.
- [4] F. Dahmoune, G. Spigno, K. Moussai, H. Remini, A. Cherbal, K. Madani, Pistacia lentiscus leaves as a source of phenolic compounds: microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction, *Ind. Crops Prod.* 61 (2014) 31–40, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.035>.
- [5] B.F. Achachlouei, S.Y. Azadmard-Damirchi, Z.R. Shaddel, Microwave pretreatment as a promising strategy for increment of nutraceutical content and extraction yield of oil from milk thistle seed, *Ind. Crop. Prod.* 128 (2019) 527–533, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.034>.
- [6] F. De Simone, A. Dini, E. Finamore, L. Minale, C. Pizza, R. Ruccio, F. Zollo, Starfish saponins. Part 5. Structure of seposituside A, a novel steroidal Glycoside from the starfish *Echinaster sepositus*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* (1981) 1855–1862, <https://doi.org/10.1039/p19810001855>.
- [7] R. Riccio, F. De Simone, A. Dini, L. Minale, C. Pizza, F. Senatore, F. Zollo, Starfish saponins VI-unique. 22, 23-epoxysteroids, Cyclic Glycoside, Minor constituents from *Echinaster sepositus*, *Tetrahedron Lett.* 22 (16) (1981) 1557–1560, [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)90377-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)90377-6).
- [8] K. Hostettmann, A. Martson, *Chemistry & pharmacology of natural products. Saponins*, Cambridge University Press, New York, 1995.
- [9] M.S. Maier, Biological activities of sulfated glycosides from echinoderms, *Stud. Nat. Prod. Chem.* 35 (2008) 311–354, [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(08\)80008-7](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(08)80008-7).
- [10] H.F. Tang, H.Y. Yi, L. Li, P. Sun, S.Q. Zhang, Y.P. Zhao, Bioactive asterosaponins from the starfish *Culcita novaeguineae*, *J. Nat. Prod.* 68 (2005), <https://doi.org/10.1021/np0401617>, 337–34.
- [11] A.A. Kicha, A.I. Kalinovsky, T.V. Malyarenko, N.V. Ivanchina, P.S. Dmitrenok, E. S. Menchinskaya, E.A. Yurchenko, E.A. Pisyagin, D.L. Aminin, T.T.T. Huong, F. Q. Long, V.K. Stonik, Cyclic steroid glycosides from the starfish *Echinaster luzonicus*: structures and immunomodulatory activities, *J. Nat. Prod.* 7 (2015) 1397–1405, <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00332>.

- [12] O.S. Malyarenko, S.A. Dyshlovoy, A.A. Kicha, N.V. Ivanchina, T.V. Malyarenko, B. Carsten, V.A. Gunhild, V.A. Stonik, S.P. Ermakova, The inhibitory activity of luzonicosides from the Starfish *Echinaster luzonicus* against human melanoma cells, *Mar. Drugs* 15 (277) (2017) 2–11, <https://doi.org/10.3390/md15070227>.
- [13] S. Van Dyck, P. Gerbaux, P. Flammang, Elucidation of molecular diversity and body distribution of saponins in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata) by mass spectrometry, *Comp. Biochem. Physiol.* 152 (2) (2009) 124–134, <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.10.011>.
- [14] D.R. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics: a Ready-reference Book of Chemical and Physical Data*, Edition CRC Press, London, 2009.
- [15] J.H. Kwon, J.M.R. Bélanger, J.R.J. Paré, V.A. yaylayan, Application of the microwave-assisted process (MAPTM) to the fast extraction of ginseng saponins, *Food Res. Int.* 36 (5) (2003) 491–498, [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00197-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00197-7).
- [16] S. Apers, S. Baronikova, J.B. Sindambiwe, M. Witvrouw, E.D. Clercq, D.V. Berghe, E.V. Marck, A. Vlietinck, L. Pieters, Antiviral, Haemolytique and molluscicidal activities of triterpénoïde saponins from *Maesia lanceolata*. Establishment of structure-activity relationships, *Planta Med.* 67 (2001) 528–532, <https://doi.org/10.1055/s-2001-16489>.
- [17] C. Le Bourvelec, D. Hauchard, A. Darchen, J.L. Burgot, M.L. Abasq, Validation of a new method using the reactivity of electrogenerated superoxide radical in the antioxidant capacity determination of flavonoids, *Talanta* 75 (4) (2008) 1098–1103, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.01.007>.
- [18] A. René, M.L. Abasq, D. Hauchard, P. Hapiot, How do phenolic compounds react toward superoxide? A simple electrochemical method for evaluating antioxidant capacity, *Anal. Chim.* 82 (2010) 8703–8710, <https://doi.org/10.1021/ac101854w>.
- [19] N. Blanc, D. Hauchard, L. Audibert, E. Ar Gall, Radical-scavenging capacity of phenol fractions in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*: an electrochemical approach, *Talanta* 84 (2011) 513–518, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.01.034>.
- [20] F. Brahmi, D. Hauchard, N. Guendouze, K. Madani, M. Kiendrebego, L. Kamagaju, C. Stevigny, M. Chibane, P. Duez, Phenolic composition, in vitro antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species, *Ind. Crop. Prod.* 74 (2015) 722–730, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.038>.
- [21] B.N. Guendouze, K. Madani, M. Chibane, M.L. Boulekbache, D. Hauchard, M. Kiendrebego, C. Stevign, P.N. Okusa, P. Duez, Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities of three Ericaceae from Algeria, *Ind. Crops Prod.* 70 (2015) 459–466, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.053>.
- [22] Z. Hu, M. Cai, H.H. Liang, Desirability function approach for the optimization of microwave-assisted extraction of saiko saponins from *Radix bupleuri*, *Sep. Purif. Technol.* 6 (2008) 266–275, <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.10.016>.
- [23] J. Li, Y.G. Zu, Y.J. Fu, Y.C. Yang, S.M. Li, Z.N. Li, M. Wink, Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11 (2010) 637–643, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.06.004>.
- [24] K. Hayat, S. Hussain, S. Abbas, U. Farooq, B. Ding, S. Xia, C. Jia, X. Zhang, W. Xia, Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro, *Sep. Purif. Technol.* 70 (2009) 63–70, <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2009.08.012>.
- [25] L. Minale, R. Riccio, F. De Simone, A. Dini, C. Pizza, E. Ramundo, Starfish saponins I. 3 $\beta$ -HYDROXY-5 $\alpha$ -CHOLESTA-8, 14-DIEN-23-ONE, the major genin from STARFISH *Echinaster sepositus*, *Tetrahedron Lett.* 19 (29) (1978) 2609–2612, [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)94842-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)94842-7).
- [26] R. Riccio, A. Dini, L. Minale, C. Pizza, F. Zollo, T. Sevenet, Starfish saponins VII. Structure of luzonicoside, a further steroidal cyclic glycoside from the pacific starfish *Echinaster luzonicus* 1, 2, *Experientia* 38 (1982) 68–70, <https://doi.org/10.1007/BF01944532>.



## Saponin contents in the starfish *Echinaster sepositus*: Chemical characterization, qualitative and quantitative distribution

Bouchra Dahmoune<sup>a,b,c,\*\*</sup>, Fouzia Bachari-Houma<sup>a</sup>, Mohamed Chibane<sup>c</sup>, Philippe Jehan<sup>d</sup>, Jean-Paul Guegan<sup>b</sup>, Farid Dahmoune<sup>e,f</sup>, Cherifa Aissou-Akrour<sup>a</sup>, Lotfi Mouni<sup>c</sup>, Vincent Ferrières<sup>b</sup>, Didier Hauchard<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Marine and Coastal Ecosystems, École Nationale des Sciences de La Mer et de L'aménagement du Littoral ENSSMAL, Alger, Algeria

<sup>b</sup> Univ Rennes, École Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, CNRS, UMR 6226 - Institut Sciences Chimiques Rennes, Rennes, France

<sup>c</sup> Laboratory for the Management and Valorisation of Natural Resources and Quality Assurance, Akli Mohand Oulhadj University of Bouira, Algeria

<sup>d</sup> SCANMAT UMS 2001, CRMPO, Université de Rennes 1, Rennes, France

<sup>e</sup> Laboratoire de Biomathématique, Biophysique, Biochimie, et Scientométrie (L3BS), Faculté des Sciences de La Nature et de La Vie, Université de Bejaia, 06000, Bejaia, Algeria

<sup>f</sup> Département de Biologie, Faculté des Sciences de La Nature et de La Vie et des Sciences de La Terre, Université de Bouira, 10000, Bouira, Algeria

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Asteroidea

*E. sepositus*

Saponins

Electrospray ionization spectrometry

Qualitative distribution

Quantitative distribution

### ABSTRACT

In this study, we report the inter-organ, the sexual and the seasonal variability, of saponins contained in the common Mediterranean starfish *Echinaster (Echinaster) sepositus*. Saponins were extracted from five distinct body components namely the stomach, the pyloric caeca, the gonads, the oral body wall and aboral body wall. Of both sexes (males and females) collected at different seasons, the saponins mixtures were analyzed by Mass spectrometry (HR-ESI-MS and HR-ESI-MS/MS). Semi-quantitative approach was performed to estimate the variability of the saponin amounts. Our results demonstrated that the diversity of saponins in *E. sepositus* is higher than previously reported. We highlighted 11 different saponins, including 9 new congeners. Presumptive molecular structures are proposed for 6 molecules on the basis of key-fragmentations identified by HR-ESI-MS/MS. The comparison of the saponin contained in the five different body components revealed that minimum 3 saponins are common in all tissues. In addition, qualitative and quantitative variability of saponins compounds were linked to the organ, sex and the collecting season. The relative highest level of saponins was found in the stomach on the period of active feeding (winter). The significant higher levels of saponins were found in the gonads and oral body wall on the spawning period (summer). Generally, a great inter-organ, sexual and seasonal variability was found in both sexes. These results suggest that saponins probably fulfill several biological functions in *E. sepositus*.

### 1. Introduction

Asteroids (sea stars) are one of the few marine organisms (sea cucumber and sponge) that contain saponin, in their organs. Numerous studies on starfish saponins reported that these compounds possess a wide variety of pharmacological activities (antibacterial, antifungal, antiviral and anti-tumor activities) (Kalinin et al., 1996; Stonik et al., 1999; Kicha et al., 2015; Malyarenko et al., 2017); and biological functions as inter-specific chemical communication and chemical

defense (Mackie et al., 1968; Demeyer et al., 2014). These compounds have a large chemical diversity, including, polyhydroxylated steroids, with carbohydrate chain consisting of one to three sugars; steroid oligoglycosides (asterosaponins) with five or six sugars in a carbohydrate chain; cyclic glycosides with a trisaccharide chain, cyclized between C-3 and C-6 of the aglycone moiety,  $\Delta^7,8-3\beta,6\beta$ -dihydroxysteroid.

Cyclic saponins are discovered in the two species of the genus *Echinaster* (*E. sepositus* and *E. luzonicus*) (De Simone et al., 1981; Riccio et al., 1981, 1982). Since more than 30 years, these saponins have been

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author. Laboratory of Marine and Coastal Ecosystems, École Nationale des Sciences de La Mer et de L'aménagement du Littoral ENSSMAL, Alger, Algeria.

E-mail addresses: [bouchra.dahmoune@yahoo.fr](mailto:bouchra.dahmoune@yahoo.fr) (B. Dahmoune), [didier.hauchard@ensc-rennes.fr](mailto:didier.hauchard@ensc-rennes.fr) (D. Hauchard).

<https://doi.org/10.1016/j.bse.2021.104262>

Received 31 October 2020; Received in revised form 5 March 2021; Accepted 9 March 2021

Available online 30 March 2021

0305-1978/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

used as chemotaxonomic markers of the genus *Echinaster*. Recently, cyclic saponins were isolated from tropical starfish *Leiaster* sp. This finding indicates that cyclic are more widely distributed in starfish than the two species of the genus *Echinaster* (Malyarenko et al., 2016). To date, nine representatives of cyclic saponins have been discovered from the starfish *E. sepositus* (De Simone et al., 1981; Riccio et al., 1981) and *E. luzonicus* (Riccio et al., 1982; Kicha et al., 2015) (Fig. 1).

Seven saponins have been identified in *E. sepositus* common sea star living in the Mediterranean, including four cyclic saponins. Sepositoside A is a major cyclic saponin from *E. sepositus*, containing glucuronic acid, glucose and galactose in the glycone part chain.

This trisaccharide chain is attached to the steroid aglycone by a glycosidic bond at C-3 and by ether bond at C-6.

Three minor cyclic saponins were also isolated from *E. sepositus*. They differ from sepositoside A only in the structures of the aglycone moiety,

characterized by 22, 23-epoxy functionalities in the side chains (Fig. 1). The three other compounds are isomers of minor's cyclic ones that lose the ether bond between the C-6 of the aglycone and C-6 of Glc of the trisaccharide chain, leading to appearance of a double bond between the C-7 and C-8 of the aglycone (Fig. 1) (De Simone et al., 1981; Riccio et al., 1981).

De Simone et al., 1981 and Riccio et al. (1981), when investigating *E. sepositus*, they extracted saponins from whole specimens, without comparison between different body components. Indeed, authors have not dealt with saponins in the various body components of *E. sepositus*. Several studies on starfish species other than *E. sepositus* have suggested that each organ would possess its own saponin mixture, and highlighted remarkable qualitatively and quantitatively differences among the saponin mixtures (Mackie et al., 1977; Voogt and Van Rheenen, 1982; Kisha et al., 2001; Demeyer et al., 2014; Popov et al., 2019). This

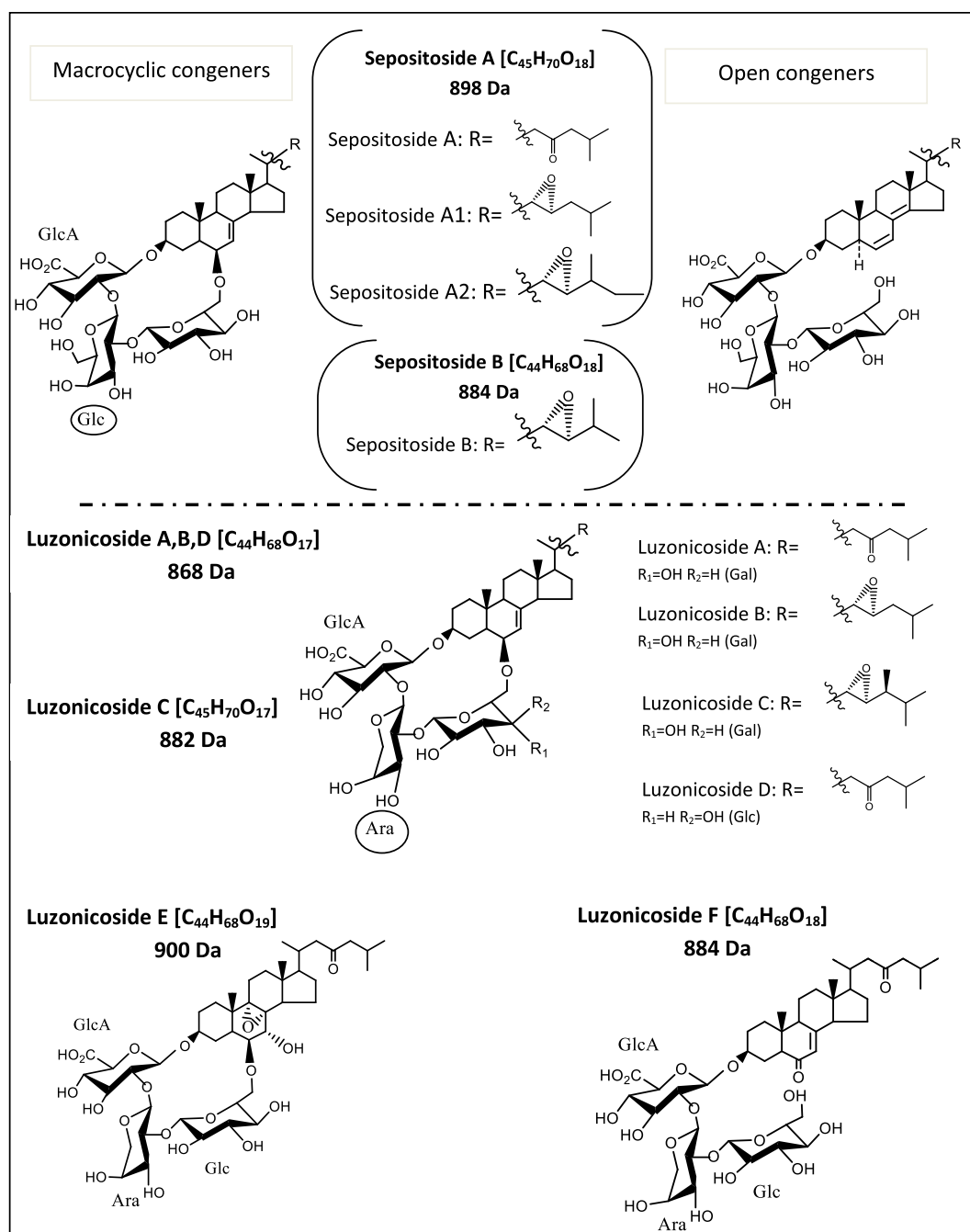


Fig. 1. Sepositoside from *E. sepositus* (De Simone et al., 1981; Riccio et al., 1981) and luzonicoside from *E. luzonicus* (Kicha et al., 2015).

indicates that starfish saponins would be involved in chemical defense, digestion and reproduction.

Since 1981, no further investigation of *E. sepositus* saponins has been reported. In this study, we investigated the specific distribution of saponins compounds in the various body components of *E. sepositus* collected on the Algerian coast. Our approach was to determinate the heterogeneity inter-organs, sexual difference and seasonal variation of the saponins distribution, by analyzing separately saponins extracts of five different body components (stomach, pyloric caeca, gonads, oral body wall and aboral body wall) from both sexes (males and females) collected at different seasons (winter, spring, summer and autumn).

Recent studies have demonstrated that mass spectrometry (MS and MS/MS analysis) procedures represent very valuable techniques in respect to fragmentation mechanism and rapid determination of native saponins in extract mixture (Van Dyck et al., 2009, 2010a, 2010b; Demeyer et al., 2014; Grauso et al., 2019). Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS) has been established as a powerful tool for the profiling of saponin mixtures, which may somewhat avoid the time-consuming steps in the isolation of saponins (Schoepke et al., 1996).

In this study, high resolution mass spectrometry experiments (HR-ESI-MS and HR-ESI-MS/MS) were used to detect and analyze saponins. A semi-quantitative study was performed to compare total saponin contents between different organs, sexes and seasons.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Biological materials

Individuals of *Echinaster* (*Echinaster*) *sepositus* (Retzius, 1783) were sampled monthly (September 2017 to September 2018), between 5 and 10 m in depth, on the rocky shore the Algerian coast. The site (36°49'17" N, 3°0'37" E) is located in the Bay of Algiers (Pointe Pescade). The individuals of starfish were separately transported in plastic bags containing sea water. At the laboratory, they were rapidly dissected. Identification of sexes was performed according to Riesgo et al. (2011), based on a color of the gonads being dark red in females and yellow in males. The organs of both sexes (stomach, pyloric caeca, gonads, oral body wall and aboral body wall) were recovered, weighted, freeze-dried, ground and stored in dark waterproof tubes inside a dissector until use.

### 2.2. Saponins extraction and purification

The saponins were extracted from the different organs of both sex (stomach, pyloric caeca, gonads and bodywall: aboral face and oral face) of the starfish *E. sepositus* by microwave assisted extraction using a multimode microwave oven (NN-S674MF, Samsung, Malaysia). The operating conditions selected for microwave-assisted extraction were: 25 min, 60% methanol, liquid-solid ratio 44 mL.g<sup>-1</sup>, and microwave power 177 W (Dahmoune et al., 2019). The extract obtained at the end of microwave irradiation was filtered with a Büchner flask through No. 1 Whatman paper under vacuum. The filtrate was evaporated at low pressure in a double boiler at 30 °C using a rotary evaporator (RE301 – Stuart). The residues were recovered and dissolved in milli-Q water (aqueous crude extract) to undergo different purification steps. The extracts were purified according to the method reported in the literature (Van Dyck et al., 2009). The aqueous crude extract was partitioned by using the liquid-liquid extraction method. Three organic solvents, *n*-hexane (0.09 D), dichloromethane (1.60 D) and chloroform (1.04 D) were conducted respectively to partition crude extracts. Saponins were maintained in methanol phase (1,70 D) for each one of these extractions (Lide, 2009). In fact, the aqueous crude extracts were dried by using rotary evaporation (RE301 – Stuart, UK). Then dry extracts were solubilized in 20 ml of methanol 90% followed by liquid-liquid partitioning in *n*-hexane (v/v) to eliminate lipids and fatty acid. The methanol fractions were recovered and adjusted with water corresponding to 20%

of the methanolic volume. After that, this later was mixed with an equal volume of dichloromethane. After decantation, the dichloromethane fraction was removed and the hydromethanolic phase was adjusted with 40% of water. Then, the liquid-liquid partitioning procedure for a remaining hydromethanolic phase was continued by adding in a separatory funnel a chloroform (v/v) that was stirred and left at rest for 3 h minimum. After the sample decantation process, the lower phase was removed and the resulting hydromethanolic upper phase was evaporated under rotary evaporation to evaporate the solvents. Then, the obtained dry extracts were dissolved in 5 ml distilled water, which was transferred to chromatography column packed with Amberlite XAD-4 (Sigma- Aldrich St. Louis, MO, USA). The column was then washed with 100 ml of distilled water to remove any organic salts. The absorbed fraction saponins were eluted with 100 ml of methanol.

Finally, the obtained methanolic fractions were evaporated to remove the methanol solvent; the dry extracts were then dissolved in 5 ml of distilled water. The resulting aqueous solution obtained previously was mixed in a separatory funnel with 5 mL *iso*-butanol solvent that was blended and left at rest for 2 h. After this period, the upper saponins-rich phase was separated from lower phases, then, the *iso*-butanol solvent was evaporated in a rotary evaporator. Finally, the dry recovered extract was dissolved in distilled water and lyophilized.

### 2.3. Mass spectrometry analysis

High resolution mass spectrometry experiments (HR-ESI-MS and HR-ESI-MS/MS) were performed on a Thermo Fisher Scientific Q-Exactive mass spectrometer, in both positive and negative ionization modes by direct infusion using Electrospray ionization source (ESI+/-).

MS and MS/MS experiments were performed at the higher resolution of the instrument (140,000 at *m/z* 200). Elementary composition of the ions was determined using instrument software (Xcalibur). The saponin extracts were prepared using a concentration of 10–20 µg mL<sup>-1</sup> and the flow rate was 5–10 µL min<sup>-1</sup>.

ESI conditions parameters were as follows: spray voltage 3–4 kV, capillary temperature 300 °C, sheath gas flow rate 10–80, auxiliary gas flow 0–10, SLens RF Level 100.

The single-stage ESI-MS spectra were recorded by scanning 150–2000 *m/z* mass range.

For the ESI-MS/MS experiments, the interest ions were mass-selected with a window of 0.4 D. The [M+Na]<sup>+</sup> of each ion was selected as a precursor and they were submitted to collision energy. Optimized conditions were obtained by decrease of 2/3 intensity of the parent ion to obtain the better MS/MS fragment ions.

The relative intensities are calculated by comparing the peak intensity of each saponin ion to the most intense saponin ion signal (set at 100%).

### 2.4. Semi-quantitative study

A semi-quantitative approach has been realized in order to obtain data on the total saponin content in *E.sepositus*. The aim of this approach was to quantify the concentration of the whole saponin mixture, for each body compartment of each sex collected in different seasons. The saponins amount was determinate according to the Food Standard Code (Kwon et al., 2003). The round bottom flask was dried at 105 °C, cooled in desiccators, and weighed to a constant weight before its freeze-drying. Once the lyophilization was completed, the flasks were weighed again. The difference in weights corresponds to the total saponin amount of the sample (mg T<sub>sap</sub>). The saponins were recovered in the form of white residues.

The total saponins compound yield (TSC) was expressed in mg.g<sup>-1</sup> and calculated from the total saponin amount (T<sub>sap</sub>) and starfish powder dry, according to the following equation (Eq. (1)):

$$\text{TSC}(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}) = \frac{\text{mg Tsap}}{\text{g starfish powder}} \quad (1)$$

Saponin concentrations have been expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD). The Data obtained was statistically assessed by ANOVA and Tukey's post hoc test for means discrimination (95% confidence level). The difference in saponins amounts was taken significant and at  $p < 0.05$ . The Minitab software was used to analyze all the results.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Qualitative study

##### 3.1.1. HR-ESI-MS analysis

HR-ESI-MS technique was used for direct detection and analysis of saponin mixtures. The major peaks in mass spectra were in accordance in ESI (+) ionization mode with  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ions which makes them easier to analyze. The full-scan HR-ESI-MS mass spectrum of the saponins extract obtained from different organs of *E. sepositus* showed intense signals in the  $m/z$  800–1000 range and corresponding potentially to ionized saponins. As a typical example, the ESI mass spectrum of the saponin extract obtained from the oral body wall of female's individuals is presented in (Fig. 2), and the accurate mass data are shown in Table 1. The mass accuracies obtained for all full-scan MS were within 1 ppm ( $\leq 1$  ppm in most cases).

This spectrum displays 6 peaks that could correspond to ionized  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  saponins. The 6 ions were detected at  $m/z$  891.4354, 907.4298, 921.4455, 935.4612, 939.4564, and 953.3867.

The molecular Formulae of these peaks (Table 1) were obtained by analyzing its high-resolution mass.

The isotopic mass profiles were utilized to deduce the molecules weights (M.Ws) of peaks. For instance, the 1Da mass difference and the descending intensities for ions peaks (921.4451, 922.4488, 923.4517) (Fig. S1) agree well with the properties of the isotopic ions. Consequently,  $m/z$  921.4451 with a higher intensity was preliminarily determined as the real pseudo-molecular ion of this peak.

The relative intensities of the peaks were different, suggesting that saponins are present in different proportions in the organ (Table 1). The most intense signal is detected at  $m/z$  921.4455 as a sodium cation adduct and seems to be the most abundant saponins in the oral body wall. The less intense signals are detected at  $m/z$  907.4298 and 939.4564.

The saponin detected at  $m/z$  921.4455 and 907.4298, and marked by a black dot on the HR-ESI-MS spectrum are likely to correspond to the compositions already identified in *E. sepositus* by Minale et al. (1978), Minale et al. (1979), De Simone et al. (1981) and Riccio et al. (1981). The  $m/z$  921.4455  $[\text{C}_{45}\text{H}_{70}\text{O}_{18} \text{Na}]^+$  may correspond to the sepositoside A, the major saponin of *E. sepositus*, while the mass  $m/z$  907.4298  $[\text{C}_{44}\text{H}_{68}\text{O}_{18} \text{Na}]^+$  could correspond to the minor saponin of *E. sepositus* already described by Riccio et al. (1981), which provisionally named sepositoside B (Fig. 1). It should be noted that the two molecules sepositoside A and B are different only at the level of the lateral chain of the aglycone (Fig. 1).

The ions marked by gray could be related to new saponins. For example, the signal  $m/z$  891.4354  $[\text{C}_{44}\text{H}_{68}\text{O}_{17} \text{Na}]^+$  could be considered as a saponin never observed for *E. sepositus*. This saponin possesses the same mass ( $m/z$ ) and raw formula as the luzonicoside A saponin isolated from *E. luzonicus* (Riccio et al., 1982; Kicha et al., 2015) (Fig. 1).

**3.1.1.1. Distribution of saponins ions in body components of the starfish *E. sepositus*.** The starfish saponins are not distributed uniformly among body components. Each organ would possess its own saponin mixture (Demeyer et al., 2014; Popov et al., 2019).

In addition to the saponins detected in oral body wall at  $m/z$  891.4354, 907.4298, 921.4455, 935.4612, 939.4564, and 953.3828, three other ones were obtained from the pyloric caeca, gonads and aboral body at  $m/z$  909.4455, 919.4298 and 937.4397. Tables 1 and 2 and Table S1 in supplementary data features the detailed distribution of these saponins ions in the different organs of different animals, i.e. females vs males, collected at different moments (winter, spring, summer and autumn). It appears that saponins ions detected at  $m/z$  921.4455,

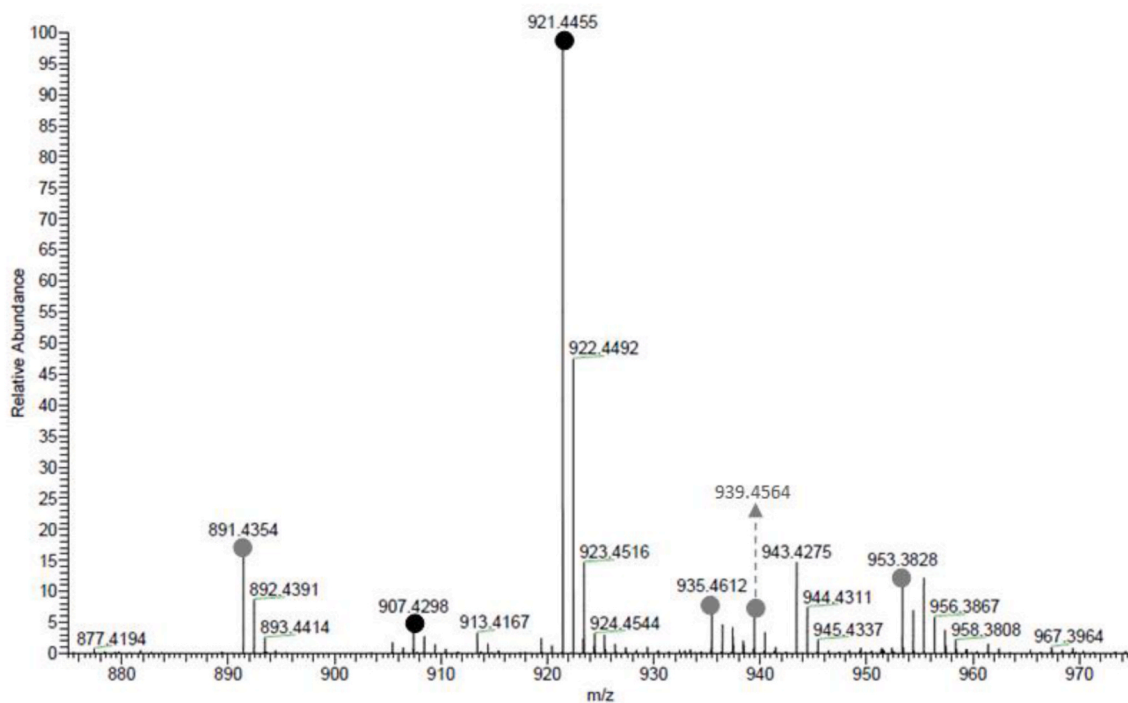


Fig. 2. HR-ESI-MS analysis of saponins extracted from the oral body wall of female's individuals of *E. sepositus*. The  $m/z$  ratio of each saponin is annotated. MS signals marked by a black dot correspond to saponin congeners already identified in *E. sepositus* while signals identified by gray dots could represent new saponins for this species (see text for details). Most of the other peaks correspond to matrix adducts.

**Table 1**HR-ESI-MS data of saponin extract obtained from the oral body wall of female's individuals. of *E. sepositus*.

Saponins	compositions	Theoretical mass ( <i>m/z</i> )	Measured mass ( <i>m/z</i> )	Mass error (ppm)	Relative intensity (%)
Luzonicoside A	C <sub>44</sub> H <sub>68</sub> O <sub>17</sub> Na	891.4349	891.4354	1	19
Sepositoside B	C <sub>44</sub> H <sub>68</sub> O <sub>18</sub> Na	907.4298	907.7298	0	7
Luzonicoside F	C <sub>45</sub> H <sub>70</sub> O <sub>18</sub> Na	921.4454	921.4455	0	100
Saponin A	C <sub>46</sub> H <sub>72</sub> O <sub>18</sub> Na	935.4610	935.4621	1	10
Saponin C	C <sub>46</sub> H <sub>72</sub> O <sub>19</sub> Na	939.456	939.4568	1	8
Saponin D	C <sub>45</sub> H <sub>70</sub> O <sub>20</sub> Na	953.4352	953.4351	0	15

**Table 2**Saponin congeners detected in the different organs of *E. sepositus* (STO: stomach; CAE: pyloric caeca; GON: gonads; OBW: oral body wall; ABW: aboral body wall) from different sexes (♂: males individuals; ♀: females individuals) collected at different seasons (a: all seasons; Wn: winter; Sp: spring; Sm: summer; At: autumn). (S: molecular structure; MW: molecular weight).

Saponins	MW (Da)	[M+Na] <sup>+</sup>	composition	S	CID Key signals				Body distribution				
					523	374	493	317	STO	CAE	GON	OBW	ABW
Luzonicoside A	868	891	C <sub>44</sub> H <sub>68</sub> O <sub>17</sub> Na	4			X	X	♀♂, a	♀♂, a	♀♂, a	♀♂, a	♀♂, a
Sepositoside B	884	907	C <sub>44</sub> H <sub>68</sub> O <sub>18</sub> Na	1	X	X			♀♂, a	♀♂, a	♀♂, a	♀♂, a	♀♂, a
Luzonicoside F				7			X	X	♀♂, a	♀♂, a	♀♂, a	♀♂, a	♀♂, a
Unidentified	886	909	C <sub>44</sub> H <sub>70</sub> O <sub>18</sub> Na						♀♂, a	♀♂, Sp,Sm			
Unidentified	896	919	C <sub>45</sub> H <sub>68</sub> O <sub>18</sub> Na		X	X				♀♂, Wn,Au	♀, Wn, Au		♀♂, Sp, Sm
Unidentified							X	X		♀♂, Wn,Au	♀, Wn, Au		♀♂, Sp, Sm
Unidentified										♀♂, Sp, Sm			
Sepositoside A	898	921	C <sub>45</sub> H <sub>70</sub> O <sub>18</sub> Na	2	X	X			♀♂, a	♀♂, a	♀♂, a	♀♂, a	♀♂, a
Saponin A	912	935	C <sub>46</sub> H <sub>72</sub> O <sub>18</sub> Na	3	X	X					♀♂, a	♀♂, a	
Saponin B	914	937	C <sub>45</sub> H <sub>70</sub> O <sub>19</sub> Na	5	X	X			♀♂, a	♀♂, a			♀♂, a
Saponin C	916	939	C <sub>44</sub> H <sub>68</sub> O <sub>20</sub> Na	6	X	X			♀♂, a	♀♂, a	♂, Wn, Au	♀♂, a	♀♂, a
Saponin D	930	953	C <sub>45</sub> H <sub>70</sub> O <sub>20</sub> Na	8	X	X					♀♂, a	♀♂, a	

891.4354, and 907.4298 are common to all tissues in both sexes at different seasons. Although these congeners are found in all organs, some saponins are restricted to one or two organs. For instance, the *m/z* 935.4612 and 953.3828 saponins ions are associated to the saponins composition of gonads and orals body wall.

Although these saponins ions were detected at the same *m/z* ratios, the relative intensities in the different spectra showed some difference between organs sex and season.

Fig. 3 describes the distribution and the relative intensity of the saponin ions (*m/z*) of the five selected organs for males and females collected at different seasons.

Considering inter-organs variability, the relative intensity of the saponin ions (*m/z*) indicated a significant difference among the five studied organs, except the saponins ions *m/z* 921.4455, which is the most represented saponin ions in all organs. These results confirm the inter-organ heterogeneity of the saponin contents in *E. sepositus*.

When comparing the composition and the relative abundance of the saponins ions of each body compartment between male and female individuals, we observed that the only organs in which there is important sexual variation are the gonads collected in winter and autumn. In fact, saponin ions that detected at *m/z* 919.4298 were restricted to female gonads saponins, while that detected at *m/z* 939.4564 characterized the male gonads. In addition, the relative abundance of saponin associated to the *m/z* 891.4354 and 953.3828 appear different in female and male gonads.

Considering seasonal variations in both sexes, the composition and the proportion of the saponins ions of stomach and oral body wall in both sexes do not show real variation. While, the pyloric caeca, the gonads and the aboral body wall have two homogeneous compositions, the first one is associated to winter and autumn, the second one is associated to spring and summer (Table 2).

The peak of the highest intensity in all organs was always detected at *m/z* 921.4354 and closely followed by the saponin ions at *m/z* 891.4354 (Fig. 3). Accordingly, the saponin ions detected at *m/z* 921.4354, 891.4354, were the most abundant molecules whatever the body component considered. These *m/z* 891.4354 ions were more intense in

the stomach and pyloric caeca extracts than in the other body compartments.

De Simone et al., 1981 and Riccio et al. (1981) who studied saponins from *E. sepositus* described 7 saponins for this species (Fig. 1) without considering the differences among body components. The reported saponins were: the major sepositoside A ([M + Na]<sup>+</sup>; *m/z* 921) as the major one with its four isomers, and the sepositoside B of *E. sepositus* ([M + Na]<sup>+</sup>; *m/z* 907) and its own isomer. Considering only the *m/z* value of the ions detected in the first-order ESI mass spectrum (Fig. 2), it appears that the saponins reported by De Simone et al., 1981 and Riccio et al. (1981) were also observed in our saponins extract at *m/z* 921.4354 and 907.4298. The saponin molecule associated with the *m/z* 891.4354 ions is identified as luzonicoside in the starfish of the same genus *E. luzonicus* (Riccio et al., 1982; Kicha et al., 2015).

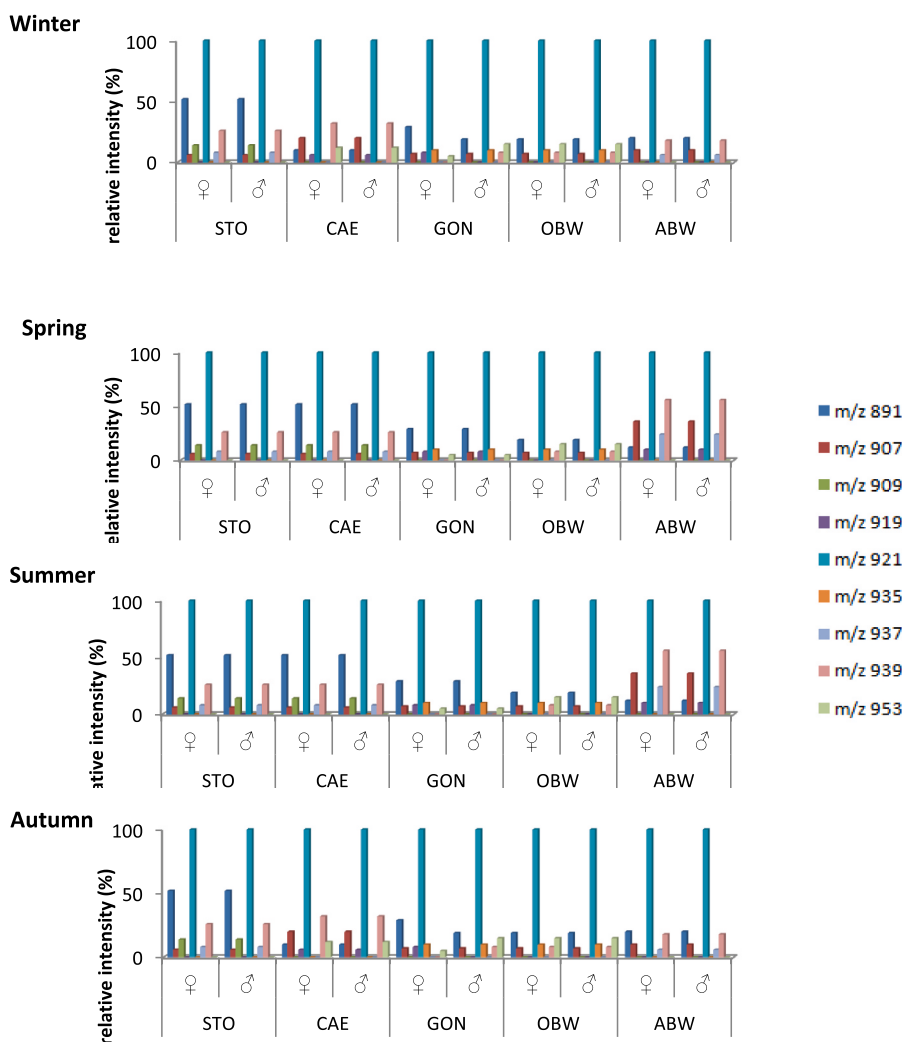
De Simone et al., 1981; Riccio et al. (1981); Riccio et al. (1982) and Kicha et al. (2015) described the molecular structures of sepositoside and luzonicoside. These studies were taken as a starting point to identify saponins in the present work. To validate that signals detected in the full-ESI mass spectrum really correspond to saponins ions, HR-ESI-MS/MS analyses were undertaken for each *m/z* ratio.

### 3.1.2. HR-ESI-MS/MS analysis and identification of new saponins

Exact structures cannot be deduced from mass spectrometry data only. Detailed fragmentation analysis with accurate mass measurement allowed for characterizing and to proposing tentative structures for the detected compounds.

On the basis of HR-ESI-MS analyses we observe 9 new saponin congeners that were until now not reported in the literature for *E. sepositus*. The corresponding saponins are detected at following ions signals *m/z* 891.4354, 907.4298, 909.4455, 919.4298, 935.4612, 937.4397, 939.4564 including two isomers at 907.4298 and 919.4298 *m/z* rations.

Based on MS/MS analysis, fragmentation patterns were built according to the collision-induced dissociation (CID) mass spectrum of each parent saponins ions. Saponin structures were elucidated or proposed corroborating the following literature (Minale et al., 1978, 1979;



**Fig. 3.** Comparison of the distribution and the relative intensity of the saponin ions ( $m/z$ ) of the five selected organs (STO: stomach; CAE: pyloric caeca; GON: gonads; OBW: oral body wall; ABW: aboral body wall) for males and females individuals collected at different seasons. In this diagram, the saponins are only identified by their compositions with no distinction between isomeric saponins.

De Simone et al., 1980, De Simone et al., 1981; Riccio et al., 1981, 1982; Kicha et al., 2015). When identification was not possible, only molecular masses are reported as a support for further investigations (Table 2). The global results, i.e. merging all the animals, are summarized in Table 2 and Fig. 6.

Before starting to analyze the MS/MS, and based on the potential structure of the  $m/z$  921 ions, i.e. sepositoside A and the  $m/z$  981 ions, i.e. luzonicoside A reported in the literature (Fig. 1), it is important to remind some dissociation rules that will be relevant to the present discussion. The negative charge is localized on the glucuronic acid group attached on the sugar moiety. Therefore, all the expected collision-induced dissociation (CID) processes must provide fragment ions containing the glycone moiety or part of the glycone moiety. The sugar sequence in the oligosaccharide chains can be defined by following the successive losses of the monosaccharide residues from the mass-selected parent ions. Characteristic losses of 176 Da, 162 and 132 Da can be associated to the presence of glucuronic acid, Galactose or Glucose and arabinose residues, respectively. Consequently, characteristic fragment ions from consecutive loss of sugar groups can provide information for the distinction of different aglycone.

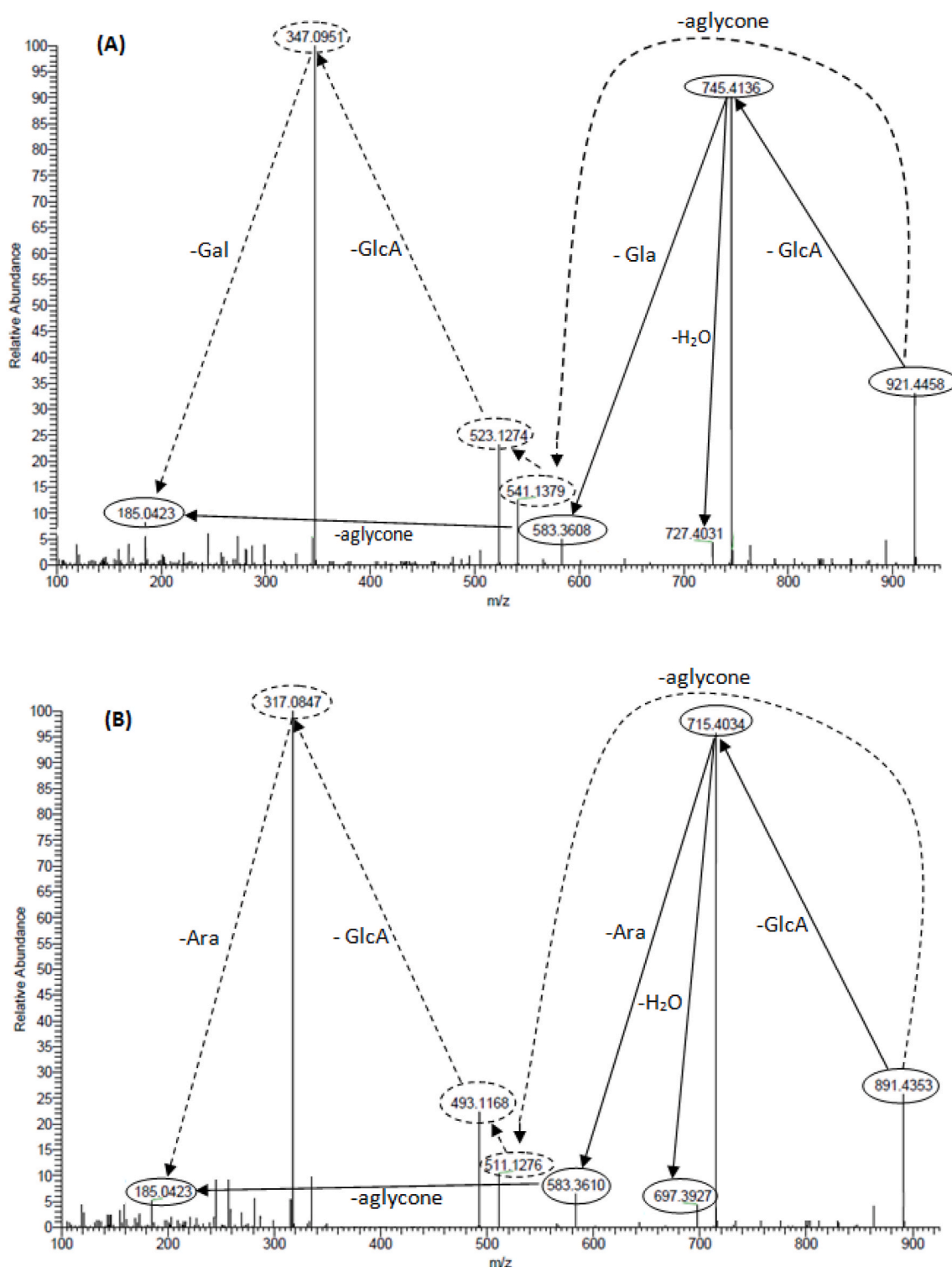
The ions at  $m/z$  921.4455 and  $m/z$  891.4354 were selected to HR-

ESI- MS/MS analysis, in order to reconstruct the collision-induced fragmentation pattern of the parent confirming that ions detected at  $m/z$  921.4455 and  $m/z$  891.4354 correspond to the sepositoside A and luzonicoside A, respectively (Fig. 4).

The HR-ESI-MS/MS mass spectrum for the ion detected at  $m/z$  921.4455 in the oral body wall show two competitive dissociation pathways. First, black lines in Fig. 4 (A) and Fig. S2, demonstrate consecutive losses of glucuronic acid, galactose residues and the aglycone part producing ions detected at  $m/z$  745.4136, 583.3608, and 185.0423, respectively. This sequence of decomposition confirms the proposed sepositoside A (structure 2 in Fig. 6).

In the second fragmentation pathways, represented by a dotted black line (Fig. 4 (A)), the fragmentation of the parent ions is initiated by the loss of the aglycone moiety, as well as the occurrence of formal successive eliminations of the monosaccharide residues (glucuronic acid and galactose). Ultimately, the fragmentation process leads to signals detected at  $m/z$  347.0951 and 185.0432 and unambiguously reveals the presence of sepositoside A ions (Fig. S2).

The MS/MS spectrum of  $m/z$  891.4354 detected upon ESI ionization of the oral body wall extract shows the co-occurrence of two fragmentation pattern as  $m/z$  921.4455 ions had did. The first fragmentation



**Fig. 4.** Comparison between the collision-induced fragmentation patterns of sepositoside  $m/z$  921 (A) and luzonicoside  $m/z$  891 (B). Full and dotted arrows are two possible fragmentations patterns (see Fig. S2 and Fig. S3 in supplementary materials for molecular structures of these saponins and their respective fragments).

pathway represented by black lines, where the consecutive losses of glucuronic acid, arabinose and the aglycone part afford ions detected at  $m/z$  715.4034, 583.3610 and 185.0422, respectively. This sequence of fragmentation is exemplified in Fig. S3. The second fragmentation pathways represented by a dotted black line, gave rise to fragment ion peak  $m/z$  511.1276 resulting from the loss of aglycone and corresponding to the tri-saccharide chain  $m/z$  511.1276 ion  $[C_6H_8O_6 + C_5H_8O_4 + C_6H_{12}O_6Na]^+$ . After dehydration this chain loses a

glucuronic acid  $[511.1276 - H_2O - C_6H_8O_6]^+$  to form the di-saccharide chain at  $m/z$  317.0847  $[C_{11}H_{18}O_9 Na]$ . The elimination of arabinose (-132 Da) from the di-saccharide ultimately leads to the glucose at  $m/z$  185.0423  $[C_6H_{10}O_5 + Na]^+$ . The complete dissociation pathway is described in Fig. S3. Indeed, these two fragmentations gave signals consistent with those obtained by analyzing the luzonicoside of *E. luzonicus* by ESI-MS/MS in positive mode (Kicha et al., 2015).

This result suggests that the CID spectra of the  $m/z$  891.4353 are in

agreement with the presence of ions corresponding to luzonicoside.

The collision-induced dissociation (CID) mass spectrum of the  $m/z$  921.4458 and 891.4353 ions allows us to identify the key signals of two types of glycosidic chains. The  $m/z$  541.1379,  $m/z$  523.1274 [541-18] and  $m/z$  374.0951 peaks would correspond to the signature of the GlcA-Gal-Glc ([GlcA-Gal-Glc + Na]<sup>+</sup>) oligosaccharide chain, and the  $m/z$  511.1276,  $m/z$  493.1168 [511-18] and  $m/z$  317.0847 peaks as a signature of the GlcA-Ara-Glc ([GlcA-Ara-Glc + Na]<sup>+</sup>) oligosaccharide chain.

The fragmentation sequence exemplified in Fig. 4, Fig. S2 and Fig. S3 established the molecular formula C<sub>27</sub>H<sub>40</sub>O of the aglycone part for  $m/z$  921 and 891, which confirm that the fragment ions originate from sodium-cationized sepositoside and luzonicoside.

The collision-induced dissociation (CID) mass spectrum of the  $m/z$  907.4306 ions detected in the oral body wall is presented in

supplementary data Fig. S4 and Fig. 5. It shows the co-occurrence of three fragmentation patterns (Fig. 5): two fragmentation routes represented by black lines (solid and dotted lines (A)) can be associated to sepositoside B of *E. sepositus* (structure 1 in Fig. 6), whereas the third fragmentation pathways, identified by the gray lines (dotted lines (B)), are characteristic of luzonicoside F ions (structure 7 in Fig. 6).

As far as the solid black line, the mass differences between the fragment ions are attributable to the losses of glucuronic acid, galactose and aglycone moiety ultimately leading to the  $m/z$  185.0423 ions. When following the dotted black line in the scheme, i.e.  $m/z$  907.4306 →  $m/z$  541.1381 →  $m/z$  523.1275 →  $m/z$  347.0953 →  $m/z$  185.0423, it is interesting to note that the ultimate mass transition corresponds to  $m/z$  523.1275 and  $m/z$  347.0953. This can unambiguously reveal the presence of GlcA-Gla-Glc oligosaccharide chain and confirm that the fragment ions are associated to sepositoside B of *E. sepositus*. The complete

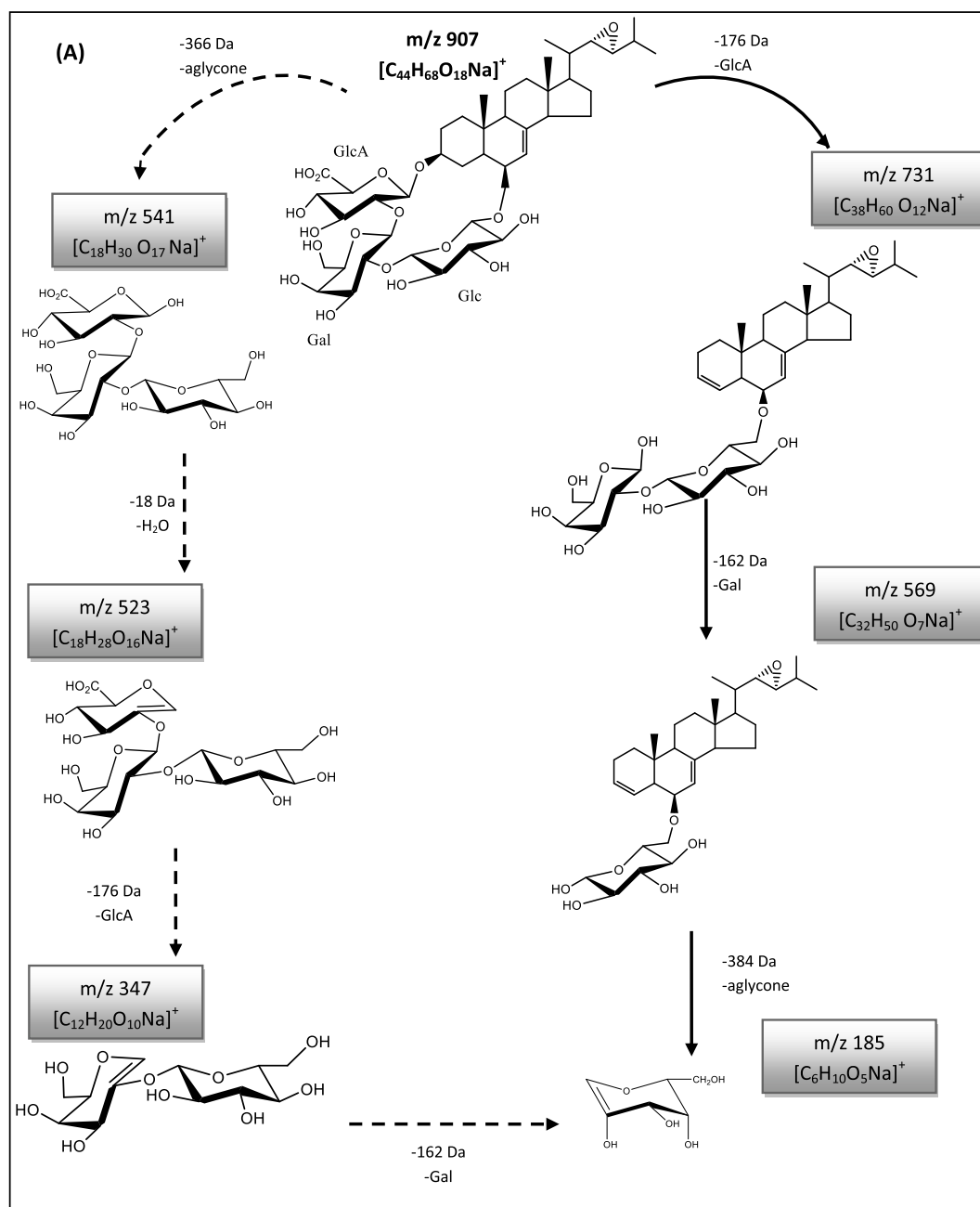


Fig. 5. Collision-induced dissociation experiments of the  $m/z$  907 ions obtained upon ESI MS/MS analysis of the oral body wall saponin extract of females Individual: fragmentation reactions of (A) sepositoside B of *E. sepositus*; and (B) luzonicoside F of *E. luzonicus*.

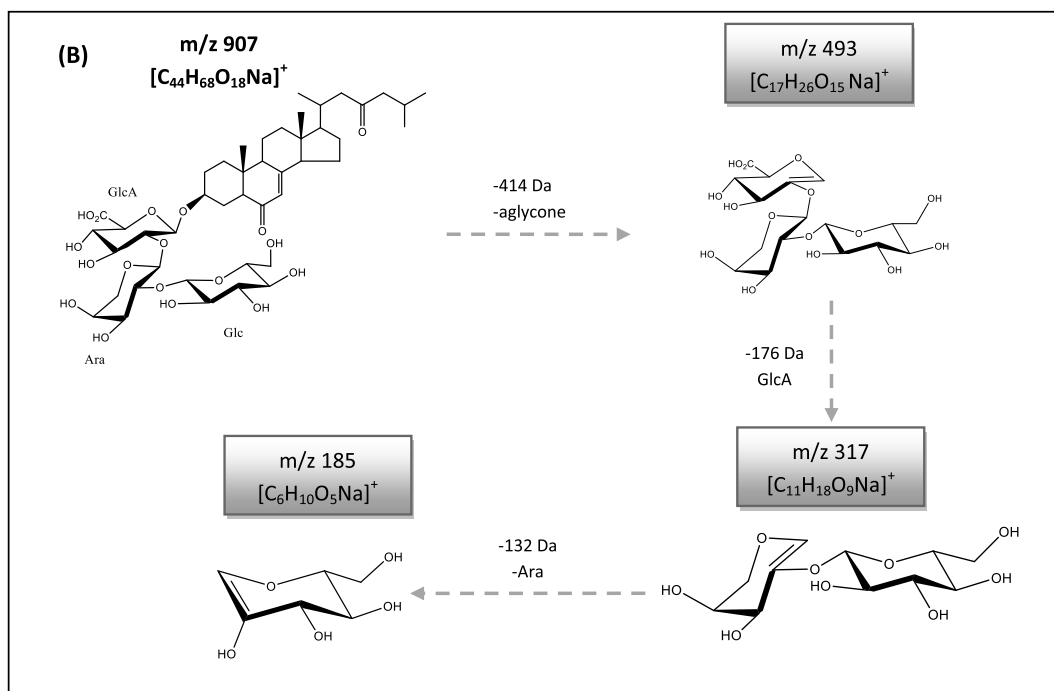


Fig. 5. (continued).

dissociation pathway is described in Fig. 5 (A).

Fig. 5 B is characterized by the key signals of AGlc -Ara-Glc oligosaccharide chain ( $m/z$  493.1168 and  $m/z$  317.0847 respectively). The detection of this sequence of fragmentations allows the identification of the  $m/z$  907.4306 as luzonicoside F already identified in *E. lozonicus* (Kicha et al., 2015).

This result indicates that isomeric saponins can be highlighted by running ESI-MS/MS analyses, which provided key-fragmentations for all the isomeric saponin ions that have been previously identified.

Similar mass spectrometry analyses were performed for all the ions detected upon ESI ionization of the oral body wall saponins ( $m/z$  935.4612, 939.4564 and 953.3828). On the basis of the recorded MS/MS spectra, three new saponins provisionally named saponin A, C and D detected at  $m/z$  935.4612, 939.4567 and 953.3828 respectively, were identified (Fig. 6). These saponins are straightforward characterization since their CID spectra share the common  $m/z$  523.1274 and 374.0951 key signals as a signature of the oligosaccharide chain GlcA-Gal-Glc. Consequently, all those congeners differ by their aglycone structure.

Based on molecule weight obtained from ESI-MS/MS analysis and the literature survey that highlight different saponins in *Echinaster* genus (Minale et al., 1978, 1979; De Simone et al., 1981; Riccio et al., 1981, 1982; Kicha et al., 2015), the aglycone structures were proposed and saponins structures were tentatively elucidated (Fig. 6).

The molecular mass difference of 32 Da between  $m/z$  907.4306 and 939.4564 (also between  $m/z$  921.4354 and 953.3828) suggested the presence of an additional hydroxy group and one epoxy group in the steroid nucleus of compounds (5) and (6) compared to compounds (1) and (2), respectively (Fig. 6).

Saponins ions observed at  $m/z$  921.4354 and 935.4612 are separated by 14 Da, which agreed with the presence of an additional methylene group added in the side chain of the aglycone of compounds (3) in comparison with compound (2) (Fig. 6).

The mass spectrometric analyses were performed for all the organs saponin ions extracts (stomach, pyloric caeca, gonads and tegument aboral).

For each analysis, fragmentation patterns were built and saponin structures were elucidated or proposed based on their elemental compositions, on their CID fragmentations and on common building parts of

known saponins (Fig. 1). Interestingly, the spectra of saponins at  $m/z$  907.4298, 891.4349, 921.4453, 935.4607, 939.4558 and  $m/z$  953.4607 obtained from other organs was found to be similar to the oral body wall saponin ion spectrum. Consequently, all the product ions identified in the oral body wall MS/MS spectrum were also detected in the corresponding MS/MS spectrum of the saponins ions obtained from other organs (Table 2).

MS/MS analysis has been carried out for the  $m/z$  909.4455, 919.4298, 939.4558 signals. The results of the whole analysis are summarized in Table 2.

The CID spectra of the  $m/z$  919.4292 ions are presented in Fig. S5 and are clearly in agreement with the presence of two isomers. Among the  $m/z$  919.4292 parent ions, at least two isomeric ions are present which, in their dissociation products, possess the  $m/z$  523.1267 and 374.0948 product ions (in accordance with GlcA-Gal-Glc oligosaccharide chain) for the first isomer (Fig. S4); and  $m/z$  493.1161, 317.0847 (characteristic of the GlcA-Ara-Glc oligosaccharide chain) for the second one. Consequently, the two molecules are differing at the level of the glycone and aglycone chains.

Similar fragmentation patterns were obtained for  $m/z$  937.4167 observed in the stomach, the pyloric caeca and the aboral body wall, presenting all the common  $m/z$  523.1267 and  $m/z$  374.0948 keys as a signature of the GlcA-Gal-Glc oligosaccharide chain. This reveals that the carbohydrate chain of these saponins is structurally related to that of sepositoside A (compound (2), Fig. 6). Hence, the structure of this saponin was proposed as compound (8) (Fig. 6), and its aglycone differs from that of compound (2) only in the structure of ring B with an additional oxygen atom (16 Da).

We noted that the MS/MS spectrums, obtained for the gonads and pyloric caeca,  $m/z$  919.4299 saponin ions were similar as well as the MS/MS spectra of  $m/z$  909.4455 ions saponins of stomachs and pyloric caeca.

### 3.2. Quantitative comparison

The mean concentration of saponins in different organs is presented in (Fig. 7) and Table 3. Quantitative differences of saponins in the organism as a whole and each of its body parts were highlighted depending

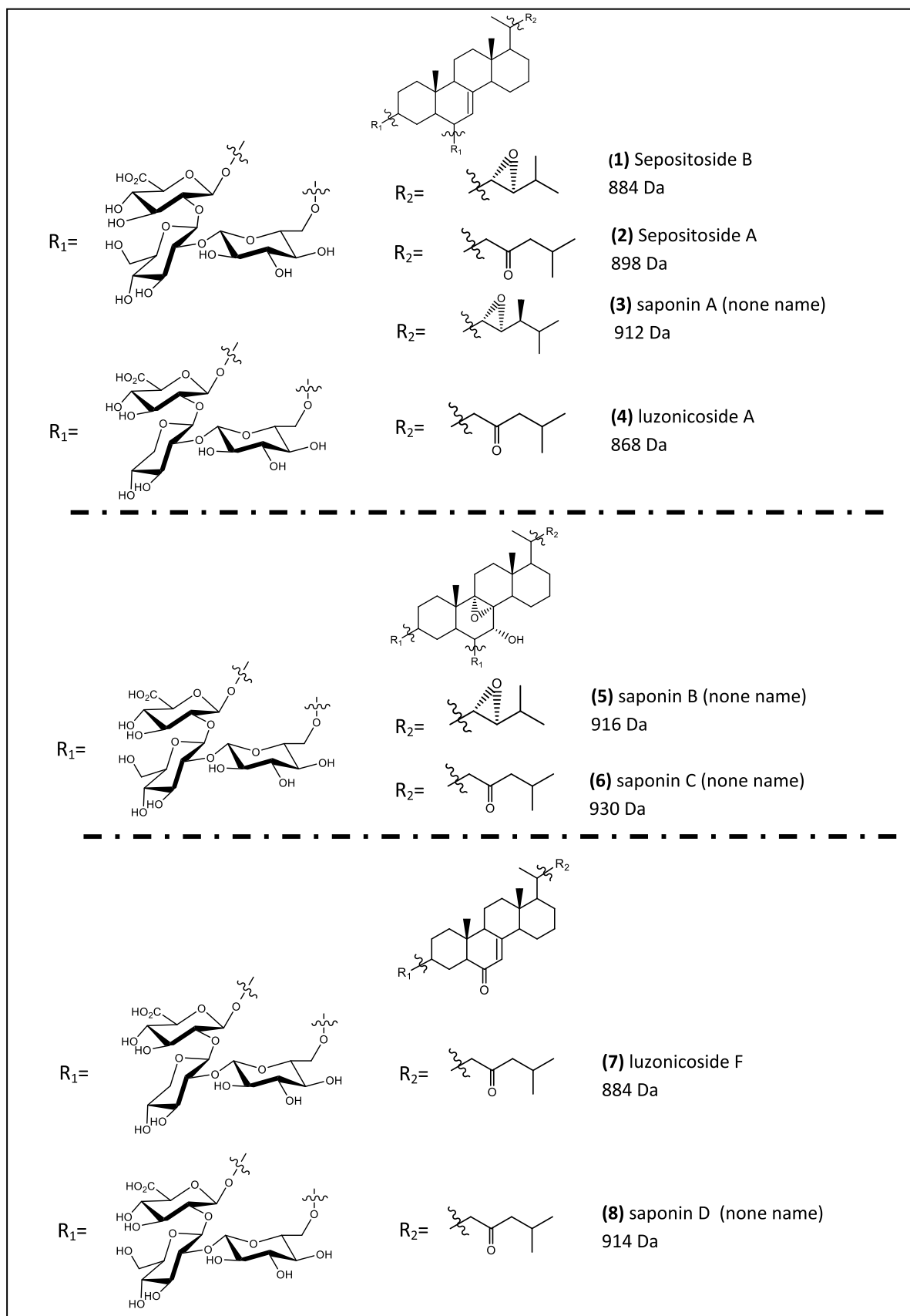
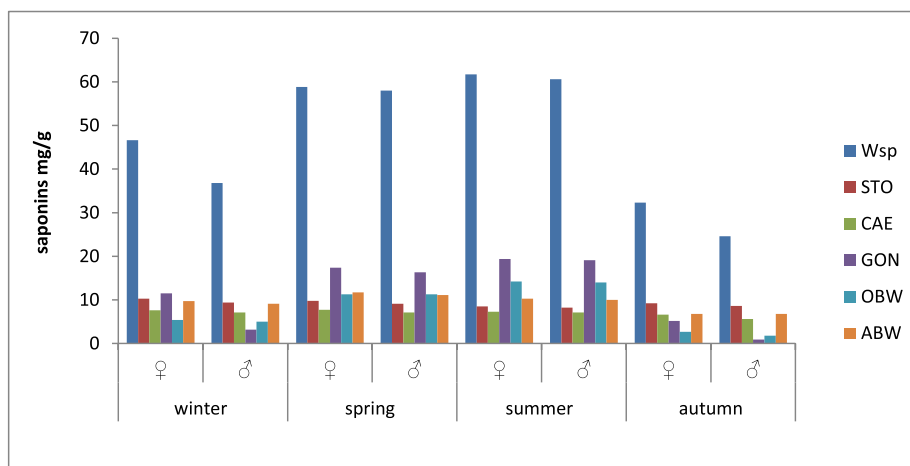


Fig. 6. Presumptive molecular structures of saponins detected in *E. sepositus* and described in Table 2.



**Fig. 7.** Total saponins amount (mg/g, dry weight) in the different organs of *E. sepositus* obtained from different sex and collected in different seasons. Wsp: Whole specimens; STO: stomach; CAE: pyloric caeca; GON: gonads; OBW: oral body wall; ABW: aboral body wall.

**Table 3**

ANOVA analysis of total saponins amounts (mg.g<sup>-1</sup>, dry weight) in the different organs of *E. sepositus* as a function of sex in different seasons. Wsp: Whole specimens; STO: stomach; CAE: pyloric caeca; GON: gonads; OBW: oral body wall; ABW: aboral body wall. For each season and each sex same letter in the same column refer to means considerate not statistically different (between the different organs) according to ANOVA and Tukey's test.

	Winter		Spring		Summer		Autumn	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Wsp	46.6 ± 0.7	36.8 ± 0.1	58.8 ± 0.8	58.0 ± 0.5	61.7 ± 1.4	60.6 ± 0.3	32.3 ± 0.3	24.6 ± 0.9
STO	10.3 ± 0.3 <sup>B</sup>	9.4 ± 0.2 <sup>A</sup>	9.8 ± 0.3 <sup>B</sup>	9.1 ± 0.4 <sup>C</sup>	8.5 ± 0.3 <sup>D</sup>	8.2 ± 0.1 <sup>D</sup>	9.2 ± 0.1 <sup>A</sup>	8.6 ± 0.4 <sup>A</sup>
CAE	7.6 ± 0.5 <sup>C</sup>	7.1 ± 0.1 <sup>B</sup>	7.7 ± 0.4 <sup>C</sup>	7.1 ± 0.2 <sup>D</sup>	7.3 ± 0.3 <sup>E</sup>	7.1 ± 0.2 <sup>E</sup>	6.6 ± 0.5 <sup>B</sup>	5.6 ± 0.5 <sup>C</sup>
GON	11.5 ± 0.4 <sup>A</sup>	3.2 ± 0.2 <sup>D</sup>	17.4 ± 0.5 <sup>A</sup>	16.3 ± 0.2 <sup>A</sup>	19.4 ± 0.5 <sup>A</sup>	19.1 ± 0.5 <sup>A</sup>	5.2 ± 0.2 <sup>C</sup>	0.9 ± 0.1 <sup>E</sup>
OBW	5.4 ± 0.4 <sup>D</sup>	5.0 ± 0.3 <sup>C</sup>	11.3 ± 0.4 <sup>B</sup>	11.3 ± 0.3 <sup>B</sup>	14.1 ± 0.1 <sup>B</sup>	14.3 ± 0.1 <sup>B</sup>	2.7 ± 0.5 <sup>D</sup>	1.8 ± 0.3 <sup>D</sup>
ABW	9.7 ± 0.3 <sup>B</sup>	9.1 ± 0.3 <sup>A</sup>	11.7 ± 0.3 <sup>B</sup>	11.1 ± 0.3 <sup>B</sup>	10.3 ± 0.1 <sup>C</sup>	10.0 ± 0.2 <sup>C</sup>	6.8 ± 0.5 <sup>B</sup>	6.8 ± 0.3 <sup>B</sup>

on sex individual and season.

### 3.2.1. Inter-organs variability

An examination of the organ distribution of saponins in *E. sepositus* (Fig. 7) showed that these substances were present in all the organs examined, and each organ its own saponins amount, this may have some general functional significance in the development cycle.

The content saponins was found to be statistically different between the various organs by ANOVA and Tukey's post hoc test (Table 3). Total saponins concentrations in the corresponding organ were increasingly or decreasingly changed as a function of developmental stage of *E. sepositus*.

In early development stage, in autumn, the maximal content of the saponins was observed in the stomach when compared with other body components of *E. sepositus*. The smallest total amount of saponins in this period was recorded in the gonads.

In advanced development stage, in winter, the amount saponins in different organs of female individuals varied in the following order: Gonads > Stomach = aboral body wall > pyloric Caecab > oral body wall. Whereas the variability inter-organs in male individuals of

saponins amount show the following order: stomach = aboral body wall > pyloric caeca > oral body wal > gonads.

In starfish the stomach saponins are implicated in the solubilization of cholesterol accelerating its absorption (Mackie et al., 1977); This explains the higher saponin levels in stomach than in other body components during the early stage of growth (autumn and winter). In addition, it is known that starfish have the so-called "external" nutrition, they evert the stomach from the organism's body and engulf the food, and then it can be assumed that saponins protect the stomach against predators at the nutrition time, and immobilize or kill living creatures and pathogenic microorganisms in food (Minale et al., 1993; Ivanchina et al., 2017).

In maturation stage, in spring, the largest quantities of saponin were found in the gonads and in the oral and aboral body wall. The presence of high levels in body wall is consistent with a role of saponins as a chemical defense system against predators, parasites and microorganisms.

In summer, the spawning season in starfish *E. sepositus*, the maximum saponin content was in the gonads for both sexes, indicating that saponins may have a role in reproduction. Naruse et al. (2010) reported that saponins of *Asteria. amurensis* are cofactor for acrosome reaction during fertilization in *A. amurensis*. According to our results, the amount of saponins in the gonads showed a strong seasonal variation, which hypothesizes the intervention of these molecules in the reproduction of *E. sepositus*.

### 3.2.2. Sex and seasonal variability

The data relative to the sex and seasonal variability of TSC in *E. sepositus* (Fig. 7, Table S2 and Table S3; respectively) highlighted the following results:

- Among body components, The maximal content of saponins was observed in the female gonads (19.4 ± 0.5 mg/g), and the minimal contents was observed in male gonads (09.1 ± 0.1 mg/g);
- The significantly different rates of gonads saponins observed in autumn and winter between male and female, created substantial differences in the total saponins compounds (TSC) in whole male and female organism (Fig. 7);
- Stomach saponins had important amount all over the year indicating that this species is actively feeding throughout the life cycle;
- The seasonal variation trend of saponins amounts in gonads of both sexes is in agreement with their maturation stage. According to seasonal variation of gonado-somatic index (GSI) (Fig. S5) we noted a variation in the timing of gonad maturation between female and male individuals. The female gonads maturation of *E. sepositus* is

precocious; begin in autumn and finishing in early summer with only one spawning event in late summer. According to Riesgo et al. (2012), oogenesis was a continuous process in *E. sepositus*, with only one spawning event in August–September. These data justify the presence of important amount of saponins in the female gonads throughout the maturation. In male individuals, the GSI values indicate that spermatogenesis was restricted to 5–6 months in spring–summer. This result concord with the result obtained by Riesgo et al. (2012) and can explain the low gonads content of saponins observed in male individuals in early development stage (autumn and spring);

- The seasonal variation of saponins amount in whole body, gonads and oral body wall of both sexes was significant, with higher rates of saponins in spawning season over the others.

#### 4. Conclusion

HR-ESI-MS and HR-ESI-MS/MS were applied to study the diversity and body distribution of saponins in *E. sepositus*. This technique was used to monitor the parent saponins and their mass fragmentation patterns in the MS and MS<sup>2</sup> experiments.

The comparison has been made in respect to body, sex and seasons components. Our results reported the presence of twelve different saponin congeners, which highlights the diversity of saponins identified in a Mediterranean starfish *E. sepositus*. With the analytical techniques used, only 8 structures have been elucidated. The distribution of these saponins in stomach, pyloric caeca, gonads, oral body wall and aboral body wall of the starfish *E. sepositus* showed qualitative and quantitative differences based on MS analysis and semi-quantitative study. The saponin mixtures in each organ were rich and complex (5–7 different saponins) with usually one or two saponins differing from one body compartment to the other and from sex's individuals to others. Sepsitoside A and luzonicoside A were the most abundant saponins in the five studied organs.

The obtained data indicate high significant inter-organs variability of saponin amounts in both sexes at different seasons. It is likely to conclude that the level of saponins in each organ seems to depend on the season in accordance with the stage of development.

High content of gonads saponin contributed to the maximal saponin content of whole body in summer (spawning season).

Saponins congeners were located mainly in gonads and oral body during spawning period, but were located at early developmental stage in stomach when starfish are actively feeding. The presence of saponins in the reproductive and digestive organs in such manner suggests that these compounds are involved in the reproduction and digestion of food.

At this point of the work, HR-ESI-MS and HR-ESI-MS/MS analyses seems to be efficient for a direct screening of saponin distribution within the organ extracts of *E. sepositus*. The identification of key-fragmentations can be very useful to highlighted isomeric saponins by running HR-ESI-MS/MS analyses. However, an additional characterization step based on a chromatographic separation prior to the mass spectrometry analyses is required to distinct isomeric saponins.

In the future, chromatography methodologies will be used to separate and purify different saponins from these saponin extracts in order to clarify the biological roles of each saponin in *E. sepositus*.

#### Author contributions

Fouzia Bachari-Houma, Didier Hauchard, Mohamed Chibane and Vincent Ferrières designed the study. Bouchra Dahmoune, Jean-Paul Guégan, and Philippe Jehan performed the experiments. Farid Dahmoune and Lotfi Mouni participated in study design, data collection and analysis. Bouchra Dahmoune and Farid Dahmoune wrote the manuscript. Cherifa Aissou-Akrour with all the authors revised the manuscript.

#### CRedit authorship contribution statement

**Bouchra Dahmoune:** Conceptualization, Formal analysis, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Funding acquisition, acquisition of data, analysis and/or interpretation of data, Drafting the manuscript, revising the manuscript critically for important intellectual content. **Fouzia Bachari-Houma:** Conceptualization, Writing – review & editing, Conception and design of study, revising the manuscript critically for important intellectual content. **Mohamed Chibane:** Conceptualization, Writing – review & editing, Conception and design of study, revising the manuscript critically for important intellectual content. **Philippe Jehan:** Formal analysis, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Funding acquisition, acquisition of data, analysis and/or interpretation of data, revising the manuscript critically for important intellectual content. **Jean-Paul Guegan:** Formal analysis, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Funding acquisition, acquisition of data, analysis and/or interpretation of data, revising the manuscript critically for important intellectual content. **Farid Dahmoune:** Formal analysis, Data curation, analysis and/or interpretation of data. **Cherifa Aissou-Akrour:** revising the manuscript critically for important intellectual content. **Lotfi Mouni:** Formal analysis, Data curation, analysis and/or interpretation of data. **Vincent Ferrières:** Conceptualization, Writing – review & editing, Conception and design of study, revising the manuscript critically for important intellectual content. **Didier Hauchard:** Conceptualization, Writing – review & editing, Conception and design of study, revising the manuscript critically for important intellectual content.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgements

We would like to express our sincerest thanks to the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research, and Campus France for their scholarship within the framework of Algerian-French cooperation PROFAS B+.

We thank the staff of the laboratories who participated in the realization of this work particularly Isabelle Soutrel for their valuable technical assistance and support, and for providing facilities to realize this search.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bse.2021.104262>.

#### References

- Dahmoune, B., Guégan, J.P., Vives, T., Soutrel, I., Jehan, P., Loutfi, M., Chibane, M., Ferrières, V., Bachari, H.F., Hauchard, D., 2019. Saponines macrocycliques d' *Echinaster sepositus* Extractions et caractérisations par RMN, UPLC/MS, MS/MS. Personnal communication. Journées Scientifiques SCF-BPL 1-3 Avril 2019. Castel Saint-Anne, Tregastel. p.65.
- De Simone, F., Dini, A., Finamore, E., Minale, L., Pizza, C., Ruccio, R., Riccio, R., Zollo, F., 1981. Starfish saponins. Part 5. Structure of seposituside A, a novel steroidal Glycoside from the starfish *Echinaster sepositus*. J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, 1855–1862. <https://doi.org/10.1039/P19810001855>.
- De Simone, F., Dini, A., Minale, L., Riccio, R., Zollo, F., 1980. The sterols OF the asteroid *ECHINASTER sepositus*\*. Comp. Biochem. Physiol. 66, 351–357. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(80\)90216-3](https://doi.org/10.1016/0305-0491(80)90216-3).
- Demeyer, M., De Winter, J., Caulier, G., Eeckhaut, I., Flammang, P., Gerbaux, P., 2014. Molecular diversity and body distribution of saponins in the sea star *Asterias rubens* by mass spectrometry. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Bio 168, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.10.004>.

- Grauso, L., Yegdaneh, A., Sharifi, M., Mangoni, A., Zolfaghari, B., Lanzotti, V., 2019. Molecular networking-based analysis of cytotoxic saponins from sea cucumber *Holothuria atra*. *Mar. Drugs* 17 (2), 86. <https://doi.org/10.3390/md17020086>.
- Ivanchina, N.V., Kicha, A.A., Malyarenko, T.V., Stonik, V.A., 2017. Recent studies of polar steroids from starfish: structures, biological activities and biosynthesis. In: Gomes, R., Rocha-Santos, T., Duarte, A. (Eds.), *Advances in Natural Products Discovery*. Nova Sci., New York, NY, USA, pp. 191–224.
- Kalinin, V.I., Prokofieva, N.G., Likhatskaya, G.N., Schentsova, E.B., Agafonova, I.G., Avilov, S.A., Drozdova, O.A., 1996. Hemolytic activities of triterpene glycosides from the holothurians order dendrochirotida: some trends in the evolution of this group of toxins. *Toxicon* 34, 475–483. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(95\)00142-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(95)00142-5).
- Kicha, A.A., Kalinovsky, A.I., Malyarenko, T.V., Ivanchina, N.V., Dmitrenok, P.S., Menchinskaya, E.S., Yurchenko, E.A., Pisyagin, E.A., Aminin, D.L., Huong, T.T.T., Long, F.Q., Stonik, V.K., 2015. Cyclic steroid glycosides from the starfish *Echinaster luzonicus*: structures and immunomodulatory activities. *J. Nat. Prod.* 78 (6), 1397–1405. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00332>.
- Kisha, A.A., Ivanchina, N.V., Kalinovsky, A.I., Dmitrenok, P.S., Stonik, V.A., 2001. Sulfated steroid compounds from the starfish *Aphelasterias japonica* of the Kuril population. 50, 724–727. *Russ. Chem. Bull.* <https://doi.org/10.1023/A:1011337617808>.
- Kwon, J.H., Bélanger, J.M.R., Paré, J.R.J., Yaylayan, V.A., 2003. Application of the microwave-assisted process (MAPTM) to the fast extraction of ginseng saponins. *Food Res. Int.* 36, 491–498. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00197-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00197-7).
- Lide, D.R., 2009. *CRC Handbook of Chemistry and Physics: a Ready-Reference Book of Chemical and Physical Data*, Edition. CRC Press, London.
- Mackie, A.M., Lasker, R., Grant, P.T., 1968. Avoidance reactions of mollusc *Buccinum undatum* to saponin-like surface-active substances in extracts of thenstarfish *Asterias rubens* and *Martasterias glacialis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 26, 415–428. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(68\)90635-X](https://doi.org/10.1016/0010-406X(68)90635-X).
- Mackie, A.M., Singh, H.T., Owen, J.M., 1977. Studies on the distribution, biosynthesis and function of steroidal saponins in echinoderms. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 56, 9–14. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(77\)90214-0](https://doi.org/10.1016/0305-0491(77)90214-0).
- Malyarenko, T.V., Kicha, A.A., Ivanchina, N.V., Kalinovsky, A.I., Dmitrenok, P.S., Stonik, V.A., 2016. Unusual steroid constituents from the tropical starfish *leiaster* sp. *Nat. Prod. Commun.* 11 (9), 1251–1252. <https://doi.org/10.1177/1934578X1601100914>.
- Malyarenko, O.S., Dyshlovoy, S.A., Kicha, A.A., Ivanchina, N.V., Malyarenko, T.V., Carsten, B., Gunhild, V.A., Stonik, V.A., Ermakova, S.P., 2017. The inhibitory activity of luzonicosides from the starfish *Echinaster luzonicus* against human melanoma cells. *Mar. Drugs* 15 (7), 277. <https://doi.org/10.3390/md15070227>.
- Minale, L., Riccio, R., De Simone, F., Dini, A., Pizza, C., Ramundo, E., 1978. Starfish saponins I. 3 $\beta$ -HYDROXY-5 $\alpha$ -CHOLESTA-8, 14-DIEN-23-ONE, the major genin from *STARFISH* *Echinaster sepositus*. *Tetrahedron Lett.* 29, 2609–2612. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)94842-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)94842-7).
- Minale, L., Riccio, R., De Simone, F., Dini, A., Pizza, C., 1979. Starfish saponins II. 22, 23-epoxysteroids, minor genins from the starfish *Echinaster Sepositus*. *Tetrahedron Lett.* 7, 645–648. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)86026-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)86026-3).
- Minale, L., Riccio, R., Zollo, F., 1993. Steroidal oligoglycosides and polyhydroxysteroids from echinoderms. In: Herz, W., Kirby, G.W., Moore, R.E., Steglich, W., Tamm, C. (Eds.), *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, vol. 62. Springer, Vienna, pp. 75–308. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-9250-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-9250-4_2).
- Naruse, M., Suetomo, H., Matsubara, T., Sato, T., Yanagawa, H., Hoshi, M., Matsumoto, M., 2010. Acrosome reaction-related steroidal saponin, Co-ARIS, from the starfish induces structural changes in microdomains. *Dev. Biol.* 347 (1), 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.08.019>.
- Popov, R.S., Ivanchina, N.V., Kicha, A.A., Malyarenko, T.V., Grebnev, B.B., Stonik, V.A., Dmitrenok, V.S., 2019. The distribution of asterosaponins, polyhydroxysteroids and related glycosides in different body components of the far eastern starfish *Iethasterias fusca*. *Mar. Drugs* 17 (9), 523. <https://doi.org/10.3390/md17090523>.
- Riccio, R., De Simone, F., Dini, A., Minale, L., Pizza, C., Senatore, F., Zollo, F., 1981. Starfish saponins VI-unique .22, 23-epoxysteroids, cyclic glycoside, minor constituents from *Echinaster sepositus*. *Tetrahedron Lett.* 22 (16), 1557–1560.
- Riccio, R., Dini, A., Minale, L., Pizza, C., Zollo, F., Sevenet, T., 1982. Starfish saponins VII. Structure of luzonicoside, a further steroidal cyclic glycoside from the pacific starfish *Echinaster luzonicus*. *Experientia* 38, 68–70. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)90377-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)90377-6).
- Riesgo, A., Villamor, A., Becerr, M., 2011. Ultrastructure of the gametogenesis of the common Mediterranean starfish, *Echinaster (Echinaster) sepositus*. *Invertebr. Reprod. Dev.* 55, 138–151. <https://doi.org/10.1080/07924259.2011.558182>.
- Schoepke, T., Hiller, K., Wray, V., Nimtz, M., 1996. Application of MSMS for the rapid, comparative analysis of saponin mixtures as exemplified by the deacylated and partially deacylated triterpenoid saponins of *Bellis annua*. *Planta Med.* 62 (4), 336–340. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957897>.
- Stonik, V.A., Kalinin, V.I., Avilov, S.A., 1999. Toxins from sea cucumbers (holothuroids): chemical structures, properties, taxonomic distribution, biosynthesis and evolution. *J. Nat. Toxins* 8 (2), 235–248. PMID: 10410334.
- Van Dyck, S., Gerbaux, P., Flammang, P., 2009. Elucidation of molecular diversity and body distribution of saponins in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata) by mass spectrometry. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 152, 124–134. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.10.011>.
- Van Dyck, S., Gerbaux, P., Flammang, P., 2010a. Qualitative and quantitative saponin contents in five sea cucumbers from the Indian Ocean. *Mar. Drugs* 8, 173–189. <https://doi.org/10.3390/md8010173>.
- Van Dyck, S., Flammang, P., Meriaux, C., Bonnel, D., Salzet, M., Fournier, I., Wiszorski, M., 2010b. Localization of secondary metabolites in marine invertebrates: contribution of MALDI MSI for the study of saponins in cuvierian tubules of *H. forskali*. *PLoS One* 5 (11), e13923. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013923>.
- Voogt, P.A., Van Rheenen, J.W.A., 1982. Carbohydrate content and composition of asterosaponins from different organs of the sea star *Asterias rubens*: relation to their haemolytic activity and implications for their biosynthesis. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 72, 683–688. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(82\)90527-2](https://doi.org/10.1016/0305-0491(82)90527-2).

*Résumé*

### Résumé:

Le présent travail de thèse vise essentiellement l'extraction des saponines et des caroténoïdes à partir de deux astéroïdes (*Echinaster sepositus* et *Ophidiastrea ophidianus* prélevées sur la côte algérienne) par deux méthodes, l'extraction assistée par micro-ondes (EAM) et l'extraction assistée par ultrasons (EAU).

L'application de la méthodologie de surface de réponse (MSR) basée sur le plan d'expérience Box et Behnken pour optimiser les conditions d'EAM et d'EAU (la concentration de solvant, le temps, le ratio liquide-solide, la puissance des micro-ondes) des saponines et des caroténoïdes a permis de modéliser les deux méthodes par des équations polynomiales de second ordre hautement significatives, et de déterminer les conditions optimales d'EAM et d'EAU des substances étudiées. Les deux méthodes optimisées (EAM et EAM) ont été comparées avec la méthode conventionnelle. Les résultats obtenus montrent que l'EAM améliore nettement le rendement d'extraction des saponines et des caroténoïdes, réduit le temps d'extraction et consomme moins de solvant. Elle est nettement plus performante que les autres méthodes.

Des analyses de spectrométrie de masse HR-ESI-MS et HR-ESI-MS/MS des saponines isolées de différents organes (l'estomac, les gonades, les caeca pyloriques et le tégument oral et aboral) d'*E. sepositus* ont démontré une diversité structurale beaucoup plus élevée chez cette espèce par rapport à ce qui était signalé dans la littérature. Les résultats obtenus ont mis en évidence 11 congénères de saponines dont 9 nouvelles saponines. Les analyses HR-ESI-MS/MS ont permis, grâce aux fragments caractéristiques, de distinguer les isomères et de proposer la structure de 6 saponines. Les structures des saponines majeurs (sepositoside et luzonicoside) ont été élucidées par l'utilisation de la RMN 1D et 2D.

La comparaison du contenu en saponines dans les différents organes d'*E. sepositus* montrent que la distribution qualitative et quantitative des saponines est caractérisée par des disparités inter-organes, sexuelles et saisonnières.

L'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante montre que les substances étudiées peuvent piéger le radical DPPH•, le radical superoxyde (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>) électrogénéré. De plus les saponines des deux espèces à la concentration non hémolytique (1mg.L<sup>-1</sup>) réduisent l'hémolyse induite par le radical hydroxyle HO•.

### Mots clés:

Étoile de mer, extraction assistée par ultra-sons, extraction assistée par micro-ondes, saponines, caroténoïdes, spectrométrie de masse haute résolution.

**Abstract:**

This thesis mainly aims to extract saponins and carotenoids from two echinoderm Asteroidea *Echinaster sepositus* and *Ophidiaster ophidianus* by two extraction methods namely microwave-assisted extraction (MAE) and ultrasound-assisted extraction (UAE).

The application of response surface methodology (RSM) coupled with a Box–Behnken design to optimize MAE and UAE conditions (the solvent concentration, irradiation time, microwave power, and liquid-solid ratio and microwave power) allows to describe the two extraction methods by second order polynomials models, and to predict the optimal extraction conditions of saponins and carotenoids by MAE and UAE.

The optimized MAE and UAE were compared with conventional solvent extraction. The results demonstrated that MAE allowing higher recovery yield of saponins and carotenoids with a shorter extraction time and a lower solvent consumption. MAE was found to be the most efficient method for the extraction of saponins and carotenoids from *E. sepositus* and *O. ophidianus*.

Screening of *E. sepositus* saponins mixtures obtained from different organs (the stomach, the pyloric caeca, the gonads, the oral body wall and aboral body wall ) by mass spectrometry (HR-ESI-MS and HR-ESI- MS/MS) demonstrated that the diversity of saponins in *E. sepositus* is higher than previously reported. We highlighted 11 different saponins, including 9 new congeners. Presumptive molecular structures are proposed for 6 molecules on the basis of key-fragmentations identified by HR-ESI-MS/MS. The structures of major saponins compounds (sepositoside and luzonicoside) were elucidated by 1 D and 2 D NMR experiments.

The comparison of the saponin contained in the five body components of *E. sepositus* revealed qualitative and quantitative variability in saponins distribution. This heterogeneity was linked to the organ, sex and the collecting season.

From the *in vitro* antioxidant test we have noted that studied molecules inhibit DPPH• radical and electro-generated superoxide radical ( $O_2^{\bullet-}$ ). In addition saponins at a non-hemolytic concentration ( $1\text{mg.L}^{-1}$ ) exhibited some inhibitory activity toward hemolysis induced by hydroxyl radical  $OH^{\bullet}$ .

**Keywords:**

Starfish, ultrasound assisted extraction, microwave assisted extraction, saponins, carotenoids, high resolution mass spectrometry.

## ملخص:

في هذه الدراسة، تم استخدام طريقتين وهما طريقة الميكرو أوند و طريقة الموجات فوق الصوتية (EAM et AEU) لاستخلاص مادة الصابونيات ومادة الكاروتينويد من صنفين من نجوم البحر والمسماة (*E. sepositus* et *O. ophidianus*). ان تطبيق التصميم التجريبي باستخدام منهجية استجابة السطح لدراسة تأثير التغيرات المستقلة (تركيز الكحول، الوقت، نسبة السعة السائلة/الصلبة، و قوة الميكرو أوند) على كمية الصابونيات و الكاروتينويد المتحصل عليها، وللحصول على العوامل المثلى لاستخراج المواد المدروسة ادى الى نمذجة الطرق المستعملة بمعادلات كثيرة الحدود من الدرجة الثانية. ان مقارنة الطريقتين النموذجيتين (EAM et AEU) مع الطريقة التقليدية أثبت ان طريقة الاستخلاص ب الميكرو أوند (EAM) هي الانسب لاستخراج الصابونيات و الكاروتينويد لانها تحسن الكمية، تقلل من وقت استخراج و كمية الكحول المستهلكة.

أظهرت تحاليل مطياف الكتلة (HR-ESI-MS / MS و HR-ESI-MS) لصابونيات المستخرجة من اعضاء نجم البحر (*E. sepositus*) (المعدة، اعضاء التخزين، الأعضاء التكاثرية، الغشاء العلوي والسفلي) ان عدد اصناف الصابونيات اكبر بكثير مما ورد في المقالات العلمية المسبقة. حيث تحصلنا على 11 نوع من بينها 9 انواع جديدة لم يسبق استخراجها من نجم البحر المدروس. وقد تم اقتراح بنية 6 صابونيات اعتمادا على نتائج مطياف الكتلة الترادفي (HR-ESI-MS/MS) وتم ايضا التحقق من بنية الصابونيات الرئيسية (sepositoside et luzonicoside) باعتماد تجارب الرنين المغناطيسي النووي (RMN).

أظهرت الدراسة المقارنة للصابونيات الموجود في أعضاء الجسم الخمسة لنجم البحر (*E. sepositus*) تباينا نوعيا وكميا في توزيع الصابونيات. ان هذا التباين مرتبط بالعضو الجنس وموسم الجمع.

ان دراسة النشاط المضاد للأكسدة اثبت ان مركبات الصابونيات و الكاروتينويد المدروسة لها القدرة على ثبط ( $DPPH^{\bullet}$  et  $O_2^{\bullet-}$ ) بالإضافة الى ذلك فان الصابونيات المدروسة عند استعمالها بتركيز (1 مغ/ل) لها القدرة على وقف انحلال كريات الدم الحمراء المفتعل باستخدام الهيدروكسيل ( $OH^{\bullet}$ ).

## المفاتيح:

نجوم البحر، استخراج مساعد بالميكرو أوند، استخراج بالموجات فوق الصوتية، الصابونيات، الكاروتينويد، مطياف الكتلة.