

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique  
المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر وتهيئة الساحل  
Ecole National Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'état**  
**Option : Biotechnologie Marine**

**Thème:**

**Production et caractérisation de biomolécules aux propriétés  
pharmacologiques à partir des macro-algues vertes de la  
famille des Ulvacées**

Présenté par :

**HAMDI Sabrina**  
**ZIDI Rayane**

Soutenu le 22 / 11 devant le jury composé de :

M, KABRANE A.	Maître assistant classe A	ENSSMAL	Président
M, CHADER H.	Professeur	LNCPP	Promoteur
Mme AMROUCHE L.	Maître assistante classe A	ENSSMAL	Co-Promotrice
Mme KHELIFA N.	Maître de conférence classe B	ENSSMAL	Examinatrice
Mme ADDA ABBOU L.	Maître assistante classe A	LNCPP	Examinatrice
Mme MEGUENNI H.	Chercheur confirmé	CRNA	Invité

**Année universitaire : 2019 / 2020**

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique  
المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر وتهيئة الساحل  
Ecole National Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master et  
d'Ingénieur d'état**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Hydrobiologie Marine et Continentale**

**Spécialité : Biotechnologie Marine**

**Thème:**

**Production et caractérisation de biomolécules aux propriétés  
pharmacologiques à partir des macro-algues vertes de la  
famille des Ulvacées**

Présenté par :

**HAMDI Sabrina**

**ZIDI Rayane**

Soutenu le 22 / 11 devant le jury composé de :

M, KABRANE A.	Maître assistant classe A	ENSSMAL	Président
M, CHADER H.	Professeur	LNCPP	Promoteur
Mme AMROUCHE L.	Maître assistante classe A	ENSSMAL	Co-Promotrice
Mme KHELIFA N.	Maître de conférence classe B	ENSSMAL	Examinatrice
Mme ADDA ABBOU L.	Maître assistante classe A	LNCPP	Examinatrice
Mme MEGUENNI.H	Chercheur confirmé	CRNA	Invité

**Année universitaire : 2019 / 2020**

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique  
المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر وتهيئة الساحل  
Ecole National Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master**  
**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Filière : Hydrobiologie Marine et Continentale**  
**Spécialité : Biotechnologie Marine**

**Thème:**

**Production et caractérisation de biomolécules aux propriétés  
pharmacologiques à partir des macro-algues vertes de la  
famille des Ulvacées**

Présenté par :

**HAMDI Sabrina**  
**ZIDI Rayane**

Soutenu le 22 / 11 devant le jury composé de :

M, KABRANE A.	Maître assistant classe A	ENSSMAL	Président
M, CHADER H.	Professeur	LNCP	Promoteur
Mme AMROUCHE L.	Maître assistante classe A	ENSSMAL	Co-Promotrice
Mme KHELIFA N.	Maître de conférence classe B	ENSSMAL	Examinatrice
Mme ADDA ABBOU L.	Maître assistante classe A	LNCP	Examinatrice
Mme MEGUENNI.H	Chercheur confirmé	CRNA	Invité

**Année universitaire : 2019 / 2020**

## REMERCIEMENTS

---

*A l'issue de la rédaction de ce mémoire, nous sommes convaincues que le projet de fin d'étude est loin d'être un travail solitaire. En effet, ce travail n'aurait pu être réalisé sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de notre recherche nous ont permis de progresser dans cette phase délicate.*

*Au terme de ce modeste travail, nous exprimons tout d'abord nos profonds remerciements à **Mr CHADER Henni**, Professeur à la faculté de Médecine d'Alger EL ZIANIA et chef de service de pharmacotoxicologie du Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques (LNCPP) d'Alger, pour la confiance qu'il nous a témoignée en acceptant la direction scientifique de ce travail. Nous le remercions pour sa disponibilité malgré ses nombreuses charges et ses pertinents conseils, qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre respect.*

*Nous tenons particulièrement à remercier Notre co-promotrice **Mme AMROUCHE Lynda** maître assistante classe A au niveau de l'Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral ENSSMAL, pour toutes les heures qu'elle a consacrées à diriger ce travail, pour ses conseils avisés et son écoute qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de ce mémoire. Nous aimerions également lui dire à quel point nous avons apprécié ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa franchise et sa sympathie. Nous avons beaucoup appris à ses côtés, soyez assurée Madame de notre attachement et de notre profonde gratitude.*

*Nous ne saurons oublier **Mme GUEROUMI Houda** ingénieur de laboratoire au niveau de l'ENSSMAL pour son aide et ses multiples conseils, son dynamisme et de son efficacité. C'était un grand plaisir de travailler à ces côtés.*

*Un grand merci à toutes les unités de recherche : CRNA, CRND et CRAPC. De nous avoir accueillie très chaleureusement et sans lesquels notre recherche serait certainement moins riche. Nous remercions particulièrement **Mr CHEGROUCHE Salah** secrétaire général du CRND, **Mr CHAHDANE Ryad** chercheur au niveau du CRND, **Mme MEGUENNI Houria** Chef de Département des Applications Nucléaires en Génie Biologique au niveau du CRNA, **Mme HAMDJ KHOUDJA Assia** chercheur au niveau du CRNA, ainsi que **Mr Kelai Elyes** ingénieur de laboratoire au niveau du CRAPC.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à **Mr KABRANE Amine**, pour ses orientations et identification des espèces d'algues utilisées dans cette étude et aussi de nous avoir fait honneur de présider ce jury et d'évaluer ce travail.*

*Nous exprimons nos vifs remerciements à **Mme KHELIFA Nedjma**, **Mme ABOU ADDA Leila** d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.*

*Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements et tout notre amour à nos parents, nos sœurs et frères, ainsi qu'à tous nos proches amis qui ont su nous faire confiance et nous soutenir en toutes circonstances.*

**« Merci »**

## DEDICACES

---

*Il m'est agréable de profiter de cette occasion, pour rendre un hommage particulièrement à tous ceux qui me sont chers, à tous ceux qui m'ont soutenu moralement et matériellement.*

**À LA MEMOIRE DE MON GRAND-PERE**, J'aurais tant aimé que tu sois présent. Que Dieu ait ton âme dans sa sainte miséricorde

**À MES CHÉRS PARENTS**, Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Vous n'avez jamais cessé de m'encourager et de me soutenir durant toutes mes années d'étude, je vous serais éternellement reconnaissante. Que ce modeste travail soit le fruit de vos innombrables sacrifices.

**À MES GRANDS-PARENTS**, qui n'ont pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Vos prières m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études, puisse Dieu vous prêter longue vie et beaucoup de santé et de bonheur.

**À MES TRÈS CHÉRES SŒURS**, Amel et Lamia ainsi que son mari sans oublier mon adorable petit neveu Elyes, à toutes mes tantes et à tous mes oncles, pour leur présence, leur aide et encouragement tout au long de mes études.

**À TOUS MES ENSEIGNANTS DE L'ENSSMAL**, J'ai eu le privilège de profiter de leurs vastes connaissances, ainsi que leur profond savoir sans oublier le corps technique pour leur soutiens et aide précieux.

**AUX PERSONNES QUI M'ONT TOUJOURS AIDÉ ET ENCOURAGÉ**, qui étaient toujours à mes côtés, mes aimables amies, Meriem, Soumia, Sarah et Fella.

**H. SABRINA**

## DEDICACES

---

### ***A Mes Très Chers Parents***

*Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude dont je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être.*

*C'est à travers vos encouragements que j'ai su me battre, et c'est à travers vos critiques que je me suis réalisée.*

*J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.*

### ***À la plus belle et la plus douce tante Assia***

*Ma conseillère, et amie fidèle, qui m'a assisté dans les moments difficiles et m'a pris doucement par la main pour traverser ensemble des épreuves pénibles....*

*Je te suis très reconnaissante, et je ne te remercierai jamais assez pour ton amabilité, ta générosité, ton aide précieuse.*

### ***À mes Grand Parents***

*Quoique je puisse dire, je ne peux exprimer mes sentiments d'amour et de respect à votre égard.*

*Puisse le tout puissant, vous procurer une longue et heureuse vie.*

### ***A mon très cher frère et mes très chères sœurs***

#### ***Houssem, Wafa et Sirine***

#### ***A Lotfi***

*Je ne peux exprimer à travers ses lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers toi. Merci pour ton précieuse aide à la réalisation de ce travail.*

### ***A toute ma famille, mes tantes, mes cousines et mes cousins***

***A tous ceux ou celles qui me sont chers et que j'ai omis involontairement de citer.***

### ***A tous mes enseignants tout au long de mes études.***

***A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.***

**Z. RAYANE**

# TABLE DES MATIERES

---

<b>Table des matières</b> .....	i
<b>Liste des abréviations</b> .....	iv
<b>Liste des figures</b> .....	vi
<b>Liste des tableaux</b> .....	viii
Introduction .....	2
Chapitre I : Généralités .....	5
I.1. Généralités sur les algues .....	5
I.2. Classification des algues .....	5
I.2.1. Les Cyanophytes ou Cyanobactéries.....	5
I.2.2. Les Rhodophytes .....	6
I.2.3. Les Phaeophycophytes .....	6
I.2.4. Les Chlorophytes.....	6
I.3. Algues appartenant à la famille des Ulvaceae.....	7
I.3.1. Écologie des Ulvaceae .....	7
I.3.2. Mode de reproduction des Ulvaceae .....	8
I.3.3. Application des Ulvaceae.....	9
I.4. Les phytoconstituants des Ulvaceae.....	10
I.4.1. Les polysaccharides.....	10
I.4.1.1. Généralités .....	10
I.4.1.2. Les différents types des polysaccharides chez les Ulvaceae .....	11
I.4.1.2.1. Les polysaccharides de réserve .....	11
I.4.1.2.2. Les polysaccharides de structure.....	11
I.4.2. Les composés phénoliques .....	11
I.4.2.1. Généralités .....	11
I.4.2.2. Classification.....	12
I.4.2.2.1. Les flavonoïdes .....	12
I.4.2.2.2. Les tanins.....	13
I.4.3. Les Protéines .....	13
I.4.3.1. Généralités .....	13
I.4.4. Les pigments .....	14
I.4.4.1. Généralités .....	14
I.4.4.2. Chlorophylles.....	14
I.4.4.3. Les Caroténoïdes.....	15
I.4.5. Les lipides .....	15
I.4.6. Les vitamines.....	15
I.4.7. Les minéraux .....	16
I.5. Propriétés pharmacologiques des biomolécules issus de la famille des Ulvacées.....	18
I.5.1. Activité anti-inflammatoire .....	18
I.5.1.1. Inflammation.....	18
I.5.1.2. Inflammation aigüe .....	18
I.5.1.3. Inflammation chronique.....	19
I.5.1.4. Cellules impliquées dans l'inflammation.....	19
I.5.1.5. Médiateurs de l'inflammation.....	19
I.5.1.6. Les anti-inflammatoires .....	21

## TABLE DES MATIERES

I.5.1.6.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdien (AINS).....	21
I.5.1.6.2. Les anti-inflammatoires stéroïdien (AIS).....	21
I.5.1.6.3. Les anti-inflammatoires d'origine algale .....	21
I.5.2. Activité antioxydante .....	22
I.5.2.1. Les oxydants et le stress oxydatif .....	22
I.5.2.2. Les défenses antioxydantes.....	23
I.5.2.3. Activité anti-oxydante chez les Ulvaceae .....	24
Chapitre II : Matériel et méthodes.....	26
II.1.1. Site de récolte .....	26
II.1.2. Matériel végétal.....	27
II.2. Identification et caractérisation des algues.....	28
II.3. Détermination de la composition chimique globale des algues .....	29
II.3.1. Détermination de la teneur en eau.....	29
II.3.2. Détermination de la teneur et de la composition minérale.....	29
II.3.2.1. Détermination de la teneur en minéraux.....	29
II.3.2.1.1. Détermination de la composition minérale par spectroscopie fluorescence à rayon X (XRF) : .....	30
II.3.3. Détermination de la teneur en lipides.....	31
II.3.4. Détermination de la teneur en protéines.....	33
II.3.5. Détermination de la teneur des sucres totaux.....	33
II.3.5.1. Dosage des sucres libres .....	33
II.4. Extraction des biomolécules d'intérêt pharmacologique .....	34
II.4.1. Extraction, Séparation et identifications des pigments photosynthétiques .....	34
II.4.1.1. Extraction des pigments photosynthétique .....	34
II.4.1.2. Séparation et identification des pigments photosynthétiques .....	35
II.4.1.2.1. Chromatographie de partage sur colonne sur gel de silice.....	35
II.4.1.2.2. Chromatographie sur couche mince.....	36
II.4.2. Extraction et analyses biochimiques des polysaccharides .....	37
II.4.2.1. Extraction des polysaccharides .....	37
II.4.2.2. Calcul du rendement d'extraction.....	40
II.4.2.3. Analyses biochimiques des polysaccharides .....	40
II.4.2.3.1. Analyse par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier .....	40
II.4.2.3.1.1. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	41
II.4.3. Extraction et dosage des composés phénoliques.....	41
II.4.3.1. Extraction des composés phénoliques .....	41
II.4.3.2. Dosage des composés phénoliques .....	42
II.5. Évaluation des propriétés pharmacologiques des biomolécules extraites des Ulvaceae	
43	
II.5.1. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i> .....	43
II.5.2. Évaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> .....	45
Chapitre III : Résultats et Discussion.....	45
III.1. Identification des algues.....	45
III.2. Composition chimique globale d' <i>Ulva sp.</i> .....	47
III.2.1. Teneur en eau .....	47

## TABLE DES MATIERES

---

III.2.2. Teneur et composition de la matière minérale .....	48
III.2.2.1. Teneur en minéraux .....	48
III.2.2.2. La composition minérale .....	48
III.2.3. Teneur en lipides totaux .....	50
III.2.4. Teneur en protéines totales.....	50
III.2.5. Teneur en sucre .....	51
III.2.5.1. Teneur en sucres totaux .....	51
III.2.5.2. Teneur en sucres libres .....	51
III.3. Identification et caractérisation des pigments contenus dans les ulves.....	53
III.3.1. Caractéristique spectrale des pigments extraits.....	53
III.3.2. Propriété chimique des pigments extraits.....	57
III.4. Caractérisation des polysaccharides.....	58
III.4.1. Rendement d'extraction .....	58
III.4.2. Analyse des polysaccharides par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier 60	
III.4.3. Analyse des polysaccharides par RMN.....	61
III.5. Activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i> des polysaccharides et des polyphénols extraits de L'Ulva .....	62
III.6. Activité anti-oxydante <i>in vitro</i> .....	64
III.6.1. Activité anti-oxydante des pigments .....	65
III.6.2. Activité anti-oxydante des polysaccharides sulfatés.....	66
III.6.3. Activité anti-oxydante des composés phénoliques.....	66
Conclusion.....	69
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	71
ANNEXES .....	84

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

Symbole	Définitions
%	Pourcentage
°C	Degrés Celsius
AA	Acide aminé
AAR	Activité anti-radicalaire
ABTS	2,2-azinobis 3-ethyl-benzothiazoline 6-sulphonate
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdien
AIS	Anti-inflammatoire stéroïdien
BSA	Sérum albumine bovine
Ca	Calcium
CCM	Chromatographie sur couche mince
Cu	Cuivre
COX	Cyclooxygénase
DO	Densité Optique.
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
DPPHH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazine
EtOAc	Acétate d'éthyle
Fe	Fer
FRAP	Ferricreducingantioxidant power
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
g	Gramme
GAE	Gallic acid equivalent
GPx	Enzyme la glutathion peroxydase
H	Heure
IC50	Concentration permettant d'inhiber 50 % du radical DPPH.
IL1	Interleukine 1
IL6	Interleukine 6
IL10	Interleukine 10
IR	Infrarouge
K	Potassium
KBr	Bromure de potassium
M	Masse
Mg	Magnésium
Mg	Milligramme

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

min	Minute
ml	Millilitre
Mo	Molybdène
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonate de sodium
Nm	Nanomètre
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
P	Phosphore
PAF	Facteurs d'activation plaquettaire
PG	Prostaglandine
pH	Potentiel d'hydrogène
PIO	Pourcentage d'inhibition de l'œdème
PN	Les polynucléaires
PSs	Polysaccharides
R <sup>2</sup>	Coefficient de corrélation
Rf	Rapport frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RNS	Espèces réactives à l'azote
ROS	Espèces réactives à l'oxygène
S	Soufre
Se	Sélénium
SOD	Enzyme superoxyde dismutase
Tr	Tour
T°	Température
TEAC	Trolox équivalent antioxidant capacity
TNF	Tumor Necrosis Factor
UV-VIS	Ultraviolet-visible
V	Volume
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
XRF	Spectroscopie fluorescence à rayon X
Zn	Zinc
µg	Microgramme

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure I.1</b> : Schéma représentatif des différents types de reproduction sexuelle chez les Chlorophytes .....	7
<b>Figure I.2</b> : Schéma représentatif du cycle de reproduction de l'Ulva.....	8
<b>Figure I.3</b> : Structure des flavonoïdes .....	12
<b>Figure I.4</b> : Structure des Chlorophylles. ....	14
<b>Figure I.5</b> : Structure des caroténoïdes (carotènes).....	15
<b>Figure II.1</b> : Situation géographique de la plage de KOUALI.....	26
<b>Figure II.2</b> : Plage de KOUALI de la wilaya de Tipaza .....	26
<b>Figure II.3</b> : Situation géographique de la plage Sidi Ghiles.....	27
<b>Figure II.4</b> : Plage Sidi Ghiles.....	27
<b>Figure II.5</b> : Récolte des échantillons .....	28
<b>Figure II.6</b> : Algue séchée et coupée .....	29
<b>Figure II.7</b> : Algue broyée en poudre.....	29
<b>Figure II.8</b> : Creusets contenant l'algue séchée dans le four à moufle à 600°C .....	30
<b>Figure II.9</b> : Extraction des lipides par un extracteur de Soxhlet.....	32
<b>Figure II.10</b> : Evaporation du solvant par rota-vapeur.....	32
<b>Figure II.11</b> : Colonne de chromatographie de gel de silice pour la séparation des pigments .....	36
<b>Figure II.12</b> : Protocole d'extraction des polysaccharides.....	39
<b>Figure II.13</b> : Extracteur Soxhlet .....	39
<b>Figure II.14</b> : Résidus appauvris en pigments et en protéines .....	39
<b>Figure II.15</b> : Macération à l'eau chaude .....	39
<b>Figure II.16</b> : Filtration .....	40
<b>Figure II.17</b> : Protocole d'extraction des polyphénols.....	42
<b>Figure II.18</b> : La pesée des souris (20 ±2 g) .....	44
<b>Figure II.19</b> : Dépôt de l'échantillon sur l'oreille de la souris.....	44
<b>Figure II.20</b> : Souris sacrifiées .....	44
<b>Figure II.21</b> : Découpage de l'oreille en disque.....	44
<b>Figure II.22</b> : Oreille de souris diamètre 6mm.....	44
<b>Figure II.23</b> : Mécanisme réactionnel du test DPPH .....	46
<b>Figure III.1</b> : Les macro-minéraux présents dans l'algue <i>Ulva sp</i> .....	49
<b>Figure III.2</b> : Les micro-minéraux présents dans l'algue <i>Ulva sp</i> .....	49
<b>Figure III.3</b> : Courbe d'étalonnage " densité optique en fonction de la concentration de la solution de BSA .....	50
<b>Figure III.4</b> : Courbe d'étalonnage du saccharose .....	51
<b>Figure III.5</b> : La composition chimique globale de l'algue séchée <i>Ulva sp</i> .....	52
<b>Figure III.6</b> : Les pigments photosynthétiques de l'algue <i>Ulva sp</i> obtenus par chromatographie de partage sur colonne de gel de silice.....	53
<b>Figure III.7</b> : Spectre d'absorption des pigments Carotènes. 1: carotène extrait de l'Ulva (présente étude).2: carotène extrait d'une plante verte.....	54
<b>Figure III.8</b> : Spectre d'absorption de la Chlorophylle A (1) et B (2) extraits de l'Ulva (présente étude) .....	55

## LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure III.9</b> : Spectre d'absorption de la Chlorophylle A (1) et B (2) extraits d'une plante verte	55
<b>Figure III.10</b> : Spectre d'absorption de la Xanthophylle.1: xanthophylle extrait de l' <i>Ulva</i> (présente étude).2: xanthophylle extrait d'une plante verte Effet anti-radicalaire de l'extrait EtOAc sur la réduction du DPPH	56
<b>Figure III.11</b> : Identification des différents pigments photosynthétiques par CCM	57
<b>Figure III.12</b> : Extrait de polysaccharides obtenus selon (protocole1)	59
<b>Figure III.13</b> : Extrait de polysaccharides obtenus après dédoublement des temps de réaction (protocole 2)	59
<b>Figure III.14</b> : Le spectre FTIR des polysaccharides extraits de l'algue <i>Ulva sp</i>	60
<b>Figure III.15</b> : Potentiel d'inhibition de l'œdème (PIO) pour chaque traitement appliqué sur souris en (%)	63
<b>Figure III.16</b> : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH <sup>•</sup> en fonction de la concentration de l'extrait EtOAc	66
<b>Figure III.17</b> : Effet antiradicalaire de l'acide ascorbique sur la réduction du DPPH	66
<b>Figure III.18</b> : Effet antiradicalaire de l'extrait EtOAc sur la réduction du DPPH	66

## LISTE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau I.1</b> : Les activités pharmacologiques des ulvacées .....	10
<b>Tableau I.2</b> : Rôle des minéraux .....	17
<b>Tableau I.3</b> : Origine cellulaire et effets des médiateurs impliqués dans une réaction inflammatoire .....	20
<b>Tableau III.1</b> : Classification d' <i>Ulva lactuca</i> . .....	45
<b>Tableau III.2</b> : Classification d' <i>Ulva fasciata</i> . .....	45
<b>Tableau III.3</b> : Clé d'identification des deux espèces d'algue. ....	46
<b>Tableau III.4</b> : Composition chimique globale de l'algue <i>Ulva sp</i> .....	47
<b>Tableau III.5</b> : Rendements d'extraction des polysaccharides de l' <i>Ulva sp</i> .....	59
<b>Tableau III.6</b> : Résultat du test statistique (T) .....	62
<b>Tableau III.7</b> : Moyenne des différences de poids et les pourcentages d'inhibition de l'œdème	63
<b>Tableau III.8</b> : Test DPPH pour les différents phytoconstituants extraits de l'algue <i>Ulva sp</i> ....	64

# **INTRODUCTION**

### Introduction

Les recherches traitant du stress oxydatif ont largement été développées depuis plusieurs années à des fins cliniques étant donné son rôle prépondérant dans le développement des pathologies, en particulier les maladies neuro-dégénératives et les troubles cardio-vasculaires, ainsi que le diabète et les cancers (AGARWAL., 2003). Le stress oxydatif perturbe l'équilibre physiologique, et conduit à la production excessive des espèces réactives à l'oxygène "ROS", notamment l'anion superoxyde [ $O_2^{\cdot-}$ ], le radical hydroxyle [ $OH^{\cdot}$ ], l'oxygène singulet [ $O_2^{\cdot}$ ] et le peroxyde d'hydrogène [ $H_2O_2$ ], qui participent à l'oxydation des composants cellulaires tels que les lipides, les protéines et l'ADN conduisant à leur altération (VALKO *et al.*, 2007 ; DAVIES, 2000 ; HAMDI DAMARK., 2013)

Réduire la production excessive des espèces réactives à l'oxygène ROS et protéger les organismes contre les dommages oxydatifs du stress est ainsi devenu un objectif primordial de recherche pour maintenir l'équilibre de l'état oxydatif, la santé et le bien-être des humains, des animaux et des plantes.

Dans ce domaine, un grand intérêt est porté aux produits naturels obtenus à partir d'organismes marins, et en particulier les algues. Fait intéressant : les composés bioactifs d'algues peuvent agir comme des alternatives aux molécules médicamenteuses, disposant d'un grand avantage par rapport aux médicaments classiques avec une biodisponibilité élevée et souvent une meilleure spécificité. Cette dernière décennie, plusieurs composés d'algues, y compris les pigments, les polyphénols, les polysaccharides et les protéines, ont été présentés comme des antioxydants puissants qui protègent les cellules contre les radicaux libres et retardent la progression de nombreuses maladies chroniques (DUNDAR *et al.*, 2012).

Parmi ces algues, les algues vertes appartenant au genre *Ulva* sont connues pour avoir une riche source de composés bioactifs structurellement diversifiée avec un potentiel pharmaceutique précieux (PEÑA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2011). Différentes études ont montré que les *Ulves* constituent une source potentielle riche en pigments naturels, en fractions phénoliques, en polysaccharides sulfatés (Ulvanes), en protéines et lectines aux propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires (VANDERLEI *et al.*, 2010; YAICH *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2018).

Sa large distribution mondiale, son innocuité et ses nombreuses applications font de l'*Ulva* une algue modèle. L'espèce *Ulva sp* présente un fort potentiel biotechnologique lié à une productivité élevée de sa biomasse avec des coûts réduits lorsqu'elle est cultivée dans un système d'aquaculture multi-trophique intégrée (GUERRERO., 2012).

## INTRODUCTION

---

De plus son exploitation biotechnologique constitue une solution et un atout pour l'environnement à cause des marées vertes qu'elle provoque suite à l'eutrophisation. En effet, l'utilisation excessive des engrais stimulerait la croissance de ces algues qui échouent sur les plages, parfois de façon spectaculaire, où des champs verts à perte de vue apparaissent. Les retombées ne sont pas qu'écologique et touristique mais elles constituent un risque réel de santé publique car quand elles rentrent en décomposition, elles dégagent un gaz toxique voire mortel (H<sub>2</sub>S) (DE LA LOIRE, 2013)

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail, il s'agit de prospecter et évaluer le potentiel de valorisation de l'algue *Ulva sp* récoltée dans les Plages KOUALI et SIDI GHILES de la wilaya de Tipaza.

Le but de la présente étude est tout d'abord d'obtenir des données sur la composition chimique de l'algue (humidité, cendres, protéines, lipides et glucides) et d'identifier et d'estimer sa teneur en biomolécules bioactives telles que les pigments, les composés phénoliques, les polysaccharides sulfatés, et enfin de déterminer leur pouvoir antioxydant *in vitro* ainsi que d'évaluer leur effet anti-inflammatoire *in vivo*.

Notre travail est organisé en plusieurs parties :

- ✓ La première partie est une synthèse bibliographique qui comprend les généralités sur les algues, focus sur la famille des ulvacées, les phyto-constituants et leurs propriétés pharmacologiques.
- ✓ Le deuxième volet est voué à la partie expérimentale et aux protocoles adoptés pour la détermination de la composition chimique et biologique de l'algue, l'extraction des biomolécules d'intérêt et l'évaluation de leurs activités anti-inflammatoires et anti-oxydantes.
- ✓ La troisième partie est consacrée à l'interprétation des différents résultats obtenus et à l'étude comparative avec les travaux antérieurs.
- ✓ Enfin, une conclusion générale résume l'essentiel des résultats obtenus et les perspectives.

# **CHAPITRE 1 :**

## **Généralités**

### Chapitre I : Généralités

Ce premier chapitre a pour vocation de regrouper les informations essentielles concernant les algues marines et plus précisément les algues appartenant à la famille des Ulvacées, décrivant aussi leurs écologies, modes de reproduction et leurs différents domaines d'utilisations, ainsi qu'un aperçu général sur les phytoconstituants appartenant à cette famille. Ce chapitre expose également les propriétés pharmacologiques des Ulvacées étudiées à savoir l'activité anti-inflammatoire et anti-oxydante.

#### I.1. Généralités sur les algues

Les algues représentent la grande majorité des végétaux marins, on les retrouve dans les mers comme dans les eaux douces, aussi sur les sols humides et même sur la neige, la plus grande partie des algues appartient au benthos c'est-à-dire aux groupes d'organismes fixés sur un substrat, et une petite partie appartient aux groupes d'organismes qui flottent librement à la surface et donc aux pelagos (KORNPROBST, 2005).

Les algues ne possèdent ni tiges, ni racines, ni fleurs. Elles sont dotées d'un appareil végétatif qu'on appelle un thalle, ce thalle est peu spécialisé, il est simple chez les algues les moins évoluées et bien différencié chez les algues les plus évoluées. Les algues se reproduisent par les deux voies sexuée et asexuée, et présentent une grande diversité de cycle de développement. Ce sont des êtres autotrophes c'est-à-dire capables de synthétiser leur propre matière organique grâce à la photosynthèse (CABIOC'H *et al.*, 2006).

#### I.2. Classification des algues

La classification des grands groupes algues est basée entre autres sur leur pigmentation, et donc à partir de ce critère on peut distinguer les quatre grands groupes d'algues : Les Cyanophytes, les Rhodophytes, les Phaeophycophytes et les Chlorophytes (LELIAERT *et al.*, 2011).

##### I.2.1. Les Cyanophytes ou Cyanobactéries

Il s'agit des algues procaryotes, elles peuvent être unicellulaires ou filamenteuses ou encore coloniale, leur couleur bleu verdâtre est due à la phycocyanine le pigment dominant chez ce groupe d'algues, elles occupent les eaux douces, les eaux de mer ainsi que les milieux humides. Leur reproduction est asexuelle. Les cyanophytes où les algues bleues partagent avec les bactéries le même type de cellules ainsi le même mode de reproduction d'où l'appellation des Cyanobactéries (KUMAR et SINGH, 1979).

### **I.2.2. Les Rhodophytes**

A l'exception de quelques exemples rares unicellulaires, les rhodobiontes sont pluricellulaires, allant de simples filaments microscopiques à des lames épaisses qui peuvent atteindre jusqu'à trois mètres de long (CABIOTCH *et al.*, 2006). Une grande partie des algues rouges est marine mais il existe aussi certaines espèces dulcicoles (RINDI *et al.*, 2012).

Les Rhodophytes ont la particularité de posséder un amidon extraplastidial appelé l'amidon floridéen. Leur couleur rouge est due au pigment dominant : r-phycoérythrine. La reproduction chez ce groupe d'algues est variée et complexe (CABIOTCH *et al.*, 2006)

### **I.2.3. Les Phaeophycophytes**

Les Phaeophycophytes sont des organismes pluricellulaires macroscopiques le plus souvent marins se définissent par un ensemble de caractères communs tels que la structure de plastes et l'absence d'amidon intraplastidial et la présence de la Fucoxanthine : un pigment jaune orangé dont l'abondance donne la couleur jaune doré à ce groupe (BAWEJA *et al.*, 2016).

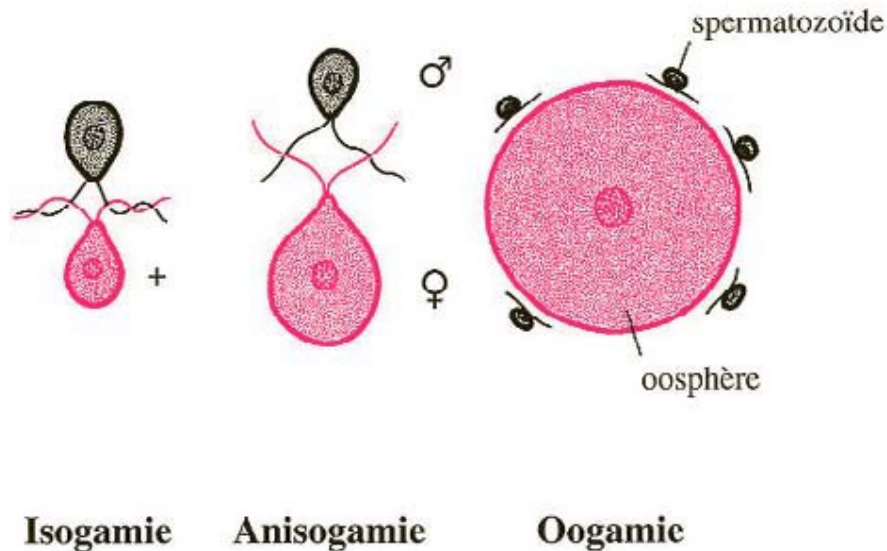
En ce qui concerne le type d'organisation, les algues brunes offrent une grande diversité allant de simples formes filamenteuses à des formes complexes et grandes dotées de systèmes conducteurs similaires à celui des végétaux supérieurs. La reproduction se fait soit par voie asexuée ou par voie sexuée (CABIOTCH *et al.*, 2006; BAWEJA *et al.*, 2016).

### **I.2.4. Les Chlorophytes**

Les Chlorophytes forment un groupe très hétérogène, elles peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires, macroscopiques ou microscopiques, sous forme de cellules isolées ou en colonie ou encore sous formes filamenteuses ou d'autres formes plus évoluées. On les retrouve dans les mers, les eaux douces ainsi dans les eaux saumâtres (NASELLI-FLORES et BARONE, 2009).

Les algues vertes se caractérisent par un certain nombre de caractères cytologiques et biochimiques fondamentaux. Elles ont des plastes bien individualisés contenant les différents pigments dont la chlorophylle a et b sont les plus dominantes d'où leur couleur verdâtre. A l'exception des autres algues, les chlorobiontes ont l'exclusivité de produire un vrai amidon intraplastidial (CABIOTCH *et al.*, 2006).

Au sein de ce groupe d'algues, tous les modes de reproduction sont présents la reproduction sexuée et asexuée, ainsi la multiplication végétative. La reproduction sexuée se limite à trois types : l'oogamie<sup>1</sup>, isogamie<sup>2</sup> et l'anisogamie<sup>3</sup> (BAWEJA *et al.*, 2016) (Figure I.1)



**Figure I.1 :** Schéma représentatif des différents types de reproduction sexuelle chez les Chlorophytes (ROLAND *et al.*, 2008)

### I.3. Algues appartenant à la famille des Ulvaceae

Il s'agit d'une famille des algues vertes de l'ordre des Ulvales de la classe des Ulvophycées. Elle regroupe actuellement huit genres qui sont exclusivement marins (RINDI *et al.* 2012, GUIRY et GUIRY. 2020).

Le thalle appartenant à ce groupe se présente soit sous forme d'une lame ondulée formée de deux rangées de cellules, tel est le cas des ulves (genre *Ulva*) (WOLF *et al.*, 2012; RINDI *et al.*, 2012; BAWEJA *et al.*, 2016), soit sous forme d'un tube simple ou ramifié formé d'une assise de cellules (exemple : genre *Enteromorpha*) (RINDI *et al.*, 2012).

#### I.3.1. Écologie des Ulvaceae

Les Ulvaceae sont des algues cosmopolites c'est-à-dire à distribution géographique très vaste et répandues dans quasiment le monde entier. Elles sont omniprésentes et abondantes dans la zone intertidale et la zone infralittoral (HAYDEN et WAALAND, 2002; DAWES, 2016).

<sup>1</sup> : Forme de reproduction sexuelle dont les gamètes mâles sont petits et mobiles et les gamètes femelles sont volumineux et immobiles

<sup>2</sup> : Forme de reproduction sexuelle dont les deux gamètes sont morphologiquement identiques.

<sup>3</sup> : Forme de reproduction sexuelle dont les cellules sexuelles sont morphologiquement différentes.

On les retrouve fixées sur des substrats rocheux, certains représentants de cette famille vivent en symbiose avec d'autres algues tels est le cas du *g.Ulva* avec l'algue *Cladophora sp* (BAWEJA *et al.*, 2016).

### I.3.2. Mode de reproduction des Ulvaceae

La reproduction s'effectue par l'intermédiaire des cellules sexuelles (gamètes ou spores), qui fusionne et produit un zygote.

C'est commun pour l'ordre des Ulvales (l'ordre dont les ulvacées appartient) que les cellules fertiles c'est-à-dire les gamètes ou les spores sont issus de la transformation intégrale d'une partie des cellules végétatives du bord de thalle. Cette zone devient incolore après l'émission des éléments fertiles et sera éliminée par la suite (CABIOC'H *et al.*, 2006).

Le cycle biologique des ulvacées est digénétique haplodiplophasique isomorphe (O'KELLY et FLOYD, 1983), il se déroule en alternance entre un sporophyte diploïde et un gamétophyte haploïde identiques (ROLAND *et al.*, 2008).

Par exemple chez le *g.Ulva* (Figure I.2), le sporophyte diploïde donne par méiose des zoospores quadriflagellées qui donnent naissance à un gamétophyte haploïde, lui-même produit par mitose des gamètes biflagellés isocontés<sup>4</sup> haploïde. La fécondation anisogame produit un zygote diploïde qui germe pour donner un nouveau sporophyte diploïde (DAWES, 2016).

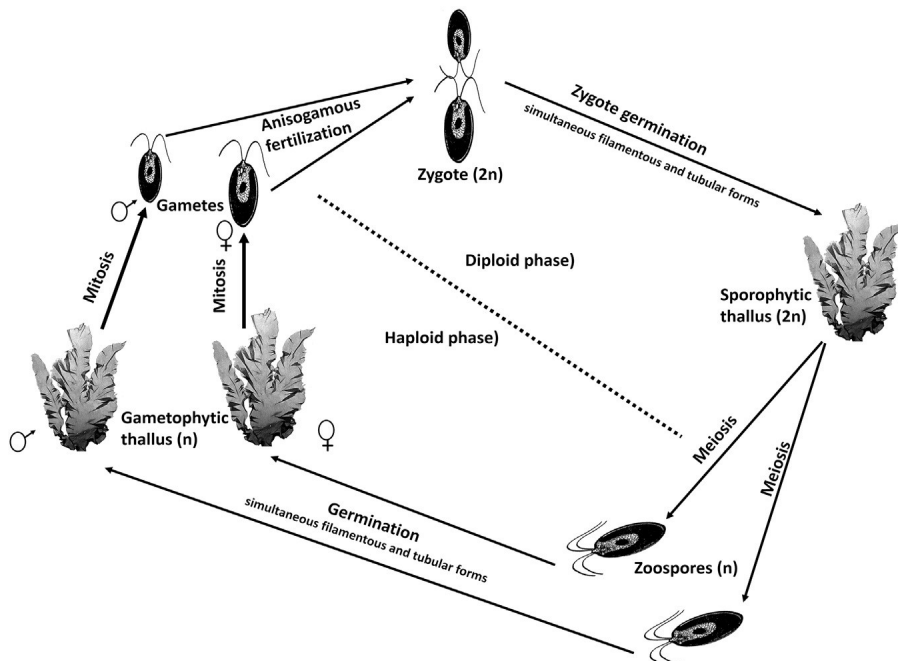


Figure I.2: Schéma représentatif du cycle de reproduction de l'Ulva (BAWEJA *et al.*, 2016)

<sup>4</sup> Les flagelles des gamètes sont de taille égale.

### I.3.3. Application des Ulvaceae

Les ulvacées comme toutes les algues marines ont été utilisées depuis des temps immémoriaux dans l'alimentation humaine notamment dans les pays d'extrême orient.

À l'heure actuelle elles forment une source importante des biomolécules utilisées dans les différentes industries.

#### Les Ulvaceae dans l'alimentation :

Depuis des milliers d'années, les ulvacées ont été utilisées comme des légumes de mer, et considérées comme des ingrédients indispensables de certains plats traditionnels japonais (BAWEJA *et al.*, 2016).

Cette famille devient de plus en plus populaire et ceci grâce à ses propriétés nutritionnelles. Elles sont exploitées comme source de production d'aliments et d'additifs alimentaires en Asie, en Europe, en Amérique et même en Afrique (FLEURENCE, 2016).

#### Les Ulvaceae dans le domaine pharmaceutique :

L'utilisation des algues dans le domaine pharmaceutique remonte à l'époque romaine et grecque. Le médecin, pharmacologue et botaniste grecque Pedanius Dioscorides a mentionné dans *materia medica* les effets thérapeutiques de certaines espèces d'algues. Pas que les romains et les grecques qui utilisaient ces végétaux comme remède, les asiatiques aussi les exploitées dans leur médecine traditionnelle (RINDI *et al.*, 2012).

Aujourd'hui les macroalgues dont les ulvacées sont la cible de plusieurs chercheurs car ils produisent une large gamme de composants doués d'un grand nombre d'activités pharmacologiques. (Tableau I.1)

Ces molécules bioactives représentent pour l'algue un moyen de défense contre les autres organismes tels que les herbivores et les micro-organismes, ou encore on peut les considérés comme une sorte d'adaptation aux différentes variations des facteurs abiotiques comme la température et la salinité (RINDI *et al.*, 2012).

**Tableau I.1** : Les activités pharmacologiques des ulvacées

Genre	Activité	Référence
<b>Genre <i>Ulva</i></b>	Activité anti inflammatoire	(EL GAMAL, 2010; AHMED <i>et al.</i> , 2017)
	Activité antimicrobienne	(EL GAMAL, 2010)
	Activité antiviral	(KIDGELL <i>et al.</i> , 2019)
	Activité anti oxydante	(AHMED <i>et al.</i> , 2017; KAZIR <i>et al.</i> , 2019; SAKTHIVEL et KASI, 2019)
	Activité anticancéreuse	(SAKTHIVEL et KASI, 2019; KIDGELL <i>et al.</i> , 2019)
	Activité hypolipémiante	(KIDGELL <i>et al.</i> , 2019)
<b>Genre <i>Enteromorpha</i></b>	Activité anti oxydante	(SAKTHIVEL et KASI, 2019)
	Activité anti inflammatoire	
	Activité cytotoxique	(EL GAMAL, 2010)

#### Les Ulvaceae dans le domaine énergétique

La recherche des ressources renouvelables, non polluantes et alternatives au pétrole s'est orientée vers la production des biocarburants ou ce qu'on appelle la bioraffinerie.

Les biocarburants peuvent être classés en fonction de la matière première utilisée en trois générations.

Les biocarburants issus de biomasse algale sont classés parmi les biocarburants de 3<sup>ème</sup> génération (APARICIO *et al.*, 2020).

Ces biocarburants proviennent de la fermentation des sucres en alcools, de la transestérification et de la gazéification de la biomasse (TIWARI *et al.*, 2019).

Chez les ulvacées, il s'agit essentiellement du biodiesels, bioéthanol, biobutanol, biogaz, biohydrogène (APARICIO *et al.*, 2020).

### **I.4. Les phytoconstituants des Ulvaceae**

#### **I.4.1. Les polysaccharides**

##### **I.4.1.1. Généralités**

Ce sont des polymères glucidiques formés par plus de vingt oses ou monosaccharides liés entre eux par des liaisons glycosidiques. Selon le type de monosaccharide on peut distinguer deux groupes de polysaccharides : les homo-polysaccharides et les hétéro-polysaccharides.

Le premier groupe est formé par l'enchaînement du même ose, tandis que le deuxième est constitué par deux ou plusieurs oses différents (MAJI, 2019).

L'origine des polysaccharides est diverse, ils peuvent être d'origine animale comme l'Héparine, la Chitine, le Chitosane, ou encore d'origine végétale tel est le cas de la Pectine et la Cellulose. Comme ils peuvent être issus des algues entre autres l'agar, l'alginate et les ulvanes (MAJI, 2019).

La fermentation microbienne peut être aussi l'origine de ces polymères comme le Xanthane (PHILP, 2018; MAJI, 2019).

### **I.4.1.2. Les différents types des polysaccharides chez les Ulvaceae**

Les polysaccharides chez les algues généralement peuvent être classés en deux groupes majeurs : les polysaccharides de structure et les polysaccharides de réserve (WIJESEKARA et KARUNARATHNA, 2017).

#### **I.4.1.2.1. Les polysaccharides de réserve**

Chez les ulvacées et comme toutes les algues vertes, l'amidon représente la forme de réserve (USOV et ZELINSKY, 2013).

#### **I.4.1.2.2. Les polysaccharides de structure**

Chez les algues marines les polysaccharides de structure représentent environ 50% du poids de l'algue sèche. La composition biochimique de ces polysaccharides pariétaux varie d'un groupe d'algue à un autre et varie au sein du même groupe en fonction des facteurs biologiques, physiques et environnementaux (WIJESEKARA et KARUNARATHNA, 2017).

Chez les ulvacées et principalement chez le *g. Ulva*, la teneur en polysaccharides de structure peut atteindre les 45% du poids sec de l'algue. Ceux-ci comprennent quatre familles: la Cellulose, le Xyloglucane, Glucuronane et les Ulvanes. Ces derniers représentent de 9 à 36% des polysaccharides totaux (KIDGELL *et al.*, 2019).

### **I.4.2. Les composés phénoliques**

#### **I.4.2.1. Généralités**

Les polyphénols aussi appelés phlorotannins sont des molécules hydrosolubles synthétisées par les végétaux afin de se défendre contre les différentes agressions environnementales, Ils sont susceptibles de présenter de nombreuses activités biologiques y compris des propriétés anti-oxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoires (BRAVO, 1998).

Le teneur en polyphénols diffère d'une espèce à une autre, ce taux varie très souvent selon le type et la polarité des solvants d'extraction. En effet, la teneur la plus élevée en phénols a été obtenue suite à une extraction dans l'acétate d'éthyle (TRIGUI *et al.*, 2013). Ce taux subit également une influence saisonnière puisque les extraits de fin de l'hiver et de début du printemps (Février et mars) ont montré une plus forte teneur phénolique que celles recueillies pendant les autres mois (TRIGUI *et al.*, 2013).

Les polyphénols sont composés par de nombreux groupes phénoliques arrangés en des structures complexes, ils ont des poids moléculaires compris entre 500 et 3000 Dalton ; et comportent au moins 9000 structures connues différentes, allant de molécules phénoliques de bas poids moléculaires comme les acides phénoliques à des composés avec un poids moléculaire très élevé comme les tannins (SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006).

### I.4.2.2. Classification

La large variété de polyphénols peut être divisée en fonction de leur structure en une dizaine de classes, Parmi ces composés on cite les plus importants : Les flavonoïdes et les tanins (BRAVO, 1998).

#### I.4.2.2.1. Les flavonoïdes

Le terme « flavonoïde » est dû à leur couleur jaune (= flavus en latin), ils sont considérés comme des pigments grâce à cette couleur jaunâtre et engendrent souvent la coloration des fleurs au-delà de la chlorophylle et des caroténoïdes (AKROUM, 2011).

Ces polyphénols représentent le groupe de composés phénoliques le plus diversifié avec plus de 4000 flavonoïdes. Ils sont caractérisés par leur aptitude à exercer une multitude d'activités biologiques (GHEDIRA, 2005).

Leur structure est composée de deux cycles benzéniques en C<sub>6</sub> (A et B), reliés entre eux par une chaîne en C<sub>3</sub> qui peut évoluer en un hétérocycle (cycle C) (figure I.3)(ERLUND, 2004).

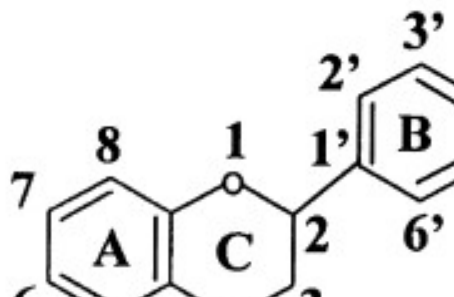


Figure I.3 : Structure des flavonoïdes (HEIM *et al.*, 2002)

### I.4.2.2. Les tanins

Les tanins sont des composés phénoliques de masse moléculaire très élevée allant jusqu'à 20000 Dalton. Ces composés phénoliques ont une immense importance économique et écologique et présentent de nombreuses activités biologiques tels que : Activité antibactérienne, anti-oxydante, anti-VIH, anticancéreuse (BRAVO, 1998).

Les tanins ont une structure très variée, ils ont la capacité de se lier aux protéines en solution et des alcaloïdes et de les précipiter. Selon leur structure on distingue deux groupes de tanins : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (MACHEIX *et al.*, 2005).

### I.4.3. Les Protéines

#### I.4.3.1. Généralités

Les protéines sont des macromolécules biologiques nécessaires pour la vie et présentes dans toutes les cellules vivantes. Elles sont composées essentiellement d'acides aminés (20 AA) liés entre eux par des liaisons peptidiques (LI-CHAN et LACROIX, 2018).

Selon FLEURENCE *et al.* (2018), chez les algues marines, les protéines représentent entre 9 et 26% du poids sec de l'algue. Cette teneur varie d'une espèce à une autre et dépend des saisons ainsi des conditions environnementales.

La fraction protéique chez le genre *Ulva* est estimée généralement entre 9 et 33% de la matière sèche (FLEURENCE *et al.*, 2018).

En ce qui concerne la composition en acide aminé (AA), les ulvacées comme toutes les algues marines sont riches en aspartate et en glutamate. Les ulves contiennent essentiellement les huit AA essentiels :

Cystéine-Isoleucine-Leucine-Lysine-Méthionine-Phénylalanine-Théonine-Valine accompagnés des AA non essentiels tels que : l'arginine, et des AA semi essentiels comme Tyrosine (SHUULUKA *et al.*, 2013).

Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines non immunes avec différentes origines à savoir : végétal, animal, bactérienne ou viral (SMIT, 2004).

Elles ont la capacité de former des liaisons avec les sucres et aussi il agglutinent les cellules comme les hématies (WANG *et al.*, 1998).

Selon leur structure, il peuvent être classés comme suit : (TEIXEIRA *et al.*, 2012)

Mérolectines : lectines avec un seul domaine de liaison avec les glucides ; elles ne sont pas capables d'agglutiner les cellules ou de précipiter les glycoconjugués.

Hololectines: lectines avec deux domaines de liaisons identiques; elles ont la capacité d'agglutiner les cellules et/ou précipiter les glycoconjugués ;

Superlectines: lectines avec au moins deux domaines de liaisons non identiques;

#### I.4.4. Les pigments

##### I.4.4.1. Généralités

Les pigments photosynthétiques sont des composés bioactifs capables de capter l'énergie solaire à une longueur d'onde bien précise. Ce qui explique la distribution bathymétrique des algues marines (CABIOC'H *et al.*, 2006; DUMAY et MORANÇAIS, 2016).

Les pigments jouent un rôle dans la photosynthèse, aussi dans la protection contre l'excès de lumière et dans la pigmentation des algues (SYRPAS et VENSKUTONIS, 2020).

Chez chaque algue marine on trouve essentiellement trois grandes classes des pigments : les chlorophylles, les caroténoïdes (carotènes et xanthophylles) et phycobilines (DUMAY et MORANÇAIS, 2016).

L'équipement pigmentaire des chlorophytes y compris les ulvacées est composé essentiellement de la Chlorophylle (a et b) des caroténoïdes ( $\beta$ -carotènes) et de certains xanthophylles (les néoxanthine et violaxanthine) (DUMAY et MORANÇAIS, 2016).

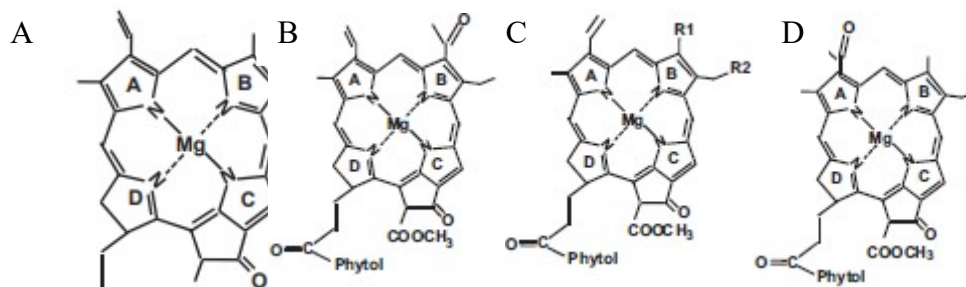
##### I.4.4.2. Chlorophylles

Ce sont des pigments de couleur verdâtre. Ils jouent un rôle primordial dans la photosynthèse, mais aussi ils permettent la protection des tissus algaux contre le stress oxydatif (ROWAN, 1989).

Il existe quatre types de chlorophylles (a, b, c, d) qui diffèrent par de légères modifications structurales (Figure I.4).

Une molécule de chlorophylle se compose d'une tête de porphyrine (quatre cycles de pyrrole contenant de l'azote disposé en anneau autour d'un ion magnésium), et d'une longue queue d'hydrocarbure (phytol) (ROWAN, 1989).

Les ulvacées et plus précisément chez l'espèce *Ulva rigida*, la chlorophylle (a et b) représente 21% des pigments (SATPATI et PAL, 2011).



**Figure I.4 :** Structure des Chlorophylles.(CHAKDAR et PABBI, 2017)  
A : Chlorophylle a ; B : Chlorophylle b ; C : Chlorophylle c ; D : Chlorophylle d

#### I.4.4.3. Les Caroténoïdes

Ce sont des pigments jaune ou orange composés de 2 cycles de 6 C liés entre eux par une chaîne de Carbone (figure I.5). Ils jouent un rôle accessoire dans la photosynthèse, ils permettent de transférer à la chlorophylle l'énergie lumineuse qu'ils absorbent (DUMAY et MORANÇAIS, 2016).

Les caroténoïdes sont de puissants antioxydants. Un grand nombre d'études a démontré les propriétés anti-oxydantes des caroténoïdes algaux et le rôle qu'ils jouent dans la prévention de plusieurs pathologies liées au stress oxydatif (HAMED *et al.*, 2015).

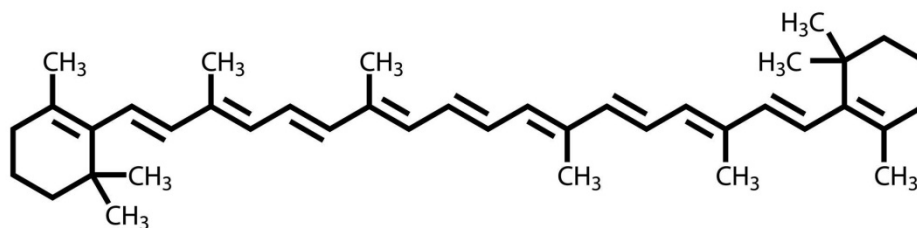


Figure I.5 : Structure des caroténoïdes (carotènes).(DOMONKOS *et al.*, 2013)

#### I.4.5. Les lipides

Les algues contiennent une faible teneur en lipide, elle est de l'ordre de 0.1 à 4% de la matière sèche (HERBRETEAU *et al.*, 1997). Cette teneur varie selon l'espèce, la localisation géographique et les conditions environnementales (KIM *et al.*, 1996).

Chez les chlorobiontes la composition en acides gras est très proche de celle des végétaux supérieurs, elles ont une forte teneur en AG polyinsaturées tels que les  $\Omega^3$  et  $\Omega^6$ (FLORETO *et al.*, 1993).

Ces derniers jouent un rôle important dans la prévention des maladies cardio-vasculaires, l'arthrose et le diabète ainsi que l'ostéoporose et présente également une forte activité anti-oxydante (WAHLE *et al.*, 2008).

Les ulvacées présentent un taux de lipides totaux moyen estimé à 2.2% de la MS (FLORETO *et al.*, 1993).

#### I.4.6. Les vitamines

Les algues marines sont très riches en vitamine ; elles contiennent de la vitamine A, B, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C, D, E, K, PP. Mais l'intérêt principal se porte sur la vitamine B<sub>12</sub> dont les teneurs sont assez importantes dans les algues contrairement aux plantes terrestres qui en sont complètement dépourvues (WATANABE *et al.*, 2002).

Les espèces du genre *Ulva* comme la plupart des algues sont une source de vitamines B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> et B<sub>12</sub>). La composition en vitamine varie en fonction de nombreux facteurs, dont l'espèce, la localisation géographique, la saison et les conditions environnementales (HAMED *et al.*, 2015).

### **I.4.7. Les minéraux**

Les algues sont très riches en minéraux essentiels et en oligo-éléments tels que le Ca, Na, P et Mg (HAMED *et al.*, 2015).

La teneur en minéraux chez les algues marines varie selon l'espèce mais généralement elle est comprise entre 8 et 66% (PADAM et CHYE, 2020). Cette variation est liée à des facteurs exogènes comme les variations saisonnières, la localisation géographique et les facteurs physico-chimiques ou encore à des facteurs endogènes comme la structure des polysaccharides pariétaux (MIŠURCOVÁ *et al.*, 2011).

Les algues vertes ont un taux de fraction minérale qui varie entre 6-30%, cette teneur est un peu inférieur par rapport aux deux autres catégories d'algues (Brunes et Rouges) (HAMED *et al.*, 2015).

La présence des minéraux est essentielle pour la vie. Ils sont indispensables au bon fonctionnement de l'organisme. Les différentes fonctions de certains minéraux sont résumées dans le tableau I.2.

Tableau I.2 : Rôle des minéraux (KRAAN, 2013)

Minéraux	Fonction
Calcium (Ca)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ C'est le principal constituant du squelette.</li> <li>➤ Il participe à l'excitabilité neuromusculaire, la conduction nerveuse, la contraction musculaire, la coagulation sanguine, l'activation de certains enzymes.</li> </ul>
Phosphore (P)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Formation des dents et des os ; rigidité du squelette.</li> <li>➤ Il a un rôle métabolique dans la production d'énergie libérée par les sucres et les acides aminés.</li> </ul>
Soufre (S)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ La formation de la méthionine et la cystéine.</li> <li>➤ La formation de la vitamine B8 et B1</li> </ul>
Potassium (K)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Régulateur osmotique.</li> </ul>
Magnésium (Mg)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Le métabolisme des carbohydrates et des lipides.</li> <li>➤ catalyseur dans de nombreux systèmes enzymatiques.</li> </ul>
Zinc (Zn)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Synthèse des protéines</li> <li>➤ Il est engagé comme cofacteur dans des systèmes enzymatiques.</li> <li>➤ antistress</li> <li>➤ Renforce le système immunitaire.</li> </ul>
Fer (Fe)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Respiration cellulaire.</li> <li>➤ Formation des hémoglobines</li> <li>➤ Transport d'oxygène</li> </ul>
Cuivre (Cu)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Formation des hémoglobines</li> <li>➤ La régulation des neurotransmetteurs, l'immunité.</li> </ul>
Molybdène (Mo)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Conversion de sulfure en sulfite.</li> <li>➤ Le métabolisme des enzymes soufrées</li> </ul>
Sélénium (Se)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Production d'enzymes anti-oxydantes</li> <li>➤ La fertilité</li> </ul>

### I.5. Propriétés pharmacologiques des biomolécules issus de la famille des Ulvacées

#### I.5.1. Activité anti-inflammatoire

##### I.5.1.1. Inflammation

L'inflammation fait partie du mécanisme de défense du corps. Il s'agit d'un processus biologique qui s'occupe de la reconnaissance et l'élimination de l'agent pathogène et la réparation des lésions tissulaires (NOACK et KOLOPP-SARDA, 2018).

Cet agent peut être d'origine biologique, chimique ou physique. Selon la nature de la réponse et sa capacité à éliminer la substance étrangère ou la cellule endommagée, on peut décrire l'inflammation comme étant aigüe ou chronique (OLAJIDE et SARKER, 2020).

##### I.5.1.2. Inflammation aigüe

L'inflammation aigüe est une réponse immédiate courte, qui peut durer quelques minutes à quelques heures voir quelques jours (RAGHAVENDRA *et al.*, 2015).

Elle se traduit par les quatre symptômes cardinaux : Œdème, rougeurs, chaleur et douleur. Ces symptômes sont liés aux effets des agents inflammatoires présents sur le site d'agression (NOACK et KOLOPP-SARDA, 2018).

La réponse inflammatoire aigüe se déroule en trois phases (GHIGNA et BALDEYROU, 2019) :

La phase initiale ou la phase vasculaire : Les cellules résidentes activées tel que les macrophages et les mastocytes s'occupent de la synthèse des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires qui agissent sur les cellules endothéliales ce qui entraîne une vasodilatation ainsi leur activation. La vasodilatation augmente l'afflux sanguin ce qui explique la rougeur et la chaleur. L'activation des cellules endothéliales se manifeste par la sécrétion de cytokines et la modification de leurs propriétés adhésives, favorisant le recrutement des leucocytes circulants (NOACK et KOLOPP-SARDA, 2018; GHIGNA et BALDEYROU, 2019).

La phase cellulaire : La migration des leucocytes et leurs accumulations dans le site d'inflammation déclenche cette phase. Les premières cellules qui arrivent dans le site enflammé sont les polynucléaires (PN) neutrophiles puis suivi par les monocytes puis par les lymphocytes (GHIGNA et BALDEYROU, 2019). Arrivés au niveau du site inflammatoire, la phagocytose et la libération de différentes enzymes hydrolytiques des polynucléaires permettent la destruction de l'agent pathogène. Cependant, les macrophages permettent le nettoyage du foyer inflammatoire et l'élimination des débris cellulaires et tissulaires (ANDERSON, 2013).

La phase de résolution : Une fois l'agression maîtrisée, la réaction inflammatoire est arrêtée. Les macrophages sécrètent des cytokines permettant la réparation du tissu par des fibroblastes et par des cellules endothéliales (NOACK et KOLOPP-SARDA, 2018).

### **I.5.1.3. Inflammation chronique**

L'inflammation chronique est définie comme étant un échec de résolution de l'inflammation aiguë. Cela peut être causé soit par la présence continue ou la mauvaise élimination de l'agent causale de l'inflammation ou par l'infiltration excessive des leucocytes au site d'inflammation ou encore par la production des cytokines pro-inflammatoires qui provoquent des lésions et un remodelage tissulaires (OLAJIDE et SARKER, 2020).

### **I.5.1.4. Cellules impliquées dans l'inflammation**

Les différents leucocytes impliqués dans l'inflammation sont :

Les neutrophiles : Elles représentent de 50 à 70% des leucocytes périphériques, leur migration vers le site d'inflammation se fait par chimio-attraction. Elles ont un rôle dans la phagocytose (STEVENS, 2009; FEHER, 2012).

Mastocytes : Elles sont des cellules d'origine hématopoïétique, s'occupent de la libération d'une multitude des médiateurs pro-inflammatoires(GILFILLAN *et al.*, 2011).

Basophiles : Elles représentent moins de 1% des leucocytes. Elles s'occupent essentiellement de la sécrétion de l'histamine et l'héparine. L'histamine est une amine vasoactive impliquée dans la réaction inflammatoire, il entraîne une perméabilité capillaire ce qui provoque un œdème inflammatoire (STEVENS, 2009; FEHER, 2012).

Eosinophiles : Elles représentent de 1 à 4% des leucocytes. Leurs nombres augmentent durant les réactions allergiques et les infections parasitaires. Elles ont une propriété phagocytaire mais moins efficace que celle des neutrophiles. Leurs actions principales est la neutralisation des basophiles et l'élimination des parasites (STEVENS, 2009; FEHER, 2012).

Monocytes : Elles représentent de 2 à 8% des leucocytes. Elles quittent la moelle osseuse vers le sang immatures, leurs différenciations s'effectuent au niveau des tissus et deviennent des macrophages (FEHER, 2012).

### **I.5.1.5. Médiateurs de l'inflammation**

L'introduction d'un pathogène dans l'organisme provoque les cellules d'immunité innée à produire des médiateurs inflammatoires qui déclenchent et stimulent la réaction inflammatoire. Le tableau I.3 résume les différents médiateurs impliqués dans l'inflammation ainsi leur origine et leurs effets.

**Tableau I.3 :** Origine cellulaire et effets des médiateurs impliqués dans une réaction inflammatoire (FEHER, 2012; SINGH *et al.*, 2013; ABDULKHALEQ *et al.*, 2018; GALVÃO *et al.*, 2018)

Médiateur	Origine	Effet
<b>Histamine</b>	Essentiellement par les mastocytes.	Il cause la vasodilatation, l'œdème et la contraction musculaire.
<b>Sérotonine</b>	Mastocytes	C'est un chimioattractant
	Monocytes/Macrophages	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Augmente la production des cytokines pro-inflammatoires comme IL1 et IL6</li> <li>➤ Améliore la capacité phagocytaire</li> <li>➤ Agit comme un chimioattractant</li> </ul>
	Neutrophiles	C'est un chimioattractant
	Cellules dendritiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ C'est un chimioattractant</li> <li>➤ Alerte la production des cytokines</li> </ul>
	Plaquette	Augmente la perméabilité vasculaire
<b>Facteurs d'activation plaquettaire (PAF)</b>	Plaquettes Basophiles Mastocytes Cellules endothéliales Macrophage Eosinophiles	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Déclenche l'activation des monocytes et des neutrophiles</li> <li>➤ Augmente l'adhésivité des cellules endothéliales et les active</li> <li>➤ Augmente la perméabilité vasculaire</li> <li>➤ La vasodilatation</li> <li>➤ Stimule l'agrégation des plaquettes</li> </ul>
<b>Cytokine</b>	Macrophages Lymphocytes Mastocytes	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Elles peuvent être des médiateurs pro-inflammatoires comme les IL1, IL6</li> <li>➤ La vasodilatation et Augmentation de la perméabilité vasculaire (TNF)</li> <li>➤ Inhibe l'expression des cytokines pro-inflammatoire (IL10)</li> </ul>
<b>Eicosanoïde</b>	Lymphocytes Neutrophiles Eosinophiles Les plaquettes Les cellules endothéliales	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Vasodilatation</li> <li>➤ Augmente la perméabilité vasculaire (Prostaglandine E2, Prostaglandine b)</li> <li>➤ Elles agissent sur les neurones dans le processus de la thermorégulation.</li> </ul>

### **I.5.1.6. Les anti-inflammatoires**

#### **I.5.1.6.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdien (AINS)**

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens font partie des médicaments largement utilisés dans le traitement des affections inflammatoires comme l'arthrose, la polyarthrite rhumatoïde. Il forme un groupe chimiquement très hétérogène mais ils ont les mêmes effets thérapeutiques : effet anti-inflammatoire, effet analgésique et effet antipyrétique (CARBONE *et al.*, 2013; WALLACE, 2013).

Ce sont des inhibiteurs non sélectifs des Cyclooxygénase (COX). Cette action inhibitrice empêche la formation de prostaglandine (PG)<sub>H2</sub>, qui est le précurseur de la production de tous les autres sous-types de PG et de thromboxane, ce qui va réduire la vasodilatation et la douleur. Les AINS réduit le flux sanguin vers le site enflammée ce qui contribue à une réduction d'œdème (WALLACE, 2013).

#### **I.5.1.6.2. Les anti-inflammatoires stéroïdien (AIS)**

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou les glucocorticoïdes sont des médicaments qui traitent les maladies inflammatoires et les maladies auto-immunes tel que l'asthme, l'allergie, la sclérose en plaque. Malheureusement, les bénéfices thérapeutiques des glucocorticoïdes sont limités par les effets secondaires indésirables associés à une dose élevée et à une utilisation à long terme. Ces effets secondaires comprennent l'ostéoporose, l'atrophie cutanée, le diabète, l'obésité abdominale, le glaucome, les cataractes, la nécrose et l'hypertension (RAMAMOORTHY et CIDLOWSKI, 2016).

#### **I.5.1.6.3. Les anti-inflammatoires d'origine algale**

Les algues marines et notamment les ulvacées produisent une large gamme de biomolécules douées d'un potentiel anti-inflammatoire. La structure de ces composés est très variée, on retrouve les formes acycliques ainsi les formes polycycliques. Leur nature est aussi diversifiée (ABAD, 2013).

Parmi les anti-inflammatoires isolés des ulvacées on cite :

Le stéroïde 3-O-b-Dglucopyranosyl-stigmasta-5,25-dien (AWAD, 2000) ;

Les polysaccharides sulfatés (DE ARAÚJO *et al.*, 2016) ;

Les lectines (MEZDOUR *et al.*, 2017) ;

### I.5.2. Activité antioxydante

#### I.5.2.1. Les oxydants et le stress oxydatif

Les oxydants appelés communément les radicaux libres sont des espèces chimiques à forte instabilité en raison d'un ou plusieurs électrons non appariés dans l'orbitale externe de leurs structures atomiques, ce qui les rend très réactifs et instables, ils réagissent très rapidement et de force avec d'autres composants, afin de capturer un électron compatible pour acquérir la stabilité. Le radical libre se rapproche d'une molécule stable et lui arrache un électron par la suite la molécule attaquée deviendra instable et donc un nouveau radical libre (MARTINEZ-CAYUELA, 1995; FAVIER, 2003).

Ces oxydants sont dérivés de l'oxygène, l'oxygène qui est connu par son caractère oxydant et qui engendre des effets dommageables dans l'organisme en produisant ces espèces appelées espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les espèces réactives de l'azote (RNS) (ORBAN, 2011)

On distingue deux grandes classes de radicaux libres (KOECHLIN-RAMONATXO, 2006) :

-les radicaux libres primaires : c'est les plus dangereux, formés directement à partir de l'oxygène tels que l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), le radical hydroxyle ( $HO\bullet$ ) et le monoxyde d'azote (NO).

-les radicaux libres secondaires : formés suite à la réaction des radicaux primaires avec des composés biochimiques de la cellule (acides nucléiques, lipides membranaires et protéines).

Exemple de quelques radicaux libres secondaire : le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et l'ion peroxydite ( $ONOO^-$ ).

Les oxydants sont produits naturellement par la cellule dans l'organisme et peuvent avoir différentes origines à savoir : le cytoplasme, le réticulum endoplasmique, la membrane plasmique. Mais leur principal lieu de formation est la mitochondrie (BALABAN *et al.*, 2005; VALKO *et al.*, 2007).

De nombreux facteurs stressants comme les variations de température, le pH, la consommation d'oxygène et la lumière, peuvent augmenter la production des ROS et RNS (SHARMA *et al.*, 2012), L'accumulation des radicaux libres dans les cellules provoque l'oxydation de l'ADN, des lipides, des protéines et des sucres. En produisant le vieillissement cellulaire qui engendre par la suite de nombreuses maladies comme la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson, l'athérosclérose et le cancer (KOECHLIN-RAMONATXO, 2006).

L'organisme se défend naturellement contre les oxydants à l'aide d'enzymes appelées SOD naturellement présentes dans les cellules, ces enzymes éliminent les radicaux libres et empêchent alors l'oxydation des cellules.

Lorsqu'il y a un déséquilibre entre la balance des ROS et RNS et les systèmes de défense, c'est-à-dire que l'organisme est incapable de se défendre contre ces espèces en raison du nombre insuffisant des enzymes anti-oxydantes, il se crée alors un stress appelé : le stress oxydatif (EVANS et HALLIWELL, 1999).

Bien que les oxydants participent à de nombreuses fonctions physiologiques destructives, elles peuvent également avoir des actions bénéfiques. Ce cas se produit généralement lors des réponses immunitaires comme la lutte contre des agents infectieux et leur fonction dans les systèmes de signalisation cellulaire (VALKO *et al.*, 2004).

### **I.5.2.2. Les défenses antioxydantes**

L'organisme réagit en permanence à la production de radicaux libres, il est capable de lutter contre ces derniers grâce à des composés appelés « les antioxydants ». Les antioxydants sont des molécules capables de protéger le système biologique des dommages causés par les radicaux libres. Ils permettent de limiter l'accumulation des ROS et RNS en les neutralisant ou en les désactivant une fois formés (WILLCOX *et al.*, 2004).

Au niveau de la cellule il existe deux types d'antioxydants : (BALABAN *et al.*, 2005; VALKO *et al.*, 2007)

#### -Les antioxydants primaires ou endogènes (systèmes enzymatiques) :

C'est la première ligne de défense constituée principalement de trois types d'enzyme: la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) (AVISSAR *et al.*, 1989), ces enzymes sont très efficaces et permettent de catalyser les radicaux libres en convertissant l'anions superoxydes ( $O_2^{\cdot-}$ ) en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), ce qui conduit à la formation de produits non toxiques c'est-à-dire l'eau et de l'oxygène moléculaire (MARFAK, 2003; HAMDI *et al.*, 2012).

-Les antioxydants secondaires ou exogènes (systèmes non enzymatiques) : C'est la deuxième ligne de défense qui complète la première, elle est constituée d'éléments nécessaires à l'organisme qui sont apportés par l'alimentation, ces éléments ont pour rôle de capturer les radicaux libres qui n'ont pas été piégés par la première ligne de défense, Les plus représentés sont:

- Les vitamines: telle que les vitamines C ou E qui sont connus pour leur forte activité anti-oxydante. La vitamine C ou acide ascorbique agit de façon directe sur les radicaux libres, c'est un excellent piègeur de ces derniers et protège contre l'oxydation membranaire. La vitamine E par contre agit indirectement sur les ROS et RNS et permet leur régénération (PASSERIEUX *et al.*, 2015).

- Les caroténoïdes : qui regroupent les pigments carotènes et xanthophylles. Ces deux pigments réagissent avec les radicaux libres notamment le peroxydes et permettent de neutraliser l'oxygène singulet. Cette activité antioxydant est liée à leur longue chaîne polyénique (DOMONKOS *et al.*, 2013).
- Les composés phénoliques : grâce à leur structure, ils ont une forte capacité anti-oxydante en particulier les flavonoïdes et les tannins. Les flavonoïdes peuvent neutraliser les radicaux libres en donnant un atome d'hydrogène disponibles dans leurs groupements hydroxyles (KAMEL GHEDIRA, 2005). Les tannins ont également une grande capacité anti-oxydante grâce à leur noyau phénol (PERONNY, 2005), ils jouent un rôle primordial dans l'anti-oxydation des lipides (HEIMEUR *et al.*, 2004).
- Il existe d'autres molécules exogènes qui sont dotées d'un potentiel antioxydant important comme : Les oligo-éléments (Se, Cu, Zn) et les protéines (la ferritine) (PASSERIEUX *et al.*, 2015).

### **I.5.2.3. Activité anti-oxydante chez les Ulvaceae**

Récemment, la recherche s'est concentrée sur l'activité anti-oxydante des algues appartenant à la famille des Ulvaceae. De nombreuses études ont prouvé que les espèces du genre *Ulva* ont un potentiel antioxydant en les soumettant dans des conditions de stress (LUO et LIU, 2011; SCHWEIKERT et BURRITT, 2012; BOURGUIBA *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2019)

**Chapitre II :**  
**Matériel et méthodes**

## Chapitre II : Matériel et méthodes

L'objectif de ce travail est la valorisation biotechnologique des algues appartenant à la famille des ulvacées. Cette deuxième partie comprend le matériel et les protocoles adoptés pour l'identification de l'*Ulva sp* récoltée aux niveaux des deux plages KOUALI et SIDI GHILES de la wilaya de Tipaza, pour l'évaluation de sa composition biochimique globale et l'extraction des molécules bioactives. Ces dernières ont fait l'objet d'une caractérisation sommaire et d'une étude des propriétés pharmacologiques (activité anti-inflammatoire et anti-oxydante).

Ce travail a été mené à terme grâce à la collaboration de plusieurs établissements et centres de recherche à savoir l'ENSSMAL, le laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques (LNCPP), le Centre de Recherche Nucléaire d'Alger (CRNA), le Centre de Recherche Nucléaire de Draria (CRND), et le centre de recherche scientifique et technique en analyses physico-chimiques (CRAPC).

### II.1. Récolte et échantillonnage des algues

#### II.1.1. Site d'étude

La récolte des échantillons a été effectuée pendant le mois de novembre 2019 et le mois de janvier 2020 au niveau de deux stations au niveau de la plage de KOUALI et la plage de SIDI GHILES, Les coordonnées lombaires des deux stations sont présentées dans les Figure II.1 et Figure II.3.



**Figure II.1** :Situation géographique de la plage de KOUALI (GOOGLE EARTH.2020)



**Figure II.2** : Plage de KOUALI de la wilaya de Tipaza

Station 1 : La plage de KOUALI (Figure II.2) se situe au niveau de la baie de Bou-Ismaïl, elle se localise à environ 70 km à l'Ouest d'Alger, c'est une plage ouverte située à l'Est de la ville

de Tipaza. Elle occupe une surface de 5 km. Ses coordonnées géographiques sont  $36^{\circ}35'27.6''\text{N}$   $2^{\circ}29'39.9''\text{E}$ . ce site est considéré comme une zone de référence car l'activité anthropique est réduite.



**Figure II.3:** Situation géographique de la plage Sidi Ghiles (GOOGLE EARTH.2020)



**Figure II.4:** Plage Sidi Ghiles

Station 2 : La plage Sidi Ghiles (Figure II.3 et II.4) se trouve est au nord-ouest de la wilaya de Tipaza, à environ 32 km à l'ouest de Tipaza et à 7 km au sud-ouest de Cherchell. Ses coordonnées géographiques sont  $36^{\circ}35'11.2''\text{N}$   $2^{\circ}07'40.5''\text{E}$ .

### II.1.2. Matériel végétal

Les échantillons ont été récoltés manuellement à une profondeur allant de 10 à 60 cm. L'échantillon recueilli a été lavé sur place avec l'eau de mer, puis trié à la main pour écarter les matières étrangères telles que les épiphytes et la contamination d'autres algues (Figure II.5).



**Figure II.5 :** Récolte des échantillons

Arrivé au laboratoire, l'échantillon a été de nouveau lavé avec de l'eau courante pour le débarrasser des sédiments, petits animaux, débris de coquillages).

Hormis une petite partie de la récolte qui a servi à l'identification, le reste des algues est séché dans une chambre à température ambiante et à l'obscurité pendant quelques jours.

Une fois sec (Figure II.6), l'échantillon est récupéré, broyé en poudre à l'aide d'un broyeur puis tamiser afin d'avoir une fine granulométrie (Figure II.7), cette poudre est ensuite stockée dans des bocaux fermés hermétiquement et placée dans un endroit à l'abri de la lumière et à température ambiante avant son utilisation.



**Figure II.6:** Algues séchées et coupées



**Figure II.7:** Algues broyées en poudre

### **II.2. Identification et caractérisation des algues**

Les algues récoltées ont été identifiées au niveau du laboratoire de biologie de l'ENSSMAL, en examinant un certain nombre de caractères morfo-anatomiques (forme, taille et couleur),

morphologiques et anatomiques en suivant les clés d'identification rapportées dans la littérature. Fiche FAO (BAUCHOT *et al.*, 1987)

### II.3. Détermination de la composition chimique globale des algues

#### II.3.1. Détermination de la teneur en eau

- **Principe :**

La teneur en eau des algues est déterminée par une méthode thermogravimétrique. Cette méthode repose sur la pesée de l'échantillon avant et après séchage à 105°C pendant 24h (AOAC, 1980). La différence des poids rapportée au poids initial correspond au taux d'humidité.

- **Mode opératoire :**

- Peser les creusets en porcelaine vides
- Peser dans ces creusets 2 g d'algues fraîches puis 2 g d'algues séchées
- Placer les creusets dans une étuve à 105°C pendant 24 h
- Retirer les creusets et les placer dans un dessiccateur
- Après refroidissement repeser les creusets

Le taux d'humidité des algues est calculé selon la formule suivante :

$$H\% = \frac{M_1 - M_2}{M_1 - M_0} \times 100$$

Avec :

H% est la teneur en humidité en pourcentage;  $M_0$  est la masse du creuset vide en g ;  $M_1$  est la masse en g du creuset et des échantillons avant séchage ;  $M_2$  est la masse en g du creuset et des échantillons après séchage.

#### II.3.2. Détermination de la teneur et de la composition minérale

##### II.3.2.1. Détermination de la teneur en minéraux

- **Principe :**

La teneur en matières minérales est déterminée par la méthode référentielle (AOAC, 1999). Elle est obtenue par élimination de la matière organique suite à l'incinération des algues séchées dans un four à moufle à 600°C pendant au moins 4h, jusqu'à calcination complète.

La matière minérale se précipite sous forme de cendres blanches.

- **Mode opératoire :**

- Peser les creusets en porcelaine vides.
- Peser 2 g d'algues séchées (Séchées à l'air libre puis à l'étuve)
- Placer les creusets dans le four à moufle à 600°C pendant 4 heures.(Figure II.8)
- Retirer les creusets et les placer dans un dessiccateur.
- Peser les creusets encore une fois après refroidissement.

La teneur en matière minérale est calculée comme suit :

$$MM(\%) = \frac{P3 - P1}{P2 - P1} \times 100$$

**Avec :**

P1 : poids du creuset vide

P2 : poids du creuset contenant la prise d'essai

P3 : poids du creuset contenant le résidu incinéré



**Figure II.8 :** Creusets contenant l'algue séchée dans le four à moufle à 600°C

### II.3.2.2. Détermination de la composition minérale par spectroscopie fluorescence à rayon X (XRF)

- **Principe :**

La spectroscopie par fluorescence de rayons X est une technique analytique de spectroscopie atomique qui implique le bombardement des échantillons avec un rayonnement primaire, lors de cette interaction, le rayonnement primaire excite les électrons dans les coquilles internes des atomes et provoque une perte d'électrons dans la coquille. Les électrons combient alors cette lacune dans les coquilles d'énergie inférieure en émettant des photons à une longueur d'onde précise. La fluorescence résultante peut être utilisée pour déterminer les éléments présents dans l'échantillon de Na à U. (HERREROS-CHAVEZ *et al.*, 2019).

- **Mode opératoire :**

Un appareil XRF Niton® XL3t de type pistolet équipé d'un tube à rayons X a été utilisé. L'échantillon solide de fine granulométrie est placé dans une coupelle à bague de 32 mm de diamètre, il est ensuite recouvert d'un film en Mylar à travers lequel il est analysé. Le lancement des analyses peut alors être piloté depuis l'ordinateur.

### II.3.3. Détermination de la teneur en lipides

- **Principe :**

La détermination de la fraction lipidique est réalisée par la méthode de Soxhlet. Une méthode gravimétrique qui repose sur la pesée de l'échantillon avant et après extraction.

Les lipides sont insolubles dans l'eau et très solubles dans les solvants organiques, tel que l'éther éthylique et c'est cette propriété qui permet leur extraction.

La méthode de Soxhlet est une méthode gravimétrique, puisqu'on pèse l'échantillon au début et à la fin de l'extraction.

- **Principe**

L'algue est pesée et placée dans une capsule de cellulose. L'échantillon est extrait en continu par l'éther éthylique à ébullition ( $T^{\circ}=35^{\circ}\text{C}$ ) qui dissout graduellement la matière grasse. Le solvant contenant la matière grasse retourne dans le ballon par déversements successifs causés par un effet de siphon dans le coude latéral. Comme seul le solvant peut s'évaporer de nouveau, la matière grasse s'accumule dans le ballon jusqu'à ce que l'extraction soit complète. Une fois l'extraction terminée, l'éther est évaporé dans un rota vapeur et la matière grasse est pesée.

Les cartouches de cellulose sont perméables au solvant et à la matière grasse. Ces cartouches sont jetables.

- **Mode opératoire :** (AISSOU, 2019)

- Peser trois cartouches en Cellulose vides.
- Peser dans deux cartouches 2 g de poudre d'algue (Algue séchée finement broyer) et laisser la troisième vide (Elle va servir de blanc).
- Peser les ballons vides.
- Placer les cartouches avec l'échantillon dans le Matra Figure II.9)
- Ajouter 160 ml d'Ether éthylique dans chaque poste.
- Régler le dispositif chauffant du ballon à  $60^{\circ}\text{C}$ .



**Figure II.9 :** Extraction des lipides par un extracteur de Soxhlet

- L'extraction se fait pendant 4 heures. Une fois terminée, on évapore le solvant contenu dans les ballons dans le rota-vapeur (Figure II.10).
- Laisser refroidir et repeser les ballons.



**Figure II.10 :** Evaporation du solvant par un rota-vapeur

La teneur en lipides (%) est estimée par la formule suivante :

$$\text{Teneur en lipides (\%)} = \frac{\text{Masse des lipides}}{\text{Masse de l'échantillon}} \times 100$$

Sachant que :

$$\text{Masse des lipides} = P1 - P0$$

P1 : Poids du ballon après extraction

P0 : poids du ballon avant extraction

### II.3.4. Détermination de la teneur en protéines

Elle est déterminée par la méthode de Biuret modifiée.

- **Principe :**

Les protéines sont des macromolécules formées par l'assemblage d'acides aminés, eux-mêmes unis par des liaisons peptidiques. Une réaction colorée, très employée pour l'analyse qualitative et quantitative des peptides et des protéines et qui n'est pas donnée par les acides aminés libres, est la réaction du biuret. Dans cette réaction, les ions cuivriques (provenant du sulfate de cuivre, un réactif de la réaction) forment avec les liaisons peptidiques un complexe de coloration bleue-violacée en milieu alcalin. Le nombre de liaisons peptidiques, et par conséquent, la concentration en protéines (C), détermine l'intensité de cette coloration. Cette même intensité est mesurable en termes de densité optique (DO) par un spectrophotomètre: c'est ce qu'on appelle « dosage colorimétrique » où la DO est fonction de la concentration selon la loi de Beer-Lambert :  $DO=f(c)$

- **Mode opératoire :**

- Préparer une solution mère de Sérum albumine bovine (BSA) à 1 %
- Préparer ensuite une gamme en utilisant différentes concentrations de BSA (0,1- 0,2- 0,3- 0,4- 0,5 g/l) ainsi que l'échantillon.
- Ajouter de l'eau distillée (volume final  $v_f=1ml$ ) et du NAOH dans la gamme et l'échantillon
- Ajouter dans la gamme et l'échantillon un volume du réactif de Biuret
- Incuber à T° ambiante, de 30 à 90 min, à l'abri de la lumière
- Lecture à 545nm après 35min d'incubation
- Tracer la courbe étalon,  $DO=f(c)$ .

### II.3.5. Détermination de la teneur des sucres totaux

#### II.3.5.1. Dosage des sucres libres

Pour le dosage des sucres solubles présents dans l'algue *Ulva sp*, on utilise la méthode DUBOIS *et al.*(1956) modifiée.

- **Principe :**

Les sucres totaux sont déterminés selon la méthode de Dubois *et al.* (1956) dont le principe repose sur la réaction suivante : l'acide sulfurique concentré provoque, à chaud, le départ de plusieurs molécules d'eau à partir des oses.

Cette déshydratation s'accompagne par la formation d'un hydroxymethylfurfural (HMF) dans le cas d'hexose et d'un furfural dans le cas d'un pentose. Ces composés se condensent avec le phénol pour donner des complexes colorés (jaune-orangé). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des oses. La densité optique est mesurée à 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

- **Mode opératoire :**

- Préparation de l'extrait aqueux : 10 g de poudre d'algue sont traité par 2 ml d'eau distillée.
- Le dosage : Un volume de l'extrait aqueux est mélangé avec du Phénol glacial à 80% et de l'acide sulfurique concentré à 95% de pureté et de densité  $d = 1,84$ .

Une fois le mélange est homogène, une première incubation à température ambiante pendant 10 minutes est réalisée, puis une deuxième incubation à 30°C pendant 20 minutes. L'absorbance est mesurée à 492 nm contre un blanc.

Dans les mêmes conditions opératoires, une gamme étalon a été préparée en utilisant le saccharose à différentes concentrations : 0, 0.05, 0.3, 0.5, 0.8, 0.95  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

La teneur en sucre soluble est estimée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage, et elle est exprimée en %.

### II.4. Extraction des biomolécules d'intérêt pharmacologique

#### II.4.1. Extraction, Séparation et identifications des pigments photosynthétiques

##### II.4.1.1. Extraction des pigments photosynthétique

- **Mode opératoire :** (THANH-TURC ET ESCALLE-LEWIS, 2011)
- Mettre 10g de poudre d'algue dans un mortier puis ajouter 65 ml d'éthanol ;
- Broyer à l'aide du pilon jusqu'à ce que le solvant prenne une couleur vert foncé ;
- Filtrer le broyat sur papier filtre, le filtrat obtenu doit avoir une couleur verte translucide;
- Récupérer le résidu et procéder à une deuxième macération dans 65 ml de Dichlorométhane ;
- Filtrer la solution, les deux filtrats sont mélangés puis évaporés au rota-vapeur.

### II.4.1.2. Séparation et identification des pigments photosynthétiques

#### II.4.1.2.1. Chromatographie de partage sur colonne avec le gel de silice

- **Principe :**

La chromatographie de partage consiste en une répartition différentielle de deux solvants qui constituent une phase mobile et une phase stationnaire. Cette dernière est obtenue par greffage du premier solvant sur un support solide à l'intérieur de la colonne. La solution de chlorophylle extraite est déposée sur cette colonne. La phase mobile (éluant) permet de séparer les pigments de la chlorophylle par affinité. Le carotène étant le plus apolaire, il est élué grâce à un éluant constitué de 90% de solvant apolaire et de 10% de solvant polaire.

Suivant la polarité du pigment on change d'éluant pour obtenir la meilleure affinité. Ainsi on recueille les différents constituants de la chlorophylle par fractionnement. On obtient donc plusieurs couleurs suivant les pigments chlorophylliens. Grâce à la couleur des pigments, cette méthode qualitative permet un suivi visuel de leur migration (Figure II.11)

- **Mode opératoire :**

On réalise préalablement une colonne de gel de silice qui servira de phase fixe ou stationnaire.

- Préparer 100ml d'éluant solvant apolaire/solvant polaire 9:1
- Placer du coton cardé au fond d'une burette de 25ml (30 cm de hauteur et 02.5 cm de diamètre). Recouvrir le coton de 0,5 cm de sable de Fontainebleaux et déposer quelques millilitres d'éluant afin de chasser l'air enfermé dans le coton.
- Dans un bécher, peser 12g de silice sèche d'une granulométrie comprise entre 0,063 et 0,200 mm et ajouter 25ml d'éluant. Agiter afin d'obtenir un gel.
- Verser ce gel dans la burette et rajouter de l'éluant si le gel se solidifie. « Tapoter » légèrement la colonne afin de chasser les éventuelles bulles d'airs et de tasser la colonne.
- Déposer une seconde couche de 0,5cm d'épaisseur de sable de Fontainebleaux afin de garder le haut de la colonne de silice toujours plat lors des dépôts d'échantillon et d'éluant. Une fois que la colonne est tassée, jeter le surplus d'éluant de la colonne afin que son niveau arrive au ras du sable
- Travailler à l'obscurité pour éviter l'oxydation des pigments. Le suivi de l'élution de chaque pigment chlorophyllien se fait visuellement en suivant la séparation de chaque couleur lors des différentes éluations
- Prélever l'extrait brut et déposer au-dessus de la colonne à l'aide d'une pipette.
- Laisser couler le solvant en rajoutant régulièrement de l'éluant en haut de la colonne, le premier pigment est élué en ajoutant l'éluant Ether de Pétrole/Ether Ethylique 9:1.

Continuer l'élution avec le même éluant jusqu'à ce que celui-ci sorte de la colonne et qu'il soit complètement récupéré. C'est dans la première fraction.

- Changer ensuite les proportions de solvant dans l'éluant (Ether de Pétrôle/Ether Ethylique 1:1) afin de séparer deux pigments chlorophylliens.
- Le dernier pigment est élué grâce à l'éluant : Ether de Pétrôle/Ether Ethylique 1:9. Continuer l'élution jusqu'à récupération de la quatrième fraction.
- Récupérer les différentes fractions puis placer-les dans des piluliers hermétiques bruns
- Conserver ces fractions dans le congélateur à une température (-20°C) jusqu'à nouvelle utilisation.



**Figure II.11** : Colonne de chromatographie de gel de silice pour la séparation des pigments.

- **Analyse spectrophotométrique :**

Les différentes fractions de pigment obtenus ont fait l'objet d'une analyse au spectrophotomètre avec un balayage de spectre de 350 nm à 700 nm, afin de déterminer l'absorbance maximale de chaque fraction  $A=f(\lambda)$ .

#### **II.4.1.2.2. Chromatographie sur couche mince**

- **Principe :**

La chromatographie sur couche mince permet une séparation des pigments dans un but d'analyse. La phase fixe est composée d'une couche solide sur laquelle est déposé un gel de silice servant de support et la phase liquide est constituée d'un éluant qui sépare les différents pigments. Plusieurs gouttes de l'échantillon sont déposées sur la phase fixe à l'aide d'une micropipette pour former une tâche.

La plaque de silice est mise en contact avec la phase liquide qui va migrer et entraîner les composés par capillarité. Une fois que la migration est terminée, on obtient plusieurs tâches colorées sur la plaque de silice correspondantes aux différents composants de l'extrait brut

- **Mode opératoire :**

- Activer la plaque de silice (d'environ 15 cm de long et 20 cm de large) à T (C°) ambiante pendant une heure.
- Avec un crayon, tracer délicatement une ligne de départ à 02cm croix du fond de la plaque mettre des croix qui serviront comme repère pour déposer les échantillons (les croix sont distancées de 02 cm).
- A l'aide d'une micropipette prélever une goutte d'extrait d'algue (extrait brut et 04 fractions obtenues précédemment, déposer chaque échantillon à l'emplacement marqué et attendre que ça sèche. Répéter cette opération plusieurs fois afin que la tâche soit bien visible.
- Lorsque les dépôts sont secs, Déposer délicatement la plaque CCM dans la cuve et laisser l'éluant migrer en imprégnant la silice.
- Retirer la plaque de la cuve et marquer le front de l'éluant à l'aide d'un trait au crayon.
- Observer le chromatogramme et entourer au crayon, les différentes tâches colorées qui apparaissent.
- Noter la distance de migration de chaque tache et calculer le rapport frontal. On appelle rapport frontal  $R_f$  d'une espèce chimique, le rapport entre la distance x parcourue par l'espèce et la distance y parcourue par l'éluant pendant le même temps. Le  $R_f$  dépend de la nature du produit, de l'éluant et de la phase stationnaire.

$$R_f = \frac{X}{Y} = \frac{\text{Distance parcourue par la substance}}{\text{Distance parcourue par l'éluant}}$$

### II.4.2. Extraction et analyses biochimiques des polysaccharides

#### II.4.2.1. Extraction des polysaccharides

Il existe différentes méthodes pour extraire les polysaccharides. Généralement, celle-ci est réalisée par des solutions aqueuses à des températures comprises autour de 80-90°C contenant un agent chélatant cationique type oxalate de sodium (LAHAYE et ROBIC, 2007; ROBIC *et al.*, 2009b), oxalate d'ammonium acide(ROBIC *et al.*, 2009b) ou basique (RAY et LAHAYE, 1995), ainsi que du DMSO et des acides.

Dans notre étude on utilise le protocole de BURLLOT (2016) modifié pour extraire les polysaccharides.

- **Mode opératoire :**

Le protocole d'extraction des polysaccharides est illustré dans la Figure II.12

**Protocole 1 :**

15 gramme d'algues séchées et finement broyées sont insérées dans trois cartouches de cellulose (5g dans chaque cartouche), qui sont placées à l'intérieur d'extracteur Soxhlet (Chaque cartouche dans un matra) (Figure II.13)

Une première extraction pendant une heure est effectuée avec 450 ml de l'acétone 100% (150 ml dans chaque post).

Par la suite une seconde extraction avec l'extracteur Soxhlet est réalisée pendant 1h avec 450 ml de l'éthanol absolu. Ces deux extractions permettent de dépigmenter l'algue, aussi d'obtenir des résidus pauvres en protéine et en lipides. Les résidus sont séchés à l'étuve à 105°C (Figure II.14)

L'échantillon ainsi séché est macéré dans 375 ml d'eau distillée pendant 2h à 80°C et sous une agitation constante (Figure II.15).

Après une filtration à l'aide de la gaze (Figure II.16), le filtrat contenant les polysaccharides est récupéré et refroidi. Deux volumes de l'éthanol absolu sont ajoutés progressivement au filtrat avec une agitation manuelle et vigoureuse.

Les polysaccharides précipitent en formant une pelote autour de l'agitateur en verre. Cette pelote est lavée et désagrégée à l'éthanol, puis placée à l'étuve à 60°C pendant 24h, ensuite broyée finement à l'aide d'un mortier et conservée dans un flacon hermétique brun à température ambiante dans un endroit sec, jusqu'à utilisation.

**Protocole 2 :**

Afin d'améliorer le rendement d'extraction, on reproduit le même protocole précédant en doublant la durée de chaque traitement.

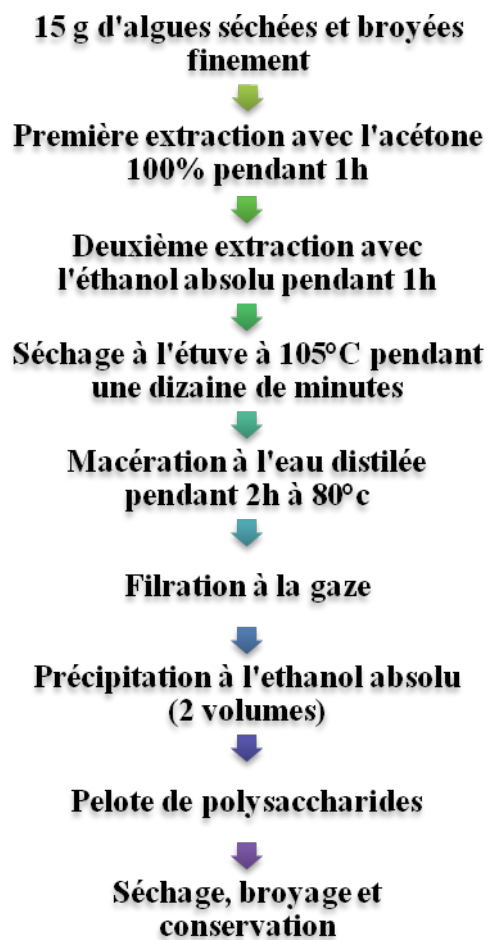


Figure II.12 : Protocole d'extraction des polysaccharides

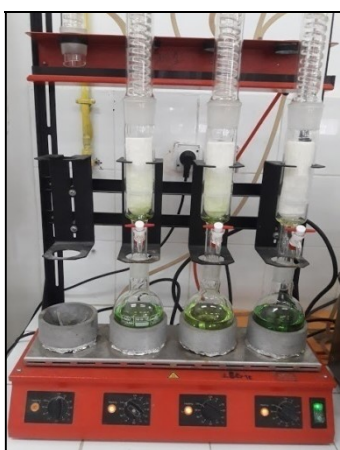


Figure II.13 :  
Extracteur Soxhlet



Figure II.14 : Résidus  
appauvris

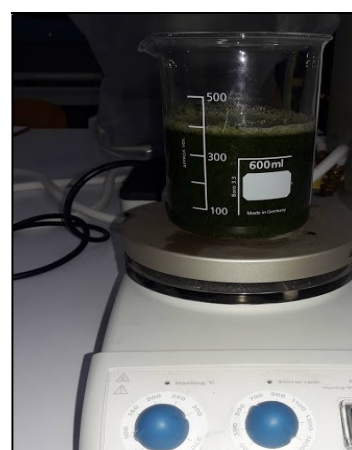
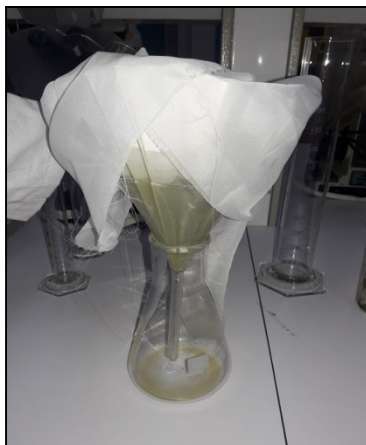


Figure II.15 : Macération  
à l'eau chaude



**Figure II.16 : Filtration**

### II.4.2.2. Calcul du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est un rapport entre la masse de précipité séché à 60°C pendant 24 h et la masse de la poudre d'algue sèche insérée dans la cartouche en cellulose. Il est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Rendement des polysaccharides\%} = \frac{M1}{M0} \times 100$$

Sachant que :

M0 : Masse de la poudre d'algue insérée dans la cartouche en cellulose.

M1 : Masse du précipité après séchage

### II.4.2.3. Analyses biochimiques des polysaccharides

#### II.4.2.3.1. Analyse par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

- **Principe :**

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est une technique analytique rapide et simple qui permet l'identification des différents groupements fonctionnelles présents dans un échantillon d'une manière non destructive.

Elle traite l'interaction des molécules avec les ondes électromagnétiques répartis entre la partie visible et la partie micro-ondes de 10000 à 100 cm<sup>-1</sup>. Lorsqu'une molécule est irradiée par un rayonnement IR, elle peut absorber partiellement ou sélectivement ce rayonnement et transfère son énergie (l'énergie du photon) en vibration moléculaire ce qui conduit à l'apparition d'une bande d'absorption à cette longueur d'onde (KAFLE, 2020).

- **Mode opératoire :**

1 mg de poudre des polysaccharides séchés est mélangé avec 130 mg de KBr. Le mélange est comprimé en un disque de KBr (8 tonnes pendant 5 minutes). La résolution spectrale est de 4  $\text{cm}^{-1}$ .(SARI-CHMAYSEM *et al.*, 2019)

### II.4.2.3.1.1. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

- **Principe**

La RMN  $^1\text{H}$  peut être utilisée pour identifier les molécules via un déplacement chimique particulier des protons. Elle ne nécessite pas de courbe d'étalonnage ni de standards et n'est pas affectée par la teneur en eau (BUSCHMANN *et al.* 2013). Cette technique, permet de déterminer la structure d'une molécule organique mettant en jeu les atomes d'hydrogène. En exposant l'échantillon à un champ magnétique, les atomes d'hydrogène s'excitent et retournent à l'état initial tout en apparaissant sous forme de pics sur un graphique (spectre) (AUDAT, 2013).

- **Mode opératoire**

- Préparer une solution de 5 mg de l'extrait dans 600  $\mu\text{l}$  d'oxyde de deutérium ( $\text{D}_2\text{O}$ ) et chauffer jusqu'à obtention d'une solution homogène.
- Soumettre l'échantillon à un champ magnétique dans un appareil BRUKER de 400 MHz à 70°C.
- Lecture

### II.4.3. Extraction et dosage des composés phénoliques

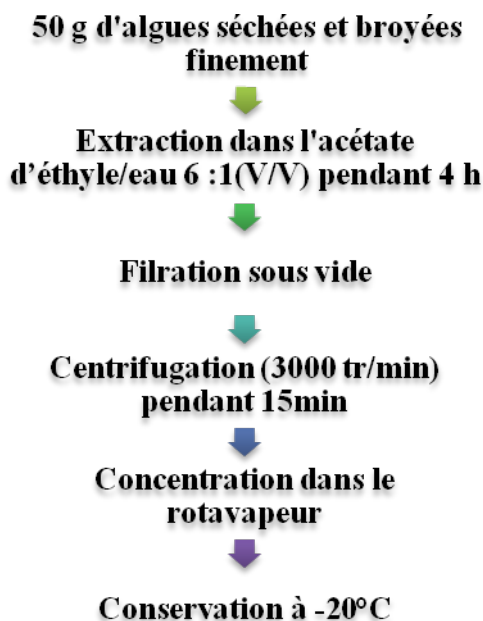
#### II.4.3.1. Extraction des composés phénoliques

- **Mode opératoire :**

L'extraction des polyphénols s'effectue selon le protocole de MEZDOUR et MENAD.(2018) (Figure II.17).

50 g d'algues séchées et finement broyées sont macérées dans un mélange d'acétate d'éthyle/eau 6 :1(V/V) pendant 4 h. Le mélange est filtré sous vide puis centrifugé (3000 tours/minutes) pendant 15 minutes.

L'extrait est concentré à l'aide d'un rotavapeur et conservé à -20°C jusqu'à utilisation.



**Figure II.17 :** Protocole d'extraction des polyphénols

### II.4.3.2. Dosage des composés phénoliques

- **Principe :**

Le dosage des polyphénols totaux est effectué selon la méthode de Folin Ciocalteu. Une méthode colorimétrique qui repose sur l'utilisation d'un réactif jaunâtre « Réactif de Folin ». Ce dernier est composé d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdiques ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). L'oxydation des composés phénoliques réduit ce réactif en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (BOIZOT et CHARPENTIER, 2006). La coloration produite, dont l'absorption maximale à 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents.

- **Mode opératoire :**

Le dosage des polyphénols totaux est effectué selon le protocole de BENARIBA *et al.* (2013). Un volume 0.1 ml d'extrait algal est mélangé avec 2ml de  $Na_2CO_3$  à 2%, le mélange est agité puis incubé à température ambiante pendant 5 minutes. Ensuite 100  $\mu$ l du réactif de Folin à 0.2N sont additionnés. Les tubes après agitation sont incubés une deuxième fois pendant une demi-heure à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'absorbance est mesurée à 760 nm contre un blanc. Dans les mêmes conditions opératoires, une gamme étalon a été préparée en utilisant le phénol à différentes concentrations de 50 à 1000  $\mu$ g/ml.

Après l'obtention des valeurs d'absorbance de la gamme étalon, une courbe d'étalonnage est tracée et une droite de régression linéaire est déterminée, et à partir de cette dernière la concentration des extraits en polyphénols est déduite. Le résultat exprimé en  $\mu\text{g}$  équivalent phénol par mg d'extrait. Le taux de polyphénols est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Polyphénols} = \frac{a \times f}{C}$$

Avec :

a : Concentration de polyphénols déterminée à partir de la courbe d'étalonnage.

f : Facteur de dilution (22).

C : Concentration de l'extrait.

### II.5. Évaluation des propriétés pharmacologiques des biomolécules extraites des Ulvaceae

#### II.5.1. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*

Pour évaluer l'effet anti-inflammatoire de chaque extrait algal (polysaccharides et polyphénols), une inflammation locale aigüe est induite par l'application du xylène à 96% sur la face interne de l'oreille gauche de la souris (CHADER, 2019).

50 souris BLBC mâles ( $20 \pm 2$  g) (Figure II.18) sont divisées en 5 lots (de 10 souris chacun) : un lot témoin négatif, un lot témoin positif, un lot pour tester les polysaccharides et un autre pour les polyphénols.

1 heure avant l'induction de l'œdème par le xylène (30  $\mu\text{l}$ ), les souris de chaque lot reçoivent sur leurs oreilles gauches les solutions suivantes (Figure II.19) :

Lot témoin négatif 1 : 100 $\mu\text{l}$  d'eau physiologique

Lot Placebo (témoin négatif 2) : 100 $\mu\text{l}$  d'acétate d'éthyle

Lot de référence (lot témoin positif): 100  $\mu\text{l}$  du Diclofénac à 1%

Lot essai 1 : 100  $\mu\text{l}$  de polyphénols

Lot essai 2 : 100  $\mu\text{l}$  de la solution de polysaccharides à 1% (1g des polysaccharides dans 100 ml d'eau physiologique).

4 heures après l'application du xylène, les souris ont été sacrifiées dans un bain d'Ether (Figure II.20).

Un disque de 6 mm de diamètre de chaque oreille traitée et non traitée a été enlevé (Figure II.21), le poids de chaque disque est mesuré (Figure II.22).

Le potentiel anti-inflammatoire des échantillons testés (polyphénols et polysaccharides) est déterminé par le pourcentage d'inhibition de l'œdème (PIO).

$$PIO = \frac{MD(\text{témoin négative}) - MD(\text{Essai})}{MD(\text{témoins négative})} \times 100$$

Avec :

MD (témoin négati) : la moyenne de la différence entre les deux disques des oreilles gauche et droite des souris du lot témoin négatif.

MD (essai) : la moyenne de la différence entre les deux disques des oreilles gauche et droite des souris du lot essai.



**Figure II.18 :** La pesée des souris ( $20 \pm 2$  g)



**Figure II.19 :** Dépôt de l'échantillon sur l'oreille de la souris



**Figure II.20 :** Souris sacrifiées



**Figure II.21 :** Découpage de l'oreille en disque



**Figure II.22 :** Oreille de souris diamètre 6mm

L'estimation de l'élimination d'œdème est déterminée par le calcul du potentiel d'inhibition de l'œdème et par test statistique T (Test de Student en utilisant Excel 2007) qui permet de comparer deux moyennes (dans ce test, les groupes témoin négatif et témoin positif sont toujours comparés à un autre lot traité par un produit donné).

Le test T ou test de Student est un test statistique permettant de comparer les moyennes de deux groupes d'échantillons. Il s'agit donc de savoir si les moyennes des deux groupes sont significativement différentes au point de vue statistique. L'emploi de ce test reste subordonné en général à deux conditions d'application importantes qui sont la normalité et le caractère aléatoire et simple des échantillons. La première condition n'est toutefois pas essentielle lorsque les échantillons ont des effectifs suffisants (en pratique, la valeur de 30 est souvent retenue) pour assurer la quasi-normalité des distributions d'échantillonnage des moyennes (ZARROUK, 2012). Dans le présent test, un lot traité par un produit donné est constitué de 10 souris pour des raisons économiques.

### II.5.2. Évaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

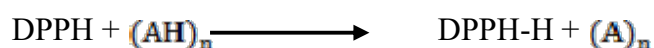
Plusieurs méthodes sont utilisées pour déterminer le pouvoir antioxydant, par exemple : la méthode FRAP (Ferricreducingantioxidant power), ORAC (oxygen radical absorbance capacity), TEAC (Trolox équivalent antioxidantcapacity) ou ABTS (2,2-azinobis 3-ethylbenzothiazoline 6-sulphonate) et DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl). Parmi tous ces tests, nous avons utilisé : la méthode du piégeage du radical DPPH (2,2-diphényl- 1 -picrylhydrazyl).

#### • Principe :

Cette méthode est largement utilisée pour déterminer la capacité de piégeage des radicaux libres d'un échantillon. Elle est basée sur la réduction du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), par don d'atome d'hydrogène ou d'électrons (YAICH *et al.*, 2017)

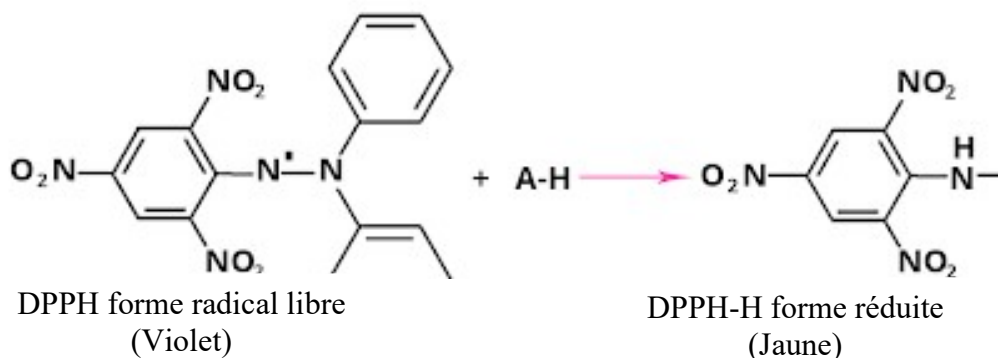
Le DPPH est un radical libre relativement stable violet en solution, lorsqu'il est réduit en diphenyle picryl hydrazine sa couleur change en virant vers le jaune.

Dans le cas des composés phénoliques, le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH alors transformé en une molécule stable DPPH-H (Figure II.23), On peut résumer la réaction sous la forme d'équation:



Où:

(AH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphényle picryl hydrazine DPPH-H (jaune) (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995)



**Figure II.23** : Mécanisme réactionnel du test DPPH  
(MOLYNEUX, 2004)

L'absorbance mesurée à 517 nm sert à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH qui est proportionnelle au pouvoir anti-radicalaire de l'échantillon (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

- **Mode opératoire :**

L'activité de piégeage des radicaux libres a été évaluée par la méthode décrite par Brand-Williams *et al.* (1995), adaptée aux microplaques à 96 puits

Préparation du DPPH : La solution du DPPH est fraîchement préparée en solubilisant 2.4 mg de DPPH dans 100 ml d'éthanol absolu. Cette solution est conservée au réfrigérateur et peut être utilisée pendant 20 jours

Avant le dosage de l'activité, les différents composants extraits de l'algue *Ulva sp* c'est-à-dire les pigments Chlorophylle, Carotène et Xanthophylle, les polysaccharides sulfatés et les polyphénols ont été testés pour le pouvoir antioxydant. Cependant, le dosage de l'activité a été effectué seulement pour l'extrait phénolique (à cause du confinement, pandémie Covid-19).

Pour le dosage, des dilutions ont été préparées à différentes concentrations. 50µl de chaque concentration de l'extrait est mélangé avec 1950µl de la solution de DPPH pour un volume final de 2ml

Le mélange réactionnel est bien agité et laissé au repos à température ambiante dans l'obscurité pendant 30 min jusqu'à décoloration.

L'absorbance du mélange est mesurée à 517 nm en utilisant des plaques de microtitration à fond plat à 96 puits et à l'aide d'un lecteur automatique de microplaque

De l'acide ascorbique a été utilisé comme contrôle positif dans les mêmes conditions et à différentes concentrations

L'activité scavenger est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH. Elle est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\text{AAR}\% = \left( \frac{\text{DO}_{\text{contrôle}} - \text{DO}_{\text{extrait}}}{\text{DO}_{\text{controle}}} \right) \times 100$$

Avec :

AAR (%) : Activité anti-radicalaire du DPPH.

DO témoin: Densité optique du tube contrôle négatif.

DO extrait : Densité optique de l'échantillon.

La valeur IC50 est déterminée avec la courbe et elle correspond à la quantité d'antioxydant nécessaire pour inhiber la formation de radicaux DPPH de 50%.(HARDOUIN *et al.*, 2016)

# **Chapitre III :**

## **Résultats et Discussion**

## Chapitre III : Résultats et Discussion

### III.1. Identification des algues

Après observation des caractères morphologiques (macroscopique et microscopique) des échantillons fraîchement récoltés aux niveaux des deux plages Anse de Kouali et Sidi Ghiles, deux espèces ont été identifiées. Il s'agit de l'*Ulva lactuca*, et l'*Ulva fasciata*. Dont la classification est représentée dans le Tableau III.1 et Tableau III.2

Les critères d'identification sont représentés dans le Tableau III.3

L'algue *Ulva fasciata* est une variété de l'*Ulva lactuca*, c'est lié au cycle végétatif (sporophyte) (GUIRY et GUIRY. 2020)

**Tableau III.1 :** Classification d'*Ulva lactuca*


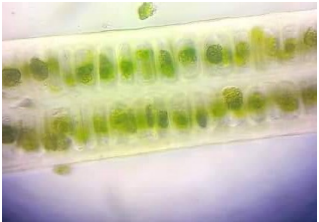
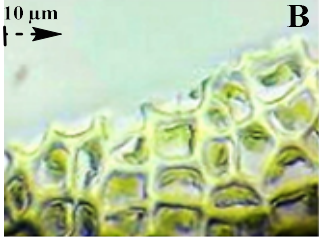
<b>Embranchement</b>	Chlorophyta
<b>Classe</b>	Ulvophyceae
<b>Ordre</b>	Ulvales
<b>Famille</b>	Ulvaceae
<b>Genre</b>	<i>Ulva</i>
<b>Espèce</b>	<i>Ulva lactuca</i>

**Tableau III.2 :** Classification d'*Ulva fasciata*

<b>Embranchement</b>	Chlorophyta
<b>Classe</b>	Ulvophyceae
<b>Ordre</b>	Ulvales
<b>Famille</b>	Ulvaceae
<b>Genre</b>	<i>Ulva</i>
<b>Espèce</b>	<i>Ulva fasciata</i>

**Tableau III.3 :** Clé d'identification des deux espèces d'algues.

Espèce utilisée	Identification par Fiche FAO (BAUCHOT <i>et al.</i> , 1987) Caractères distinctifs
<div data-bbox="328 479 684 808" data-label="Image"> </div> <p data-bbox="352 813 657 842"><i>Ulva lactuca</i> Linnaeus, 1753</p> <div data-bbox="360 875 651 976" data-label="Image"> </div> <p data-bbox="201 987 812 1084">Observation microscopique Gr <math>\times 40 \times 10</math> d'une coupe transversale du thalle d'<i>Ulva lactuca</i> montrant une lame constituée de 2 couches de cellules superposées</p> <div data-bbox="368 1126 647 1375" data-label="Image"> </div> <p data-bbox="220 1384 794 1440">Observation microscopique Gr <math>\times 40 \times 10</math> des cellules rectangulaires présentes dans le thalle d'<i>Ulva lactuca</i></p> <div data-bbox="371 1476 643 1731" data-label="Image"> </div> <p data-bbox="209 1742 807 1798">Observation microscopique Gr <math>\times 60 \times 10</math> des bords non denticulés du thalle d'<i>Ulva lactuca</i></p>	<p data-bbox="847 488 1230 521">➤ <u>Caractères macroscopiques</u></p> <ul data-bbox="847 568 1439 880" style="list-style-type: none"> <li>- Algue marine d'une couleur verdâtre translucide.</li> <li>- Le thalle est en forme d'une large feuille mince avec une marge ondulée, il porte un crampon discoïde par lequel l'algue se fixe sur les substrats.</li> </ul> <p data-bbox="847 958 1225 992">➤ <u>Caractères microscopiques</u></p> <ul data-bbox="847 1039 1439 1406" style="list-style-type: none"> <li>- L'appareil végétatif d'<i>Ulva lactuca</i> est formé d'une bicouche cellulaire, ce qui permet de la distinguer du genre <i>Enteromorpha</i>.</li> <li>- Les bords sont non denticulés de ce thalle</li> <li>- les cellules sont polygonales, pourvues d'un plaste pariétal d'une taille importante.</li> </ul>

 <p><b>A</b></p> <p><i>Ulva fasciata</i> Delile, 1813</p>  <p>Observation microscopique Gr <math>\times 40 \times 10</math> d'une coupe transversale du thalle de l'<i>Ulva fasciata</i> montrant une lame constituée de 2 couches de cellules superposées</p>  <p><b>B</b></p> <p>Observation microscopique Gr <math>\times 40 \times 10</math> d'une coupe histologique du thalle de l'<i>Ulva fasciata</i> montrant le bord dépourvu de dents microscopiques et présence de cellules polygonales</p>	<p>➤ <u>Caractères macroscopique</u></p> <p>Une algue verte marine fixée sur les substrats avec une base en forme de tube, son thalle est tubuleux avec des bords ondulés.</p> <p>➤ <u>Caractères microscopique</u></p> <p>-La coupe transversale du thalle montre deux rangés de cellule.</p> <p>- Le bord du thalle est dépourvu de dents microscopiques</p> <p>-Les cellules se présentent sous une forme polygonale contenant des plastides d'une taille moins importante que celle d'<i>Ulva lactuca</i>.</p>
---	--

### III.2. Composition chimique globale d'*Ulva sp*

La composition chimique globale de l'*Ulva* est représentée dans le Tableau III.4.

**Tableau III.4 :** Composition chimique globale de l'algue *Ulva sp*

Composant	Teneur	
Eau	17.25%*	86.13%**
Minéraux	19.9 %*	
Lipides	1.43%*	
Protéines	11.83%*	
Sucre totaux	49.59%*	

\* : Résultat exprimé par rapport à la matière sèche

\*\* : Résultat exprimé par rapport à la matière fraîche

### III.2.2. Teneur en eau

D'après le Tableau III.2, la teneur en eau de l'*Ulva sp* (mélange des deux espèces d'algue) est estimée par rapport à la matière fraîche (MF) et la matière sèche elle est de 17.25% (MS) et de 86.13% du poids de l'algue fraîche (MF).

Ces résultats corroborent avec ceux de la littérature. Selon les auteurs (YAICH *et al.*, 2011; YAICH *et al.*, 2015; OUCIF *et al.*, 2020), les teneurs en en eau enregistrées chez l'espèce *Ulva lactuca* sont dans l'ordre ( $74.9 \pm 0.0052\%$  (MF),  $85.05 \pm 0.15\%$  (MF) et  $12.63 \pm 0.3\%$  (MS).

En effet, *Ulva sp* provient d'un milieu marin et est immergée dans l'eau durant tout son cycle de vie, ce qui explique la forte teneur en eau à l'état frais.

A l'état sec, la teneur en eau peut être influencée par plusieurs facteurs entre autres le mode de séchage et les conditions de stockage.

### III.2.3. Teneur et composition de la matière minérale

#### III.2.3.1. Teneur en minéraux

Le taux des cendres qui est la teneur de la fraction minérale chez *Ulva sp* représente 19.9% du poids sec (Tableau III.2). Cette valeur est proche aux taux relevés et rapportés dans plusieurs études :

Pour *Ulva reticulata* (RATANA-ARPORN et CHIRAPART, 2006; BAROT *et al.*, 2019) ont trouvé que le taux de cendre était respectivement de  $20 \pm 0.5\%$  et  $17.58 \pm 2$ . YAICH *et al.* (2011), ont enregistré  $19.59 \pm 0.51\%$  (MS) de matières minérales chez *Ulva lactuca*.

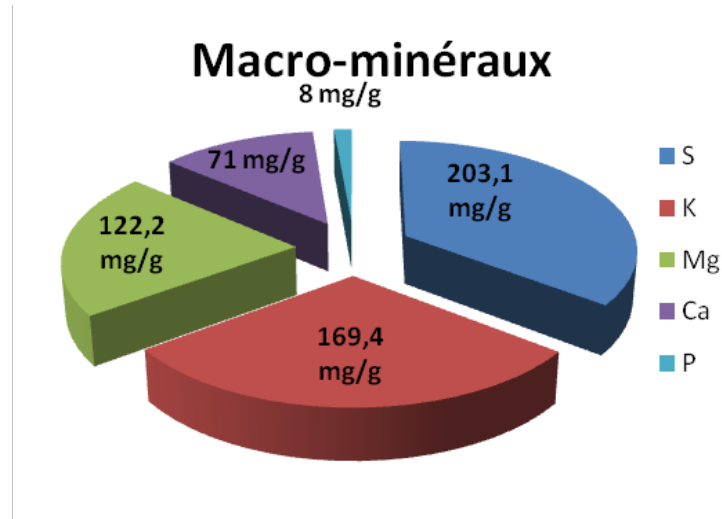
Néanmoins, ces teneurs sont considérablement plus faibles que celles signalées par d'autres auteurs : les taux étaient de  $27.13 \pm 0.35\%$  (MS) pour *U.lactuca* (OUCIF *et al.*, 2020) et de 49.6%(MS) pour *U.clathrata* (PENG *et al.*, 2015).

La composition chimique des algues est variable et elle est dépendante de plusieurs facteurs :

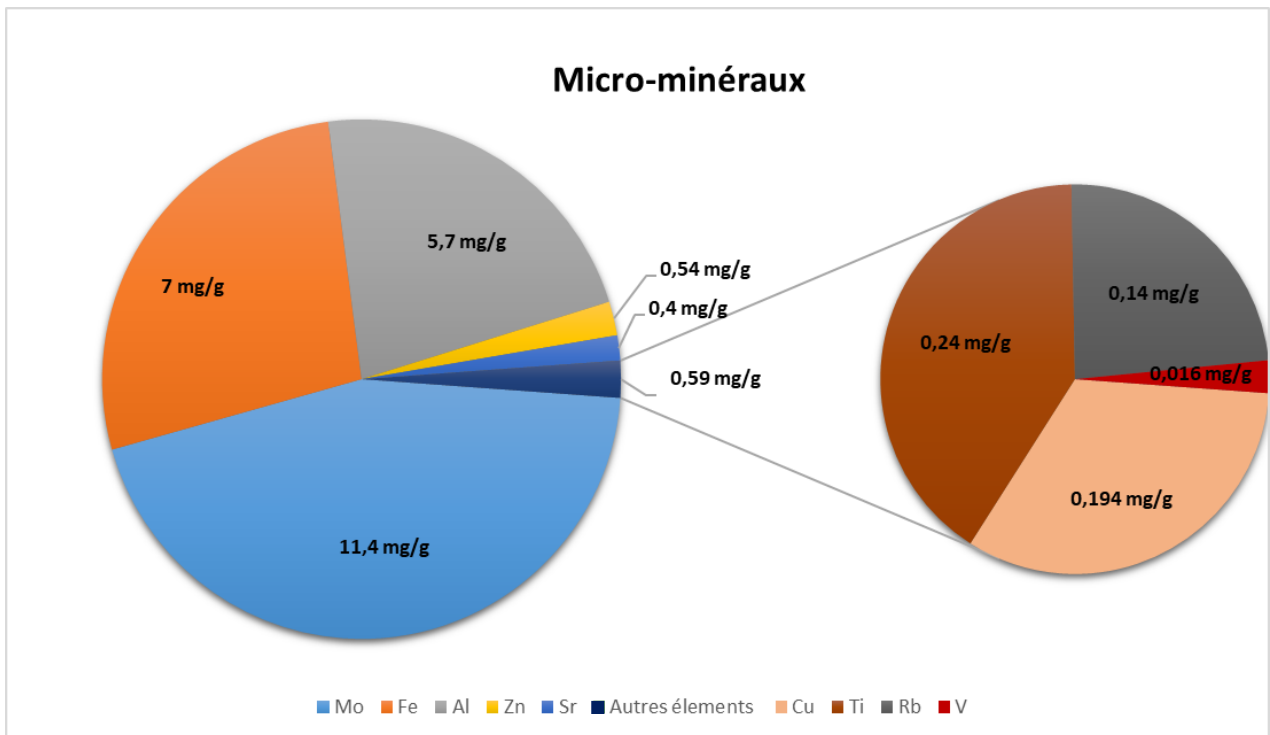
- Facteurs endogènes qui sont liés à l'algue elle-même, son métabolisme, son stade de croissance, sa structure et la composition de sa paroi.
- Facteurs exogènes tels que l'habitat, la saison, la température, la salinité, la présence de polluants dans le milieu environnant.

#### III.2.3.2. La composition minérale

La composition minérale est déterminée en utilisant la XRF. Les principaux minéraux déterminés dans l'algue *Ulva sp* sont illustrés dans les figures III.1 et III.2.



**Figure III.1:** Les macro-minéraux présents dans l'algue *Ulva sp*



**Figure III.2:** Les micro-minéraux présents dans l'algue *Ulva sp*

Il ressort des deux figures III.1 et III.2, que l'algue *Ulva sp* est riche en minéraux. Certains d'entre eux sont nécessaires à des quantités assez importante (macro-minéraux) et d'autres sont nécessaires à de petites concentrations et elles deviennent toxique au-delà (micro-minéraux).

Les résultats en macro-minéraux (S, K, Mg, Ca, P) indiquent que l'algue étudiée présente une teneur importante en Soufre ( $203.1 \pm 0.9$  mg/g), suivi de Potassium ( $169.4 \pm 1$  mg/g) puis de Magnésium et de Calcium ( $122.2 \pm 1.3$  mg/g ;  $71 \pm 0.7$  mg/g), et enfin de Phosphore ( $8 \pm 0.4$  mg/g).

Neufs micro-minéraux sont enregistrés dans la présente étude. L'élément le plus abondant est le Molybdène ( $11.4 \pm 0.002$  mg/g), suivi du Fer ( $7 \pm 0.1$  mg/g), puis de l'Aluminium, du Zinc, du Strontium, du Titane, du Cuivre, du Rubidium et enfin du Vanadium ( $5.7 \pm 0.1$  mg/g ;  $0.54 \pm 0.02$  mg/g ;  $0.4 \pm 0.0062$  mg/g ;  $0.24 \pm 0.043$  mg/g ;  $0.194 \pm 0.02$  mg/g ;  $0.14 \pm 0.00035$  mg/g ;  $0.016 \pm 0.0833$  mg/g).

La composition minérale de la même espèce varie fortement en fonction de la localisation géographique, de la saison, et des différents facteurs physico-chimiques, ce qui rend les études comparatives difficiles d'autant plus que l'échantillon utilisé dans cette étude est issu d'un mélange de deux espèces d'Ulves.

#### III.2.4. Teneur en lipides totaux

En général, la teneur totale en lipides chez l'Ulva est inférieure à 4% (MS)(TABARSA *et al.*, 2012). Les résultats (1,42% de la matière sèche) (Tableau III.2) obtenus concordent avec ceux signalés pour différentes espèces du genre Ulva (0,2 à 5,6%) ainsi que celles du genre Enteromorpha (0,07 à 1,06%)(BANERJEE *et al.*, 2009; PEÑA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2011).

#### III.2.5. Teneur en protéines totales

La teneur en protéines totales dans l'extrait d'algue est déterminée à partir de l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage (Figure III.3).

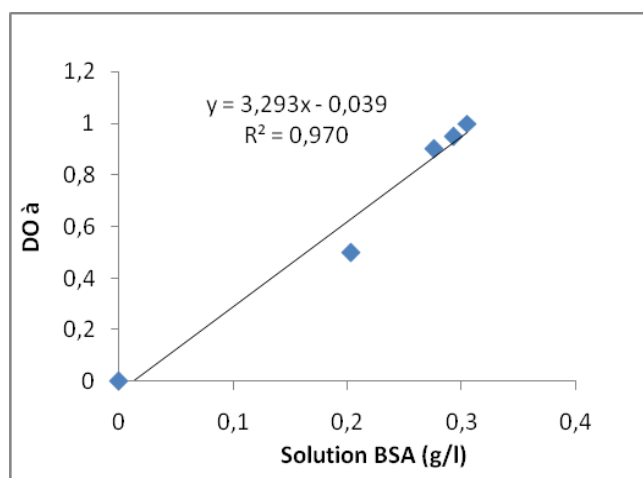


Figure III.3 : Courbe d'étalonnage de la solution de BSA"

La teneur en protéines trouvée dans la présente expérience était relativement faible, elle a été estimée à 11.83 % du poids sec (Tableau III.2). D'autres études, conformément à la recherche actuelle, ont rapporté des niveaux de protéines similaires, une valeur de 11.88% pour l'espèce *Ulva sp* cultivée en France (WIJESEKARA *et al.*, 2017), un taux de protéines 10.69% pour *U.lactuca* (TABARSA *et al.*, 2012) et 10.35% en poids sec pour *U.rigida* récoltée en Bretagne région de France (FLEURENCE *et al.*, 1995).

Cette quantité en protéines est dans l'intervalle des taux décrits pour *Ulva sp* (10–26%) (JOËL FLEURENCE *et al.*, 2018). Évidemment, la variation de la teneur dépend des espèces, des saisons, de la localisation géographique et des conditions environnementales (BENJAMA et MASNIYOM, 2011), La teneur en protéines varie également en fonction du mode d'extraction et du dosage. Les solutions aqueuses peuvent donner des rendements plus bas que certains solvants à base de phénols (WIJESEKARA *et al.*, 2017)

#### III.2.6. Teneur en sucre

##### III.2.6.1. Teneur en sucres totaux

Les sucres totaux représentent 49.59% du poids de l'algue sèche (Tableau III.2). Selon KIM *et al.*(2011), la teneur en polysaccharides chez les ulves varie de 38 à 54% de la matière sèche (MS) . La valeur obtenue dans cette étude se situe dans cet intervalle. Elle est en accord aussi avec d'autres travaux effectués sur les espèces d'Ulves : *Ulva lactuca* ( $54.9 \pm 0.95\%$  MS) (YAICH *et al.*, 2011) ; ( $42.81 \pm 0.28\%$  MS) (OUCIF *et al.*, 2020)

##### III.2.6.2. Teneur en sucres libres

La teneur en sucres libres est déterminée à partir de la droite de régression de la courbe d'étalonnage. (Figure III.4)

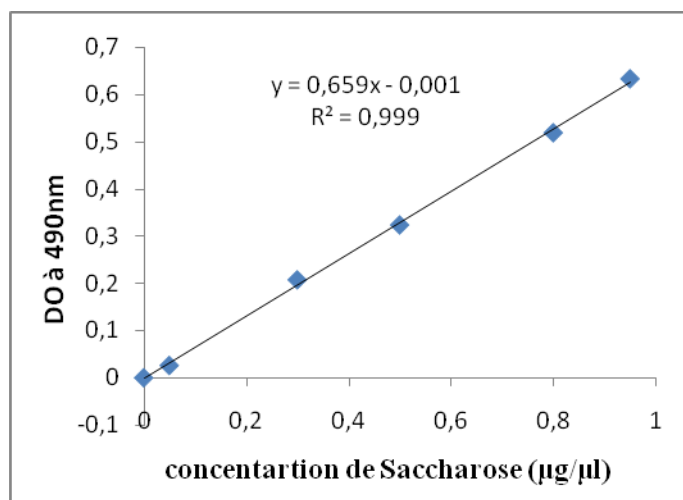
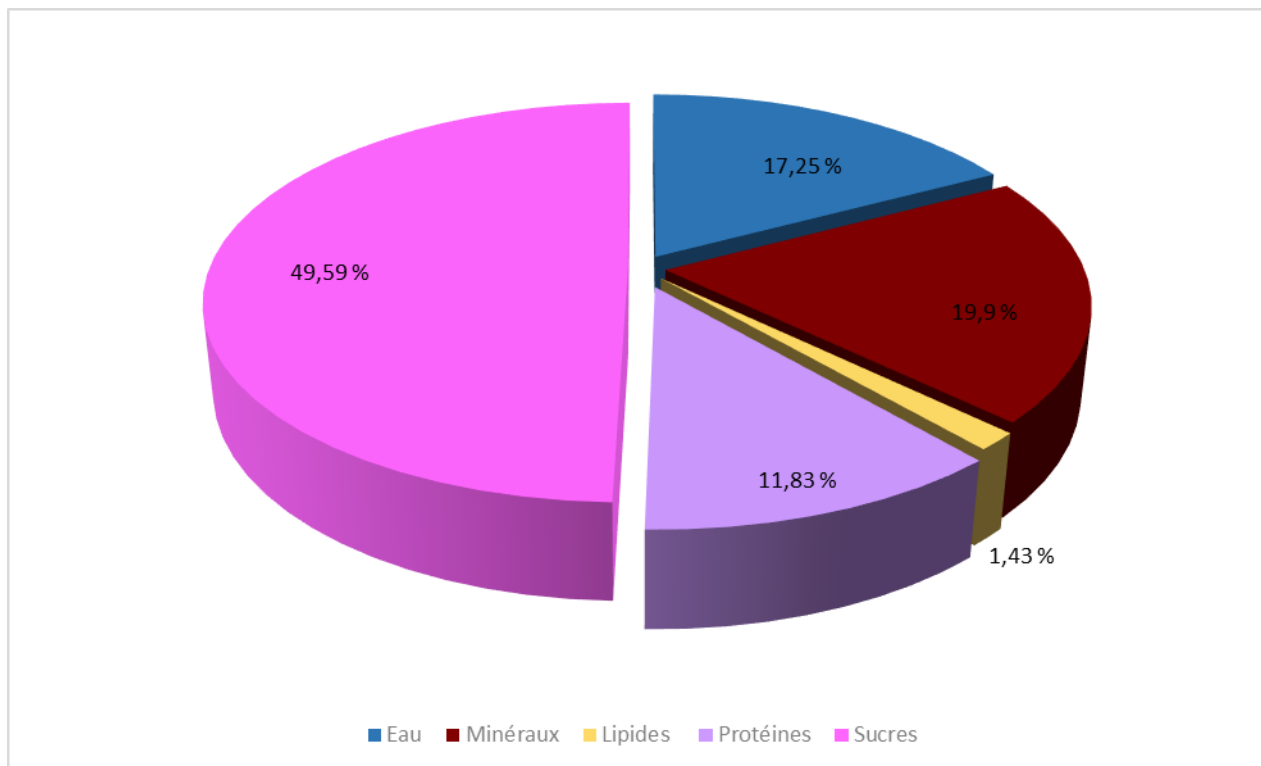


Figure III.4 : Courbe d'étalonnage du saccharose

La teneur des sucres libres dans cette étude est de 86  $\mu\text{g}$  équivalent de saccharose /g d'algue sèche.

De l'ensemble des résultats obtenus, on peut conclure que l'*Ulva* est une bonne source naturelle de glucides, de protéines et de minéraux et contient de faibles niveaux de lipides. Son contenu chimique peut être influencé par les conditions de croissance (température de l'eau, salinité, lumière et nutriments). Dans cette étude, l'échantillon contient de grandes quantités de glucides 49,59 %, suivis de cendres (19,95%) et de protéines (11,83%) (Figure III.5). La teneur élevée en glucides serait compatible avec la croissance et la maturité des algues, les variations saisonnières et l'activité photosynthétique. Quand celle-ci augmente, elle induirait une teneur plus élevée en glucides et une réduction du taux protéique. La relation inverse entre la teneur en glucides et en protéines est observée chez plusieurs espèces appartenant au genre *Ulva*.

En effet, La réduction de la teneur en protéines résulte de la diminution de l'azote disponible qui est sollicité pour la synthèse des glucides (FAREEHA *et al.*, 2013). La teneur en cendres dans l'*Ulva* est élevée en raison de la teneur élevée en soufre qui est représentée par les sulfates probablement associés aux polysaccharides chargés (COSTA *et al.*, 2012).



**Figure III.5:** La composition chimique globale de l'algue séchée

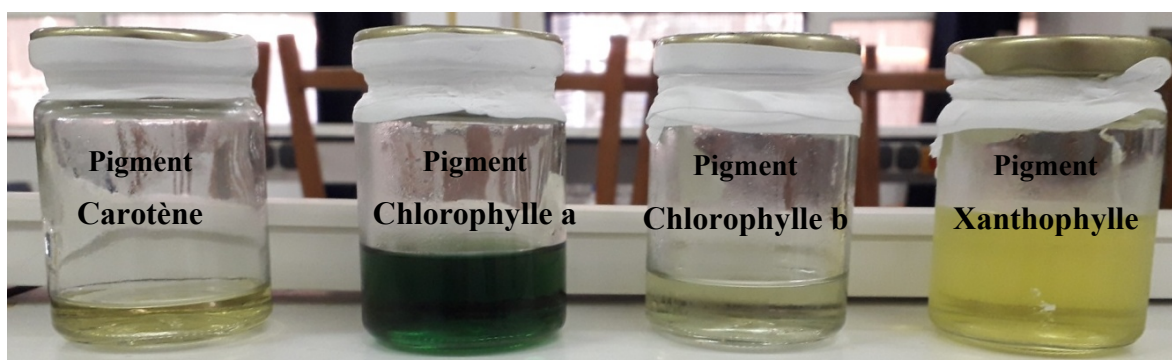
*Ulva sp*

### III.3. Identification et caractérisation des pigments contenus dans les ulves

Les pigments photosynthétiques extraits des ulves sont identifiés et classés suivant leur caractéristique spectrale et leur propriété chimique.

#### III.3.1. Caractéristique spectrale des pigments extraits

La séparation par chromatographie de partage des pigments photosynthétiques extraits de *Ulva sp* a été réalisée à l'aide d'un mélange de solvants apolaire (éther de pétrole) et polaire (ether-diéthylique) en faisant varier les proportions (9/1, 1/1 et 1/9) afin de permettre une meilleure séparation. Les spectres d'absorption des pigments chlorophylliens extraits de l'*Ulva* sont similaires à ceux extraits des plantes vertes. Il s'agit de la chlorophylle a et b, des carotènes et des xanthophylles (Figure III.6). Le solvant (éther de pétrole/ etherdiéthylique, 9/1) a permis l'élution du premier pigment jaune-orange "les carotènes". Ces derniers ne comportant pas d'atome d'oxygène et sont de même nature que l'éther de pétrole (apolaire), ce qui explique leur affinité pour cette phase mobile et leur élution en premier. Les deux fractions de chlorophylle A (vert-bleu) et B (vert clair) ont été éluées successivement par le solvant (éther de pétrole/ etherdiéthylique, 1/1). La chlorophylle B se différencie de la chlorophylle A par la présence un groupement aldéhyde (-CHO) au lieu d'un méthyle (CH<sub>3</sub>). La chlorophylle B est donc plus polaire et plus retenue par la phase stationnaire que la chlorophylle A. La dernière fraction Xanthophylle (jaune) a été récupérée grâce au solvant polaire (éther de pétrole/ etherdiéthylique, 1/9). En effet, Les xanthophylles (violaxanthine et néoxanthine) sont des carotènes oxydés, ils sont polaires puisqu'ils comportent de nombreux atomes d'oxygènes qui vont pouvoir se lier avec les groupements hydroxyles (-OH) du support solide (gel de silice).



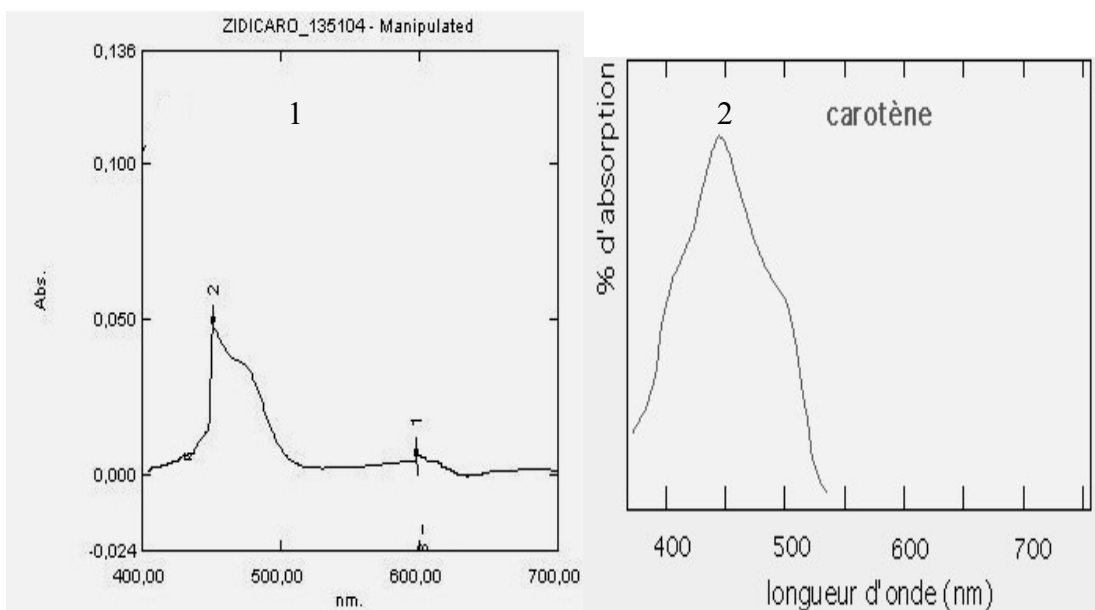
**Figure III.6:** Les pigments photosynthétiques de l'algue *Ulva sp* obtenus par chromatographie de partage sur colonne de gel de silice

Les différents extraits obtenus par chromatographie sur colonne ont fait l'objet d'une caractérisation d'absorption de la lumière en réalisant un spectre d'absorption à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible classique.

Celui-ci permet de mesurer l'absorption en fonction de la longueur d'onde (allant de 400 nm à 700 nm). Les spectres obtenus sont comparés aux pigments chlorophylliens décrits dans la littérature. (HARYATFREHNI *et al.*, 2015).

#### Pigments carotènes

Le profil du spectre d'absorption des pigments carotènes présente un pic significatif à 451nm (Figure III.7). Le carotène absorbe le bleu. L'œil perçoit alors la couleur complémentaire (mélange de vert et de rouge qui ne sont pas absorbés). On voit alors une nuance de jaune-orangé. D'après l'étude de (HYNSTOVA *et al.*, 2018), Les caroténoïdes dont les carotènes présentent une large gamme d'absorption spectrale entre 400 et 500 nm.



**Figure III.7 :** Spectre d'absorption des pigments Carotènes. 1: carotène extrait de l'Ulva (présente étude).2: carotène extrait d'une plante verte (Thanh-Truc et Escalle-Lewis, 2011)

#### Chlorophylles A et B

Le spectre de la chlorophylle A a révélé deux pics d'absorption significatifs à 423 nm et 660 nm, tandis que les pics d'absorption de la chlorophylle B étaient à 450nm et 643nm (Figure III.8). Un maximum d'absorption dans le rouge de la chlorophylle A est observé entre 660 et 665 nm et le maximum d'absorption dans le bleu est enregistré entre 428 à 432 nm.

Il en est de même pour la chlorophylle B, qui passe de 642 à 652 nm et de 452 à 469 nm (Figure III.9) (HYNSTOVA *et al.*, 2018).

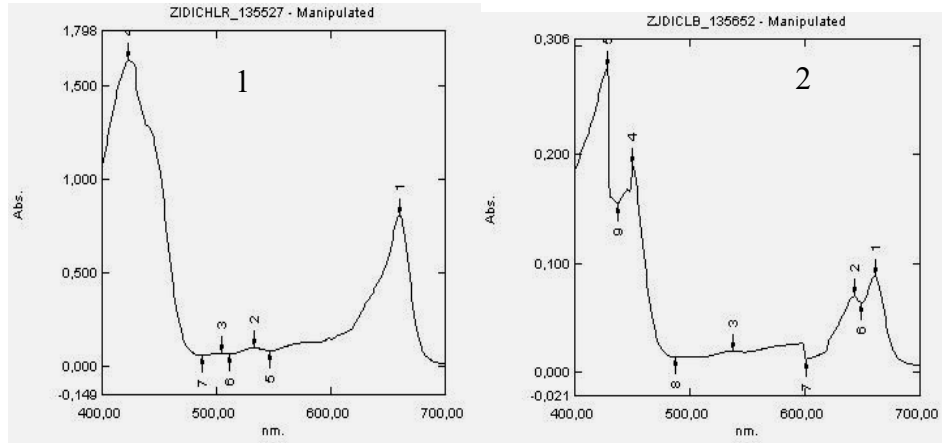


Figure III.8 : Spectre d'absorption de la Chlorophylle A (1) et B (2) extraits de l'Ulva (présente étude)

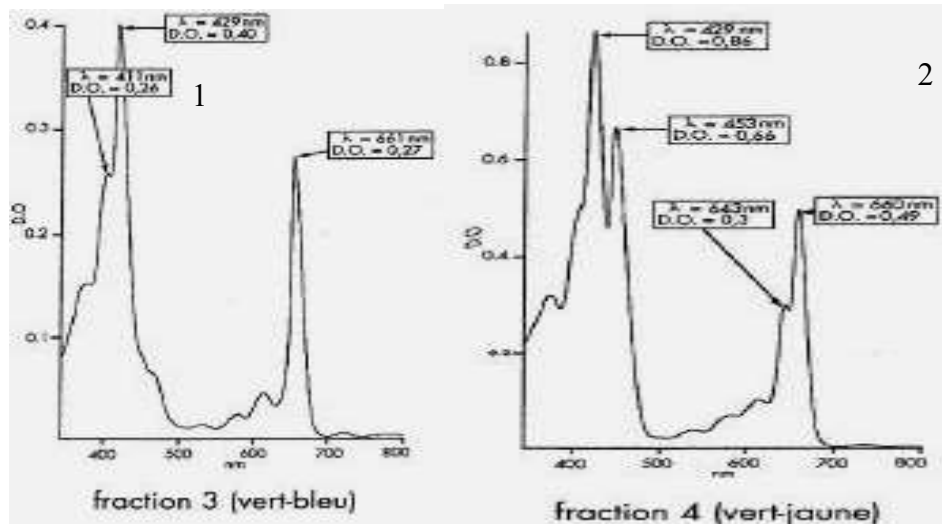


Figure III.9 : Spectre d'absorption de la Chlorophylle A (1) et B (2) extraits d'une plante verte (Thanh-Truc et Escalle-Lewis, 2011)

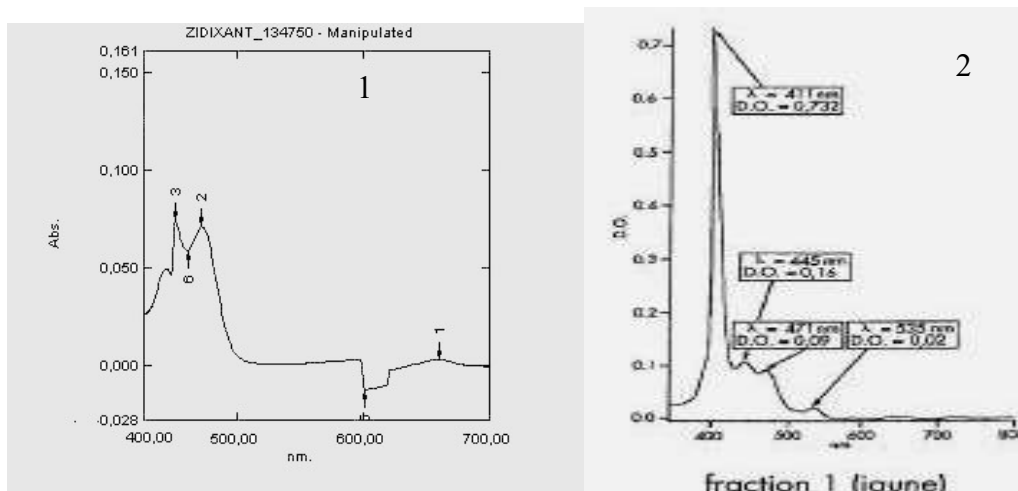
La chlorophylle est le principal pigment photosynthétique. Deux structures remarquables caractérisent cette molécule : un noyau tétrapyrrolique ou chlorine, contenant un atome de magnésium en son centre et une chaîne terpénique ou phytol, constituée de vingt atomes de carbone. La structure des formes a et b de la chlorophylle est quasi identique, à l'exception d'une fonction aldéhyde située sur la chlorine.

Cette différence de structure a une forte incidence sur leurs propriétés optiques respectives. L'atome de magnésium participe aux propriétés optiques de la molécule alors que le groupement phytol n'interagit pas avec la lumière.

En revanche, en raison de ses propriétés liposolubles, il joue un rôle essentiel dans l'intégration de la chlorophylle dans les protéines de la membrane des thylakoïdes. La synthèse et la dégradation de la chlorophylle mettent en jeu des précurseurs comme la chlorophyllide et des produits de dégradation (phéophytine, phéophorbide...) dont les propriétés optiques sont proches de celles de la chlorophylle. Ces molécules responsables de la formation de radicaux libres sous l'action de la lumière sont dites phototoxiques. Pour limiter cet effet, une chaîne de mécanismes empêche l'accumulation de ces précurseurs et de produits de dégradation. Leur influence sur les propriétés optiques de la feuille d'une plante ou du thalle de l'algue est donc négligeable. Par contre on peut les retrouver à de fortes proportions lors l'extraction des pigments suivant la nature des solvants utilisés (LICHTENTHALER, 1987; FÉRET, 2009).

### Pigment xanthophylle

Trois pics d'absorption de la xanthophylle ont été enregistrés, le premier à 421nm, le deuxième à 451nm et le dernier à 472nm, (Figure III.10). Les caroténoïdes ont un large spectre d'absorption qui se situe entre 400 et 500 nm (HARYATFREHNI *et al.*, 2015).



**Figure III.10 :** Spectre d'absorption de la Xanthophylle.1: xanthophylle extrait de l'Ulva (présente étude).2: xanthophylle extrait d'une plante verte (Thanh-Truc et Escalle-Lewis, 2011)

Les xanthophylles sont synthétisées à partir des carotènes et possèdent en plus des atomes d'oxygène. Dans le chloroplaste, on distingue cinq formes de xanthophylles (lutéine, zéaxanthine, violaxanthine, anthéroxanthine et néoxanthine). Les caroténoïdes présentent une très forte absorption de la lumière bleue entre 400 nm et 500 nm. Comme pour la chlorophylle, leur spectre d'absorption est sensible au solvant utilisé et à l'environnement de la molécule.

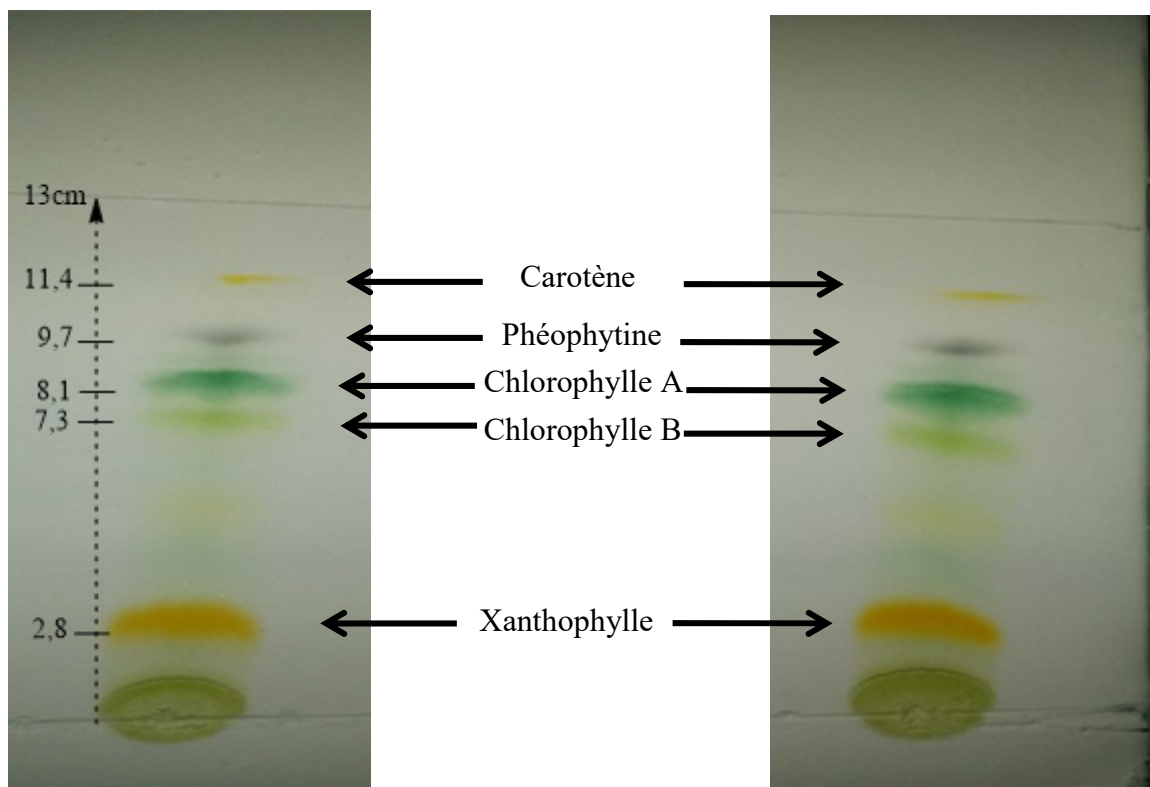
### III.3.2. Propriété chimique des pigments extraits

La chromatographie sur couche mince est une technique analytique principalement utilisée pour séparer des substances colorées non volatiles, comme les pigments biologiques. La séparation s'effectue grâce à la migration, par capillarité, d'un solvant sur une plaque de chromatographie.

Un mélange de pigments peut être séparé en fonction de la différence d'affinité de chacun des pigments pour le substrat sur lequel ils sont placés ainsi que par leur degré de solubilité (défini par la polarité) dans le solvant utilisé.

Dans cette étude, les pigments avec une faible polarité, donc soluble dans le solvant apolaire, vont migrer vers le haut de la plaque CCM, tandis que les pigments avec une grande polarité, soit peu ou pas soluble vont rester près de la ligne de dépôt.

L'extrait chlorophyllien brut ainsi que les différentes fractions obtenues par chromatographie de partage sur colonne ont été analysés par CCM. Les résultats de la CCM sont illustrés ci-dessous : (Figure III. 11)



**Figure III.11:** Identification des différents pigments photosynthétiques par CCM

L'analyse du chromatogramme de l'extrait chlorophyllien brut révèle 05 bandes, du haut vers le bas :

- Carotènes (jaune-orange) : très peu polaires avec un Rf de 0,87 qui correspond au carotène.

- Phéophytine (gris-marron) avec un Rf de 0,74. La phéophytine correspond aux molécules de chlorophylles sans l'atome de magnésium central dans le noyau porphyrine. Une faible quantité de phéophytine existe naturellement et participe aux transferts d'électron durant le processus de photosynthèse.

En effet, Les phéophytines interviennent dans la photosynthèse comme premiers transporteurs d'électrons intermédiaires dans la chaîne de transferts d'électrons du photosystème II chez les plantes (PS II), et du centre réactionnel photosynthétique des bactéries pourpres . Dans ces deux cas, la lumière transfère les électrons des centres réactionnels à des phéophytines, qui les cèdent à leur tour à une quinone (Q<sub>A</sub>), selon un mécanisme semblable dans l'un et l'autre cas. Elle est surtout un produit de dégradation de la chlorophylle lors des extractions par les solvants. Ce pigment n'a pas été mis en évidence lors de l'étude spectrale ; il possède un maximum d'absorption à 410 nm et 666 nm. (KLIMOV, 2003)

- Chlorophylle A (vert-bleu) : peu polaire à Rf= 0,62.
- Chlorophylle B (vert-jaune) : moyennement polaire à Rf= 0,56.
- Xanthophylle (jaune) polaire. Ce pigment est très dense et bien visible dont le Rf égale 0,21.

Par ailleurs, l'analyse par CCM et par spectrophotométrie des fractions obtenues de la chromatographie sur colonne révèle que celle-ci a permis globalement une bonne séparation des pigments. Toutefois, la distinction et la séparation des pigments tels que la chlorophylle A, la chlorophylle B et la phéophytine reste difficile avec l'éluant (éther de pétrole/éther di éthylique aux proportions 1/1). Selon SAINT-DIZIER. (1981), les produits de dégradation des chlorophylles ont des spectres d'absorption semblables à ceux des chlorophylles, ainsi ils interfèrent sérieusement dans leurs dosages.

### III.4. Caractérisation des polysaccharides

#### III.4.1. Rendement d'extraction

Les rendements d'extraction des polysaccharides à partir de l'*Ulva sp* sont consignés dans le tableau III.5

Tableau III.5 : Rendements d'extraction des polysaccharides d'*Ulva sp*

Protocole/Temps d'extraction	Temps d'extraction			Rendement
	1 <sup>ere</sup> extraction Méthode Soxhlet	2 <sup>eme</sup> extraction Méthode Soxhlet	Macération dans l'eau chaude	
Protocole 1	1 h	1h	2h	8%
Protocole 2	2h	2h	4h	20%

Une variation importante du rendement d'extraction des PSs est perceptible. En effet il est de l'ordre de 8% pour le premier protocole (Figure III.12) et de 20% pour le deuxième protocole (Figure III.13). Il apparait clairement que la durée de chaque traitement influence considérablement le rendement d'extraction.

Ces résultats corroborent avec les travaux de LAHAYE et ROBIC.(2007) qui ont rapportés que le rendement d'extraction des polysaccharides chez les Ulvales varie de 8 à 26 %.

KIDGELL *et al.*(2019) ont mentionné qu'en plus de la composition chimique globale de l'espèce et les différents facteurs environnementaux, le rendement d'extraction des PSs est aussi influencé par d'autres facteurs tel que les procédés de prétraitement, la taille des particules d'algues, le solvant d'extraction, la température d'extraction, sa durée et les méthodes de purification.

WAHLSTRÖM *et al.*(2020) ont montré que l'extraction des PSs à partir de l'*Ulva lactuca* en utilisant un acide a un rendement plus important que l'extraction dans l'eau chaude avec une précipitation à l'éthanol et une purification à la protéinase K.



Figure III.12 : Extrait de polysaccharides obtenus selon (protocole1)

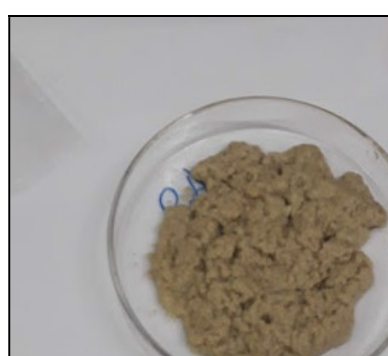
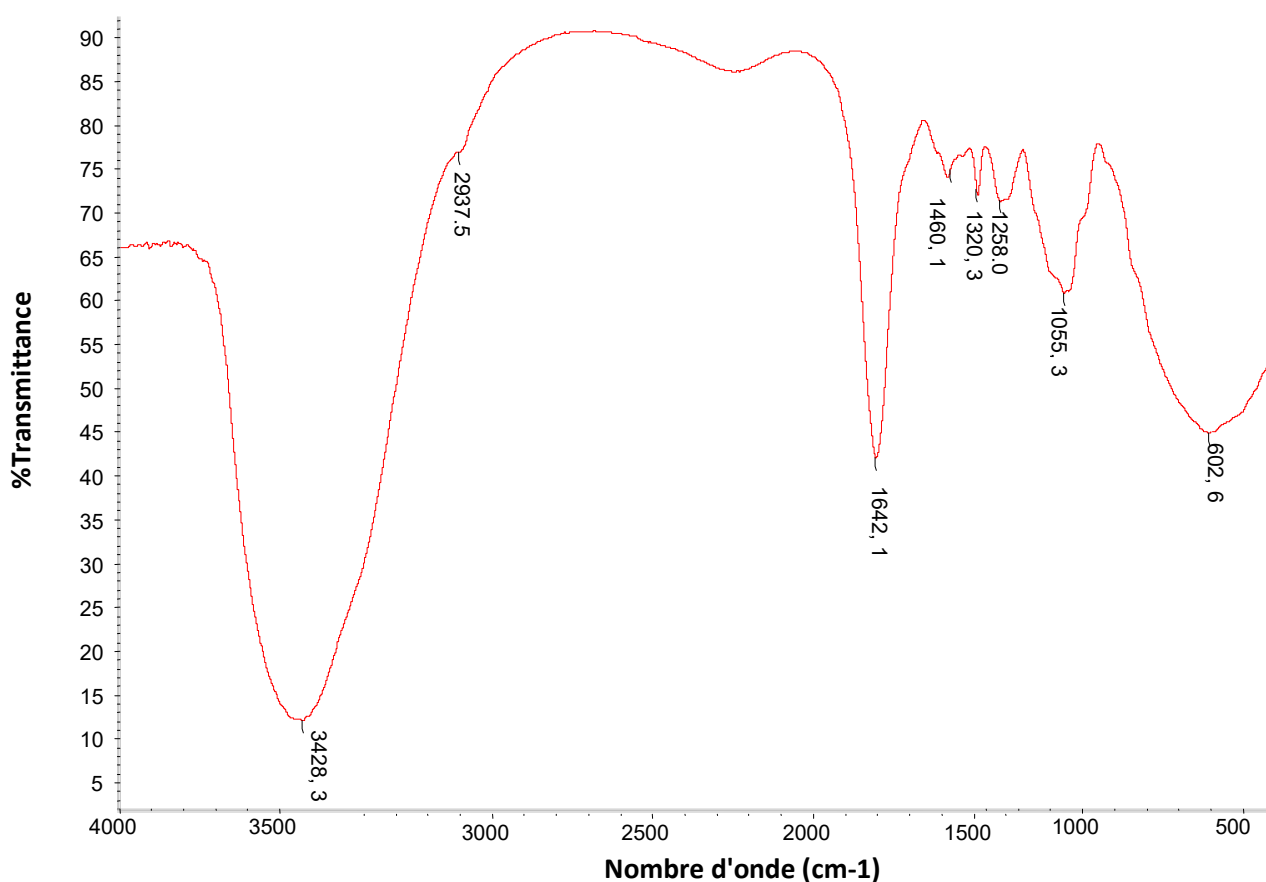


Figure III.13 : Extrait de polysaccharides obtenus après dédoublement des temps de réaction (protocole 2)

### III.4.2. Analyse des polysaccharides par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

La FTIR est utilisée dans cet étude afin d'identifier les groupements fonctionnelles caractéristiques de ce groupe de polysaccharides .Le spectre obtenu est présenté dans la Figure III.14



**Figure III.14** : Le spectre FTIR des polysaccharides extraits de l'algue *Ulva sp*

La présence d'une large bande intense à  $3428.3\text{ cm}^{-1}$  est attribuée à la vibration des groupements hydroxyles ( $-\text{OH}$ ). De même une faible bande d'absorption à  $2937.5\text{ cm}^{-1}$  correspond à la vibration des liaisons C-H. (HE *et al.*, 2016; YAICH *et al.*, 2017; OLASEHINDE *et al.*, 2019). Deux autres signaux à  $1646.1\text{ cm}^{-1}$  et  $1460.1\text{ cm}^{-1}$  mettent en évidence le groupement carboxylique ( $-\text{COOH}$ ), elles correspondent à la vibration asymétrique et à la vibration symétrique de cette fonction respectivement. Ces bandes sont caractéristiques à l'acide uronique. (TOSKAS *et al.*, 2011)

Les absorptions révélées aux alentours des  $1258\text{ cm}^{-1}$  et  $1055.3\text{ cm}^{-1}$  sont considérées comme une empreinte digitale des polysaccharides sulfatés des ulves.

Le signal à  $1258\text{ cm}^{-1}$  est spécifique à la vibration des liaisons S=O, ce qui confirme la présence des groupements sulfatés dans ces polysaccharides. La bande intense enregistrée à  $1055.3\text{ cm}^{-1}$  est typique à la vibration des liaisons C–O de deux groupes principales de glucosides : le Rhamnose et l'acide glucuronique.(ROBIC *et al.*, 2009a). Le signal enregistré à  $602.2\text{ cm}^{-1}$  peut être probablement une impureté ou encore un groupement inconnu.

En comparant le spectre FTIR des polysaccharides extrait d'*Ulva sp* dans le cadre de cette étude avec celui des études précédentes (SARI-CHMAYSEM *et al.*, 2019), on remarque l'absence de deux signaux ( $849\text{ cm}^{-1}$  et  $787\text{ cm}^{-1}$ ) uniquement. Ces signaux correspondent à la vibration de la liaison S=O, et à l'élongation des groupements C-O-C de résidus du rhamnose, et des acides glucuronique et iduronique. Cela peut être expliqué par la différence des méthodes d'extraction des polysaccharides préconisées dans les deux études.

#### III.4.3. Analyse des polysaccharides par RMN

On a voulu confronté les résultats de l'analyse des polysaccharides obtenus par FTIR à ceux de la RMN et estimer le pourcentage des groupements sulfates, mais cela a été vain à cause de problèmes purement techniques, par la suite on n'a pas pu reprogrammer les analyses au niveau du CRAPC à cause de la pandémie Covid-19 et du confinement.

#### III.5. Teneur en polyphénol

La teneur en polyphénols totaux dans l'extrait acétate d'éthyle d'algue est déterminée à partir de l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage exprimée en  $\mu\text{g}$ . Eq acide gallique par mg d'extrait (Figure III.15).

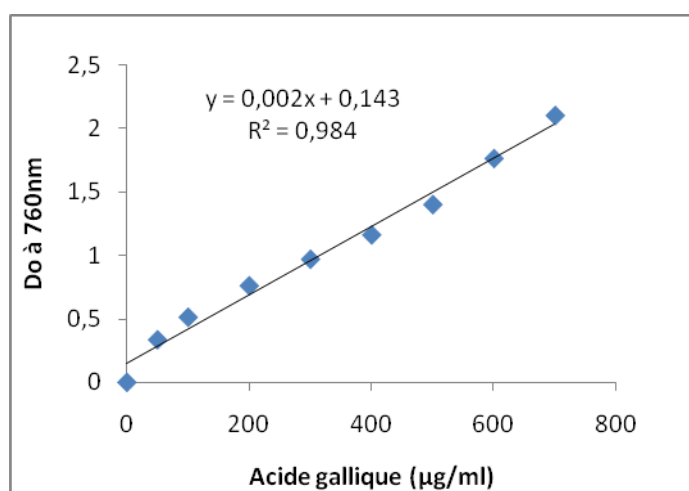


Figure III.15 : Courbe d'étalonnage de l'acide

Dans cette étude, l'extrait EtOAc a montré une teneur en phénols totaux de  $25,39\text{ }\mu\text{g}$  d'acide gallique/mg

Ces résultats ont été comparés et confirmés par plusieurs études sur les algues du genre *Ulva* en utilisant le même solvant EtOAc. Ces travaux ont montré que l'espèce *Ulva rigida* contenait en moyenne 19 µg GAE /mg (TRIGUI *et al.*, 2013), *Ulva linza* 39,59 µg GAE /mg (KIM *et al.*, 2018) et *Ulva lactuca* 77,3 µg GAE /mg (AL-MALKI *et al.*, 2018). *Ulva fasciata* a montré un taux presque similaire (21 µg GAE /mg) mais en utilisant un solvant différent l'éthanol (VIJAYAVEL et MARTINEZ, 2010)

La teneur totale en phénol dépend du type et de la polarité des solvants d'extraction. L'acétate d'éthyle est un très bon solvant pour l'extraction phénolique, il a montré les rendements les plus élevés par rapport à d'autres. (TRIGUI *et al.*, 2013; AL-MALKI *et al.*, 2018)

### III.6. Activité anti-inflammatoire *in vivo* des polysaccharides et des polyphénols extraits de L'Ulva

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des polysaccharides et des polyphénols extraits du mélange d'algue *Ulva lactuca* et *Ulva fasciata* a été réalisée sur le modèle de l'œdème de l'oreille de souris induit par le Xylène à 96% et estimée par le pourcentage d'inhibition de l'œdème (CHADER, 2019).

Quatre heures après l'induction de l'inflammation (traitement avec du xylène), les souris du groupe témoin négatif ont développé un œdème au niveau de leur oreille gauche avec un poids moyen de 1,457 mg. Les valeurs des poids des oreilles du groupe témoin négatif sont toujours comparées aux autres valeurs des lots traités en utilisant le test T (en supposant que la valeur moyenne des poids suit la loi normale et l'égalité des variances avec des différences non significatives), les résultats sont présentés dans le Tableau III.6.

**Tableau III.6 : Résultat du test statistique (T)**

T- et diclofénac	T- et polysaccharides	T- et polyphénols	T- et Placébo	T+ et polysaccharides	T+ et polyphénols
0,00021312	0,00021275	0,0011352	0,90626494	0,97501311	0,06302804
<0.01	<0.01	<0.01	>0,05	>0,05	>0,05
***	***	***	NS	NS	NS

\*\*\* : Hautement significatif ;  
NS : Non significatif

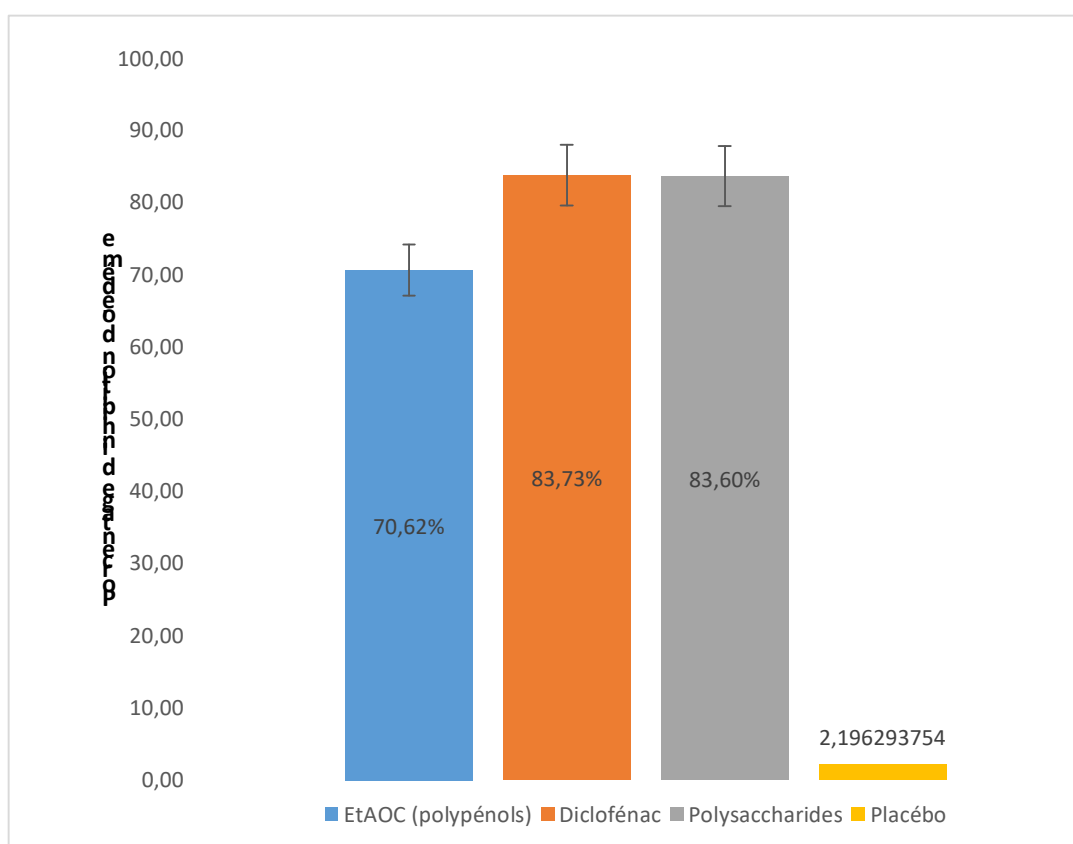
- Le traitement par l'anti-inflammatoire non stéroïdien Diclofénac à 1% (témoin positif) provoque une réduction très significative ( $P < 0.01$ ) (Tableau III.6) de l'œdème. La moyenne des différences de poids entre les oreilles est de 0,237 mg avec un pourcentage d'inhibition de 83.73% (Figure III.15) (Tableau III.7).
- Le traitement par une solution de polysaccharides extraits du mélange d'algue entraîne une inhibition très significative ( $P < 0.01$ ) de l'œdème (Tableau III.6). Elle est estimée à 83.60% avec une moyenne des différences de poids entre les deux oreilles de 0,239 mg (Figure III.15) (Tableau III.7)
- L'extrait EtOAc (composés polyphénoliques) présente un pouvoir inhibiteur très significatif de l'œdème ( $p < 0.01$ ) (Tableau III.6) qui est de l'ordre de 70.62% et une moyenne des poids de 0,428 mg. (Figure III.15) (Tableau III.7).

Ces résultats sont prometteurs puisque CHATTER et TARHOUNI.(2009) n'ont enregistré aucune activité anti-inflammatoire dans les extraits méthanoïques de l'*Ulva lactuca*.

- Le traitement par le réactif acétate d'éthyle (Placébo) utilisé pour l'extraction des composés polyphénoliques entraîne une inhibition non significative ( $P > 0,05$ ) de l'œdème (Tableau III.6). Ce réactif a présenté une différence de poids moyen de 1,425 mg et un pourcentage d'inhibition très faible estimé à 2,19% (Figure III.15) (Tableau III.7). Ce résultat confirme que l'inhibition de l'œdème est due à l'extrait EtOAc (polyphenols) et non au réactif acétate d'éthyle qui présente une activité anti-inflammatoire très faible voire nulle.

**Tableau III.7 :** Moyenne des différences de poids et les pourcentages d'inhibition de l'œdème

	T-	Diclofénac 1%	Polysaccharides	Polyphénols	Placébo (Acétate d'éthyle)
Moyenne des différences de poids entre l'oreille traité et non traité (mg)	1,457	0,237	0,239	0,428	1,425
PIO (%)	/	83,73	83,60	70,62	2,19



**Figure III.15 :** Potentiel d'inhibition de l'œdème (PIO) pour chaque traitement appliqué sur souris en (%). Placebo (acétate d'éthyle) l'extrait polyphénolique, Diclofénac à 1% (Témoin+) et les polysaccharides

### III.7. Activité anti-oxydante *in vitro*

Le dosage DPPH est la méthode la plus largement appliquée pour étudier l'activité anti-oxydante des produits naturels en raison de la fiabilité du test (FARASAT *et al.*, 2014), La capacité de réduction du radical libre instable DPPH<sup>•</sup> en DPPH-H est déterminée par la diminution des

absorbances à 517 nm, qui est induite par l'antioxydant. Ceci est visualisé par le changement de couleur du violet au jaune. Dans cette étude, les différents extraits issus de l'*Ulva sp* ont été testés. Les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau III.8

Faute de temps et à cause des conditions de travail défavorables dans le cadre de la pandémie (COVID-19), le dosage DPPH n'a été réalisé que pour les solutions mères et la détermination de l'IC50 n'a été effectuée que pour les composés phénoliques.

**Tableau III.8** : Activité anti-oxydante des différents phytoconstituants extraits de l'algue *Ulva sp* (Test DPPH).

Extrait d'algue <i>Ulvasp</i>		Activité antioxydante en fonction de la décoloration du DPPH	Activité antioxydante (Pourcentage d'inhibition)
Les polysaccharides sulfatés (Ulvanes)		+	16,6%
Les composés phénoliques		+++	88,8%
Les pigments	Chlorophylle	+	21,11%
	Carotène	+	13,33%
	Xanthophylle	+++	73,33%

+++ : Activité anti-oxydante très élevée, + : Activité anti-oxydante relativement faible

### III.7.1. Activité anti-oxydante des pigments

- **Les pigments carotènes**

Les carotènes connus pour leur forte activité anti-oxydante chez plusieurs algues ont montré dans cette étude un léger changement de couleur du DPPH et un pourcentage d'inhibition du radical relativement faible qui est de l'ordre de 13,33%. Cette faible activité anti-oxydante pourrait s'expliquer par une faible concentration en pigment carotène dans les algues vertes du genre *Ulva* dont le pigment dominant est la chlorophylle. En effet lors de la séparation et la caractérisation des pigments extrait du mélange d'algue par spectrophotométrie et par CCM, la fraction carotène se trouvait en faible quantité (volume, absorbance et concentration)

Néanmoins, l'étude de (ABD EL-BAKY *et al.*, 2008), a révélé une activité anti-radicalaire considérable des pigments carotènes issus du l'espèce *Ulva lactuca* avec une efficacité anti-oxydante de 77,19%.

- **Les pigments chlorophylles**

Les extraits de chlorophylle a et b ont également présenté un léger changement de couleur du DPPH. Bien que ces extraits ont révélés un pourcentage d'inhibition plus important que celui des pigments carotènes, mais il reste relativement faible 21,11%.

Selon l'étude de (LANFER-MARQUEZ *et al.*, 2005), l'extrait de chlorophylle a présenté une faible capacité piégeage des radicaux DPPH avec un pourcentage d'inhibition de 43%.

- **Les pigments xanthophylles**

Le test DPPH a clairement indiqué des résultats positifs pour les pigments xanthophylles, avec un changement de couleur évident avec un pourcentage d'inhibition du DPPH élevé de l'ordre de 73,33%, ce qui indique la présence d'une activité anti-oxydante importante.

L'étude de (RAJAURIA *et al.*, 2017) a confirmé la forte activité anti-radicalaire des pigments xanthophylles avec un IC50 égale à 12.9 µg/mL.

### III.7.2. Activité anti-oxydante des polysaccharides sulfatés

Les polysaccharides sulfatés extraits de l'espèce *Ulva sp* (Ulvanes) ont présenté un léger changement de couleur et un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 16%, et donc une activité anti-oxydante relativement faible. Cependant de nombreux travaux *in vitro* ont été réalisés sur l'activité anti-oxydante des polysaccharides sulfatés "ulvanes". Il en ressort que ces ulvanes possèdent un pouvoir inhibiteur du radical DPPH moyen notamment l'étude de (PEASURA *et al.*, 2015) avec un pourcentage d'inhibition de 56.18%.

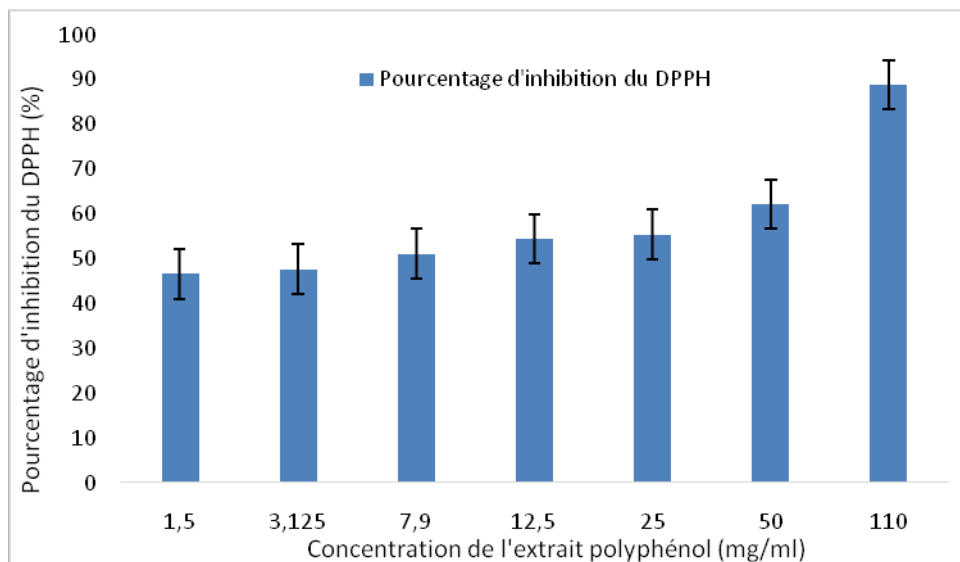
### III.7.3. Activité anti-oxydante des composés phénoliques

Le test DPPH pour les polyphénols a indiqué une très forte activité anti-radicalaire, qui se manifeste par un virage de couleur du DPPH du violet vers le jaune, cet extrait a également présenté le pourcentage d'inhibition le plus élevé (88,88%) par rapport aux autres phytoconstituants.

TRIGUI *et al.*(2013) et KIM *et al.* (2018) ont signalé la présence d'activité anti-oxydante des polyphénols extraits dans le solvant acétate d'éthyle à partir de l'*Ulva sp*.

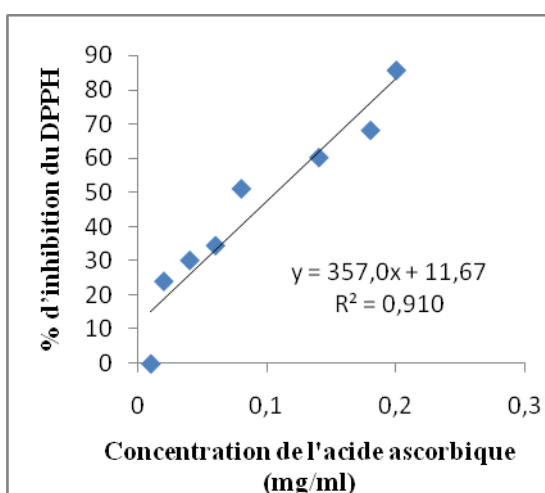
Différentes concentrations de composés phénoliques ont été testées afin de déterminer la IC50 correspondant à la concentration de l'échantillon nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH. Elle est déduite de la droite de régression des pourcentages d'inhibition. Des valeurs IC50 élevées indiquent une faible activité anti-oxydante. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard. Le pouvoir de piégeage de l'EtOAc testé à différentes concentrations (1,5, 3,12, 7,9, 12,5, 25, 50 et 110 mg /ml) sur le radical DPPH, il augmente avec l'augmentation des concentrations. En effet, le pourcentage d'inhibition de l'extrait varie de 46,6% à 88,8%.

L'activité de piégeage de l'EtOAc a atteint le maximum à 88,8% et était dans le même ordre de grandeur que le contrôle positif (acide ascorbique) testé à 0,2 mg/ml. Les résultats obtenus sont représentés dans la Figure III.16.

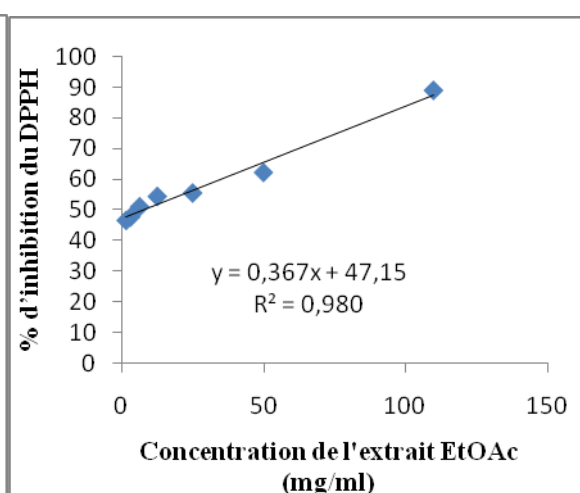


**Figure III.16 :** Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de l'extrait EtOAc

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par KIM *et al.* (2018) qui révèlent un pourcentage d'inhibition du DPPH de 90% pour l'extrait EtOAc de l'espèce *Ulva linza*. Un pourcentage d'inhibition de 90,3% a été enregistré pour l'extrait phénolique obtenu de l'espèce *Ulva clathrata* récoltée en Iran (FARASAT *et al.*, 2014)



**Figure III.17:** Effet antiradicalaire de l'acide ascorbique sur la réduction du DPPH



**Figure III.18:** Effet antiradicalaire de l'extrait EtOAc sur la réduction du DPPH

L'acide ascorbique a présenté une inhibition de 94,09% du radical DPPH à 1 mg/ml (Figure III.17). L'acide ascorbique présente donc une faible IC<sub>50</sub> égale à 0,107mg/ml et un pouvoir anti-radicalaire élevé.

Dans cette étude, la concentration obtenue de l'extrait EtOAc est de 7,73mg/ml pour une l'inhibition de 50 % du radical DPPH, cette concentration est nettement élevée à celle de l'acide ascorbique. Ceci peut être expliqué par le fait qu'il s'agit d'un extrait brut.

Des valeurs similaires d'inhibition à 50 % ont été détectées chez plusieurs algues marines notamment chez des algues vertes du genre *Caulerpa* avec une IC<sub>50</sub> égale à 6.74 mg/ml (SARINI *et al.*, 2014).

(ZUBIA *et al.*, 2007) ont constaté que l'espèce *Enteromorpha intestinalis* possédait une activité anti-oxydante moins importante que les autres espèces algales explorées.

De même, SADI (2010) a signalé la faible activité anti-oxydante des extraits éthanoïques (100mg/ml) issus de l'*Ulva lactuca* et d'*Enteromorpha intestinalis* qui sont dans l'ordre 20% et 12.64%

Toutefois, la concentration obtenue pour une inhibition de 50 % du radical DPPH pour un extrait phénolique (au dichlorométhane : méthanol) de l'espèce *U.lactuca* est de 16,50 µg/ml (Abd El Baky *et al.* 2008).

Dans une étude réalisée sur la détermination de l'activité anti-oxydante de 11 plantes médicinales, DJERIDANE *et al.* (2006) ont rapporté que le potentiel antioxydant des composés phénoliques est étroitement associé à leurs structures chimiques, dépendant ainsi du nombre et de la position des groupements hydroxyles agrippés au noyau aromatique de ces molécules.

En outre, il y a aussi l'éventuelle appartenance des molécules constitutives de l'extrait à différentes classes de polyphénols. Ces dernières possèdent probablement des forces anti-oxydantes variables ainsi qu'un effet synergique émanant des liaisons existantes entre elles et/ ou des composants présents dans les extraits pouvant contribuer à cette activité.

**CONCLUSION**

### Conclusion

Ce travail a pour objectif de déterminer la composition chimique globale de l'algue *Ulva sp*, de produire et de caractériser des biomolécules (composés phénoliques, polysaccharides sulfatés et pigments) aux propriétés pharmacologiques.

De l'ensemble des résultats obtenus, on peut conclure que *Ulva* est une bonne source naturelle de glucides (49.59%), de minéraux (19,95%), de protéines (11.83%), et contient un faible taux de lipides. Parmi les macro-minéraux, on trouve le soufre, le potassium, Magnésium, le Calcium et le phosphore, et les micro-minéraux les plus abondants sont le Molybdène, le Fer, l'Aluminium, le Zinc, le Strontium, le Titane, le Cuivre, le Rubidium et le Vanadium. Il a été constaté que *Ulva sp* contienne des niveaux élevés en polysaccharides sulfatés (20%), des teneurs appréciables en polyphénols (25,39 µgEq/mg) et en pigments chlorophylliens. Ces derniers sont, dans l'ordre décroissant, la chlorophylle a, la chlorophylle b, les xanthophylles et les carotènes.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* des biomolécules extraites du mélange des deux algues *Ulva lactuca* et *Ulva fasciata* a révélé que les polysaccharides sulfatés possèdent un potentiel d'inhibition très significative ( $P < 0.01$ ) de l'œdème qui est de 83.59%.

De même, L'extrait EtOAc (polyphénols) présente un pouvoir inhibiteur très significatif de l'œdème ( $p < 0.01$ ) qui est de l'ordre de 70.62%.

Par ailleurs, L'évaluation de l'activité anti-radicalaire et du pouvoir réducteur des phytoconstituants ont révélé que la meilleure activité anti-oxydante est celle des composés polyphénoliques avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 88,88% et une IC50 de 7,73mg/ml suivie de celle des pigments xanthophylles (70.73%) et des polysaccharides sulfatés (16%). Ces premiers résultats sont encourageants et font de l'*Ulva* des côtes algériennes une source inestimable en divers composés naturels à pouvoir antioxydant et anti-inflammatoire très intéressants. Cependant et malgré leur importance, ces résultats restent partiels et d'autres travaux sur ces algues s'imposent pour prospecter d'autres propriétés pharmacologiques, car les approches sont restées globales en ne prenant en compte que l'ensemble des composés présents dans les extraits. Il serait donc essentiel, à l'avenir de:

- Compléter l'identification et la caractérisation des polysaccharides sulfatés par RMN et par HPLC

## CONCLUSION

---

- Evaluer l'activité anti-oxydante des extraits par d'autres méthodes *in vitro* tels que (ABTS, CUPRAC, FRAP, Phénanthroline et nanoparticules d'argents), et *in vivo* sur différents modèles biologiques.
- Rechercher d'autres activités biologiques (les activités anticoagulantes, anti-tumorales, immunomodulatrices, anti-hyperlipidémique, anti-hépatotoxicité).
- Extraire et caractériser les protéines notamment les lectines et étudier leur propriétés anti-oxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoires.
- Etudier l'effet antioxydant et antimicrobien *in vivo* des pigments chlorophylliens.
- Identifier et caractériser les molécules constitutives des extraits polyphénoliques.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

### A:

- ABAD M. J. 2013. 10 - Anti-inflammatory properties of algae. In *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*, edited by H. Domínguez: Woodhead Publishing, 338-368.
- ABD EL-BAKY H. H., EL BAZ F. K., et EL-BAROTY G., 2008. Evaluation of marine alga *Ulva lactuca* L. as a source of natural preservative ingredient. *Am Eurasian J Agric Environ Sci* 3 (3):434-444.
- ABDULKHALEQ L. A., ASSI M. A., ABDULLAH R., ZAMRI-SAAD M., TAUFIQ-YAP Y. H., et HEZMEE M. N. M., 2018. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Veterinary world* 11 (5):627-635. Disponible sur le web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2991550>
- AGARWAL A., SALEH R. A., et BEDAIWY M. A., 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility* 79 (4):829-843. Disponible sur le web: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04948-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04948-8)
- AHMED O. M., SOLIMAN H. A., MAHMOUD B., et GHERYANY R. R., 2017. *Ulva lactuca* hydroethanolic extract suppresses experimental arthritis via its anti-inflammatory and antioxidant activities. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* 6 (4):394-408. Disponible sur le web: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2314853517301166>
- AISSOU C., 2019. Manuel de travaux pratiques de nutrition et alimentation des espèces aquacoles. Document interne 30p
- AKROUM S., 2011. Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels.
- ANDERSON J. M. 2013. Chapter II.2.2 - Inflammation, Wound Healing, and the Foreign-Body Response. In *Biomaterials Science (Third Edition)*, edited by B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen and J. E. Lemons: Academic Press, 503-512.
- APARICIO E., RODRÍGUEZ-JASSO R. M., LARA A., LOREDO-TREVIÑO A., AGUILAR C. N., KOSTAS E. T., et RUIZ H. A. 2020. Chapter 15 - Biofuels production of third generation biorefinery from macroalgal biomass in the Mexican context: An overview. In *Sustainable Seaweed Technologies*, edited by M. D. Torres, S. Kraan and H. Dominguez: Elsevier, 393-446.
- AOAC (1980). Association of official analytical chemists. Official methods of analysis. Washington : DC [en ligne]. [Consulté le 06/08/2020].
- AOAC (1999). Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. Washington : DC. [en ligne]. [Consulté le 06/08/2020]. Disponible sur le web: <https://law.resource.org/pub/us/cfr/ibr/002/aoac.methods.1.1990.pdf>. Disponible sur le web: [https://www.domainex.co.uk/services/analyticalsciences?gclid=Cj0KCCQjwoJX8BR CZARIsAEWBFMK8eTC0qAxUc3VCl\\_bllbCaQ7L4Gef8AcH3bSxGu4Q7ajrIuXefWTwaAuPyEALw\\_wcB](https://www.domainex.co.uk/services/analyticalsciences?gclid=Cj0KCCQjwoJX8BR CZARIsAEWBFMK8eTC0qAxUc3VCl_bllbCaQ7L4Gef8AcH3bSxGu4Q7ajrIuXefWTwaAuPyEALw_wcB)
- AVISSAR N., WHITIN J., ALLEN P., WAGNER D., LIEGEY P., et COHEN H., 1989. Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. Cell of origin and secretion. *Journal of Biological Chemistry* 264 (27):15850-15855.
- AWAD N. E., 2000. Biologically active steroid from the green alga *Ulva lactuca*. *Phytotherapy Research* 14 (8):641-643. Disponible sur le web: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1099-1573%28200012%2914%3A8%3C641%3A%3AAID-PTR668%3E3.0.CO%3B2-R>

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

### B:

- BALABAN R. S., NEMOTO S., et FINKEL T., 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. *cell* 120 (4):483-495.
- BANERJEE K., GHOSH R., HOMECHAUDHURI S., et MITRA A., 2009. Biochemical composition of marine macroalgae from Gangetic Delta at the apex of Bay of Bengal. *African Journal of Basic & Applied Sciences* 1 (5-6):96-104.
- BAROT M., NIRMAL KUMAR J. I., et KUMAR R. N., 2019. An Evaluation of the Nutritional Composition of Seaweeds as Potential Source of Food and Feed. *National Academy Science Letters* 42 (6):459-464. Disponible sur le web: <https://doi.org/10.1007/s40009-019-0783-x>
- BAUCHOT M. L., FISCHER W., SCHNEIDER M., EUROPEA C. E., et L'ALIMENTACIÓ O. D. L. N. U. P. A. L. A. I. 1987. *Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la peche: Mediterranée et mer Noire : zone de peche 37 : révision 1*: Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture.
- BAWEJA P., KUMAR S., SAHOO D., et LEVINE I. 2016. Chapter 3 - Biology of Seaweeds. In *Seaweed in Health and Disease Prevention*, edited by J. Fleurence and I. Levine. San Diego: Academic Press, 41-106.
- BENARIBA N., Phytochemical screening and free radical scavenging activity of Citrullus colocynthis seeds extracts. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2013, vol. 3, no 1, p. 35-40.
- BENJAMA O., et MASNIYOM P., 2011. Nutritional composition and physicochemical properties of two green seaweeds (*Ulva pertusa* and *U. intestinalis*) from the Pattani Bay in Southern Thailand. *Sonklanakarinn Journal of Science and Technology* 33 (5):575.
- BOIZOT N., et CHARPENTIER J.-P., 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier des Techniques de l'INRA*: pp.79-82. Disponible sur le web: <https://hal.inrae.fr/hal-02669118/document>
- BOURGUIBA I., ZAHLILA A., BOUAÏCHA N., AMRI M., et MEZGHANI S., 2017. Antioxidant effect of the marine green alga *Ulva rigida* ethanolic precipitate in yeast cells and zebrafish embryos. *South African Journal of Botany* 113:253-260.
- BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M.-E., et BERSET C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology* 28 (1):25-30.
- BRAVO L., 1998. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews* 56 (11):317-333. Disponible sur le web: <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
- BURLLOT A.-S. 2016.[En ligne] Valorisation des métabolites d'algues proliférantes par voie enzymatique: applications dans les domaines de la nutrition et santé animale, végétale et humaine, de la cosmétique et de l'environnement. *Thèse de doctorat.*, Biotechnologies, Université de Bretagne Sud.

### C:

- CABIOC'H J., FLOC'H J. Y., TOQUIN A. L., et BOUDOURESQUE C. F. 2006. *Guide des algues des mers d'Europe*: Delachaux et Niestlé.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- CARBONE C., MUSUMECI T., et PIGNATELLO R. 2013. 9 - Non-steroidal anti-inflammatory drugs. In *Drug-Biomembrane Interaction Studies*, edited by R. Pignatello: Woodhead Publishing, 281-303.
- CHAKDAR H., et PABBI S. 2017. Chapter 9 - Algal Pigments for Human Health and Cosmeceuticals. In *Algal Green Chemistry*, edited by R. P. Rastogi, D. Madamwar and A. Pandey. Amsterdam: Elsevier, 171-188.
- CHATTER R., et TARHOUNI S., 2009. CRIBLAGE DE L'EFFET ANTI ET ANALGESIQUE DES ALGUES MARINES DE LA MER MEDITERRANEE. 88.
- COSTA C., ALVES A., PINTO P. R., SOUSA R. A., BORGES DA SILVA E. A., REIS R. L., et RODRIGUES A. E., 2012. Characterization of ulvan extracts to assess the effect of different steps in the extraction procedure. *Carbohydrate polymers*. 88 (2):537-546. Disponible sur le web: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.041>

### D:

- DAWES C. 2016. Macroalgae Systematics, 107-148.
- DE ARAÚJO I. W. F., RODRIGUES J. A. G., QUINDERÉ A. L. G., SILVA J. D. F. T., MACIEL G. D. F., RIBEIRO N. A., DE SOUSA OLIVEIRA VANDERLEI E., RIBEIRO K. A., CHAVES H. V., PEREIRA K. M. A., BEZERRA M. M., et BENEVIDES N. M. B., 2016. Analgesic and anti-inflammatory actions on bradykinin route of a polysulfated fraction from alga *Ulva lactuca*. *International Journal of Biological Macromolecules* 92:820-830. Disponible sur le web: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813016310170>
- DE LA LOIRE D. D. P., 2013. Étude inter-régionale de connaissance des marées vertes du littoral atlantique sous influence de la Loire et de la Vilaine (secteur compris entre Quiberon et Ré). *Mer et milieux marins*.
- DAVIES K. J., 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB life* 50 (4-5):279-289. Disponible sur le web: <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1080/713803728>
- DJERIDANE A., YOUSFI M., NADJEMI B., BOUTASSOUNA D., STOCKER P., et VIDAL N., 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry* 97 (4):654-660.
- DOMONKOS I., KIS M., GOMBOS Z., et UGHY B., 2013. Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. *Progress in Lipid Research* 52 (4):539-561. Disponible sur le web: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163782713000453>
- DUBOIS M., GILLES K. A., HAMILTON J. K., REBERS P. T., et SMITH F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry* 28 (3):350-356.
- DUMAY J., et MORANÇAIS M. 2016. Chapter 9 - Proteins and Pigments. In *Seaweed in Health and Disease Prevention*, edited by J. Fleurence and I. Levine. San Diego: Academic Press, 275-318.
- DUNDAR A., YESIL O. F., ACAY H., OKUMUS V., OZDEMIR S., et YILDIZ A., 2012. Antioxidant properties, chemical composition and nutritional value of *Terfezia boudieri* (Chatin) from Turkey. *Food Science and Technology International* 18 (4):317-328. Disponible sur le web: <https://doi.org/10.1177/1082013211427954>

### E:

- EL GAMAL A. A., 2010. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal* 18 (1):1-25. Disponible sur le web:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319016409000462>
- ERLUND I., 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research* 24 (10):851-874. Disponible sur le web:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0271531704001344>
- EVANS P., et HALLIWELL B., 1999. Free radicals and hearing: cause, consequence, and criteria. *Annals of the New York Academy of Sciences* 884 (1):19-40.

### F:

- FARASAT M., KHAVARI-NEJAD R.-A., NABAVI S. M. B., et NAMJOOYAN F., 2014. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoid contents of some edible green seaweeds from northern coasts of the Persian Gulf. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR* 13 (1):163.
- FAREEHA A., ATIKA A., et ALIYA R., 2013. Protein extraction from *Ulva lactuca* and *Padina pavonica* found at Buleji coast, Karachi, Pakistan. *Int. J. Phycol. Phycochem.* 9:49-52.
- FAVIER A., 2003. Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique* (11/12):108-117.
- FEHER J. 2012. 5.3 - White Blood Cells and Inflammation. In *Quantitative Human Physiology*, edited by J. Feher. Boston: Academic Press, 437-445.
- FÉRET J.-B. 2009.[En ligne] Apport de la modélisation pour l'estimation de la teneur en pigments foliaires par télédétection, Paris 6.
- FLEURENCE J. 2016. Seaweed as Food. J.Fleurence.2016 In Seaweed in health and disease prevention. Academic Press.
- FLEURENCE J., LE COEUR C., MABEAU S., MAURICE M., et LANDREIN A., 1995. Comparison of different extractive procedures for proteins from the edible seaweeds *Ulva rigida* and *Ulva rotundata*. *Journal of applied phycology* 7 (6):577-582.
- FLEURENCE J., MORANÇAIS M., et DUMAY J. 2018. 9 - Seaweed proteins. In *Proteins in Food Processing (Second Edition)*, edited by R. Y. Yada: Woodhead Publishing, 245-262.
- FLEURENCE J., MORANÇAIS M., et DUMAY J. 2018. Seaweed proteins. In *Proteins in food processing*: Elsevier, 245-262.
- FLORETO E., HIRATA H., ANDO S., et YAMASAKI S., 1993. Fatty acid composition of *Ulva pertusa* Kjellman (Chlorophyta) and *Gracilaria incurvata* Okamura (Rhodophyta) in Japanese coastal waters. *Botanica Marina* 36 (3):217-222.

### G:

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- GALVÃO I., SUGIMOTO M. A., VAGO J. P., MACHADO M. G., et SOUSA L. P. 2018. Mediators of Inflammation. In *Immunopharmacology and Inflammation*, edited by C. Riccardi, F. Levi-Schaffer and E. Tiligada. Cham: Springer International Publishing, 3-32.
- GHEDIRA K., 2005. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie* 3 (4):162-169. Disponible sur le web: <https://doi.org/10.1007/s10298-005-0096-8>
- GHEDIRA K., 2005. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* 3 (4):162-169.
- GHIGNA M. R., et BALDEYROU P. 2019. Chapter 6 - Infectious and Inflammatory Pathologies. In *Normal and Pathological Bronchial Semiology*, edited by P. Baldeyrou, A. Hanna and A. Crutu: Academic Press, 75-81.
- GILFILLAN A. M., AUSTIN S. J., et METCALFE D. D., 2011. Mast cell biology: introduction and overview. *Advances in experimental medicine and biology* 716:2-12. Disponible sur le web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21713648>
- GUIRY M. D., et GUIRY G. M. 2020. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>: Ulvaceae JV Lamouroux ex Dumortier, 1822.
- H:**
- HAMDI Y., KADDOUR H., VAUDRY D., DOUIRI S., BAHDOUDI S., LEPRINCE J., CASTEL H., VAUDRY H., AMRI M., et TONON M.-C., 2012. The stimulatory effect of the octadecaneuropeptide ODN on astroglial antioxidant enzyme systems is mediated through a GPCR. *Frontiers in Endocrinology* 3:138.
- HAMDI-DAMARK Y., 2013. Contribution à l'étude des mécanismes moléculaires de la maladie d'Alzheimer: implication des endozépines dans la modulation des interactions neuro-astrocytaires, UNIVERSITE TUNIS EL MANAR FACULTE DES SCIENCES DE TUNIS. Doctorat en Sciences Biologiques
- HAMED I., ÖZOGUL F., ÖZOGUL Y., et REGENSTEIN J. M., 2015. Marine Bioactive Compounds and Their Health Benefits: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14 (4):446-465. Disponible sur le web: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1541-4337.12136>
- HARDOUIN K., BEDOUX G., BURLOT A.-S., DONNAY-MORENO C., BERGÉ J.-P., NYVALL-COLLÉN P., et BOURGOUGNON N., 2016. Enzyme-assisted extraction (EAE) for the production of antiviral and antioxidant extracts from the green seaweed *Ulva armoricana* (Ulvales, Ulvophyceae). *Algal Research* 16:233-239.
- HARYATFREHNI R., DEWI S. C., MEILIANDA A., RAHMAWATI S., et SARI I. Z. R., 2015. Preliminary study the potency of macroalgae in yogyakarta: extraction and analysis of algal pigments from common gunungkidul seaweeds. *Procedia Chemistry* 14:373-380.
- HAYDEN H., et WAALAND J., 2002. Phylogenetic systematics of the Ulvaceae (Ulvales, Ulvophyceae) using chloroplast and nuclear DNA sequences. *Journal of Phycology* 38:1200-1212.
- HE J., XU Y., CHEN H., et SUN P., 2016. Extraction, Structural Characterization, and Potential Antioxidant Activity of the Polysaccharides from Four Seaweeds.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- International journal of molecular sciences* 17 (12):1988. Disponible sur le web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27916796>
- HEIM K. E., TAGLIAFERRO A. R., et BOBILYA D. J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13 (10):572-584. Disponible sur le web: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286302002085>
- HEIMEUR N., IDRISSE HASSANI L., et AMINE SERGHINI M., 2004. Les polyphénols de *Pyrus mamorensis* (Rosaceae). *Reviews in biology and biotechnology* 3:37-42.
- HERBRETEAU F., COIFFARD L., DERRIEN A., et DE ROECK-HOLTZHAUER Y., 1997. The fatty acid composition of five species of macroalgae. *Botanica Marina* 40 (1):25-28.
- HERREROS-CHAVEZ L., CERVERA M., et MORALES-RUBIO A., 2019. Direct determination by portable ED-XRF of mineral profile in cocoa powder samples. *Food chemistry* 278:373-379.
- HYNSTOVA V., STERBOVA D., KLEJDUS B., HEDBAVNY J., HUSKA D., et ADAM V., 2018. Separation, identification and quantification of carotenoids and chlorophylls in dietary supplements containing *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* using High Performance Thin Layer Chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 148:108-118.
- K:**
- KAFLE B. P. 2020. Chapter 7 - Infrared (IR) spectroscopy. In *Chemical Analysis and Material Characterization by Spectrophotometry*, edited by B. P. Kafle: Elsevier, 199-243.
- KAZIR M., ABUHASSIRA Y., ROBIN A., NAHOR O., LUO J., ISRAEL A., GOLBERG A., et LIVNEY Y. D., 2019. Extraction of proteins from two marine macroalgae, *Ulva* sp. and *Gracilaria* sp., for food application, and evaluating digestibility, amino acid composition and antioxidant properties of the protein concentrates. *Food Hydrocolloids* 87:194-203. Disponible sur le web: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X18302716>
- KIDGELL J. T., MAGNUSSON M., DE NYS R., et GLASSON C. R. K., 2019. Ulvan: A systematic review of extraction, composition and function. *Algal Research* 39. Disponible sur le web: <https://hdl.handle.net/10289/12611>
- KIM J.-H., KIM S. A., EDWARDS M. S., et LEE I.-A., 2018. Anti-inflammatory Effects of Polyphenol Extracts from *Ulva linza* (Ulvophyceae, Chlorophyta). *Toxicology and Environmental Health Sciences* 10 (3):212-219.
- KIM M.-K., DUBACQ J.-P., THOMAS J.-C., et GIRAUD G., 1996. Seasonal variations of triacylglycerols and fatty acids in *Fucus serratus*. *Phytochemistry* 43 (1):49-55. Disponible sur le web: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031942296002439>
- KIM S.-K., PANGESTUTI R., et RAHMADI P. 2011. Chapter 5 - Sea Lettuces: Culinary Uses and Nutritional Value. In *Advances in Food and Nutrition Research*, edited by S.-K. Kim: Academic Press, 57-70.
- KLIMOV V. V., 2003. Discovery of pheophytin function in the photosynthetic energy conversion as the primary electron acceptor of Photosystem II. *Photosynthesis research* 76 (1-3):247-253.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- KOECHLIN-RAMONATXO C., 2006. Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme* 20 (4):165-177.
- KORNPROBST J. M. 2005. *Substances naturelles d'origine marine: chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologies*: Éditions Tec & Doc.
- KRAAN S. 2013. Pigments and minor compounds in algae, 205-251
- KUMAR H. D., et SINGH H. N. 1979. *Textbook on Algae*: Macmillan Education, Limited.

### L:

- LAHAYE M., et ROBIC A., 2007. Structure and Functional Properties of Ulvan, a Polysaccharide from Green Seaweeds. *Biomacromolecules* 8 (6):1765-1774.  
Disponible sur le web: <https://doi.org/10.1021/bm061185q>
- LANFER-MARQUEZ U. M., BARROS R. M., et SINNECKER P., 2005. Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Research International* 38 (8-9):885-891.
- LELIAERT F. W. E., DE CLERCK O. W. E., COPPEJANS E. U., et RICHMOND M. D. E. 2011. Marine macroalgae ; seaweeds. In *Field guide to the seashores of Eastern Africa and the Western Indian Ocean islands*, edited by M. D. Richmond. Stockholm: Swedish International Development Co-operation (SIDA), 80 - 105.
- LI-CHAN E. C. Y., et LACROIX I. M. E. 2018. 1 - Properties of proteins in food systems: An introduction. In *Proteins in Food Processing (Second Edition)*, edited by R. Y. Yada: Woodhead Publishing, 1-25.
- LICHTENTHALER H. K., 1987. [34] Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology* 148:350-382.
- LUO M. B., et LIU F., 2011. Salinity-induced oxidative stress and regulation of antioxidant defense system in the marine macroalga *Ulva prolifera*. *Journal of experimental marine biology and ecology* 409 (1-2):223-228.

### M:

- MACHEIX J.-J., FLEURIET A., et JAY-ALLEMAND C. 2005. *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*: PPUR presses polytechniques.
- MAJI B. 2019. 1 - Introduction to natural polysaccharides. In *Functional Polysaccharides for Biomedical Applications*, edited by S. Maiti and S. Jana: Woodhead Publishing, 1-31.
- MARFAK A., 2003. Radiolyse gamma des flavonoïdes, Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides. *Université de LIMOGES*.
- MARTINEZ-CAYUELA M., 1995. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie* 77 (3):147-161.
- MEZDOUR H., et MENAD A. 2018.[En ligne] Potentiel antioxydant des algues des côtes de l'est Algérien. *Thèse de doctorat Université des Frères Mentouri Constantine I*.
- MEZDOUR H., MENAD A., ABDEFETTAH G., ALGABR M., et SOUAD A., 2017. IMMUNOMODULATORY AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF ALGERIAN ULVA LACTUCA. *World Journal of Pharmaceutical Research* 6:72-95.
- MIŠURCOVÁ L., MACHŮ L., et ORSAVOVÁ J. 2011. Chapter 29 - Seaweed Minerals as Nutraceuticals. In *Advances in Food and Nutrition Research*, edited by S.-K. Kim: Academic Press, 371-390.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

MOLYNEUX P., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol* 26 (2):211-219.

### N:

NASELLI-FLORES L., et BARONE R. 2009. Green Algae. In *Encyclopedia of Inland Waters*, edited by G. E. Likens. Oxford: Academic Press, 166-173.

NOACK M., et KOLOPP-SARDA M. N., 2018. Cytokines et inflammation : physiologie, physiopathologie et utilisation thérapeutique. *Revue Francophone des Laboratoires* 2018:28-37.

### O:

O'KELLY C. J., et FLOYD G. L., 1983. The flagellar apparatus of entocladia viridis motile cells and the taxonomic position of the resurrected family ulvellaceae ulvales chlorophyta. *Journal of Phycology* 19 (2):153-164. Disponible sur le web: <https://eurekamag.com/research/006/678/006678157.php>

OLAJIDE O. A., et SARKER S. D. 2020. Anti-inflammatory natural products. In *Annual Reports in Medicinal Chemistry*: Academic Press.

OLASEHINDE T. A., MABINYA L. V., OLANIRAN A. O., et OKOH A. I., 2019. Chemical characterization of sulfated polysaccharides from *Gracilaria gracilis* and *Ulva lactuca* and their radical scavenging, metal chelating, and cholinesterase inhibitory activities. *International Journal of Food Properties* 22 (1):100-110. Disponible sur le web: <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1573831>

ORBAN J.-C. 2011. Oxygène, stress oxydant. In *Désordres métaboliques et réanimation*: Springer, 427-437.

OUCIF H., BENAÏSSA M., ALI MEHIDI S., PREGO R., AUBOURG S. P., et ABI-AYAD S.-M. E.-A., 2020. Chemical Composition and Nutritional Value of Different Seaweeds from the West Algerian Coast. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 29 (1):90-104. Disponible sur le web: <https://doi.org/10.1080/10498850.2019.1695305>

### P:

PADAM B. S., et CHYE F. Y. 2020. Chapter 2 - Seaweed components, properties, and applications. In *Sustainable Seaweed Technologies*, edited by M. D. Torres, S. Kraan and H. Dominguez: Elsevier, 33-87.

PASSERIEUX E., HAYOT M., JAUSSENT A., CARNAC G., GOUZI F., PILLARD F., PICOT M.-C., BÖCKER K., HUGON G., et PINCEMAIL J., 2015. Effects of vitamin C, vitamin E, zinc gluconate, and selenomethionine supplementation on muscle function and oxidative stress biomarkers in patients with facioscapulohumeral dystrophy: a double-blind randomized controlled clinical trial. *Free Radical Biology and Medicine* 81:158-169.

PEASURA N., LAOHAKUNJIT N., KERDCHOECHUEN O., et WANLAPA S., 2015. Characteristics and antioxidant of *Ulva intestinalis* sulphated polysaccharides

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- extracted with different solvents. *International journal of biological macromolecules* 81:912-919.
- PEÑA-RODRÍGUEZ A., MAWHINNEY T. P., RICQUE-MARIE D., et CRUZ-SUÁREZ L. E., 2011. Chemical composition of cultivated seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh. *Food chemistry* 129 (2):491-498.
- PENG Y., HU J., YANG B., LIN X.-P., ZHOU X.-F., YANG X.-W., et LIU Y. 2015. Chapter 5 - Chemical composition of seaweeds. In *Seaweed Sustainability*, edited by B. K. Tiwari and D. J. Troy. San Diego: Academic Press, 79-124.
- PERONNY S. 2005.[En ligne] La perception gustative et la consommation des tannins chez le maki (*Lemur catta*).
- PHILP K. 2018. Polysaccharide Ingredients. In *Reference Module in Food Science*: Elsevier.

### R:

- RAGHAVENDRA G. M., VARAPRASAD K., et JAYARAMUDU T. 2015. Chapter 2 - Biomaterials: Design, Development and Biomedical Applications. In *Nanotechnology Applications for Tissue Engineering*, edited by S. Thomas, Y. Grohens and N. Ninan. Oxford: William Andrew Publishing, 21-44.
- RAJAURIA G., FOLEY B., et ABU-GHANNAM N., 2017. Characterization of dietary fucoxanthin from *Himantalia elongata* brown seaweed. *Food Research International* 99:995-1001.
- RAMAMOORTHY S., et CIDLOWSKI J. A., 2016. Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheumatic diseases clinics of North America* 42 (1):15-vii. Disponible sur le web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26611548>
- RATANA-ARPORN P., et CHIRAPART A., 2006. Nutritional Evaluation of Tropical Green Seaweeds *Caulerpa lentillifera* and *Ulva reticulata*. *Kasetsart Journal - Natural Science* 40.
- RAY B., et LAHAYE M., 1995. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (ulvales, chlorophyta). Extraction and chemical composition. *Carbohydrate Research* 274:251-261. Disponible sur le web: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000862159500138J>
- RINDI F., SOLER-VILA A., et GUIRY M. D. 2012. Taxonomy of Marine Macroalgae Used as Sources of Bioactive Compounds. In *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications*, edited by M. Hayes. Boston, MA: Springer US, 1-53.
- ROBIC A., GAILLARD C., SASSI J.-F., LERAT Y., et LAHAYE M., 2009. Ultrastructure of ulvan: A polysaccharide from green seaweeds. *Biopolymers* 91 (8):652-664. Disponible sur le web: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bip.21195>
- ROBIC A., RONDEAU-MOURO C., SASSI J.-F., LERAT Y., et LAHAYE M., 2009. Structure and interactions of ulvan in the cell wall of the marine green algae *Ulva rotundata* (Ulvales, Chlorophyceae). *Carbohydrate polymers* 77 (2):206-216.
- ROLAND J. C., BOUTEAU H. E. M., et BOUTEAU F. 2008. *Atlas de biologie végétale - Tome 1 - 7ème édition*: Dunod.
- ROWAN K. S. 1989. *Photosynthetic pigments of algae*: CUP Archive.

### S:

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- SADI H. 2010.[En ligne] Pouvoir antioxydant de quelques algues marines, Université de Béjaia-Abderrahmane Mira.
- SAKTHIVEL R., et KASI P. D. 2019. Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer potential of natural bioactive compounds from seaweeds, 113-160.
- SÁNCHEZ-MORENO C., 2002. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food science and technology international* 8 (3):121-137.
- SARI-CHMAYSEM N., TAHA S., MAWLAWI H., GUÉGAN J.-P., JEFTIĆ J., et BENVENU T., 2019. Extracted ulvans from green algae *Ulva linza* of Lebanese origin and amphiphilic derivatives: evaluation of their physico-chemical and rheological properties. *Journal of Applied Phycology* 31 (3):1931-1946. Disponible sur le web: <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1668-y>
- SARINI A., AISHAH H., et ZAINI N. M. 2014. Determination of antioxidant activity for seven types of macroalgae. Paper read at International Conference on Food Engineering and Biotechnology.
- SARNI-MANCHADO P., et CHEYNIER V. 2006. *Les polyphénols en agroalimentaire*: Éditions Tec & Doc.
- SATPATI G. G., et PAL R. 2011. Biochemical composition and lipid characterization of marine green alga *Ulva rigida*- a nutritional approach.
- SCHWEIKERT K., et BURRITT D. J., 2012. The organophosphate insecticide Coumaphos induces oxidative stress and increases antioxidant and detoxification defences in the green macroalgae *Ulva pertusa*. *Aquatic Toxicology* 122:86-92.
- SHARMA P., JHA A. B., DUBEY R. S., et PESSARAKLI M., 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany* 2012.
- SHUULUKA D., BOLTON J. J., et ANDERSON R. J., 2013. Protein content, amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors of *Ulva rigida* and *Ulva capensis* from natural populations and *Ulva lactuca* from an aquaculture system, in South Africa. *Journal of Applied Phycology* 25 (2):677-685. Disponible sur le web: <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9902-5>
- SINGH P., SINGH I. N., MONDAL S. C., SINGH L., et GARG V. K., 2013. Platelet-activating factor (PAF)-antagonists of natural origin. *Fitoterapia* 84:180-201. Disponible sur le web: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X1200295X>
- SMIT A. J., 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. *Journal of applied phycology* 16 (4):245-262.
- STEVENS C. D. 2009. *Clinical Immunology and Serology: A Laboratory Perspective*: F.A. Davis.
- SYRPAS M., et VENSKUTONIS P. R. 2020. Chapter 6 - Algae for the production of bio-based products. In *Biobased Products and Industries*, edited by C. M. Galanakis: Elsevier, 203-243.

### T:

- TABARSA M., REZAEI M., RAMEZANPOUR Z., et WAALAND J. R., 2012. Chemical compositions of the marine algae *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta) and *Ulva lactuca*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- (Chlorophyta) as a potential food source. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92 (12):2500-2506.
- TEIXEIRA E., ARRUDA F., SANTIAGO DO NASCIMENTO K., CARNEIRO V., NAGANO C., DA SILVA B., SAMPAIO A., et CAVADA B., 2012. Biological Applications of Plants and Algae Lectins: An Overview. *Comprehensive Studies On Glycobiology and Glycotechnology; Chuan-Fa Chang*:533-558.
- TIWARI A., KIRAN T., et PANDEY A. 2019. Chapter 14 - Algal cultivation for biofuel production. In *Second and Third Generation of Feedstocks*, edited by A. Basile and F. Dalena: Elsevier, 383-403.
- TOSKAS G., HUND R.-D., LAOURINE E., CHERIF C., SMYRNIOTOPOULOS V., et ROUSSIS V., 2011. Nanofibers based on polysaccharides from the green seaweed *Ulva Rigida*. *Carbohydrate Polymers* 84 (3):1093-1102. Disponible sur le web: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861711000063>
- TRIGUI M., GASMI L., ZOUARI I., et TOUNSI S., 2013. Seasonal variation in phenolic composition, antibacterial and antioxidant activities of *Ulva rigida* (Chlorophyta) and assessment of antiacetylcholinesterase potential. *Journal of Applied Phycology* 25 (1):319-328. Disponible sur le web: <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9866-5>

### U:

- USOV A. I., et ZELINSKY N. D. 2013. 2 - Chemical structures of algal polysaccharides. In *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*, edited by H. Domínguez: Woodhead Publishing, 23-86.

### V:

- VALKO M., IZAKOVIC M., MAZUR M., RHODES C. J., et TELSER J., 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and cellular biochemistry* 266 (1-2):37-56.
- VALKO M., LEIBFRITZ D., MONCOL J., CRONIN M. T., MAZUR M., et TELSER J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39 (1):44-84.
- VANDERLEI E. S. O., PATOILLO K. K. N. R., LIMA N. A., LIMA A. P. S., RODRIGUES J. A. G., SILVA L. M. C. M., LIMA M. E. P., LIMA V., et BENEVIDES N. M. B., 2010. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. *International immunopharmacology* 10 (9):1113-1118.

### W:

- WAHLE K. W., GOUA M., D'URSO S., et HEYS S., 2008. Conjugated linoleic acid effects on body composition and clinical biomarkers of disease in animals and man: Metabolic and cell mechanisms. *Trans Fatty Acids*.
- WAHLSTRÖM N., NYLANDER F., MALMHÄLL-BAH E., SJÖVOLD K., EDLUND U., WESTMAN G., et ALBERS E., 2020. Composition and structure of cell wall ulvans recovered from *Ulva* spp. along the Swedish west coast. *Carbohydrate Polymers* 233:115852. Disponible sur le web: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861720300266>

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- WALLACE J. L., 2013. Mechanisms, prevention and clinical implications of nonsteroidal anti-inflammatory drug-enteropathy. *World journal of gastroenterology* 19 (12):1861-1876. Disponible sur le web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23569332>
- WANG H., NG T. B., et OOI V. E. C., 1998. Lectins from mushrooms. *Mycological Research* 102 (8):897-906. Disponible sur le web: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0953756208609661>
- WATANABE F., TAKENAKA S., KITAKA-KATSURA H., EBARA S., et MIYAMOTO E., 2002. Characterization and Bioavailability of vitamin B<sub>12</sub>-Compounds from Edible Algae. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 48 (5):325-331.
- WIJESEKARA I., et KARUNARATHNA W. K. D. S. 2017. Chapter 18 - Usage of Seaweed Polysaccharides as Nutraceuticals. In *Seaweed Polysaccharides*, edited by J. Venkatesan, S. Anil and S.-K. Kim: Elsevier, 341-348.
- WIJESEKARA I., LANG M., MARTY C., GEMIN M.-P., BOULHO R., DOUZENEL P., WICKRAMASINGHE I., BEDOUX G., et BOURGOUGNON N., 2017. Different extraction procedures and analysis of protein from *Ulva* sp. in Brittany, France. *Journal of applied phycology* 29 (5):2503-2511.
- WILLCOX J. K., ASH S. L., et CATIGNANI G. L., 2004. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical reviews in food science and nutrition* 44 (4):275-295.
- WOLF M. A., SCIUTO K., ANDREOLI C., et MORO I., 2012. *Ulva* (Chlorophyta, Ulvales) Biodiversity in the North Adriatic Sea (Mediterranean, Italy): Cryptic Species and New Introductions. *Journal of Phycology* 48 (6):1510-1521. Disponible sur le web: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jpy.12005>

### Y:

- YAICH H., AMIRA A. B., ABBES F., BOUAZIZ M., BESBES S., RICHEL A., BLECKER C., ATTIA H., et GARNA H., 2017. Effect of extraction procedures on structural, thermal and antioxidant properties of ulvan from *Ulva lactuca* collected in Monastir coast. *International Journal of Biological Macromolecules* 105:1430-1439. Disponible sur le web: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813017320032>
- YAICH H., GARNA H., BCHIR B., BESBES S., PAQUOT M., RICHEL A., BLECKER C., et ATTIA H., 2015. Chemical composition and functional properties of dietary fibre extracted by Englyst and Prosky methods from the alga *Ulva lactuca* collected in Tunisia. *Algal Research* 9:65-73. Disponible sur le web: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926415000430>
- YAICH H., GARNA H., BESBES S., PAQUOT M., BLECKER C., et ATTIA H., 2011. Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. *Food chemistry* 128 (4):895-901. Disponible sur le web: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611005152>
- YANG J. J., MA Y. F., YIN Y., et SHEN S. D., 2019. Antioxidative defense response of *Ulva* prolifera under high or low-temperature stimulus. *Algal Research* 44:101703.

### Z:

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

ZUBIA M., ROBLEDO D., et FREILE-PELEGRIN Y., 2007. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of applied phycology* 19 (5):449-458.

ZARROUK F (2012). Les statistiques inferentielles (test T). [en ligne]. Issep ksar-said. [Consulté le 20/09/2020]. Disponible sur le web : [http://www.issepks.rnu.tn/fileadmin/templates/Fcad/Test\\_\\_de\\_Student.pdf](http://www.issepks.rnu.tn/fileadmin/templates/Fcad/Test__de_Student.pdf).

# ANNEXES

## ANNEXE 1 : Matériel et réactifs utilisés

### Appareillage

- Balance de précision
- Centrifugeuse
- Etuve
- Spectrophotomètre UV-visible
- Microscope optique
- Dessiccateur
- Four à moufle
- Spectroscopie fluorescence à rayon X : appareil XRF Niton® XL3t
- Extracteur de Soxhlet
- Cartouche de cellulose
- Rota vapeur
- Mortier
- Papier filtre
- Burette
- Pipette
- Micropipette
- Flacon hermétique brun
- Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)
- Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)
- Plaques de microtitration à fond plat à 96 puits
- Lecteur automatique de microplaque

### Réactifs

- Ether de Pétrole
- Ether éthylique
- BSA à 1% (0,1mg de BSA dans 10mg d'eau physiologique)
- Hydroxyde de sodium NaOH
- Réactif de Biuret
- Acide sulfurique
- Phénol
- Ethanol absolu
- Dichlorométhane
- Gel de silice
- Acétone 100%
- Oxyde de deutérium (D<sub>2</sub>O)
- Acétate d'éthyle
- Carbonate de sodium Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- Réactif de Folin
- Xylène à 96%
- DPPH (2,2-diphényl-1-picrilhydrazyl).

- Acide ascorbique
- Eau physiologique

**ANNEXE 2 : Photos des différents procédés**



Figure (A2) 1: Creusets contenant l'algue calcinée après passage dans le four à moufle à 600°C



Figure (A2) 2: Dosage des sucres totaux par la méthode de Dubois

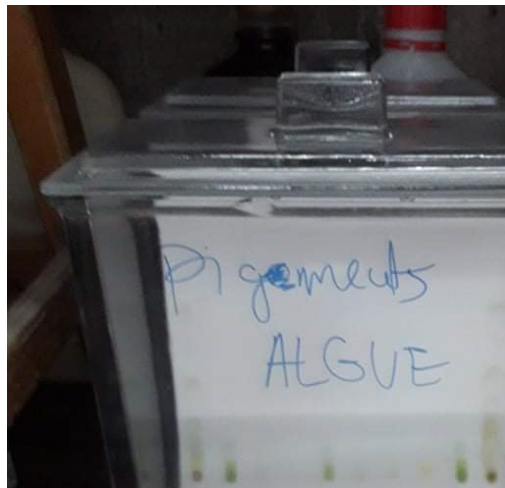


Figure (A2) 3: Migration des pigments

## ANNEXES

---



Figure (A2) 4: Précipitation des polysaccharides à l'éthanol absolu



Figure (A2) 5: Polysaccharides séchés et broyage

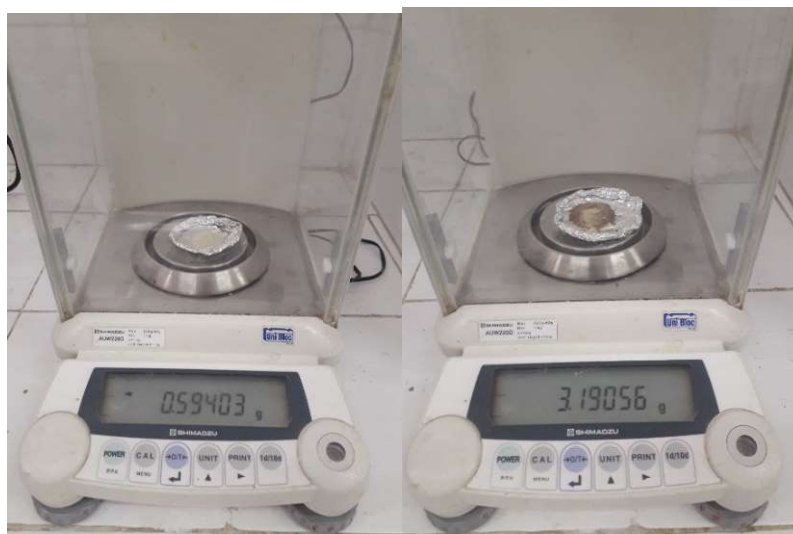


Figure (A2) 6: Pesée de la poudre des polysaccharides (protocole 1 et 2)



Figure (A2) 7: Etape de l'extraction des polyphénols (Macération dans l'acétate d'éthyle/eau, Filtration sous vide)

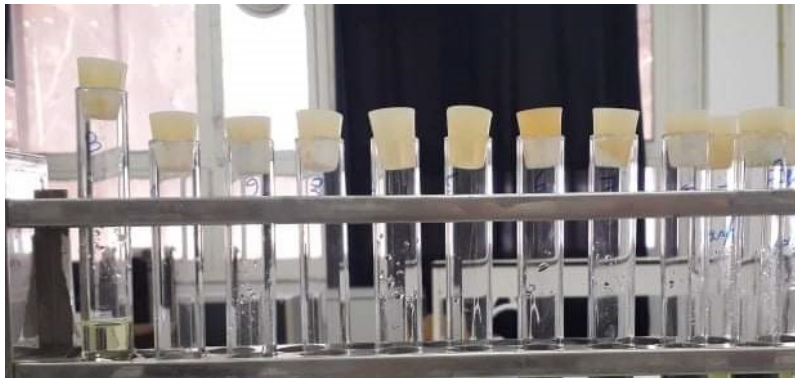


Figure (A2) 8: Dosage des polyphénols par la méthode de Folin



Figure (A2) 9: Lot de 10 souris BLBC mâles ( $20 \pm 2$  g)

Figure (A2) 10 : Souris traitées à l'extrait polyphénols

**ANNEXE 3 : Détail du Test statistique t**

Tableau (A3) 1 : Les différences de poids (mg) entre l'oreille traitée et l'oreille non traitée des souris du T+, T-, Polysaccharides sulfatés, Polyphénols et Placébo

	<b>T+</b>	<b>T-</b>	<b>Polysaccharides sulfatés</b>	<b>Polyphénols</b>	<b>Placébo</b>
<b>Différences entre l'oreille traitée et l'oreille non traitée des souris (mg)</b>	0,02	1,01	0,21	0,59	1,09
	0,3	2,37	0,23	0,42	0,98
	0,38	1,55	0,15	0,24	0,89
	0,39	0,88	0,14	0,7	0,71
	0,42	0,94	0,49	0,41	0,59
	0,03	1,11	0,31	0,3	1,33
	0,26	3,33	0,12	0,53	0,97
	0,12	1,11	0,45	0,59	0,97
	0,18	0,64	0,1	0,39	0,92
	0,27	1,63	0,19	0,11	8

## RÉSUMÉ

Le nombre d'études sur les biomolécules issues des algues vertes de la famille des ulvacées des côtes algériennes reste très restreint. Le présent travail vise dans un premier temps à déterminer la composition chimique globale de *Ulva sp* et dans une seconde étape à examiner le potentiel biologique des fractions (polysaccharides, polyphénols et pigments) extraites de cette espèce collectée aux niveaux de plages de la wilaya de Tipaza (Anse de KOUALI et SIDI GHILES). Ces fractions sont évaluées en testant l'activité anti-oxydante *in vitro*, l'activité anti-inflammatoire *in vivo* induite par le xylène à 96%.

La détermination de la composition chimique proximale de *Ulva sp* est une bonne source naturelle de glucides (49.59%), de minéraux (19,95%), de protéines (11.83%), et contient un faible taux de lipides. L'analyse de la fraction minérale par spectroscopie fluorescence à rayon X (XRF) a révélé la présence de taux élevés de soufre suivi dans l'ordre décroissant de la concentration de potassium, de magnésium, de calcium et de phosphore et parmi les micro-minéraux, les plus abondants sont le molybdène, le fer, l'aluminium, le zinc, le strontium, le titane, le cuivre, le rubidium et le vanadium. Il a été constaté que *Ulva sp* contenait des niveaux élevés en polysaccharides (20%), des teneurs appréciables en polyphénols (25,39 µg Eq/mg) et en pigments chlorophylliens. Ces derniers sont, dans l'ordre décroissant, la chlorophylle a, la chlorophylle b, les xanthophylles et les carotènes. L'analyse par FTIR de la fraction glucidique a montré la présence de groupements sulfatés. Ces derniers seraient à l'origine de l'activité anti-inflammatoire. En effet, les polysaccharides sulfatés possèdent un potentiel d'inhibition très significative ( $P < 0.01$ ) de l'œdème qui est de 83.59%.

De même, L'extrait EtOAc (polyphénols) présente un pouvoir inhibiteur très significatif de l'œdème ( $p < 0.01$ ) qui est de l'ordre de 70.62%.

Par ailleurs, L'évaluation de l'activité anti-radicalaire et du pouvoir réducteur de ces phytoconstituants ont révélé que la meilleure activité anti-oxydante est celle des composés polyphénoliques avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre (88,88%) et une IC<sub>50</sub> de 7.73 mg/ml., suivie de celle des pigments xanthophylles (70.73%). Ces premiers résultats sont encourageants et font de l'Ulva des côtes algériennes une source inestimable en divers composés naturels à pouvoir antioxydant et anti-inflammatoire très intéressants.

Mots clés : *Ulva*, composition chimique globale, phytoconstituants (pigments, polyphénols et polysaccharides), activité anti-inflammatoire *in vivo*, activité anti-oxydante *in vitro*

## ABSTRACT

The number of studies on biomolecules from green algae of the Ulvaceae family from the Algerian coast remain very limited. This work aims firstly at determining the overall chemical composition of the *Ulva* sp and in a second step, at examining the biological potential of the fractions (polysaccharides, polyphenols and pigments) extracted from this species collected on beaches in Tipaza (ANSE DE KOUALI and SIDI GHILES). These fractions are evaluated by testing the *in vitro* antioxidant activity as well as the *in vivo* anti-inflammatory activity induced by xylene at 96%. The determination of the proximal chemical composition of the *Ulva* sp shows that it is a good and natural source of carbohydrates (49.59%), minerals (19.95%), proteins (11.83%), and contains a low level of lipids. The analysis of the mineral fraction by X-ray fluorescence spectroscopy (XRF) revealed high levels of sulphur followed, in descending order par : potassium, magnesium, calcium and phosphorus and among microminerals, the most abundant being molybdenum, iron, aluminum, zinc, strontium, titanium, copper, rubidium and vanadium. It was found that the *Ulva* sp contains high levels of polysaccharides (20%), significant levels of polyphenols (25.39 µgEq/mg) and chlorophyll pigments. The previous ones are in descending order: the chlorophyll a, chlorophyll b, xanthophylls and carotenes. FTIR analysis of the carbohydrate fraction showed the presence of sulphate groups. They are believed to be the cause of the anti-inflammatory activity. Indeed, sulfated polysaccharides have a very significant inhibition potential ( $P < 0.01$ ) of edema of 83.59%. Similarly, the extract EtOAc (polyphenols) has a very significant inhibitory power of edema ( $p < 0.01$ ) which represents 70.62%. Furthermore, the evaluation of the anti-radical activity and the reducing power of these phyto-constituents revealed that the best antioxidant activity is that of polyphenolic compounds with an inhibition percentage of order of 88.88% as well as an IC<sub>50</sub> of 7.73 mg/ml, followed by xanthophyll pigments (70.73%). These first results are encouraging and make the *Ulva* sp of The Algerian coast an invaluable source for various natural compounds with a very interesting antioxidant and anti-inflammatory power.

Keywords: *Ulva*, global chemical composition, phytoconstituents (pigments, polyphenols and polysaccharides), anti-inflammatory activity *in vivo*, antioxidant activity *in vitro*

## الملخص

لا يزال عدد الدراسات حول الجزيئات الحيوية المأخوذة من الطحالب البحرية الخضراء لعائلة Ulvaceae من الساحل الجزائري محدودة جداً. يهدف العمل الحالي إلى تحديد التركيب الكيميائي العام لـ *Ulva sp* أولاً، ثم من بعد ذلك فحص الإمكانيات البيولوجية للمستخلصات (متعدد السكريات ومتعدد البوليفينول والأصبغ) المستخرجة من هذا النوع من الطحالب والتي تم جمعها على مستوى شاطئين في ولاية تيبازة (أنس دي كوالي وسيدي غيلاس). يتم تقييم هذه المستخلصات عن طريق اختبار نشاط مضادات الأكسدة في

في المختبر، والنشاط المضاد للالتهابات الناجم عن 96% Xylène. مكنا التركيب الكيميائي العام لـ *Ulva sp* استنتاج انها تمثل مصدر جيد للكربوهيدرات الطبيعية (49.59%)، المعادن (19.95%)، والبروتينات (11.83%)، كما أنها تحتوي على نسبة منخفضة من الدهون. تحليل التكوين المعدني بواسطة مطيافية الأشعة السينية (XRF) أفصح عن وجود مستويات مرتفعة من الكبريت متنوعة بالبوتاسيوم ومن ثم المغنيسيوم بعده الكالسيوم والفوسفور ومنبين المعادن الزهيدة الأكثر وفرة هو الموليبيدوم والحديد والألمنيوم والزنك والسترونتيوم، التيتانيوم والنحاس والروبيديوم والفناديوم.

أظهرت النتائج أن *Ulva sp* تحتوي على مستويات عالية من السكريات (20%)، ومستويات محترمة من متعدد البوليفينول (25.39 ميكروغرام/مغ) وأصبغ كلوروفيلية. هذه الأخيرة ظهرت على الترتيب كما يلي الكلوروفيل أ، الكلوروفيل ب، الزانثوفيلوكاروتينات.

تحليل FTIR الخاص بجزء الكربوهيدرات أظهر وجود مجموعات كبريتية. التي تعد أصل النشاط المضاد للالتهاب.

في الواقع، تحتوي السكريات الكبريتية على قدرة تثبيط الوذمة ذات دلالة إحصائية (83.59%) ( $P < 0.01$ ) وبالمثل، فإن مستخلص (EtOAc متعدد بوليفينول) له قوة تثبيط وذمة كبيرة للغاية وهي حوالي 70.62% ( $P < 0.01$ ). بالإضافة إلى ذلك، فإن تقييم النشاط المضاد للجذور الحرة والقوة الرجعية لهذه المكونات النباتية أظهر أن المكون أفضل نشاطاً مضاداً للأكسدة هو متعدد بوليفينول وهذا بنسبة تثبيط تقدر ب 88.88% و  $IC_{50}$  قدرت ب 7.73 مغ/مل، يليه صبغة الزانثوفيل (70.73%).

هذه النتائج الأولى مشجعة وتجعل من هذا الطحلب المتواجد في الساحل الجزائري مصدرًا لا يقدر بثمن في مختلف المركبات الطبيعية مع قوة مضادة للأكسدة ومضادات للالتهاب مثير للإعجاب.