

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE & POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR & DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DJILLALI LIABES
FACULTE DES SCIENCES
DE LA NATURE ET DE LA VIE
SIDI BEL ABBES

THESE DE DOCTORAT DE TROISIEME CYCLE

Présentée par :

M^{me} KHERRAF Asmà épouse El Ghazi

Spécialité :

Sciences biologiques

Option :

Immunochimie alimentaire et santé

Intitulé

***Caractérisation physicochimique et évaluation du
potentiel antioxydant, antimicrobien et anti-
inflammatoire de la microalgue Nannochloropsis
gaditana***

Soutenue en : 18-04-2018

Devant le jury composé de :

Président :

Pr ABOUNI Bouziane

UDL-Sidi Bel-Abbès

Examineurs :

Pr RIAZI Ali

Université de Mostaganem

Pr DEMMOUCHE Abbassia

UDL-Sidi Bel-Abbès

Dr MENADI Noredine

UDL-Sidi Bel-Abbès

Rapporteur :

Pr BENALI Mohammed

UDL-Sidi Bel-Abbès

A la mémoire de mon grand père,
A mes enfants, Mohamed et Younes.

Remerciements

Mes remerciements vont tout premièrement, à Allah le tout puissant de m'avoir donné le courage, la patience et la force durant toutes ces années d'études.

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement mon directeur de thèse le **Pr BENALI Mohammed**, au département de Biologie, Faculté SNV-UDL de Sidi Bel Abbès, pour m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail. Je suis reconnaissante pour la confiance et le soutien permanent qu'il m'a témoignés au cours de ce travail ainsi que pour la grande autonomie qu'il m'a accordé.

J'exprime ma vive reconnaissance au **Pr ABBOUNI Bouziane** du département de Biologie, faculté SNV-UDL de Sidi Bel-Abbés de me faire l'honneur de présider ce jury.

De même, je remercie très sincèrement le **Pr RIAZI Ali** du département de biologie de l'Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, pour avoir accepté d'examiner ce travail. Je tiens à lui exprimer ma sincère reconnaissance et mon plus profond respect.

Je remercie **Pr DEMMOUCHE Abbassia**, du département de biologie de la faculté SNV-UDL de Sidi Bel-Abbes pour avoir accepté avec enthousiasme de nous faire partager ses impressions avisées concernant ce travail.

Je suis très sensible à l'intérêt qu'a manifesté le **Dr MENADI Noredine** du département de biologie de la faculté SNV-UDL de Sidi Bel-Abbes, à l'égard de ce travail et je le remercie pour sa disponibilité.

Je voudrais aussi remercier tous mes enseignants qui m'ont aidé de près ou de loin particulièrement le Dr ZAÏRI et le Dr BENABDERRAHMANE du département de biologie.

Un grand merci à l'ingénieur du laboratoire de biochimie appliquée, également à mes copines Ibticem, Wafaa et Wahiba, qui m'ont beaucoup aidé au cours de ma thèse de doctorat. Merci pour tous les moments passés ensemble, merci pour votre gentillesse et vos encouragements.

Et je laisse le meilleur pour la fin

Enfin, j'adresse toute mon affection à ma famille et en particulier à mon père, mon exemple, merci pour tout, merci pour ta gentillesse ta simplicité, ton soutien et ton savoir.

Ma mère, mon trésor précieux, merci pour ton aide, ta présence et tes encouragements qui sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais.

Que le tout puissant vous accorde une longue vie papa, maman....

Je remercie mon cher époux pour son soutien quotidien indéfectible et son enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme de la vie en général. Notre couple a grandi en même temps que mon projet scientifique, le premier servant de socle solide à l'épanouissement du second. A ma belle famille toujours aussi chaleureuse avec moi.

Mes très chers frères, merci de m'avoir supporté durant toute cette période de thèse.

Résumé :

Cette étude a pour l'objectif de déterminer la teneur en métabolites primaires et secondaires de la microalgue *Nannochloropsis gaditana* et d'évaluer l'activité antioxydante, antimicrobienne, ainsi que le potentiel anti-inflammatoire des extraits ethanologique (EENg) et méthanolique (EMNg). Le profil nutritionnel par rapport à la matière sèche montre une richesse en protéines ($13.38 \pm 0.26\%$), en lipides ($7 \pm 1\%$) et en sucres ($7.13 \pm 0.23\%$). L'humidité et les minéraux constituent respectivement $9.33 \pm 1.15\%$ et $6.4 \pm 0.23\%$. L'estimation quantitative des métabolites secondaires a montré que les EENg et EMNg sont riches en ces composés avec des proportions respectivement de 41.53 ± 0.42 et 38.74 ± 0.33 mg EAG/g PS pour les polyphénols ; 19.82 ± 1.66 et 18.61 ± 1.45 EQ/g PS pour les flavonoïdes et 0.35 ± 0.05 et 0.50 ± 0.08 mg acide tannique/g PS pour les tanins. Le pourcentage d'inhibition par le test DPPH est de $22.37 \pm 3.5\%$ et $12.27 \pm 1.4\%$ pour EENg et EMNg respectivement avec des extraits à la concentration de 0.5 mg/ml. Les pouvoirs réducteurs de EENg, EMNg et de l'acide ascorbique déterminés par la méthode FRAP sont exprimés en densité optique et sont respectivement de 0.031 ± 0.023 ; 0.029 ± 0.009 et de 0.439 ± 0.035 unités de densité optique (DO) à la concentration de 0.15 mg/ml. Ces valeurs deviennent aussi respectivement de 0.349 ± 0.037 ; 0.414 ± 0.012 et 1.15 ± 0.07 D à la concentration de 5 mg/ml.

Les résultats de l'activité antimicrobienne des EENg et EMNg sur sept souches bactériennes et une souche de levure mettent en évidence une forte inhibition surtout des bactéries Gram+ avec un diamètre qui varie de 8.5 ± 0.7 à 20.5 ± 0.7 mm. En revanche, ils ont une activité modérée vis-à-vis les bactéries Gram- et aucun effet sur La levure *Candida albicans*. L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vivo de EENg montre une inhibition de l'œdème de la patte induit par la carragénine chez les rats Wistar avec un taux moyen de 70.53 %. De plus on note une augmentation de l'albumine sérique, une diminution de la C-réactive protéine (CRP) par rapport à l'état initial ainsi qu'une diminution remarquable des leucocytes et des plaquettes par rapport au lot traité avec du NaCl 0,9%. En définitive, la microalgue *Nannochloropsis gaditana* peut être recommandée pour ses vertus nutritionnelles et thérapeutiques importantes.

Mots clés : *Nannochloropsis gaditana*, métabolites secondaires, activité antioxydante, antimicrobienne, anti-inflammatoire rat Wistar.

Absract

The objective of this study is to determine the primary and secondary metabolite content of the microalgae *Nannochloropsis gaditana* and to evaluate the antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory potential of ethanolic (EENg) and methanolic (EMNg) extracts. The nutritional profile in relation to the dry matter showed a high protein content ($13.38 \pm 0.26\%$), lipids ($7 \pm 1\%$) and sugars ($7.13 \pm 0.23\%$). Moisture and minerals were respectively $9.33 \pm 1.15\%$ and $6.4 \pm 0.23\%$. Quantitative estimation of secondary metabolites showed that EENg and EMNg were rich in these compounds with proportions of 41.53 ± 0.42 and 38.74 ± 0.33 mg EAG/g PS respectively for polyphenols; 19.82 ± 1.66 and 18.61 ± 1.45 EQ/g PS for flavonoids and 0.35 ± 0.05 and 0.50 ± 0.08 mg tannic acid/g PS for tannins. The percentage of inhibition by the DPPH test was $22.37 \pm 3.5\%$ and $12.27 \pm 1.4\%$ for EENg and EMNg respectively with extracts at the concentration of 0.5 mg/ml. The reducing powers of EENg, EMNg and ascorbic acid determined by the FRAP method were expressed in optical density and were respectively 0.031 ± 0.023 ; 0.029 ± 0.009 and 0.439 ± 0.035 optical density units (OD) at a concentration of 0.15 mg/ml. These values also become respectively 0.349 ± 0.037 ; 0.414 ± 0.012 and 1.15 ± 0.07 OD at the concentration of 5 mg/ml. Results of antimicrobial activity of the EENg and EMNg on seven bacterial strains and a yeast strain showed a strong inhibition especially of Gram + bacteria with a diameter that varies from 8.5 ± 0.7 to 20.5 ± 0.7 mm. In contrast, they have moderate activity against Gram- and no effect on yeast *Candida albicans*. The evaluation of the in vivo anti-inflammatory activity of EENg showed an inhibition of carrageenin-induced paw edema in Wistar rats with an average rate of 70.53%. In addition there was an increase in serum albumin, a decrease in the C-reactive protein (CRP) compared to the initial state and a remarkable decrease in leukocytes and platelets compared to the batch treated with NaCl 0 , 9%. Ultimately, the microalga *Nannochloropsis gaditana* can be recommended for its important nutritional and therapeutic virtues.

Key words: *Nannochloropsis gaditana*, secondary metabolites, antioxidant activity, antimicrobial, anti-inflammatory, rat Wistar.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تحديد محتوى الأيض الأولي والثانوي للطحالب الدقيقة نانوكلوروبسيس غاديتانا وتقييم مضادات الأكسدة، مضادات الميكروبات، والمضادة للالتهابات المحتملة من الإيثانول (إينغ) والميثانوليك (إمنغ) مقتطفات. أظهرت البيانات التغذوية بالنسبة للمادة الجافة نسبة عالية من البروتين ($13.38 \pm 0.26\%$) والدهون ($7 \pm 1\%$) والسكريات ($7.13 \pm 0.23\%$). وكانت الرطوبة والمعادن على التوالي $9.33 \pm 1.15\%$ و $6.4 \pm 0.23\%$. وأظهرت التقديرات الكمية للمستقلبات بس على التوالي g / الثانوية أن إينغ و إمنغ كانتا غنيتين في هذه المركبات بنسب 41.53 ± 0.42 و 38.74 ± 0.33 مجم إينغ للبوليفينول؛ 19.82 ± 1.66 و 18.61 ± 1.45 مكافئ / جرام بس لفلافونويد و 0.35 ± 0.05 و 0.50 ± 0.08 ملغ حمض التانيك / غ بس للعص. كانت نسبة تثبيط اختبار ديف $22.37 \pm 3.5\%$ و $12.27 \pm 1.4\%$ ل إينغ و إمنغ على التوالي مع مقتطفات عند تركيز 0.5 ملغم / مل. تم التعبير عن الصلاحيات المخفضة ل إينغ و إمنغ وحمض الاسكوريك المحدد بواسطة طريقة فراب بكثافة بصرية وكانت 0.031 ± 0.023 على التوالي. 0.009 ± 0.029 و 0.439 ± 0.035 وحدة كثافة بصرية (أود) بتركيز 0.15 ملغم / مل. هذه القيم أيضا تصبح على التوالي 0.349 ± 0.037 ؛ 0.414 ± 0.012 و 1.15 ± 0.07 أود عند تركيز 5 ملغ / مل. وأظهرت نتائج النشاط المضاد للميكروبات من إينغ و إمنغ على سبع سلالات بكتيرية وسلالة الخميرة تثبيط قوي وخاصة من البكتيريا غرام + التي يبلغ قطرها من 8.5 ± 0.7 إلى 20.5 ± 0.7 ملم. في المقابل، لديهم نشاط معتدل ضد غرام وليس لها تأثير على الخميرة المبيضات البيض. وأظهر تقييم النشاط الحيواني المضادة للالتهابات من إينغ تثبيط وذمة مقلب كارجينين التي يسببها في الفئران ويستار بمعدل متوسط قدره 70.53% . وبالإضافة إلى ذلك كان هناك زيادة في رد الفعل (كرب) مقارنة مع الحالة الأولية وانخفاض ملحوظ في الكريات البيض C- ألبومين المصل، وانخفاض في البروتين والصفائح الدموية مقارنة مع دفعة تعامل مع ناكل 0، 9%. في نهاية المطاف، يمكن أن يوصى ميكروالغا نانوكلوروبسيس غاديتانا لفوائدها الغذائية والعلاجية الهامة.

الكلمات المفتاحية: نانوكلوروبسيس غاديتانا، الأيض الثانوية، النشاط المضادة للأكسدة، مضادات الميكروبات، المضادة للالتهابات، الفئران ويستار.

LISTE DES ABREVIATIONS

ABTS•: 2,2'-azino-bis(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonate)

AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens

AOAC : association of analytical communities

ATCC : American type culture collection

BHA : butylhydroxyanisole

BHT/ butylhydroxytoluène

COX: Cyclo-oxygénase

DHA : acide docosahexaénoïque

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DPPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

EAG : équivalent acide gallique

EAT : équivalent acide tannique

EENg : extrait éthanolique *Nannochloropsis gaditana*

EMNg : extrait méthanolique *Nannochloropsis gaditana*

EPA : acide eicosapentaénoïque

EQ : équivalent quercétine

ERO : espèces réactives de l'oxygène

FRAP : Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter

IASP: International Association for the Study of Pain

iNOS : Inducible nitric oxide synthase

MAPK: Mitogen-activated protein kinases

MRSA : Staphylococcus aureus methicillin resistant

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

NF-κB : nuclear factor-kappa B

ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity

PPA: protéine de la phase aigue

ROO• : le radical peroxy

ROS : espèces réactives oxygénées.

SOD : superoxyde-dismutase

TNFα : facteur de nécrose tumorale

TRAP : Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Diversité morphologique des microalgues	5
Figure 2	Biocarburants issus de microalgues lipidiques	10
Figure 3	Image microscopique de <i>Nannochloropsis gaditana</i>	15
Figure 4	Structure des dérivés de l'acide benzoïque et l'acide cinnamique	19
Figure 5	Structure de base des flavonoïdes	19
Figure 6	Structure chimique (A) d'un tanin condensé (proanthocyanidine) et (B) d'un gallotanin (1,2,3-tri-O-galloyl- β -D-glucose)	20
Figure 7	Déséquilibre de la balance entre oxydant et antioxydant (Stress Oxydant)	24
Figure 8	Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydantes	29
Figure 9	<i>Nannochloropsis gaditana</i> lyophilisée	31
Figure 10	Complexation des flavonoïdes par le chlorure d'aluminium	35
Figure 11	Réduction du radical DPPH	37
Figure 12	Rats wistar	42
Figure 13	Injection au niveau de la veine caudale de l'extrait de <i>N. gaditana</i>	43
Figure 14	Injection de carragénine au niveau de la région sub-plantaire de la patte gauche du rat Wistar	44
Figure 15	Mesure des épaisseurs des pattes traitées (Edèmes)	44
Figure 16	prélèvement du sang par ponction cardiaque et par ponction dans l'aorte abdominale	45
Figure 17	Contenu des phénoliques et des flavonoïdes dans <i>N. gaditana</i>	52
Figure 18	Contenu des tanins condensés et hydrolysés dans <i>N. gaditana</i>	53
Figure 19	L'évaluation par la méthode de DPPH de IC50 des extraits de <i>N. gaditana</i> et le niveau d'acide ascorbique	54
Figure 20	IC50 des différents extraits de <i>N. gaditana</i> (mg/ml).	55
Figure 21	Antioxydant Activités des extraits éthanoliques et méthanoliques de <i>N. gaditana</i> et de vitamine C par la réduction du fer	57
Figure 22	Résultats de diffusion des extraits méthanoliques et éthanolique de <i>N. gaditana</i> sur les souches microbiennes.	58
Figure 23	Zones d'inhibition des extraits de <i>N. gaditana</i> sur le milieu gélosé	59
Figure 24	Effets de l'extrait éthanolique de <i>N. gaditana</i> sur l'œdème de la patte induit par la carragénine 1% chez le rat	61
Figure 25	Inhibition de l'inflammation aiguë par l'EENg et le Diclofenac.	62

LISTE DES TABLEAUX

Tableau1	Composition brute (% du poids sec) et profil des acides gras de <i>Nannochloropsis gaditana</i>	16
Tableau 2	Description et pouvoir pathogène des souches testées (bactéries et levure).	39
Tableau 3	Composition nutritionnelle de <i>N. gaditana</i> .	49
Tableau 4	Diamètres d'inhibition des différents extraits vis-à-vis les germes testés	59
Tableau 5	Taux de CRP _r et d'albumines chez les lots témoins, et les lots traités avec le diclofenac, et EENg	64
Tableau 6	Décompte cellulaire des leucocytes et thrombocytes chez les lots témoins et traité	67

Table des matières

Résumés	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Table des matières	
Introduction	01
1ère Partie: Synthèse bibliographique	
Chapitre I : les microalgues	
I. Les microalgues	04
I.1 Définition et origine des microalgues.....	04
I.3. Caractéristiques de base des microalgues.....	04
I.1.2 Classification et distribution.....	05
II. Application des microalgues.....	07
II.1 En alimentation humaine et animale.....	07
II.2 Domaine pharmaceutique.....	08
II.3 Domaine cosmétique.....	09
II.4 Production d'énergie.....	09
II.5 Domaine environnemental.....	11
III. Activités biologiques des microalgues.....	11
III.1 Activité antioxydante.....	11
III.2 Activités antivirales.....	12
III.3 Activité antimicrobienne.....	13
III.4 Activité anti-inflammatoires.....	14
III.5Activité anticancéreuse.....	14
IV. Généralité sur le genre <i>Nannochloropsis</i>	15
IV.1 <i>Nannochloropsis gaditana</i>	16
Chapitre II : polyphénols et stress oxydatif	
I.Présentation générale des polyphénols.....	19
II.Classification des polyphénols.....	19
II.1. Acides phénoliques.....	20

II.2. Les flavonoïdes	20
II.3. Les tannins.....	21
III. Rôle et intérêt des composés phénoliques	22
III.1. Les polyphénols et les maladies cardiovasculaires.....	22
III.2. Les polyphénols et cancer.....	22
III.3. Les polyphénols et effet antiallergique.....	23
III.4. Les polyphénols et le diabète.....	23
III.5. Les polyphénols et l'inflammation.....	24
IV. Le stress oxydatif.....	25
IV.1. Définition.....	25
IV.2. Les radicaux libres	25
IV.2.1. Le radical superoxyde.....	25
IV.2.2. Le radical hydroxyle	26
IV.2.3. Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂):.....	26
IV.3. Production des espèces réactives de l'oxygène.....	26
IV.3.1. Production endogène.....	26
IV.3.2. Production exogènes.....	27
IV.4. Action néfaste des ERO dans les tissus biologiques.....	28
IV.4.1. Le stress oxydant et les lipides.....	28
IV.4.2. Le stress oxydant et les protéines.....	28
IV.4.3. Le stress oxydant et l'ADN.....	29
V. Les antioxydants.....	29
V.1. Les défenses antioxydantes.....	29
2ème Partie: Matériel et méthodes	
I. Matériel biologique.....	32
II. Analyses physico-chimiques.....	32
II.1. Taux d'humidité	32
II.2. Taux de cendres	33
II.3. Détermination de la teneur en matières azotées totales ou protéines brutes.....	33
II.4. Dosage des sucres totaux.....	34
II.5. Teneur en matières grasses.....	34

III. Préparation des extraits éthanolique et méthanolique de <i>N. gaditana</i>	35
III.1. Calcul des rendements en extraits secs.....	35
IV. Dosage qualitatif des métabolismes secondaires	35
IV.1. Dosage des polyphénols totaux	35
IV.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	36
IV.3. Dosage des tanins condensés.....	37
IV.4. Dosage des tanins hydrolysables.....	38
V. Détermination des activités biologiques.....	38
V.1. Méthodes de détermination de l'activité antioxydante.....	38
V.1.1. Piégeage du radical DPPH.....	38
V.1.2. Pouvoir réducteur du fer.....	39
V.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	40
V.2.1 Préparation des extraits.....	40
V.2.2. Préparation des suspensions microbienne.....	40
V.2.3 Ensemencement des milieux de cultures sur boîtes de Pétri et réalisation des puits	41
V.3. Détermination de l'Effet anti inflammatoire de l'extrait éthanolique de <i>N. gaditana</i>	43
V.3.1. Conditions d'adaptation des rats Wistar	43
V.3.2. Induction de l'inflammation par la carragénine et l'activité anti inflammatoire.....	44
V.3.3. Mesures des œdèmes des pattes enflammées.....	45
V.3.4. Sacrifice et prélèvement du sang.....	46
V.3.5. Dosage des protéines de l'inflammation.....	47
3ème parties : Résultats et discussion	
I. Composition chimique du matériel végétal.....	49
II. Rendement d'extraction.....	50
III. Dosage des composés du métabolisme secondaire.....	51
IV. Evaluation de l'activité antioxydante.....	54
IV.1 Test au radical DPPH•	54
IV.2 Pouvoir réducteur de fer.....	57
V. Evaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits.....	58
VI. Potentiel anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique de <i>N. gaditana</i>	62
VI.1 Effet de EENg sur l'œdème de la patte de rat.....	62
VI.2. Effet de l'EENg sur les protéines sériques du rat.....	65

VI.3. Effet de l'EENg sur l'hémogramme du rat.....	67
Conclusion et perspectives.....	71
Références bibliographiques.....	74
Annexe	

Introduction

Les microalgues sont des organismes unicellulaires photosynthétiques, à la base de la chaîne alimentaire en milieu aquatique. De par leur extraordinaire biodiversité – de 40 000 à 70 000 espèces – et leur grande faculté d'adaptation, elles sont présentes sur l'ensemble des surfaces du globe : des océans (soit $\frac{2}{3}$ de la surface terrestre) aux glaces arctiques, en passant par les lacs hyper-salés, les neiges éternelles, les forêts humides et les murs de nos maisons. Le phytoplancton, qui comprend les microalgues et les bactéries phototrophes, participe à 50% de la production primaire mondiale et joue ainsi un rôle majeur dans la séquestration du dioxyde de carbone atmosphérique ([Raven et Falkowski, 1999](#))

Majoritairement cultivées depuis plus de 30 ans pour la nutrition animale en aquaculture, mais aussi pour la cosmétologie et plus récemment pour leur intérêt dans les secteurs de la pharmacie et de l'énergie, les microalgues sont aussi un produit alimentaire. En nutrition humaine et animale, deux approches de valorisation existent : la première consiste à viser une consommation de la microalgue entière, la deuxième concerne l'extraction, la transformation et le conditionnement de molécules bioactives ([Gaël et Bruno, 2014](#)).

Les algues occupent une place importante dans la découverte de nouveaux médicaments. On estime que près de 50% des agents thérapeutiques utilisés actuellement proviennent de sources naturelles (plantes, champignons, animaux, algues, etc.) ([Balunas et Kinghorn, 2005](#) ; [Lioret, 2010](#)).

Actuellement, les scientifiques favorisent le développement d'une nouvelle génération de substances antimicrobiennes et/ou antioxydantes d'origine végétale pour remplacer celles de synthèse. De même, un certain nombre de secteurs industriels se tournent de nouveau vers l'incorporation de ces molécules aux caractéristiques biologiques intéressantes dans leurs formulations ([Taviano et al., 2013](#)).

Le genre *Nannochloropsis* fait parti des eustigmatophytes marins, photosynthétiques, présentent un intérêt significatif dans le secteur bioénergétique et de l'aquaculture en raison de leur capacité à accumuler efficacement les lipides pour la production de biocarburants, des aliments pour l'aquaculture.

Nannochloropsis est une excellente microalgue en raison de sa valeur nutritive et de sa capacité à produire de précieux métabolites secondaires tels que des pigments comme la zéaxanthine, l'astaxanthine et les acides gras polyinsaturés (PUFA).

N. gaditana est reconnue comme une source potentielle d'acide eicosapentaénoïque (EPA) (20:05 ω3) important pour la consommation humaine et pour la prévention de plusieurs maladies.

Dans ce contexte, ce travail est consacré à l'étude phytochimique et à l'évaluation du potentiel antioxydant, antimicrobien et anti-inflammatoire des extraits de la microalgue *Nannochloropsis gaditana*.

Cette étude comporte trois parties :

✚ La première est consacrée à une synthèse bibliographique sur les microalgues, la classification et l'intérêt des composés phénoliques, des oxydants et des antioxydants;

✚ La seconde décrit le matériel biologique et les techniques utilisées dans les différentes analyses du potentiel nutritionnel de *N. gaditana*, de la présence des métabolites secondaires à caractères antioxydants, antimicrobiens et anti-inflammatoires ;

✚ La troisième est consacrée aux résultats et à la discussion.

«Er mor ez eus danvez», «dans la mer il y a de la richesse» disent les Bretons.

1ère Partie: Synthèse bibliographique

Chapitre1 :
Les microalgues

I. Les microalgues

I.1 Définition et origine des microalgues

Les algues sont des organismes qui poussent dans les milieux aquatiques et utilisent la lumière et le dioxyde de carbone (CO₂) pour créer de la biomasse. Les algues marines constituent un énorme réservoir de molécules naturelles potentiellement actives ([Rajeev. and Xu Z. 2004](#), [Blunt et al. 2009](#)). On distingue les macroalgues et les microalgues.

Les macroalgues sont des algues multicellulaires de taille proche du centimètre et qui croissent le plus souvent dans des bassins naturels d'eau douce ou d'eau salée. ([Wen et Johnson, 2009](#))

Les microalgues désignent des algues de petite taille dont la forme ne peut être observée qu'au microscope. Ces microorganismes jouent un rôle majeur dans les écosystèmes aquatique marins en tant que producteur primaires ([Becker, 2004](#)). Ils sont une sorte d'organisme cellulaire primitif unique avec une capacité élevée de photosynthèse. La période de croissance est courte, et le temps de doublement cellulaire des microalgues est de seulement 1-4 jours. Les microalgues qui contiennent au moins 30% de lipides dans la cellule des microalgues peuvent être utilisées pour convoier des biocarburants. Grâce à la photosynthèse, les microalgues peuvent absorber de grandes quantités de CO₂ pour produire des sucres et de l'oxygène. L'équation de la réaction de photosynthèse est la suivante:



Les sucres peuvent ensuite se transformer en lipides, en protéines et en réserve de glucides, ce qui permet de transformer ces matières en biocarburant ([wang,2013](#)).

Les microalgues représentent une source d'alimentation pour les premières étapes larvaires de quelques crustacées (*N.Salina*) comme pour les êtres humains de par leur composition biochimique adaptée ([Sumi, 2009](#)).

I.1.1 Caractéristiques de base des microalgues

Ces microorganismes synthétisent, par le biais de la photosynthèse, de l'oxygène et des métabolites organiques primaires tels que les glucides, les lipides et les protéines. Du point de vue structure cellulaire, la microalgue présente un noyau et une membrane plasmique contenant des organites essentiels à son fonctionnement tels que les chloroplastes, les amyloplastes, les oléoplastes et les mitochondries. Elle contient trois principaux types de pigments qui sont les chlorophylles, les caroténoïdes et les phycobiliprotéines ([Filali, 2012](#)).

Les microalgues présentent des formes variables, souvent sphériques (*Porphyridium*), en forme de croissant (*Clostridium*), de spirale (*Arthrospira*), de gouttelette (*Chlamydomonas*) et même d'étoile (*Staurostrum*) (Figure 1).

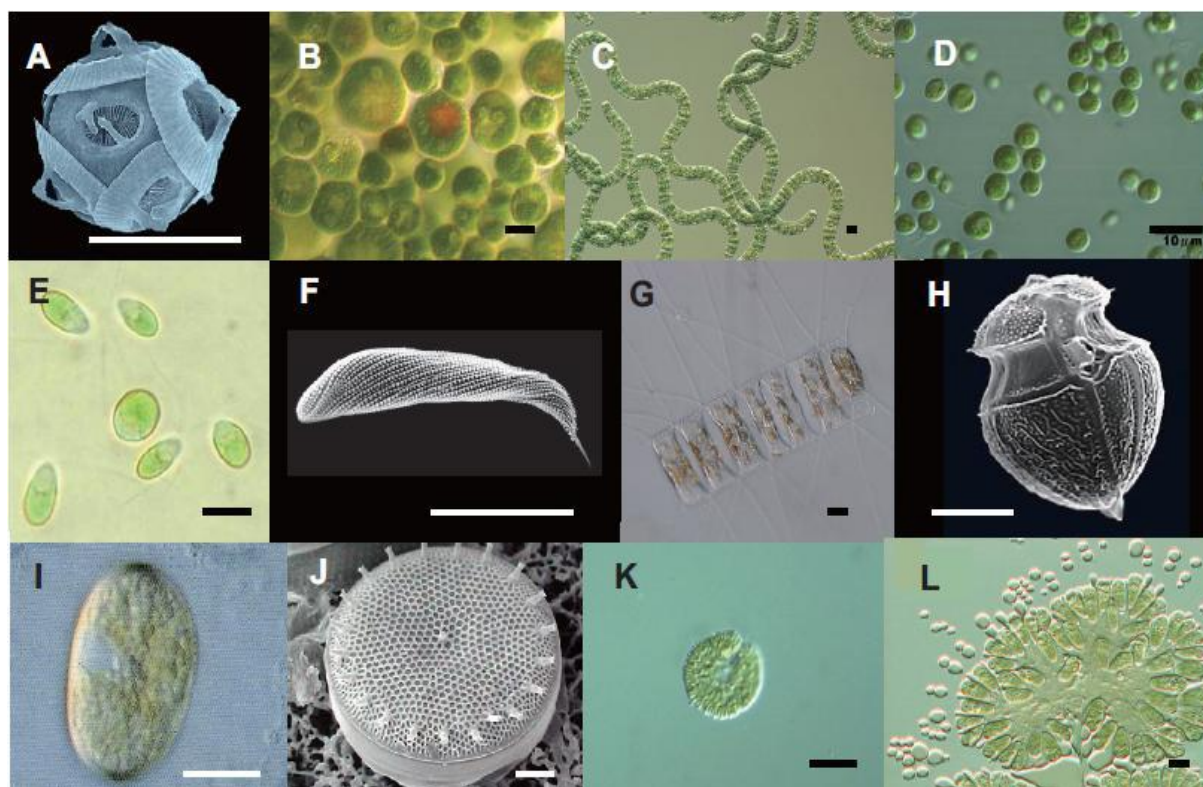


Figure 1: Diversité morphologique des microalgues (Sumi, 2009). A : *Gephyrocapsa* ; B : *Haematococcus lacustris* ; C : *Spirulina platensis* ; D : *Chlorella vulgaris* ; E : *Dunaliella tertiolecta* ; F : *Chaetoceros calcitrans* ; H : *Dinophysis acuminata* ; I : *Alexandrium* ; J : *Bacillariophyceae* ; K : *Raphidophyceae* ; L : *Botryococcus* (La longueur du trait dans chaque figure représente 10µm).

Certaines espèces peuvent aussi être chémo-hétérotrophes ou hétérotrophes. Ainsi, au besoin, elles sont capables de puiser de l'énergie et des nutriments directement des matières organiques présentes dans le milieu aquatique (Chevalier et al., 2002).

I.1.2 Classification et distribution

Les microalgues sont très diversifiées et environ 30 000 espèces ont déjà été analysées. Ce nombre représente moins de 10 % du total existant estimé. En 2000, près d'une cinquantaine seulement avaient été étudiées en détails. Les scientifiques ont analysé les microalgues pour les distinguer et les diviser en plusieurs classes selon des critères généraux comme la pigmentation, la structure biologique, l'organisation des membranes photosynthétiques et le métabolisme (Anderson, 1992 ; Carlsson et al., 2007).

On distingue principalement deux grands groupes de microalgues.

✓ **Les procaryotes** : Ce sont des organismes unicellulaires qui sont dépourvus de noyau et ne présentent que très rarement des organites cellulaires.

-Les *Cyanophycées* : appelées également cyanobactéries, sont des microalgues procaryotes de coloration bleue-verte qui présentent une forte tolérance vis-à-vis des températures extrêmes (Pulz et al., 2004). Ces microalgues sont répandues dans toutes les variétés d'habitats aquatiques. Les espèces les plus connues sont *Spirulina* (*Arthrospira*) *plantensis*, *Nostoc* commune et *Aphanizomenon flos-aquae* (Pulz et al., 2004).

✓ **Les eucaryotes** : Ce sont des organismes uni ou pluricellulaires qui présentent une structure complexe contenant un noyau entouré d'une membrane ainsi que plusieurs organites intracellulaires

-Les *bacillariophycées* (*diatomées*) : Les diatomées sont considérées comme majoritaires, car elles représentent souvent le groupe dominant parmi les populations de phytoplancton et sont extrêmement répandues dans tous les types d'habitats. Elles sont responsables de 20% de la production carbonée océanique (Kroth et al., 2008).

-Les *Chlorophycées* : Les chlorophycées sont retrouvées dans tous types d'habitat. Ces microorganismes présentent des formes filamenteuses (Pulz et al., 2004).

On dénombre actuellement 8 000 espèces, dont 1 000 sont des chlorophytes marines (Alcaine, 2010). Les espèces les plus connues sont *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella* ainsi que *Haematococcus* (Pulz et al., 2004).

-Les *chrysophycées* : sont des algues unicellulaires jaunes à brunes, de forme allongée. Elles vivent indépendantes ou en colonies dans les eaux marines et continentales des zones tempérées et chaudes. On répertorie environ 1 000 espèces avec des caractéristiques similaires à celles des diatomées du point de vue pigmentation et structure biochimique (Alcaine, 2010).

-Les *Rhodophycées* : ce sont des algues de pigmentation rouge qui sont capables de se développer dans les eaux saumâtres et salées. Cette classe comprend près de 400 espèces présentant dans la majorité des cas un métabolisme photoautotrophe (Lechevalier et al., 1977).

II. Application des microalgues

La diversité d'espèces en micro-algues et leur richesse en métabolites permet un vaste panel d'applications et peut s'adresser à de nombreux secteurs industriels

Les composés d'intérêt essentiellement identifiés sont les lipides, les vitamines, les polysaccharides, les protéines, les pigments, les antioxydants et d'autres composants cellulaires. Ces produits issus des micro-algues et cyanobactéries sont commercialisés pour les secteurs de la santé et du bien être avec l'alimentation humaine (additifs et colorants alimentaires), la nutraceutique, la cosmétique et la pharmaceutique (actifs biologiques et thérapeutiques). On les retrouve aussi dans les domaines de l'alimentation animale (tourteau protéique potentiel et colorants), de l'énergie, et de la chimie verte.

II.1 En alimentation humaine et animale

Les microalgues constituent un réel apport nutritif. Ces microorganismes sont utilisés dans l'alimentation animale et humaine, et dans l'aquaculture (Pulz et al., 2004). La biomasse peut être produite sous forme de poudre, tablettes, capsules, pastilles....

En France, seules trois espèces de phytoplancton sont autorisées pour une consommation humaine sans transformation : la spiruline ou *Arthrospira platensis* (une cyanobactérie communément assimilée aux microalgues), probablement l'espèce la plus anciennement consommée, sous forme fraîche ou séchée, pour ses propriétés nutritionnelles (une forte teneur en protéines, entre 60 et 70 % de la matière sèche) et plus récemment comme alicament (en raison de son pigment naturel de couleur bleue, la phycocyanine) ; la microalgue verte *Chlorella sp.*, riche en amidon, dont l'exploitation sous forme de complément alimentaire pour ses propriétés tonifiantes et détoxifiantes est utilisée comme complément alimentaire pour sa richesse en protéines (Liu et al., 2005) et en minéraux (Wiston et Goldber, 2003). La diatomée *Odontella aurita*, (Bougaran et Saint-Jean, 2014) est également utilisée comme complément alimentaire en tant que source d'acides gras polyinsaturés (Jiang et al., 1999) et est destinée à l'alimentation humaine et animale. Ces organismes sont susceptibles de synthétiser des acides gras polyinsaturés (AGPI) de la série $\omega 3$ comme l'acide eicosapentaénoïque (EPA), l'acide docosahexaénoïque (DHA), l'acide α -linoléique (LNA) et les AGPI de la série $\omega 6$ comme l'acide arachidonique (AA) et l'acide linoléique (LA). Ces AGPI sont utilisés en nutrition humaine et animale pour leurs vertus thérapeutiques sur certaines maladies.

Les caroténoïdes sont de plus en plus employés dans l'industrie alimentaire, suite à la pression du consommateur et à l'augmentation des réglementations limitant l'utilisation des colorants artificiels (Gordon et Bouernfeind, 1982).

Le β -carotène est un pigment synthétisé par l'algue *Dunaliella* et est utilisé comme colorant en industrie alimentaire. D'autres caroténoïdes, tel que l'astaxanthine synthétisée par l'algue *Haematococcus*, la lutéine, la zéaxanthine et la canthaxanthine sont des antioxydants utilisés en alimentation humaine, animale et en aquaculture. Ces biomolécules sont utilisées en tant que, colorant dans divers produits comme les glaces, les jus de fruits et en tant qu'additifs alimentaire sous le code E160a (Person et al., 2011).

Les microalgues sont également connues comme source de vitamines A, B1, B6, D, E, K (Dabbadie, 1992). Les polysaccharides (polymères hydrosolubles) issues des microalgues sont exploités dans l'industrie agroalimentaire en tant qu'agents gélifiants ou épaississants (De la Noüe et al., 1988). Le glycérol, molécule intervenant dans les systèmes d'osmorégulation des microalgues, est exploité dans l'agroalimentaire comme édulcorant. C'est l'algue *Dunaliella salina* qui en est la plus riche (Filali, 2012).

Le phytoplancton en tant que production primaire des milieux aquatiques est par ailleurs tout naturellement exploité comme ressources nutritive pour l'aquaculture (Spolaore et al., 2006). Dans cette filière majeure de la production mondiale, les microalgues sont utilisées directement pour subvenir aux besoins des stades larvaires des mollusques bivalves et des crustacés ou indirectement comme complément alimentaire et comme substrat pour le zooplancton, base alimentaire de nombreuses espèces aquacoles (Muller-Feuga et al., 2003).

Par ailleurs, 30 % de la biomasse algale produite est aussi utilisée dans le cadre de la fabrication industrielle d'aliments pour les élevages d'animaux terrestres (volailles, porcs...) (Costa et al., 2011).

II.2 Domaine pharmaceutique

Les microalgues représentent une source intéressante de molécules bioactives et de toxines utilisables dans le développement de nouveaux médicaments. Plusieurs études ont permis de mettre en évidence l'implication des microalgues dans le domaine pharmaceutique par l'identification de nouvelles molécules naturelles (Hoppe, 1979). Dans ce contexte, la tubercidine, une molécule cytotoxique, a été identifiée chez la microalgue *Tolythrix byssoidea* ainsi que chez les cyanobactéries (Patterson et al., 1991). Cette molécule présente une action in vitro, effective contre un type de leucémie lymphoïde. Par ailleurs, les

microalgues peuvent synthétiser des sulfolipides antiviraux pour fortifier le système immunitaire.

Certains exopolysaccharides sécrétés par les microalgues ont montré des capacités antivirales sur l'Herpes simplex virus type 1 (responsable d'infections buccales) ou bien le measles virus (responsable de la rougeole) ou encore l'Influenza virus A (responsable de grippe), et antiprolifératives sur des lignées cellulaires cancéreuses (Laurienzo,2010). Ces composés insolubles pourraient également entrer dans la formulation d'hydrogels pour la reconstruction osseuse et la vectorisation d'agents ostéoinducteurs (De Jesus Raposo et al., 2013).

L'utilisation d'extraits de microalgues à forte teneur en antioxydants trouve des applications dans l'industrie pharmaceutique pour des thérapies contre certains types d'inflammation (Pulz et al., 2004).

La microalgue *Chlorella* fait l'axe de recherche dans de nombreuses applications pharmacologiques. Elle a démontré des propriétés intéressantes dans le traitement du diabète chez la souris (Jong-Yuh et Mei-Fen, 2005 ; Mizoguchi et al, 2008). Elle présente de nombreuses propriétés immunologiques (Konishi et al, 1990 ; Pugh et al, 2001) et anti-cancéreuses (Justo et al, 2001).

II.3 Domaine cosmétique

L'utilisation de certaines espèces de microalgues, en particulier *Arthrospira* et *Chlorella* est bien établie dans le domaine cosmétique puisque elles représentent une source de biomolécules dotées de diverses activités : anti-irritantes et hydratantes pour la peau (Stolz et Obermayer, 2005 ; Person et al., 2011).

La phycocyanine extraite de *Spirulina sp.* est un pigment bleu utilisé dans l'industrie cosmétique comme colorant (Morice et Jamma, 1992). Les protéines synthétisées à partir de la souche *Arthrospira* entraînent une réparation des premiers signes de vieillissement de la peau alors que des extraits de *Chlorella vulgaris* permettent de stimuler la synthèse du collagène dans la peau induisant la réduction des rides (Spolaore et al., 2006).

II.4 Production d'énergie

La raréfaction des ressources énergétiques fossiles et la pression anthropique sur le climat mondial conduisent à l'exploration de sources d'énergie renouvelables. Fortes d'une activité photosynthétique élevée, les microalgues peuvent capter et convertir l'énergie solaire en biomasse polyvalente et exploitable comme source d'énergie (Bougaran et Saint-Jean, 2014).

À partir de cette biomasse microalgale, deux voies de valorisation peuvent être envisagées : son utilisation directe pour la production de méthane par digestion anaérobie ou d'éthanol via un processus de fermentation alcoolique ; et la biosynthèse de molécules fortement énergétiques telles que les lipides et l'hydrogène (Figure 2).

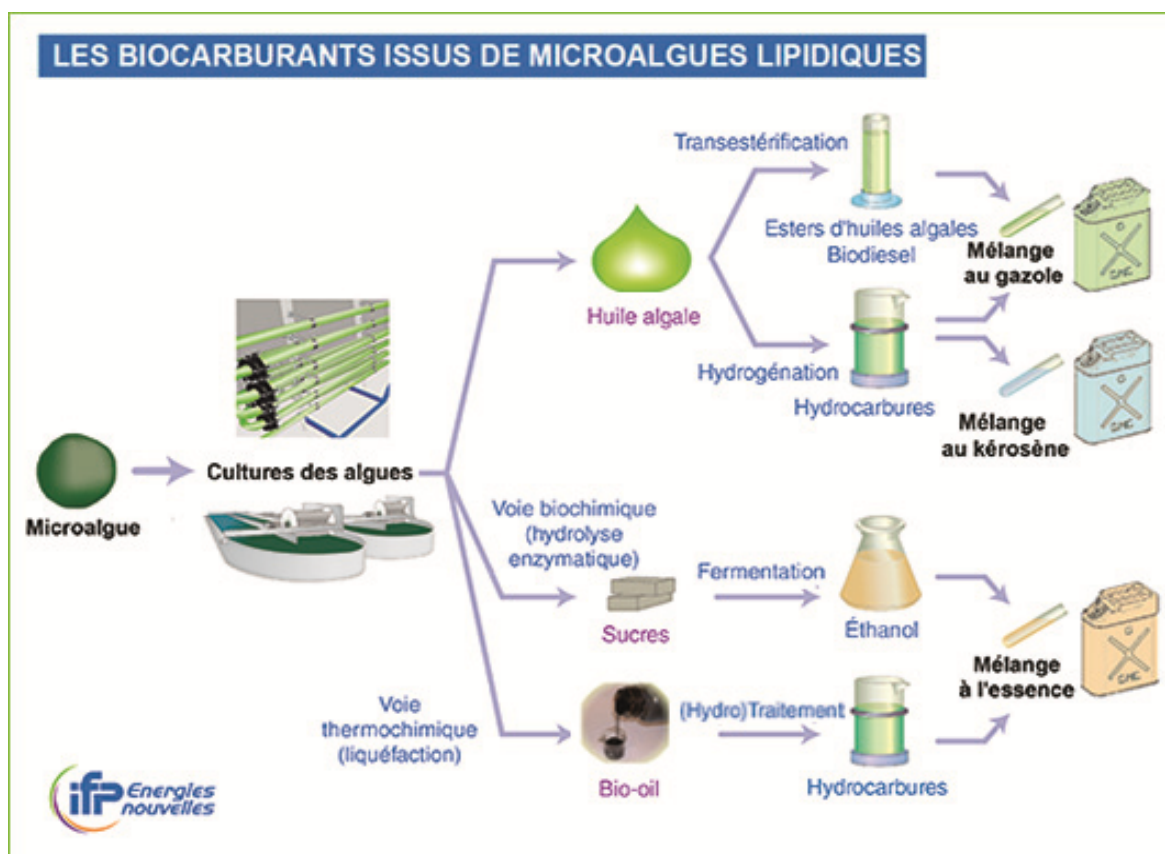


Figure 2 : Biocarburants issus de microalgues lipidiques (Daphné Lorne ,2011)

Les microalgues sont en train d'émerger comme matière première de biodiesel de la prochaine génération et ont le potentiel de répondre à la demande actuelle de carburants de transport (Chisti, 2007 ; Hu et al., 2008).

Les microalgues sont des microorganismes photosynthétiques responsables d'au moins 32% de la photosynthèse globale et près de la moitié de l'oxygène atmosphérique (Safi et al., 2014 ; Kumar et al., 2015). Les avantages de l'utilisation de microalgues pour la production de biodiesel sont :

- Leur efficacité photosynthétique élevée;
- Ils se cultivent aussi sur des terres non arables, évitant ainsi une compétition directe avec les cultures céréalières;

- Le CO₂, l'azote et le phosphate sont utilisés pendant la culture des microalgues, ce qui a pour effet d'atténuer l'effet de serre et la pollution de l'eau. Environ 1,8 kg de CO₂ sont nécessaires pour produire un kilogramme de biomasse (Rodolfi et al., 2009).

Les espèces telles que *Chlorella sp.*, *Neochloris oleoabundans*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Nannochloropsis sp* se révèlent être de bonnes candidates pour la production de biocarburants de troisième génération grâce à leur contenu lipidique de 30 à 60% du poids sec.

II.5 Domaine environnemental

Au vu de leur capacité d'assimilation de nombreux nutriments nécessaires à leur croissance, les microalgues représentent une solution intéressante pour éliminer ces éléments ; elles sont également capables de fixer des métaux lourds. Elles sont ainsi les principaux éléments biologiques de certains systèmes de traitement des eaux municipales et industrielles (essentiellement traitement tertiaire) (Filali, 2012).

Les microalgues ont des capacités d'absorption particulièrement intéressantes de l'azote et du phosphore pour la décontamination de milieux pollués et la lutte contre l'eutrophisation (Bougaran et Saint-Jean, 2014).

Aslan et Kapdan, 2006 ont porté sur l'implication de *Chlorella vulgaris* dans l'absorption de l'azote et du phosphore des eaux usées et ils ont montrés que l'oxygénation du milieu est facilitée par la production in situ de O₂ par la photosynthèse, permettant ainsi de réduire l'aération extérieure et limitant la fuite dans l'air des composés organiques volatils (Olguin, 2003 ; Muñoz et Guieysse, 2006).

Les microalgues ont une grande capacité d'accumulation des métaux lourds (Monteiro et al, 2012), elles sont donc très utilisées dans le traitement des eaux usées.

III. Activité biologique des microalgues

III.1 Activité antioxydante

Les microalgues représentent une ressource presque inexploitée d'antioxydants naturels, en raison de leur énorme biodiversité et beaucoup plus diversifiée que les plantes supérieures. La valeur des microalgues comme source d'antioxydants naturels est encore accrue par la facilité relative de la purification des composés cibles (Li et al., 2001). Cependant, tous les groupes de microalgues ne peuvent pas être utilisés comme sources naturelles d'antioxydants, en raison de leur contenu très varié des produits cibles, du taux de croissance ou des rendements, de la facilité de culture et/ou d'autres facteurs (Hemalatha, 2013).

La cyanobactérie *Spirulina platensis* a montré une activité antioxydante élevée par l'utilisation de méthodes comme celle du DPPH et de l'ABTS et ce grâce à sa teneur en pigments phycobiliprotéiques totaux et en métabolites secondaires hautement produits (Sanaa et al., 2012).

Les pigments phycobiliprotéiques sont connus pour leur haute activité antioxydante (Shalaby, 2011). L'augmentation de la production des phycobiliprotéines est améliorée par l'augmentation des concentrations de nitrate dans les milieux de culture des deux espèces de cyanobactéries (*Nostoc. muscorum* et *Oscillatoria sp.*) ce qui s'est traduit par une augmentation évidente de l'activité antioxydante (Sanaa et al., 2012).

Les microalgues contiennent plusieurs ingrédients actifs, notamment la phycocyanine qui a de puissantes propriétés antioxydant. La phycocyanine a la capacité de piéger les radicaux libres, y compris les radicaux alcoyle, hydroxyle et peroxy. Elle diminue également la production de nitrite, supprime l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), et inhibe la peroxydation des lipides microsomique du foie (Romy et al., 1998 ; Manconia et al., 2009).

Chlorella ellipsoid et *Spirulina maxima*, possèdent une large gamme de molécules antioxydantes pour la protection biomoléculaire contre les ROS formés dans des conditions de stress (Abd El-Baky et al., 2008).

Des chercheurs coréens ont mis en contact un extrait alcoolique de l'algue rouge *Callophysis japonica* avec des cellules pulmonaires de hamster soumises à l'effet nocif de l'eau oxygénée (H₂O₂). L'action antioxydante de l'extrait, s'est manifestée de différentes façons:

- Par une inhibition de la peroxydation des lipides
- Par une action anti-radicaux libres qui a protégé la viabilité des cellules pulmonaires
- Par une réduction de l'apoptose (mort cellulaire) induite par H₂O₂
- Par une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes cellulaires telles que la superoxyde dismutase et la catalase (Kyoung Ah Kang et al., 2005).

III.2 Activité antivirales

Les polysaccharides sulfatés de plusieurs algues marines ont une forte activité antivirale contre des agents pathogènes pour l'homme parmi lesquels l'herpes simplex virus, le cytomégalovirus, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et celui de la dengue (Wei Wang et al., 2012).

Au cours de la dernière décennie, de nombreux polysaccharides bioactifs possédant des propriétés fonctionnelles intéressantes sont découverts à partir d'organismes marins (Patel, 2012). Les activités antivirales de la plupart des polysaccharides marins sont généralement liées à la structure spécifique du sucre, aux poids moléculaires et à leur degré de sulfatation (Jiao et al., 2011). Des exopolysaccharides sulfatés provenant de microalgues marines sont prétendus interférer avec la phase I de certains virus enveloppés (Batinic et Robey, 1992); Ils offrent des avantages compétitifs en raison de leur large spectre antiviral contre, par exemple VIH-1 (Damonte et al., 2004).

III.3 Activité antimicrobienne

Les microalgues se sont avérées produire des antibiotiques: un grand nombre d'extraits de microalgues et/ou de produits extracellulaires ont fait leurs preuves antibactériennes, antifongiques, antiprotozoaires et antiplasmodiales. L'activité antimicrobienne des microalgues a été attribuée à des composés appartenant à plusieurs classes chimiques - indoles, terpènes, acetogénines, phénols, acides gras et hydrocarbures halogènes volatils (Cardozo et al., 2007).

Pratt et al., (1944) ont isolé le premier composé antibactérien d'une microalgue, *Chlorella*; un mélange d'acides gras, la Chlorelline responsable de l'activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries Gram+ et Gram-.

Les extraits ethanologiques d'*Haematococcus pluvialis* possèdent une activité antimicrobienne contre une bactérie Gram-, *E. coli* et Gram +, *S. aureus* due à la présence d'acides gras à chaîne courte, des acides butanoïque et méthyl lactique (Santoyo et al., 2009). Les composés importants identifiés comme antimicrobiens sont les acides gras, l'acide acrylique, les composés aliphatiques halogénés, les terpènes, les composés hétérocycliques contenant du soufre, les glucides et les phénols (Kannan et al., 2010).

Sushanth et Rajashekhar (2015) ont rapporté que l'extrait d'hexane chez *Nannochloropsis oceanica* présente une activité antimicrobienne contre *Streptococcus pyogenes* (17mm).

Les esters méthyliques des acides gras de *Nannochloropsis oculata* ont la capacité d'inhiber les bactéries (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* (20-27mm)), et la levure *Candida albican* avec un effet modéré (19mm) (Duraiarasan et al., 2014) alors que *Nannochloropsis sp* a montré une activité antibactérienne élevée contre *Salmonella paratyphi* et *Shigella boydi* (Krishnika et al., 2011).

III.4 Activités anti-inflammatoires

Les microalgues contiennent plusieurs ingrédients actifs, notamment la phycocyanine et le β -carotène qui ont de puissantes propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Les propriétés anti-inflammatoires de la phycocyanine ont été signalées pour la première fois en 1998 (Romay et al., 1998).

La phycocyanine inhibe la formation de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF α , supprime l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) et diminue la production de prostaglandine E2. De plus, la phycocyanine inhibe l'activation du facteur nucléaire κ B (NF- κ B) en empêchant la dégradation de I κ B- α cytosolique (Deng et Chow, 2010). Un autre ingrédient de la spiruline, le β -carotène, aurait des activités anti-inflammatoires (Katsuura et al., 2009). Des études ont montré que le β -carotène inhibait la production d'oxyde nitrique et de prostaglandine E2 et supprimait l'expression de iNOS, COX-2, TNF- α et IL-1 β . Une telle suppression des médiateurs inflammatoires par le β -carotène résulte probablement de son inhibition de l'activation du NF- κ B par le blocage de la translocation nucléaire de la sous-unité p65 du NF- κ B. En outre, le β -carotène a supprimé la transcription des cytokines inflammatoires, y compris IL-1 β , IL-6 et IL-12, dans la lignée cellulaire des macrophages stimulée par le lipopolysaccharide (LPS) (Bai et al., 2005).

III.5 Activité anticancéreuse

Plusieurs études ont montré que des populations grandes consommatrices de soja, mais aussi d'algue, sont moins sujettes aux cancers que les populations qui consomment peu de ces aliments. La carence en iode et en sélénium peut contribuer à l'apparition du cancer du sein. Or, les algues contiennent cet oligo-élément en quantité importante. Elles contiennent aussi les lignanes, molécules qui régulent la production d'œstrogènes et permettent de lutter contre les cancers liés aux hormones (prostate, sein). Les algues favoriseraient leur développement en cas de prolifération. Chez l'animal, la consommation d'algues arrête le développement des tumeurs mammaires et certaines cellules cancéreuses meurent en présence d'algues, sous l'effet de plusieurs substances (fucoïdanes, caroténoïdes, phytostérols et fucoxanthine).

En France, des expériences conduites par des chercheurs affinent les soins possibles à partir de microalgues. Sous l'effet de la lumière, des extraits d'algues, introduits dans les cellules cancéreuses, produisent des radicaux libres (molécules d'oxygène) qui ne tuent que les cellules malades. C'est une photochimiothérapie locale, qui pourra être utilisée sur plusieurs types de cancer, hors système lymphatique (Quéva, 2011).

Les extraits aqueux des espèces d'algue prometteuses ont démontré une efficacité anticancéreuse élevée contre les lignées cellulaires EACC et HepG2 (87,25 et 89,4% respectivement pour *Nostoc muscorum* et 67,40 et 77,8% pour *Oscillatoria sp.*) (Sanaa et al., 2012).

Ces résultats ont démontré que les composés responsables de l'activité anticancéreuse sont très polaires comme les phycobilines, les composés phénoliques et les polysaccharides qui induisent l'apoptose des cellules cancéreuses (Aboul-Enein et al., 2011 ;Sanaa et al., 2012).

IV. Généralité sur le genre *Nannochloropsis sp*

Nannochloropsis est une algue verte unicellulaire, de forme sphérique, de diamètre d'environ 2-5 μm (Kandilian et al., 2013). Appartenant à la classe eustigmatophyceae. Comprenant 6 espèces *N. oculata*, *N. gaditana*, *N. salina*, *N. oceanica*, *N. granulata* et *N. limnetica* (Hibberd, 1981 ; Lubian, 1982 ; Karlson et al., 1996 ; Krienitz et al., 2000 Suda et al., 2002) qui sont déterminés par analyse des séquences d'ADN basée sur l'ADN_r 18S et le gène *rbcl* qui se trouve dans le génome chloroplastique (Andersen et al.,1998).

Ces espèces sont surtout connues dans le milieu marin, mais également dans les eaux douces et saumâtres (Fawley et Fawley, 2007).

Ces microorganismes sont des sources de différents pigments tels que la chlorophylle a l'astaxanthine, la zéaxanthine et la canthaxanthine (Lubian et al., 2000). Les espèces ont des formes très variables. En effet, les cellules de *N. granulata* ont une forme globulaire à ovale alors que *N. salina* et *N. gaditana* ont une forme cylindrique (Figure 3). *N. oculata* quand à elle a une forme sphérique. Par ailleurs la description de *N. salina* et *N. limnetica* n'est pas établie (Suda et al., 2002 ; Fawley et Fawley, 2007).

Les espèces appartenant au genre *Nannochloropsis* sont considérées comme un modèle émergent pour étudier la biologie des algues en raison de leur taux de croissance élevé, et de leur capacité à accumuler de grandes quantités d'huile (Bondioli et al.,2012 ;Breuer et al.,2012 ; Laurens et al.,2012 ;Jinkerson et al.,2013 ; Roleda et al.,2013). Qui en font des candidats prometteurs pour la production de biodiesel.

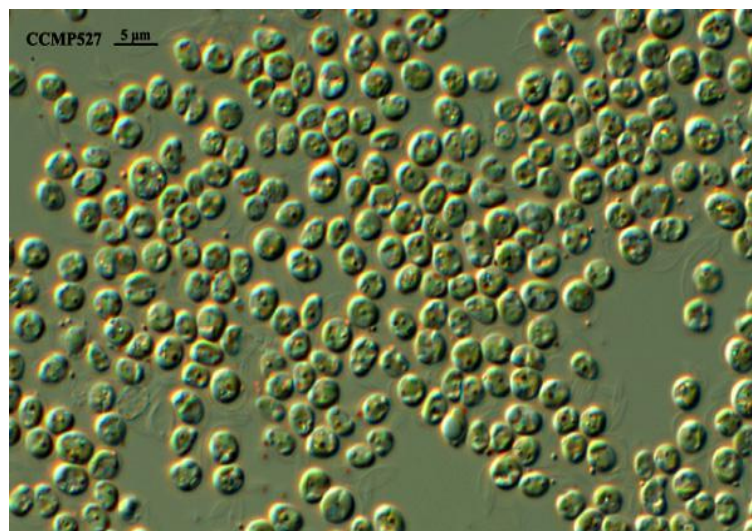


Figure 3: Image microscopique de *Nannochloropsis gaditana* (Baker et al, 2012)

IV.1 *Nannochloropsis gaditana*

Nannochloropsis gaditana est une microalgue qui appartient à la classe des Eustigmatophyceae. Cette microalgue est utilisée en aquaculture soit directement dans l'élevage du poisson, soit via des rotifères (Cheng-Wu, 2001).

N.gaditana est reconnue de commerce de composés précieux largement décrits et est également reconnue comme une source potentielle d'acide eicosapentaénoïque (EPA) (20:05 ω 3) important pour la consommation humaine et pour la prévention de plusieurs maladies (Sukenik et Cohen, 1999 ; Rodolfi, 2003 ; Wen et Chen, 2003).

La croissance de *Nannochloropsis gaditana* est améliorée lors d'une exposition plus longue à la lumière et un contrôle du pH et de l'urée comme source d'azote supplémentaire (Jorge et al., 2003). *Nannochloropsis gaditana* est principalement utilisée comme source de nourriture pour les larves de poissons et de rotifères grâce à son potentiel énergétique et sa richesse en protéines et lipides (Tableau 1). Récemment *Nannochloropsis gaditana* a été étudiée pour la production de biocarburants et a été utilisée même en alimentation humaine (Gouveia et Oliveira, 2009).

Tableau°1 : Composition brute (% du poids sec) et profil des acides gras de *Nannochloropsis gaditana* (Fernandes seixas, 2009).

Composition	<i>Nannochloropsis gaditana</i>
Protein (%)	39,9
Lipid (%)	25,1
Carbohydrate (%)	8,7
<u>Fatty acid</u>	
14 :0	8,1
16:0	25,4
16:1n-9	22,7
18:0	1,4
18:1n-9	4,7
18:1n-7	1,1
18:2n-6	4
18:3n-3	0,8
18:4n-3	0,4
20:4n-6	4,4
20:3n-3	-
20:4n-3	-
20:5n-3	25
22:6n-3	-
DHA/EPA	-
EPA/ARA	5,7
ΣSaturated	35
Σmonones	29,1
ΣPUFA	35,2
Σn-3	26,2
Σn-6	8,9

Chapitre2 :
Polyphénols et stress oxydatif

Introduction

Les polyphénols sont considérés comme des composés quasi universels des végétaux. Structuellement, ils se répartissent en plusieurs classes allant de composés présentant un simple noyau phénolique (ex: acide gallique) à des composés polymériques complexes comme les tanins.

Les polyphénols constituent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales. On les trouve, d'une manière générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes: racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits.

In vitro, les polyphénols présentent des activités antioxydantes, antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses. Ces activités sont attribuées en partie à la capacité de ces composés à réduire les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\text{HO}^\bullet$) et superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) mais aussi à leur affinité pour une grande variété de protéines dont certains enzymes et récepteurs.

I. Présentation générale des polyphénols

Les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits.

Les polyphénols sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la production (Fleuriet, 1982 ; Yusuf, 2006).

En effet les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connues (Lugasi et al ., 2003).

Les principales classes de composants phénoliques sont: les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines (King et Young., 1999 ; Tapiero et al., 2002).

II. Classification des polyphénols

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. On peut distinguer deux catégories : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes (Clifford,1999 ; D'Archivio et al.,2007).

II.1. Acides phénoliques

Ces composés sont universellement rencontrés chez les plantes. Deux sous-groupes peuvent être distingués (Figure 4) (Andersen et Markham, 2006; Bruneton, 2009):

Acides hydroxybenzoïques Ces composés répondent à une représentation structurale de type (C6-C1), dont les plus répandus sont l'acide salicylique et l'acide gallique.

Acides hydroxycinnamiques Ces composés répondent à une représentation structurale de type (C6-C3), dont les plus abondants sont les acides caféique et coumarique. Ils sont à l'origine des voies de biosynthèse de nombreuses substances telles que les lignines, les flavonoïdes et les stilbènes.

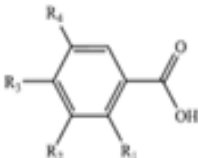
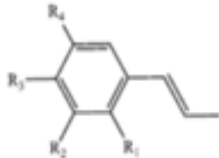
									
Les acides benzoïques	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Les acides cinnamiques	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ac. benzoïque	H	H	H	H	Ac. cinnamique	H	H	H	H
Ac. salicylique	OH	H	H	H	Ac. o-coumarique	OH	H	H	H
Ac. p-hydroxy-benzoïque	H	H	OH	H	Ac. m-coumarique	H	OH	H	H
Ac. gallique	H	OH	OH	OH	Ac. p-coumarique	H	H	OH	H
Ac. protocatéchique	H	OH	OH	H	Ac. caféique	H	OH	OH	H

Figure 4: Structure des dérivés de l'acide benzoïque et l'acide cinnamique (Andersen et Markham, 2006; Bruneton, 2009):

II.2. Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Seyoum et al., 2006), ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. À l'état naturel les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides (Ghestem et al., 2001; Bruneton, 1999).

Du point de vue structural, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, en effet plus de 6400 structures ont été identifiées (Harborne et Williams., 2000).

Il existe plusieurs classes de flavonoïdes, dont les principales sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines. La structure de base de ces différents flavonoïdes peut subir de nombreuses substitutions, les groupements hydroxyles étant généralement en positions 4, 5 et 7. Ces substances existent généralement sous forme de glycoside (Chira et al., 2008) (Figure 5)

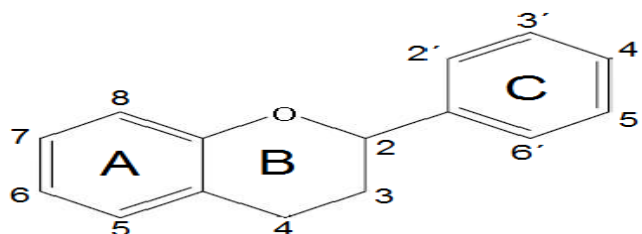


Figure 5 : Structure de base des flavonoïdes (Di Carlo et al., 1999).

II.3. Les tannins

Les tannins sont des composés, résultant de la condensation de certaines formes simples évoquées précédemment, capables de se lier à des protéines en solution et de les précipiter.

Il existe deux grands groupes de tannins :

- les tannins hydrolysables ce sont des esters du D-glucose et de l'acide gallique ou de ses dérivés, en particulier l'acide ellagique (Figure 6B) (O'Connell et Fox, 2001)
- les tannins condensés ou les proanthocyanidines sont des polymères constitués d'unités flavane reliées par des liaisons entre les carbones C4 et C8 ou C4 et C6 (Figure 6B) (Bruyne et al., 1999)

Les tannins sont utilisés depuis l'Antiquité pour le tannage des peaux d'animaux. D'un point de vue alimentaire, ils sont responsables de l'astringence de nombreux fruits, légumes et de produits qui en sont dérivés. Cette caractéristique est due à leur propriété de complexation avec les protéines salivaires (Prieur et al., 1994; El Gharras, 2009).

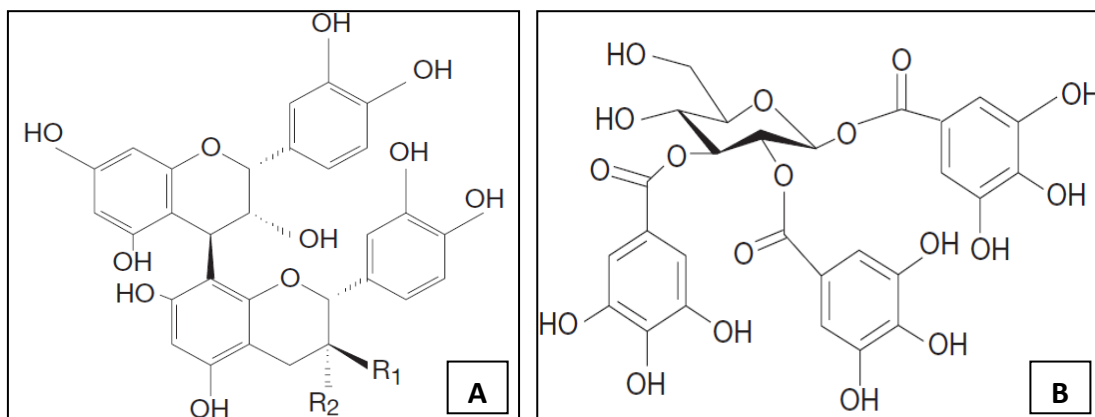


Figure 6 : Structure chimique (A) d'un tanin condensé (proanthocyanidine) et (B) d'un gallotanin (1,2,3-tri-O-galloyl-β-D-glucose) (Bruyne et al., 1999)

III. Rôle et intérêt des composés phénoliques

Le rôle des composés phénoliques est largement montré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et aussi vis-à-vis de leurs propriétés antioxydantes.

III.1. Les polyphénols et les maladies cardiovasculaires

Si les effets santé des polyphénols semblent concerner un large spectre de maladies chroniques, c'est bien vis à vis de la protection vasculaire que les données épidémiologiques, cliniques, pré-cliniques et mécanistiques sont les plus convergentes et convaincantes (Rodriguez-Matéos et al., 2014). Une récente méta-analyse des études prospectives sur cohortes rapporte une association inverse entre le niveau de consommation de flavonoïdes spécifiques (flavanones, anthocyanes, flavonols, flavanols, flavones) et la mortalité ou le risque de MCV (Wang et al., 2014). D'autres études ont montré que la consommation des flavanols du thé vert a un effet bénéfique sur le LDL-cholestérol tandis que celle de cacao riche en flavanols diminue la pression artérielle et améliore la fonction endothéliale, ceci dans des proportions associées à une réduction significative du risque cardiovasculaire global (Morand, 2013).

Il s'avère notamment que de fortes prises de quercétine et de kaempférol réduisent le taux de mortalité due à des accidents cardiaques de type ischémie, dans lesquels peuvent être mises en cause les plaques d'athérome (Knekt et al., 2002).

Les mécanismes d'action des polyphénols, impliqués dans la prévention de ce type de pathologies, incluent l'inhibition de l'oxydation des LDL et l'inhibition de l'agrégation des plaquettes (Scalbert et al., 2005).

III.2. Les polyphénols et cancer

Les propriétés anticancéreuses des polyphénols ont été mises en évidence dans de nombreuses études in vitro, utilisant des cultures cellulaires cancéreuses ou des animaux prétraités par des réactifs chimiques carcinogènes. Cependant, les données disponibles sur les effets des polyphénols vis-à-vis des cancers chez l'homme sont plus disparates.

Les polyphénols ont des effets protecteurs dans le développement de la néoplasie pulmonaire (Katiyar et al., 1993 ; Komori et al., 1993). En outre, ils sont capables d'inhiber la prolifération des cellules de carcinome pulmonaire et les métastases par différents mécanismes (Menon et al., 1995 ; Sazuka et al., 1995 ; Yang et al., 1998 ; Yuan et al., 2006). Il a été rapporté que les polyphénols du thé inhibent de manière synergique la tumorigénèse des poumons murins chimiquement induits et la croissance des cellules H1299 et H460 du cancer

du poumon, éventuellement par une apoptose améliorée (Lu et al.,2008). Un autre rapport récent montre que l'épicatechine améliore l'induction de l'inhibition de la croissance et de l'apoptose dans les cellules cancéreuses du poumon humain par la curcumine (Saha et al.,2010).

La croissance cellulaire peut être inhibée également par d'autres mécanismes, à savoir: la stabilisation du collagène, l'altération de l'expression des gènes et la réduction des radicaux libres (Landolfi et al.,1984). En effet, la catéchine augmente la résistance du collagène et inhibe l'activité de la collagénase (Makimura et al.,1993).

Les flavonoïdes ont montré des effets protecteurs contre les cancers de la prostate, du côlon et du poumon (Duthie et al., 2000).

III.3. Les polyphénols et effet antiallergique

Les effets antiallergiques sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca^{2+} -dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles.

Di Carlo, 1999 a étudié les effets antiallergiques de la quercétine, il a trouvé que ce flavonoïde exerce ses effets, en inactivant l'enzyme ATPase Ca^{2+} dépendante, de même l'action de la quercétine est supérieure à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme.

III.4. Les polyphénols et le diabète

Les glucides provenant des aliments ou des repas sont les principales sources d'hyperglycémie et d'hyperinsulinémie chez les diabétiques. Le potentiel des polyphénols alimentaires pour lutter contre l'hyperglycémie est un aspect très intéressant.

Les effets hypoglycémiques et hypolipémiants des polyphénols alimentaires sur le diabète de type 2, peuvent être résumés comme suit: protection des cellules pancréatiques contre la toxicité du glucose, effet anti-inflammatoire et antioxydants, inhibition de la digestion de l'amidon par inhibition des enzymes de digestion, et amélioration de la résistance à l'insuline (Xiao JB and Högge ,2015).

Hanhineva et al., 2010 ont résumé l'influence des polyphénols sur le métabolisme des glucides et ont illustré des mécanismes possibles comme la stimulation de la sécrétion d'insuline, l'inhibition de la digestion des glucides, l'absorption du glucose et la modulation de sa libération. Plus récemment, Williamson, 2013 a examiné de façon exhaustive les

polyphénols alimentaires montrant qu'ils influencent l'absorption du sucre et sa digestion par l'inhibition des enzymes et des transporteurs de son métabolisme.

Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase (Chaudhry, 1983).

Ong et Khoo, 2000 ont rapporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques.

III.5. Les polyphénols et l'inflammation

L'inflammation est la réponse immunitaire de l'organisme à une agression par des agents pro-inflammatoires d'origine virale, bactérienne ou autre (par exemple, les lipoprotéines oxydées, marqueurs du stress oxydant). L'inflammation est précisément régulée afin de limiter les altérations des biomolécules de l'hôte. Cependant, une régulation inappropriée de ce phénomène peut conduire à un état inflammatoire chronique.

Aggarwal et Shishodia (2006) supposent que les composants actifs des phytochimiques alimentaires (comme la curcumine, le resvératrol, la capsaïcine, les catéchines, les vitamines, le bêta-carotène et les fibres alimentaires) suppriment les processus inflammatoires, les voies de signalisation cellulaire modérées, la prolifération, l'apoptose, l'équilibre redox et semblent le plus souvent être protecteurs contre le cancer, les troubles neurodégénératifs et les maladies cardiovasculaires. Les polyphénols peuvent exercer leurs propriétés anti-inflammatoires à plusieurs niveaux, via la modulation des voies de signalisation de la protéine kinase activées par un mitogène (MAPK) et la transcription NF- κ B et AP-1, l'inhibition de la production de cytokines inflammatoires et de chimiokines, la suppression de l'activité de la cyclooxygénase (COX) et diminuant ainsi la production d'espèces réactives d'oxygène et d'azote (ROS/RNS) (Balázs Veres, 2012).

Les flavonoïdes sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (Middleton et Elliott., 1996), ils sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T (Namgoong et al., 1994).

IV. Le stress oxydatif

IV.1. Définition

Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (Figure 7) (Boyd et al., 2003).

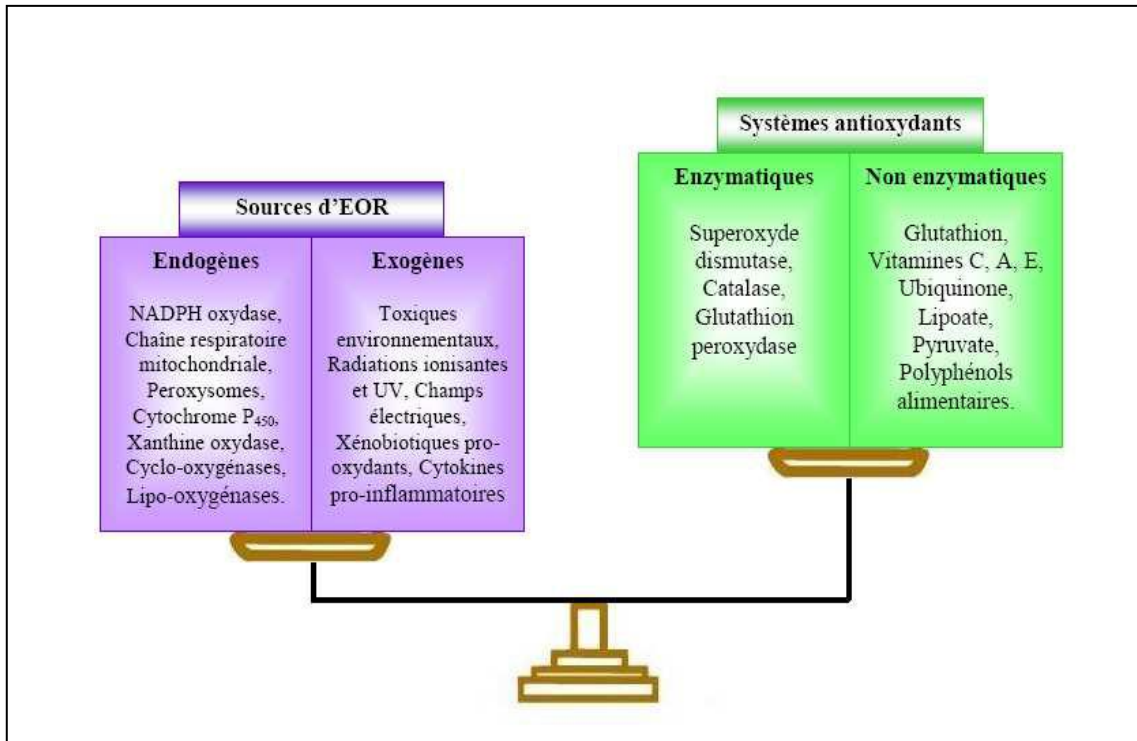


Figure 7 : Déséquilibre de la balance entre oxydant et antioxydant (Stress Oxydant) (Boyd et al., 2013)

IV.2. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont omniprésents dans notre corps et sont générés par des processus physiologiques normaux y compris le métabolisme aérobie et de réponses inflammatoires, pour éliminer les microorganismes pathogènes envahisseurs (Govindarajan et al., 2005).

Un radical libre est encore définies comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés (Jacques et André., 2004), Parce que les radicaux libres peuvent également causer des dommages cellulaires, plusieurs moyens de défense ont évolué pour protéger nos cellules contre les radicaux et pour réparer les dommages de l'ADN (Hussain et al., 2003).

IV.2.1. Le radical superoxyde

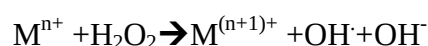
Ion superoxyde ($O^{\cdot 2-}$): Il est issu de la réaction de l'oxygène avec un électron, au niveau de la chaîne de transport d'électrons de la membrane mitochondriale au cours de la

lutte des leucocytes contre les bactéries et les virus. Il est dangereux surtout par le fait qu'il participe à la formation du radical hydroxyle (OH). L'ion superoxyde est neutralisé par la SOD (superoxyde-dismutase) qui se trouve sous trois formes (Mn-SOD, Fe-SOD, Cu-SOD) (Chaouche,2014).

Le radical superoxyde est peu réactif, mais il entre comme agent oxydant dans la majorité des réactions (Antwerpen, 2006).

IV.2.2. Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle (OH) est une espèce radicalaire hautement réactive. Il est principalement formé lors de réactions d'ions métalliques avec le peroxyde d'hydrogène, ces réactions sont décrites sous le nom de réactions de Fenton:



Le fer peut également catalyser la transformation de l'anion superoxyde en présence de peroxyde d'hydrogène avec production de radical hydroxyle selon la réaction dite Haber-Weiss. Cette réaction est relativement lente et moins courante que la précédente dans les tissus vivants (Jacques et André, 2004).



Il est très puissant et attaque toutes les cibles cellulaires (acides nucléiques, protéines, les acides gras poly-insaturés et les glucides) (Gutteridge, 1994, Bergendi et al. 1999). Le radical hydroxyle est neutralisé par la GPX (Glutathion Peroxydase), le sélénium, les vitamines B1 et B2 (Castro et Freeman, 2001).

IV.2.3. Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂):

Il provient d'une réaction entre deux ions superoxyde (O₂^{•-}). Il endommage les membranes cellulaires et est neutralisé par la GPX (glutathion peroxydase), le sélénium et la L-cystéine (Chaouche, 2014).

IV.3. Production des espèces réactives de l'oxygène

IV.3.1. Production endogène

Production endogène Les ERO peuvent apparaître au cours de six types de réaction biochimique (Oldham et al., 1998 ;Chaouche,2014):

- La respiration : Au niveau des mitochondries, au cours du transfert d'électron dans la chaîne respiratoire, le radical superoxyde (O₂^{•-}) est produit.
- Les cellules phagocytaires, polynucléaires et macrophages, possèdent une enzyme membranaire, la NADPH oxydase, qui est spécialisée dans la fabrication du radical superoxyde, pour tuer les bactéries ou les virus.

- La xanthine oxydase est une enzyme ubiquitaire impliquée dans le catabolisme de l'ATP. Elle est impliquée dans la production du radical superoxyde.
- Les ions métalliques comme le fer et le cuivre, sont de remarquables promoteurs de processus radicalaires. Ils transforment H_2O_2 en radical hydroxyle ($OH^\bullet$), encore plus toxique,
- Des radicaux libres sont produits au cours de la biosynthèse des prostaglandines et des leucotriènes ainsi que durant le catabolisme de certains xénobiotiques.
- Des cellules sont capables de produire du monoxyde d'azote ($NO^\bullet$) à partir de l'arginine et l'oxygène, dans une réaction catalysée par la NO-synthase. À forte concentration, le monoxyde d'azote réagit avec un radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) pour former un puissant oxydant, le peroxynitrite ($ONOO^-$). En outre, le peroxynitrite peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants ($NO_2^\bullet$, $OH^\bullet$, etc.).

De même, les radicaux libres sont produits *in vivo* sous l'action de plusieurs systèmes biochimiques tel que, les cellules neuronales, endothéliales et phagocytaires (macrophages). Des radicaux libres sont également produits sous l'influence d'autres facteurs endogènes, notamment le stress intellectuel ou thermique ([Ansari, 1997](#) ; [Valko et al., 2006](#)).

IV.3.2. Production exogènes

Des facteurs exogènes liés à l'environnement ou au mode de vie sont également à l'origine d'une augmentation du stress oxydant dans l'organisme par l'accumulation de radicaux libres dans l'organisme.

Ces facteurs environnementaux incluant des agents cancérigènes non-génotoxiques peuvent directement ou indirectement être impliqués dans la génération de radicaux libres (xénobiotiques, activation des leucocytes). L'exposition prolongée au soleil, ainsi les rayonnements UV induisent la synthèse de $O_2^\bullet$, $OH^\bullet$, $1O_2$ et d' H_2O_2 l'intermédiaire d'agents photo sensibilisants ([Martínez-Cayuela, 1995](#) ; [Chen et al., 2012](#)).

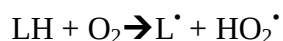
Des toxiques tels que monoxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO_2) présents dans notre mode de vie (tabagisme, radiations ionisantes, champs électriques, polluants industriels), ainsi qu'une alimentation «chimiquée» (raffinée, riche en graisses saturées et en sucre, consommation d'alcool...), sont autant d'éléments favorisant la genèse de radicaux libres ([Mena et al., 2009](#)) qu'une alimentation déséquilibrée (carences en vitamines et oligo-éléments).

IV.4. Action néfaste des ERO dans les tissus biologiques

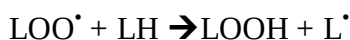
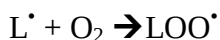
IV.4.1. Le stress oxydant et les lipides

Les peroxydations lipidiques vont altérer la structure des cellules animale ou végétale, et sont responsables de la dégradation organoleptique des aliments. Cette peroxydation lipidique se déroule en trois phases (Penfield, 1990):

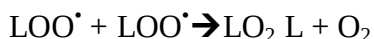
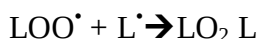
- L'initiation où se forme un premier radical libre «L•». L'arrachement du proton « H+ » de la chaîne d'un acide gras «LH», qui est un composé radicalaire très réactif vis-à-vis de l'oxygène.



- La propagation où l'oxygène fixé donne un radical peroxy «LOO•» qui réagit avec une autre molécule d'acide gras « LH » et conduit à un hydroperoxyde «LOOH» et un néo radical libre qui va à son tour s'oxyder.



- La terminaison, entraînée par la réaction de deux radicaux pour donner une espèce moléculaire ou par intervention d'un composé antioxydant, dit «briseur de chaîne».



Ainsi, la peroxydation lipidique revêt une importance toute particulière dans la physiopathologie de l'athérosclérose et le rôle des ROS apparaît comme majeur, validant la "théorie oxydative de l'athérosclérose" proposée il y a une vingtaine d'années (Steinberg, 1989).

IV.4.2. Le stress oxydant et les protéines

Dans les conditions physiologiques les cibles majeures des ERO sont les acides aminés soufrés (cystéine, méthionine) (Finkel, 2000), les acides aminés basiques (arginine, lysine) et les acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) (Huggins et al., 1993). Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases. Les dérivés de l'oxydation des protéines joueraient un rôle dans le processus de la mort cellulaire et le vieillissement de l'organisme (Valko et al. 2007) et la maladie d'alzheimer (Inoue et al., 2006).

IV.4.3. Le stress oxydant et l'ADN

L'acide désoxyribonucléique est une molécule très sensible au stress oxydant. La plupart des ERO sont en effet capable de réagir avec l'ADN qui provoque des modifications des bases, cassures simples, doubles de la chaîne d'ADN et pontages avec des protéines, conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer (Favier 2003 ; Valko et al. 2007).

Dans l'ADN, les télomères sont indispensables pour maintenir l'intégrité du génome. Ils sont associés à plusieurs protéines vulnérables à l'attaque des ROS, et dont le dysfonctionnement jouerait un rôle dans le vieillissement cellulaire (Dröge 2002 ; Valko et al. 2007).

V. Les antioxydants

Un antioxydant est défini comme une substance qui, ajoutée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, est capable de ralentir ou d'inhiber le phénomène d'oxydation. Cette définition peut être élargie et le terme "antioxydant" englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive (Park et al., 2001).

Certains antioxydants sont fabriqués par le corps comme les enzymes, d'autres proviennent de l'alimentation qui a une plus grande hétérogénéité comme les vitamines, les minéraux et les métabolites secondaires (les composés phénoliques). Il y a actuellement, un regain d'intérêt pour les composés phytochimiques comme sources d'antioxydants naturels. L'objectif est de les utiliser dans les aliments et les préparations pharmaceutiques afin de remplacer les antioxydants de synthèse en raison de leur activité suspectée en tant que promoteurs de la carcinogenèse ainsi que d'un rejet général des consommateurs d'additifs alimentaires synthétiques (Sanab et al., 2001).

V.1. Les défenses antioxydantes

Cette production physiologique d'ERO est régulée par des systèmes de défense composés d'enzymes (Figure 8) (superoxyde dismutases (SODs), catalase, glutathion peroxydases (GPx's), couple thiorédoxine/thiorédoxine réductase, hèmeoxygénase, peroxyrédoxine...), de molécules antioxydantes de petite taille (caroténoïdes, vitamines C et E, glutathion, acide urique, bilirubine, acide lipoïque, ubiquinone...) Certains oligo-éléments comme le cuivre, le zinc, le sélénium sont indispensables pour l'activité des enzymes antioxydantes (Cu,Zn-SOD, MnSOD, SeGPx) (Pincemail et al., 2002).

D'autres sont des dérivés phénoliques d'origine synthétiques, le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), les esters de l'acide gallique (gallate de propyle, gallate d'octyle et gallate de dodécyle) (Pokorny et al., 2001).

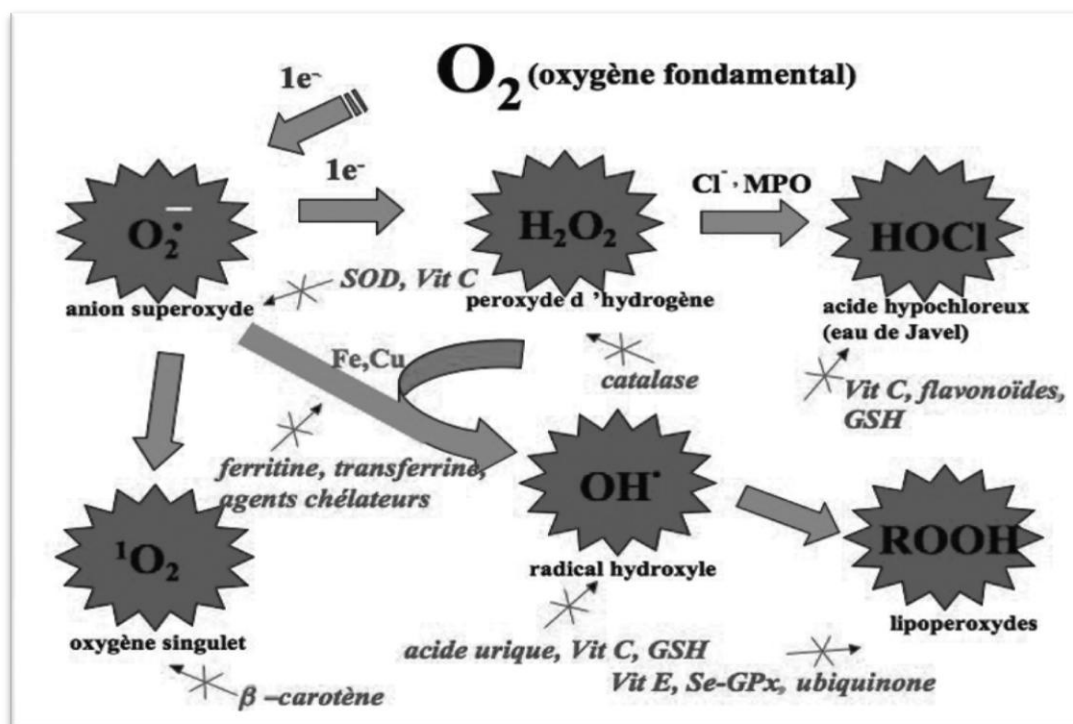


Figure 8 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydantes. (Pincemail et al., 2002).

2ème Partie: matériels et méthodes

I. Matériel biologique

La microalgue *Nannochloropsis gaditana* est produite en masse dans des photobioréacteurs plats par la société partisano Biotech Algérie établie à Sidi Bel Abbès à l'ouest algérien. La microalgue nous a été fournie sous forme lyophilisée pour les différentes utilisations (Figure 09).



Figure 9 : *Nannochloropsis gaditana* lyophilisée

II. Analyses physico-chimiques

II.1. Taux d'humidité

Pour déterminer la teneur en eau, on a introduit dans chaque creuset en porcelaine de tare connue 5g d'échantillon de microalgue représentant ainsi le poids P. L'ensemble est mis dans une étuve (Memmert UF 110) réglée à $105 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant trois heures. Une pesée est effectuée pour avoir un poids P1. L'opération est répétée jusqu'à obtention d'un poids constant (Audigie et al., 1982). La teneur en eau (%) est donnée par la formule suivante:

$$\text{Teneur en eau (\%)} = (P - P1) / M \cdot 100$$

- **P** : masse en g de la prise d'essai avant séchage.
- **P1** : masse en g de la prise d'essai après séchage.
- **M** : masse du matériel biologique.

A partir de la teneur en eau, on détermine le taux de matière sèche qui est donné par la formule suivante :

$$\text{Taux de matière sèche (\%)} = 100 - \text{teneur en eau (\%)}$$

II.2. Taux de cendres

Le principe consiste en une incinération d'un échantillon de poudre de microalgue à une température de 900°C dans un four à moufle (Heraeus Instrument UK). L'opération ne sera terminée que lorsque la couleur des résidus deviendra blanche grisâtre et qui se transformera en une couleur blanche après refroidissement (Audigie et al., 1982).

La teneur en cendres (%) est donnée par la formule suivante:

$$\text{Teneur en cendres (\%)} = (B - A) / M \cdot 100$$

- **B** : poids de creuset vide (g).
- **A** : poids de creuset + échantillon après l'incinération (g).
- **M** : poids de l'échantillon (g).

II.3. Détermination de la teneur en matières azotées totales ou protéines brutes

La teneur en protéines brutes est déterminée selon la méthode AOAC 981.10 qui fait appel à la méthode Kjeldahl réalisée sur trois étapes :

Minéralisation de la prise d'essai : environ 1 g de biomasse sèche dans un matras (ballon de minéralisation à long col), en présence de 20 ml d'acide sulfurique concentré et 2g de catalyseur mixte (sulfate de potassium et de cuivre) Le ballon est disposé sur la plaque de minéralisation, tel que son axe soit incliné par rapport à la verticale et sur son col un entonnoir dont le passage est fermé par une bille en verre. Le but de la minéralisation est de dégrader la matière organique azotée sous forme de sel d'ammonium ($M_{\text{Organique}} \rightarrow \text{NH}_4^+$) utilisant un appareil à cet effet, le Speed Digester k-425.

Distillation de l'ion ammoniac : après avoir ajouté environ 160 ml d'eau distillée et quelques gouttes de phénolphthaléine, la solution est transférée dans le matras de l'appareil de distillation qui est relié à un réfrigérant par son extrémité haute. Ainsi une neutralisation a lieu par aspiration automatique de la soude à 33% et à cause du barbotage de l'air chaud l'ammoniac s'évapore pour être condensé sur les parois du réfrigérant et par la suite se précipite dans la fiole de réception de l'appareil à distillation, contenant 20 ml d'acide sulfurique à 0.1N comme liquide de récupération. La vérification de la neutralité du distillat se fait au moyen de papier pH, si la réaction est alcaline, la distillation est poursuivie sur l'appareil Buchi Unit k-355.

Titrage de l'ion ammonium présent dans la fiole de réception, par NaOH 0.1 N.

La teneur en azote obtenue est exprimée en pourcentage de masse comme suit :

$$\text{Teneur en azote (\%)} = 0,014 \cdot T \cdot V / P_E \cdot 100$$

Avec :

- T la normalité de la solution d'acide sulfurique utilisé pour le titrage ;
- V le volume en millilitres de la solution d'acide sulfurique nécessaire pour arriver au point d'équivalence (fin de titration)
- P_E la masse en grammes de la prise d'essai
- La teneur en protéines brutes, exprimée en pourcentage de masse, se calcule en multipliant la teneur en azote par le facteur 5,95 (Lopez et al., 2010).

II.4. Dosage des sucres totaux

La méthode utilisée est celle de Fox et Robyt, 1991. Le principe repose sur les liaisons glycosidiques des sucres qui sont hydrolysées en milieu acide et à chaud en dérivés furfuriques qui se combinent facilement avec le phénol et donnent une coloration rougeâtre qui absorbe dans le visible (450-500 nm). Cette méthode permet de doser tous les glucides totaux d'un matériel biologique.

➤ Mode opératoire

1 g d'échantillon de *N. gaditana* est dispersé dans 10 ml de DMSO à 25% (v/v), et le mélange est ensuite incubé pendant 15 min au bain marie bouillant. Ce mélange (0.1 ml) est dilué dans 9.9 ml d'eau. A 0.5 ml de ce dernier on ajoute 0.5 ml de phénol (5%). Après homogénéisation, 2 ml de H_2SO_4 sont ajoutés, puis le mélange est incubé 30 min à température ambiante. La lecture est réalisée avec un spectrophotomètre (Shimadzu Scientific Instruments) Une gamme de glucose est réalisée dans les mêmes conditions que les échantillons (Annexe 01). Les essais sont faits en trois fois.

II.5. Teneur en matières grasses

Les lipides sont extraits en continu à l'hexane dans un appareil de Soxhlet. Ce dernier comporte 3 parties, respectivement de bas en haut, un ballon à col rodé, un extracteur recevant une cartouche et un réfrigérant à reflux. Environ 3g d'échantillon sont pesés dans une cartouche en carton poreux, après introduction de 150 ml de n-hexane pur dans le ballon à col rodé, la cartouche est déposée dans l'extracteur et les trois parties de l'appareil sont assemblées. L'hexane est alors porté à ébullition pendant 6h sur des plaques chauffantes jusqu'à obtention d'un maximum d'hexane dans l'extracteur. Le lipide extrait est mesuré après élimination du solvant en utilisant un évaporateur rotatif sous vide pour évaporer le n-hexane à 35°C pendant 60 minutes. La teneur en lipides est ainsi déduite (Sukarni et al., 2014).

Le taux de matière grasse est calculé par la formule suivante :

$$\text{MG (\%)} = \frac{P1-P2}{ME} \times 100$$

- MG% : Taux de la matière grasse.
- P1 : Poids du ballon après évaporation.
- P2 : Poids du ballon vide.
- ME : Masse de la prise d'essai.

III. Préparation des extraits éthanolique et méthanolique de *N. gaditana*

Les extraits éthanolique et méthanolique sont préparés à partir de 10g d'échantillons qui sont mis à macérer dans 100ml d'éthanol ou méthanol à 70% à la température ambiante, à l'abri de la lumière, pendant 24heures et sous agitation magnétique. Les extraits obtenus sont filtrés à l'aide de papier Whatman. Les opérations sont répétées une seconde fois sur le résidu. Les filtrats obtenus sont additionnés et évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif ([Heidolph instruments](#)) à une température de 60°C afin d'obtenir les extraits éthanolique et méthanolique de *N. gaditana* (EENg et EMNg) qui sont conservés à 4°C.

III.1. Calcul des rendements en extraits secs

Les rendements (Rdt) en extraits secs de la microalgue *N. gaditana* sont déterminés comme suit :

$$\text{Rdt \%} = [P1-P2/P3] \times 100$$

- P1: Poids du ballon après évaporation.
- P2: Poids du ballon vide.
- P3: Poids de la matière microalgale sèche de départ.

Les extraits secs sont repris, soit dans l'eau pour le dosage des composés phénoliques et l'activité anti-inflammatoire, soit dans le méthanol pour les dosages de l'activité antioxydante, soit dans le DMSO pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.

IV. Dosage qualitatif des métabolismes secondaires

IV.1 Dosage des polyphénols totaux

La méthode adoptée pour le dosage des polyphénols totaux est celle décrite par [Singleton et al. \(1999\)](#). Les polyphénols sont quantifiés par spectrophotométrie en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu qui est une solution de couleur jaune constituée d'un mélange de deux acides :

acide phosphotungstique et acide phosphomolybdique. Ce réactif est réduit lors de l'oxydation des phénols pour former un complexe bleu stable d'oxydes de tungstène et de molybdène (Ribéreau-Gayon, 1968). La coloration bleue produite, dont l'absorption maximale est au voisinage de 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits de *N. gaditana* (Boizot et Charpentier, 2006). La quantification des polyphénols est effectuée à l'aide d'une courbe d'étalonnage linéaire, réalisée dans les mêmes conditions que l'échantillon, en utilisant l'acide gallique comme standard (Annexe 01).

➤ Mode opératoire

Chaque extrait (0,4 ml) est mélangé à 2 ml de réactif de Folin-ciocalteu dilué (1:10) avec de l'eau distillée et 1,6 ml de Na_2CO_3 7,5%. Après 30 min d'incubation la densité optique des échantillons de couleur bleue est mesurée à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par g du poids du résidu sec de *N. gaditana* (mg EAG/g). Tous les essais sont reproduits trois fois.

IV.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes des extraits a été déterminée par spectrophotométrie selon la méthode décrite par Zhishen et al. (1999).

Le principe de la méthode colorimétrique repose sur la formation de complexes stables du chlorure d'aluminium (AlCl_3) avec les groupes cétoniques C-4 et C-3 ou le groupe hydroxyle C-5 des flavones et des flavonols (Figure 10). En outre, le chlorure d'aluminium forme des complexes avec les groupes ortho-dihydroxylés des cycles A ou B des flavonoïdes (Mabry et al., 1970) qui absorbent à 510 nm. Ce dosage est effectué en utilisant une gamme étalon de quercétine.

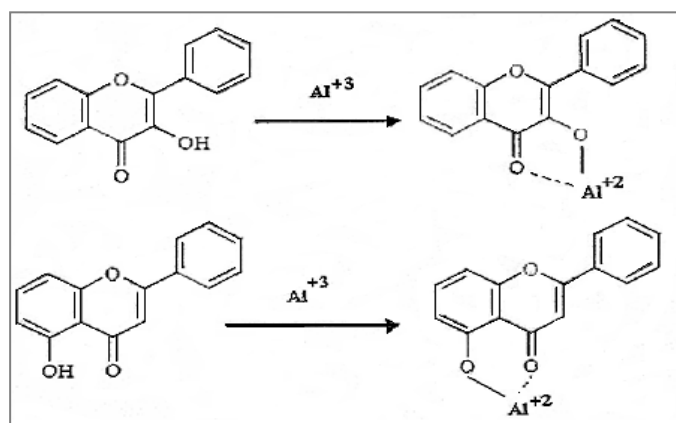


Figure 10: Complexation des flavonoïdes par le chlorure d'aluminium (Mabry et al., 1970)

➤ **Mode opératoire**

Dans un tube à essai 0,1 ml de chaque extrait dilué avec de l'eau distillée est mélangé à 0,2 ml de NaNO_2 à 5% et laisser au repos pendant 6 min. On ajoute 0,2 ml de AlCl_3 à 10% et l'ensemble est mélangé. Après 6 min, on ajoute 2 ml de NaOH à 4%. Le mélange est ensuite additionné de 5 ml d'eau distillée. L'absorbance est mesurée à 510 nm contre un blanc préparé en utilisant un spectrophotomètre UV-VIS (Shimadzu Scientific Instruments). La teneur en flavonoïdes est calculée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions opératoires avec une gamme de concentrations de quercétine (Annexe 01).

Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents quercétine par gramme de résidu sec (mg EQ/g de résidu sec).

IV.3. Dosage des tanins condensés

Les tanins sont dosés selon la méthode colorimétrique de Folin Denis, décrite par Joslyn, 1970.

➤ **Principe**

Il est basé sur la réduction de l'acide phosphomolybdique et tungstique en milieu alcalin, en présence de tanins pour donner une coloration bleue dont l'intensité est mesurée à 760 nm sous 1 cm d'épaisseur.

➤ **Mode opératoire**

Dans une fiole de 100 ml, on introduit :

- 75 ml d'eau distillée ;
- 1 ml de chaque extrait ;
- 5 ml de réactif de Folin Denis ;
- 10 ml de la solution saturée de CO_3Na_2

Cette solution saturée est préparée à partir de 43,75 g de carbonate de sodium dissous dans 100 ml d'eau chaude (70° à 80°C) après refroidissement la solution est filtrée puis ajustée à 125 ml. Après agitation mécanique, la préparation repose pendant 30 minutes, la mesure de la densité optique est faite à 760 nm.

Une gamme étalon d'acide tannique est préparée dans les mêmes conditions avec des concentrations allant de 0 à 0,1 g/l.

Un témoin avec de l'eau distillée est réalisé dans les mêmes conditions.

IV.4. Dosage des tanins hydrolysables

La méthode de [Mole et Waterman \(1987\)](#) est basée sur une réaction avec le chlorure ferrique. Le mélange de l'extrait tannique avec le réactif de chlorure ferrique provoque la coloration rouge violette du complexe, d'où la formation d'ions Fe^{3+} ([Bate-Smith, 1973](#)). Une solution de FeCl_3 0,01 M est mélangée avec une solution de HCl 0,001 M (v/v). Ajouter 3,5 ml de ce réactif dans 1 ml de chaque extrait.

Après 15 secondes, lire l'absorbance à 660 nm. Les tannins hydrolysables sont exprimés par la relation:

$$T\% = DO \left(\frac{M \cdot V}{E_{\text{moles P}}} \right)$$

- DO: densité optique,
- E moles: 2169 d'acide gallique,
- M: 300,
- V: volume d'extrait utilisé,
- P: poids de l'échantillon,
- T %: Pourcentage de tanins hydrolysables.

V. Détermination des activités biologiques

V.1. Méthodes de détermination de l'activité antioxydante

V.1.1. Piégeage du radical DPPH

Le $\text{DPPH}^\cdot$ est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité de l'analyse. A température ambiante, le radical $\text{DPPH}^\cdot$ présente, en solution alcoolique, une intense coloration violette qui disparaît au contact d'une substance donneuse de protons ([Figure 11](#)). Cette décoloration met en évidence le pouvoir antioxydant d'un échantillon par sa capacité à piéger le radical libre et se traduit par une diminution de l'absorbance à 517 nm ([Masuda et al., 1999](#)).

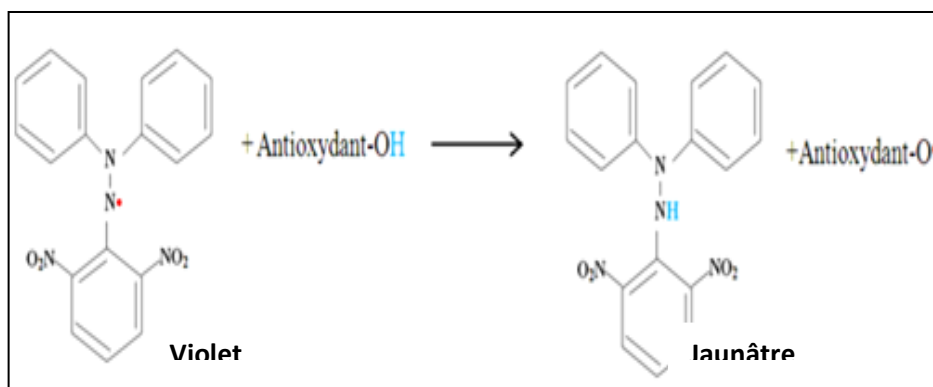


Figure 11: Réduction du radical DPPH ([Masuda et al., 1999](#)).

➤ Mode opératoire

L'activité de piégeage des radicaux libres des extraits de *Nannochloropsis gaditana* est déterminée selon [Sanchez-Moreno, et al., \(1998\)](#). Pour la mesure de l'activité, une prise d'essai de 50 µl d'extraits à différentes concentrations est mise en présence de 1,95 ml de la solution méthanolique de DPPH à 25 mg/l. L'absorbance est mesurée à 515 nm après 30 minutes d'incubation à l'abri de la lumière et à 37°C contre un témoin négatif (sans extrait). L'antioxydant de synthèse utilisé est l'acide ascorbique. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition, calculé suite à la diminution de l'intensité de la coloration du mélange, selon la formule.

$$PI = (D.O \text{ témoin} - D.O \text{ extrait} / D.O \text{ témoin}) \times 100$$

- PI: pourcentage d'inhibition.
- D.O témoin: absorbance du témoin négatif.
- D.O extrait: absorbance de l'extrait

Pour chaque extraits nous avons déterminé la valeur EC50 qui est la concentration de l'extrait responsable de 50% d'inhibition des radicaux DPPH ([Bidie et al., 2011](#)).

Graphiquement, la concentration effective 50 (EC50) est calculée par régression linéaire correspondant à celle des antioxydants nécessaires pour réduire de moitié la quantité de DPPH présente initialement dans le milieu ([Blois, 1958](#) ; [Brand-Williams et al., 1995](#)).

V.1.2. Pouvoir réducteur du fer

La méthode de FRAP est basée sur la réaction de réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}) par un antioxydant. La réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) à la couleur bleue-vert du fer ferreux (Fe^{2+}). L'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm ([Chung et al., 2002](#)). En d'autre terme, le système $FeCl_3/K_3Fe(CN)_6$ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination semi quantitative des concentrations de polyphénols qui participent à la réaction redox.

Pour le test de FRAP, nous avons suivi la technique de ([Oyaizu et al., 1986](#)) qui consiste à prélever 0,5 ml de chaque extrait à différentes concentrations et le mélanger à 1.25 ml d'une solution tampon phosphate à 0,2 M (pH= 6,6) et 1,25 ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. Le tout est incubé à 50°C pendant 20 min, puis refroidi à la température ambiante. 2,5 ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3000 tr/min pendant 10 min. 1,25 ml du

surnageant sont ajoutés à 1,25 ml d'eau distillée et 250 µl d'une solution de chlorure de fer (FeCl_3) à 0,1%. La lecture des absorbances se fait par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 700nm. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard, l'acide ascorbique dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons.

V.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Les différents extraits de microalgue sont testés sur un panel de micro-organismes comprenant des bactéries et une levure (Tableau 02) qui nous ont été fournis par le laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques d'Alger.

Tableau 02: Description et pouvoir pathogène des souches testées (bactéries et levure).

Type de micro-organismes	Espèces	Références	Pouvoir pathogène
Bactéries Gram-	<i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella abony</i> <i>Bordetella brauchiseptica</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 8739 ATCC 9027 ATCC 9617 ATCC 9027	Gastro-entérite et infection urinaire Fièvre paratyphoïde et TIA Une pneumonie Infection nosocomiale
Bactéries Gram+	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6538 ATCC 10240 ATCC 6633	Intoxication alimentaire contaminant occasionnel Infection alimentaire
levure	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Infections fongiques (digestive et gynécologique)

V.2.1 Préparation des extraits

Deux extraits sont testés dans cette partie, l'EENg et l'EMNg

Les méthodes d'extraction sont présentées précédemment et les solutions des extraits sont préparées dans le Diméthylsulfoxyde (DMSO) à 1%.

L'activité antimicrobienne a été effectuée avec les deux extraits à des concentrations 2,5mg/ml et 5mg/ml.

V.2.2. Préparation des suspensions microbiennes

Les colonies qui ont été bien isolées à partir des cultures jeunes sur milieu gélose nutritive incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures sont transférées dans des tubes contenant de l'eau physiologique stérile (0,9% NaCl), afin de préparer des suspensions ayant une turbidité équivalente au standard McFarland 0.5 ce qui correspond à $1-2 \times 10^8$ UFC/ml pour les bactéries ($\text{D.O} = 0.08$ à $0.1 / \lambda = 625\text{nm}$) et $1-5 \times 10^6$ UFC/ml pour la levure *C. albicans*

(D.O= 0.12 à 0.15 / $\lambda = 530$ nm) L'inoculum peut être ajusté en ajoutant de la culture si la DO est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile si elle est trop forte (Aboun et al., 2001 ; Aboun et al., 2008 ; Abi-ayad, 2009).

La technique utilisée pour étudier l'effet des extraits de *N. gaditana* est celle de la diffusion sur milieu solide (par puits : contact direct).

V.2.3 Ensemencement des milieux de cultures sur boîtes de Pétri et réalisation des puits

Cette méthode suit pratiquement le même principe de l'antibiogramme décrit par Kirby-Bauer (1960) et standardisée par le comité national des normes pour laboratoires cliniques. Elle peut prévoir avec certitude l'efficacité *in vivo* du produit en question (Prescott et al., 2003 ; NCCLS, 2003).

Elle est basée sur la diffusion des substances à tester qui sont imprégnées dans des puits sur un milieu solide ensemencé avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre ces substances et le microorganisme cible. L'effet du produit antibactérien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition (Hellal., 2011).

➤ Mode opératoire

20 ml des milieux sont coulés dans des boîtes de pétri de 90mm de diamètre et l'épaisseur doit être impérativement de 4 mm. Le milieu est laissé se solidifier sur une surface froide dans des conditions aseptiques. Il faut éviter que des gouttelettes d'eau se forment à la surface de la gélose, phénomène pouvant altérer les qualités de diffusion sur le milieu.

L'ensemencement est fait par écouvillonnage en stries sur toute la surface du milieu en 3 reprises en faisant tourner la boîte de pétri de 60° après chaque application. L'inoculum doit être bien réparti sur la surface de la gélose afin d'obtenir une bonne reproductibilité des diamètres de la zone d'inhibition.

Avec les bactéries à Gram négatif, les inoculum trop lourds sont à éviter en prenant soin d'essorer l'excès de liquide sur l'écouvillon en le pressant légèrement à l'intérieur du tube avant l'ensemencement (EUCAST, 2010).

Après l'ensemencement et le séchage des boîtes de pétri, les puits sont comblés avec les extraits de microalgue. Et les semences sont mises à incuber à 37°C pendant 24 heures pour les espèces bactériennes et 48 h pour la levure, il est recommandé de ne pas la raccourcir ou l'allonger mais souvent des résultats satisfaisants peuvent être obtenus dès la 6^{ème} heure (EUCAST, 2010).

Pour la lecture, la bordure de la zone d'inhibition correspond à une inhibition complète de la culture observée à l'œil nu (Janakat et al., 2005).

les tests ont été répétés 3 fois.

➤ **Lecture des résultats**

L'activité antibactérienne est considérée comme positive à partir d'un diamètre supérieur à 6 mm (Parck et al., 2006 ; Nath et al., 2008 ; Rahmoun, 2009). Ce produit peut avoir une:

- Très forte activité : diamètre = 21-29 mm
- Moyenne activité : diamètre=10-15mm
- Petite activité : diamètre =9 mm

raccourcir ou l'allonger mais souvent des résultats satisfaisants peuvent être obtenus dès la 6^{ème} heure (EUCAST, 2010).

Pour la lecture, la bordure de la zone d'inhibition correspond à une inhibition complète de la culture observée à l'œil nu (Janakat et al., 2005).

Lire les géloses Mueller Hinton à l'envers sur un fond noir avec une lumière réfléchissante (Eucast, 2010). La mesure du diamètre d'inhibition est la moyenne de trois mesures. les tests ont été répétés 3 fois.

➤ **Lecture des résultats**

L'activité antibactérienne est considérée comme positive à partir d'un diamètre supérieur à 6 mm (Parck et al., 2006 ; Nath et al., 2008 ; Rahmoun, 2009). Ce produit peut avoir une:

- Très forte activité : diamètre = 21-29 mm
- Moyenne activité : diamètre=10-15mm
- Petite ou pas d'activité : diamètre =9 mm

V.3. Détermination de l'Effet anti inflammatoire de l'extrait éthanolique de *N. gaditana*

L'étude in vivo a été conduite conformément aux lignes directrices de l'International Association for the Study of Pain (IASP), Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals ([Zimmermann, 1983](#)),

V.3.1. Conditions d'adaptation des rats Wistar

Nous avons utilisé dans le cadre de cette étude 18 rats males Wistar ayant un poids variant entre 160 et 200g et provenant de l'institut Pasteur d'Alger. Ils sont hébergés dans des cages en plastique transparentes d'une longueur de 55 cm, d'une largeur de 33 cm et d'une hauteur de 19 cm. Les animaux ont été randomisés par groupe de six rats par cage en polypropylène où ils ont accès libre à l'eau et à l'alimentation.

Les animaux ont bénéficiés d'une période d'adaptation de 7 jours avant leur utilisation. L'aliment standard sous forme bâtonnets est composé de maïs, de tourteaux de soja, d'issus de meunerie et d'un complexe minéralo-vitaminique. La composition chimique globale est de 55% de glucides, 18% de protéines brutes, 3.4% de matière grasse brute, 3% de cellulose brute, 4.9% de cendre brute, 14% d'humidité et 1.7% de vitamines. Cet aliment nous a été fourni par l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) d'Alger. La température de l'animalerie est comprise entre 20 et 25°C avec une photopériode de 12h de lumière/12h d'obscurité). Les rats sont mis à jeun une nuit avant l'administration des produits ([Figure 12](#)).



Figure 12 : Rats wistar

V.3.2. Induction de l'inflammation par la carragénine et l'activité anti inflammatoire

Pour évaluer l'effet anti-inflammatoire de l'extrait éthanoloïque de la microalgue *N. gaditana*, un modèle d'inflammation aiguë est utilisé. L'œdème peut être provoqué par plusieurs agents phlogogènes tels que le formol, l'ovalbumine, le kaolin, la carragénine... Pour cette étude, la carragénine est retenue pour induire l'inflammation.

L'étude expérimental de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait est réalisée selon la méthode décrite par Winter et al., 1962 et selon laquelle l'inflammation est induite par injection de carragénine au niveau de la voute plantaire de la patte postérieure gauche du rat (Figure 14). A la suite de cette agression tissulaire, une réaction vasculaire se développe rapidement. Elle se traduit par une étape très brève de vasoconstriction artériolaire, suivie par une vasodilatation des petits vaisseaux. Celle-ci entraîne une rougeur, un gonflement, et une augmentation de la chaleur, locales. L'œdème causé par cet agent phlogogène se traduit en volume mesuré par un pied à coulisse ce qui permet de suivre l'évolution du processus inflammatoire (Gentili et al., 1997). Aussi des analyses d'autres paramètres inflammatoires sériques sont effectuées.

Pour cette étude, Les 18 rats utilisés, sont mis à jeune pendant 16 heures avant de commencer l'expérimentation, ils sont répartis en 3 lots :

Le lot témoin du NaCl reçoit une dose unique par voie intraveineuse au niveau de la veine caudale (NaCl à 0,9%) (Figure 13),

Lot traité par l'extrait éthanoïque de *N. gaditana* (l'extrait présente les meilleurs constituants en composés antioxydants, est retenue) reçoivent une injection par voie intraveineuse à une concentration de 500mg/kg ;

Le lot témoin de référence reçoit du Diclofénac à 5mg/kg par la même voie d'injection décrite pour les deux lots.

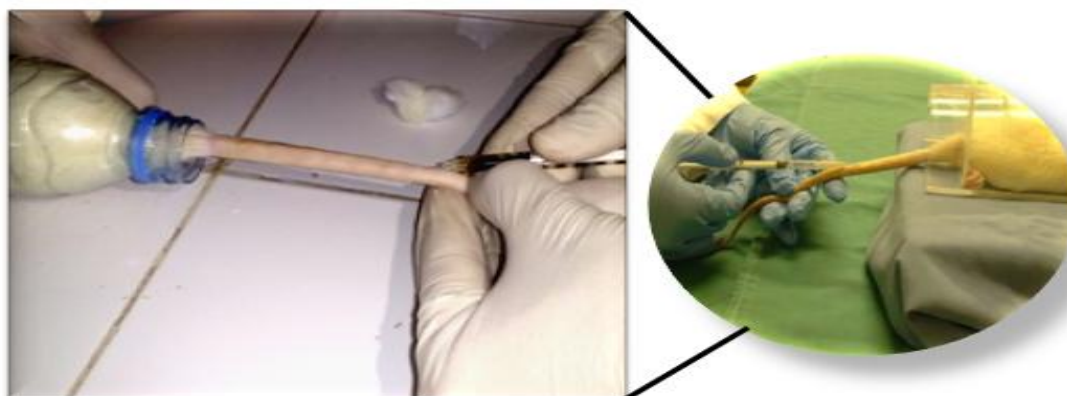


Figure 13 : Injection au niveau de la veine caudale de l'extrait de *N. gaditana*

Trente minutes après l'administration de l'eau physiologique, de l'extrait éthanoïque de microalgue et de Diclofenac, 100 μ l de suspension de carragénine à 1% dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%) est injectée dans la voute plantaire de la patte postérieure gauche pour provoquer l'inflammation (Winter, 1962 ; Epa et al., 2015).

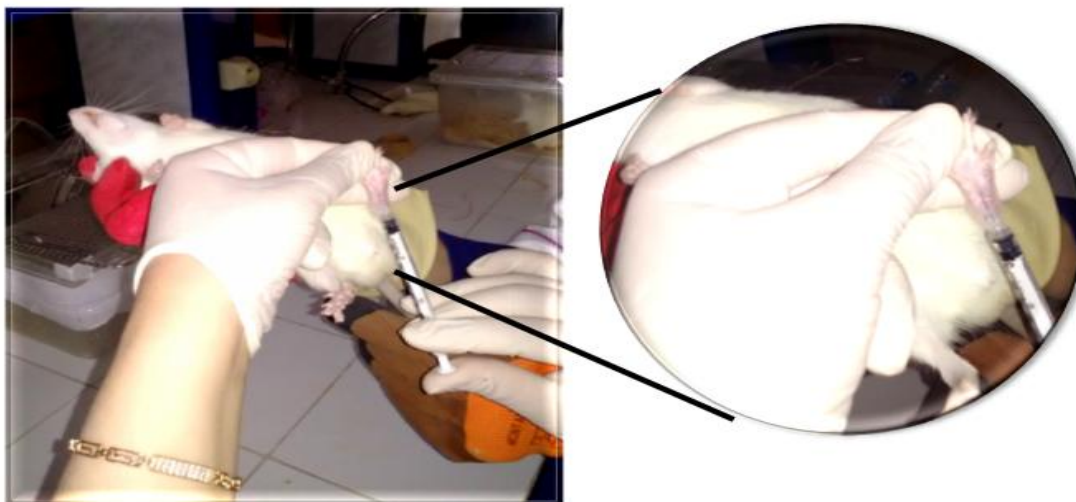


Figure 14: Injection de carragénine au niveau de la région sub-plantaire de la patte gauche du rat Wistar

IV.3.3. Mesures des œdèmes des pattes enflammées

Le suivi de l'évolution de l'œdème se fait par mesure de l'épaisseur de la patte traitée par la carragénine (Figure 15) et ceci initialement à temps 0 (V_0), à 3h, et 6h après injection de la carragénine 1% (Winter et al., 1962 ; Elion Itou et al., 2014).



Figure 15: Mesure des épaisseurs des pattes traitées (œdèmes)

Une diminution du volume de l'œdème est considérée comme effet anti-inflammatoire de l'extrait étudié. Ensuite la détermination du pourcentage d'inhibition de l'œdème (% PI)

permet d'évaluer le potentiel anti-inflammatoire de l'extrait de *N. gaditana* et de le comparer à celui du produit de référence selon la formule suivante (Elion Itou et al, 2014) :

$$\% \text{ PI} = \frac{[(V_t - V_0) \text{ témoin} - (V_t - V_0) \text{ traité}]}{(V_t - V_0) \text{ témoin}} \times 100$$

- V_0 : représente le volume de la patte à $T=0$ (avant injection de la carragénine).
- V_t : représente le volume de la patte à trois heures et six heures.

Une réduction du volume de l'œdème par rapport au lot témoin a été considérée comme effet anti-inflammatoire de l'extrait testé.

V.3.4. Sacrifice et prélèvement du sang

A la fin de l'expérimentation (après 6h), les rats sont anesthésiés au chloroforme dans une cloche en verre. Le sang est prélevé soit par ponction cardiaque directement, soit par ponction au niveau de l'aorte abdominale (Figure 16). L'avantage de ces techniques est la possibilité de collecter du sang stérile et aussi de prélever le maximum de sang. (Kraus. 1980 ; Weiss et al., 2000).

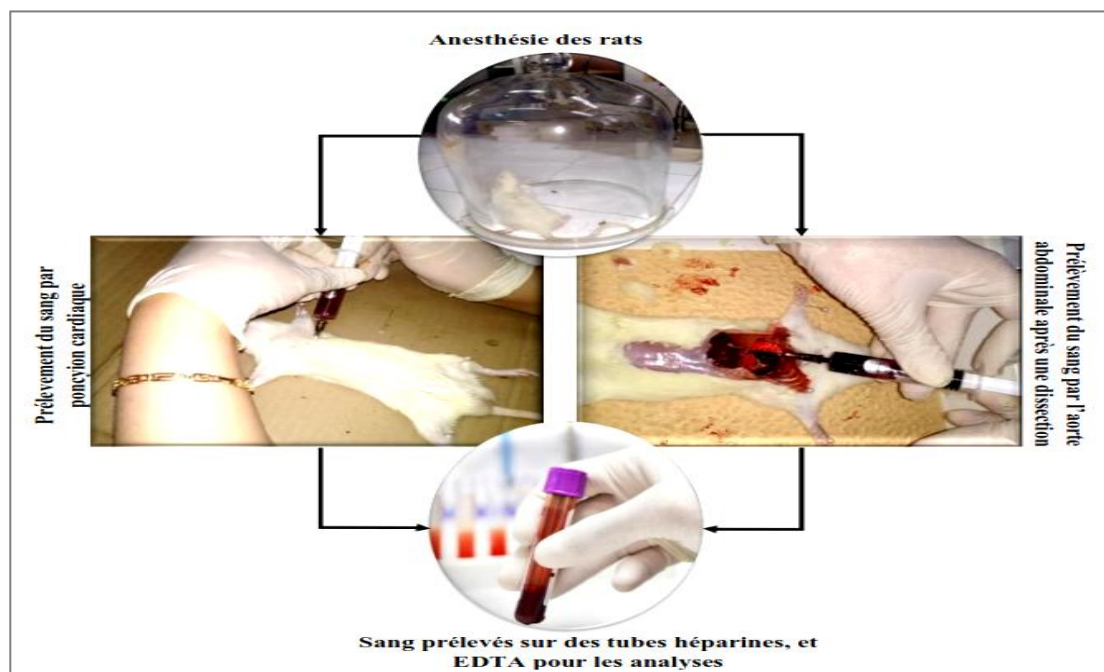


Figure 16 : prélèvement du sang par ponction cardiaque et par ponction dans l'aorte abdominale

V.3.5. Dosage des protéines de l'inflammation

Pour notre étude nous avons réalisé le dosage des paramètres sériques de **l'albumine**, et de la protéine C réactive **CRP** et de la fraction totale de numération sanguine **FNS**, qui sont mesurés par des méthodes immunochimiques et spectrophotométriques réalisées au niveau d'un Laboratoire d'analyse clinique privé à Sidi Bel-Abbes, utilisant un spectrophotomètre **Beckman coulter Synchro CX-9 clinical system ALX**.

VI. Analyses statistique :

Les résultats des différents paramètres sont représentés par la moyenne suivie de l'écart-type. Tous les paramètres physico-chimiques mesurés ont été testés en utilisant l'analyse de variance (ANOVA). La comparaison des moyennes est réalisée à l'aide du test t de « Student » pour le dernier paramètre analysé (activité anti-inflammatoire). Les différences significatives sont établies au niveau $p < 0,05$. L'analyse statistique est réalisée à l'aide du logiciel **STATISTICA (version 6.1.478.0 Statsoft)**.

3ème Partie: résultats et discussion

I. Composition chimique du matériel végétal

Les résultats de la composition nutritive de *N. gaditana* sont rapportés dans le [tableau 03](#). Les analyses effectuées ont révélé que la microalgue renferme un taux d'humidité et de cendres respectivement de $9.33 \pm 1.15\%$ et $6.4 \pm 0.23\%$ concordant avec ceux de [Mert Eryalçın et al., 2015](#) qui ont rapporté des valeurs de 9.56% et 7.21% respectivement pour la même espèce. D'après [kent et al., 2015](#) *Nannochloropsis sp* contient 1.84% d'humidité et 11.32% de cendres. *Nannochloropsis sp* est riche en minéraux et renferme dans 100 g de biomasse sèche 972mg de calcium, 533mg de potassium, 659mg de sodium, 316mg de magnésium, 103 mg de Zinc, 136 mg de Fer, 3.4mg de Manganèse, 35 mg de Cuivre, 0,22 mg de Nickel et moins de 0,1mg de monoxyde de carbone ([Reboloso et al., 2001](#)). En outre, on note que le taux de cendre des microalgues change en fonction des paramètres de culture ([Camacho Rodríguez et al., 2009](#)).

Une teneur trop élevée en cendres dans les aliments est généralement indésirable; cependant, les cendres d'algues peuvent contribuer à satisfaire la dose journalière recommandée de minéraux dans la nutrition humaine ([Sánchez-Machado et al., 2004](#)).

Le taux de protéines de *N. gaditana* est déterminé par la méthode de Kjeldahl en utilisant le facteur de conversion de l'azote 5,95 ([Lopez et al, 2010](#)). Ce taux de 13,38% est nettement inférieur à celui rapporté par [Mert Eryalçın et al., 2015](#) (67.61%) chez la même espèce. D'autres auteurs ont signalé qu'une élévation de la concentration en CO_2 induit une diminution des protéines chez *Spirulina platensis* ([Gordillo et al., 1998](#)). Aussi les traitements élevés en phosphore et en azote de la culture de *Nannochloropsis sp* induisent des teneurs plus élevées en protéines. Pour des

D'autre étude a été faite sur des traitements élevés en phosphore et d'azote dans la culture de *Nannochloropsis sp* ont induit à des teneurs en protéines plus élevées et les températures basses et élevées ont entraîné une augmentation des lipides totaux et des teneurs en protéines ([Hu et Gao, 2006](#)).

Une étude faite en Espagne par [Camacho Rodríguez et al., 2009](#) a conclu que la concentration en nitrate (NO_3^-) est un paramètre important dans la nutrition, la production de la biomasse et la composition biochimique de *Nannochloropsis gaditana*.

La teneur en sucre de notre microalgue est de $7.13 \pm 0.23\%$ corroborant celle de [Fernandes seixas, 2009](#) qui a rapporté une teneur en sucres totaux de 8.7% chez *N. gaditana* déterminée par l'acide phénol-sulfurique.

Le changement des paramètres de culture peut affecter la composition des glucides chez les microalgues. Ainsi, un déficit en azote entraîne une augmentation des glucides (Shifrin et Chisholm, 1981; Harrison et al., 1990). Les hydrates de carbone algaux peuvent apporter des bienfaits pour la santé humaine sous forme d'anticoagulants, d'antiviraux, de fibres alimentaires et d'antioxydants (Wijesekara et al., 2011).

Le contenu lipidique de *N. gaditana* est de $7 \pm 1\%$. (Hu, et al., 2006) ont rapporté des valeurs de 9 à 62% de lipides chez *Nannochloropsis sp*.

La production de lipides par les microalgues dépend de l'espèce et est affectée par des conditions de culture telles que les nutriments, la salinité, les périodes d'intensité lumineuse, la température, le pH et même l'association avec d'autres micro-organismes (Guschina et Harwood, 2006 ; Li et al., 2009). D'autres études ont montré une augmentation quasiment **4 fois supérieure** à la teneur en lipides de *Nannochloropsis sp* cultivé à faible teneur en azote (Renaud et al., 1994 ; Gu et al., 2012). La teneur en lipides totaux dans les espèces *Ulva pertusa*, *Euglena gracilis* et *Euglena botryococcus* a augmenté lors de la privation en azote (Floreto et al., 1993, Regnault et al., 1995, Yeesang et Cheirsilp, 2011). On note que la concentration de CO_2 aussi a un effet sur la croissance des algues et de la teneur en lipides. Chez *Nannochloropsis oculata*, l'effet de concentration du CO_2 sur la production de biomasse et l'accumulation de lipides a été étudié. Les résultats ont montré que la teneur en lipides de *N. oculata* a augmenté de 30,8% à 50,4% à 2% de CO_2 (Chiu et al., 2009).

Tableau 03: Composition nutritionnelle de *N. gaditana* (moyenne $\pm$ écart-type ; n = 3)

Paramètres	<i>N. gaditana</i>
L'humidité (%)	$9,33 \pm 1,15$
cendres(%)	6.4 ± 0.23
Protéines ($\times 5.95$ coefficient Kjeldahl)	$13,38 \pm 0.26$
Les sucres (%)	7.13 ± 0.23
Les lipides (%)	7 ± 1

II. Rendement d'extraction

L'extraction est une étape très importante pour l'isolement et l'identification des principes actifs à haute valeur ajoutée à partir de la matière végétale, notamment le cas des polyphénols, qui suscitent actuellement beaucoup d'intérêt grâce à leurs activités biologiques diverses en particulier leur propriétés antioxydantes (Su et al., 2006).

L'extraction des polyphénols se fait grâce à plusieurs solvants ou à des mélanges solvant/eau. Le mélange éthanol/eau et méthanol/eau, 70/30 (v/v) considéré comme un mélange de polarité élevée, a été choisi pour la réalisation des extractions. Ce choix est basé

sur les résultats de plusieurs travaux antérieurs qui ont montré que le rendement d'extraction augmente de manière significative avec l'utilisation d'éthanol aqueux ou du méthanol aqueux par rapport à des extractions aux solvants organiques purs (Vazquez et al., 2008; Mussatto et al., 2011). Ce comportement peut être expliqué par le fait que la présence de l'eau déstabilise les parois cellulaires. Par conséquent, en pénétrant plus profondément dans la matrice végétale, le solvant peut entrer au contact avec une quantité plus grande de soluté, favorisant ainsi l'extraction (Chaouche, 2014).

Dans ce travail, la poudre de *N. gaditana* a été extraite avec de l'éthanol et du méthanol qui sont connus comme des solvants ayant une affinité pour une grande diversité de composés bioactifs, à savoir les composés phénoliques (Khoddami et al, 2013).

Cette extraction a permis d'obtenir deux extraits bruts: l'extrait éthanolique (EENg) et méthanolique (EMNg) de *N. gaditana*. Les rendements en EENg et EMNg sont respectivement de $24 \pm 1,65\%$ et $14,2 \pm 0,7\%$.

Ces rendements sont compatibles avec l'étude de Farasat et al., 2014 qui ont montré que les rendements chez les algues *Ulva flexuosa* Wulfen et *Ulva intestinalis* Linnaeus sont respectivement de 13.39 % et 25.82 %.

Le rendement d'extraction, la composition des extraits obtenus et leur activité biologique dépend de la polarité et la nature des solvants utilisés (Franco et al., 2008, Lee et al., 2003).

III. Dosage des composés du métabolisme secondaire

Les composés phénoliques sont des molécules bioactives très recherchées qui sont principalement de puissants antioxydants ou piègeurs de radicaux libres. Ils jouent rôle bénéfique dans la santé humaine et la guérison, ils préviennent les maladies telles que les troubles inflammatoires, le cancer, les maladies cardiovasculaires et le diabète (Middleton et al., 2000 ; Thomas,et Kim,2011; Li et al., 2011).

Récemment, les composés polyphénoliques sont devenus des constituants très courants de l'alimentation humaine et ont reçu un intérêt croissant des consommateurs et aussi des fabricants d'aliments pour les nombreux bienfaits pour la santé, mentionnés ci-dessus (Manach et al., 2004).

Les dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes, des tanins condensés et hydrolysables, ont été effectués pour chaque extrait préparé et ce, par des méthodes spectrophotométriques et utilisant des équations de régression linéaire à partir de droites d'étalonnages exprimées en mg équivalent d'acide gallique (mg EAG/g PS), en mg équivalent

de quercétine (mg EQ/g PS) et en mg équivalent d'acide tannique par g de résidu sec (mg acide tannique/g PS) (annexes 1).

Les résultats du dosage des polyphénols, flavonoïdes et tannins des extraits de *N. gaditana* sont rapportés dans les Figure 17 et 18.

Les résultats montrent que les teneurs moyennes en phénols totaux des EENg et EMNg par rapport au poids sec (PS) sont respectivement de 41.53 ± 0.42 et 38.74 ± 0.33 mg EAG/g. Le contenu phénolique des EENg est supérieur à celui des EMNg ($P < 0.05$). Pereira et al, 2015 rapporte une valeur de 83,3 mg EAG/g PS dans l'extrait méthanolique de *Nannochloris* sp tandis que Maadane et al., 2015 n'ont signalé que 32 mg EAG/g PS chez *N. gaditana*.

Selon Goiris et al., 2012 *Nannochloropsis oculata* contient 2,04mg EAG/g, *Nannochloropsis* sp 1.39mg EAG/g, *Chlorella vulgaris* 1.47mg EAG/g et *Isochrysis* sp 4.57mg EAG/g.

Le contenu en flavonoïdes des extraits EENg et EMNg révèle des valeurs respectives de 19.82 ± 1.66 et 18.61 ± 1.45 EQ/g PS. Le contenu en ces composés de l'EENg semble significativement plus important que celui de l'EMNg ($P < 0.05$). Selon Safafar et al., 2015 l'extrait méthanolique de *Nannochloropsis* sp contient 6.45 mg EAG/g de polyphénols et 5.296 mg EQ/g de flavonoïdes.

L'extrait méthanolique de l'algue *Chlorococcum humicola* contient 4mg/g de flavonoïdes (Uma et al., 2011) tandis que les flavonoïdes totaux dans les algues *Laminaria digitata*, *Laminaria saccharina*, *Himanthalia elongata*, *Palmaria palmata*, *Chondrus crispus* et *Enteromorpha spirulina* varient de 7.66 à 42.5 mg EQ/g (Cox et al., 2011).

La teneur en flavonoïdes des extraits d'algues exprimée en mg EQ/g varie de 33.094 ± 2.053 pour *Ulva clathrata* à 8.048 ± 1.119 pour *Ulva intestinalis* (Farasat et al., 2014). Des études antérieures ont révélé des changements marqués dans les constituants chimiques en fonction des saisons et des conditions environnementales (Manivannan et al., 2009). La variation de la teneur en flavonoïdes peut être due à la variation des paramètres physico-chimiques tels que la salinité (Farasat et al., 2014).

Kahkonen et al. (1999) ont rapporté que les flavonoïdes sont probablement les composés phénoliques naturels les plus importants en raison de leur large spectre d'activités chimiques et biologiques, y compris les propriétés antioxydantes et de neutralisation des radicaux libres. Les flavonoïdes sont des antioxydants piègeurs d'une large gamme d'espèces oxygénées réactives et des inhibiteurs de peroxydation lipidique, ainsi que comme agents thérapeutiques potentiels contre une grande variété de maladies (Ross et Kasum, 2002).

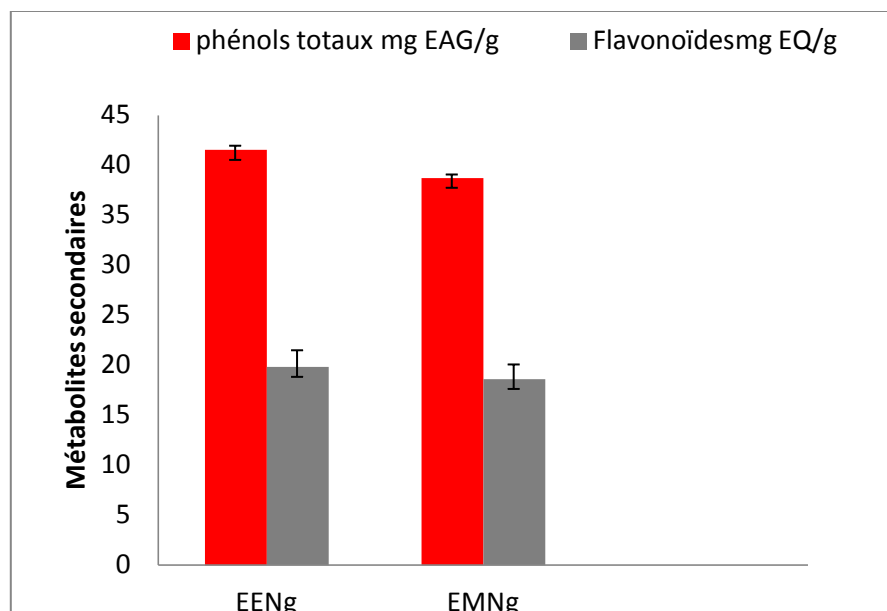


Figure 17 : Figure 1: Contenu des phénoliques et des flavonoïdes dans *N. gaditana* (Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type. Les comparaisons ont été effectuées en utilisant un test ANOVA avec $P < 0,05$ $n = 3$).

Les tanins condensés des EENg et EMNg sont respectivement de 0.35 ± 0.05 et 0.50 ± 0.08 mg acide tannique/g tandis que ceux hydrolysables ils représentent 0.63 ± 0.09 et 0.18 ± 0.02 mg acide gallique/g ($P < 0.05$). Les tannins condensés sont légèrement plus importants dans l'EMNg que dans l'EENg ($P = 0.03$). Il en est de même pour les tannins hydrolysables dans les deux extraits ($P < 0.05$). Ceci concorde avec les résultats rapportés par (Rutikanga et al., 2014) qui ont montré que l'algue verte *Spirogyra* contient 0.399g d'acide tannique pour 100g de substrat

La teneur totale en tannin condensé des extraits méthanoliques séchés de *Laminaria digitata*, *Laminaria saccharina*, *Himanthalia elongata*, *Palmaria palmata*, *Chondrus crispus* et *Enteromorpha spirulina* varient de 3.19 à 38.34 mgEC / g (Cox et al., 2011).

Les faibles teneurs en tanins dans la microalgue, comparées avec celles des polyphénols totaux et des flavonoïdes, sont probablement dues au fait que l'éthanol et le méthanol ne sont pas les solvants appropriés à l'extraction de ces composés. Cette probabilité est soutenue par plusieurs travaux, qui ont montré que les tanins condensés sont mieux extraits par un mélange acétone/eau (70/30) (Chavan et al., 2001; Macheix et al., 2005; Trabelsi et al., 2010).

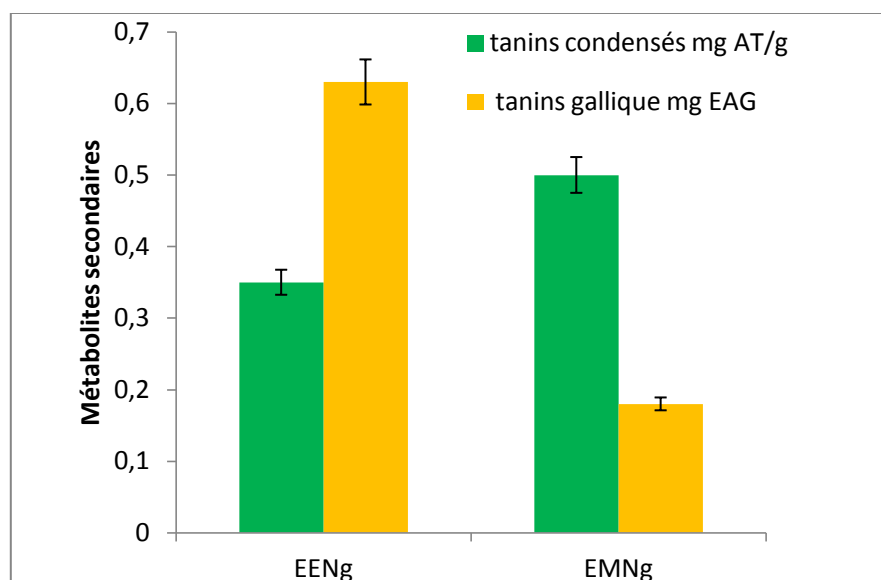


Figure 18: Contenu des tanins condensés et hydrolysés dans *N. gaditana* (Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type. Les comparaisons ont été effectuées en utilisant un test ANOVA avec $P < 0,05$ $n = 3$).

IV. Evaluation de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer *in vitro*, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents, comme les peroxydes $\text{ROO}^{\bullet}$ par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter); les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter); ou les radicaux $\text{ABTS}^{\bullet}$ (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-éthyl benzothiazoline -6- sulfonique), ainsi que la méthode utilisant le radical libre $\text{DPPH}^{\bullet}$ (Popovici, 2009 ; Ozen, 2009).

Parmi ces différentes méthodes, les tests DPPH et FRAP sont les deux méthodes qui ont été retenues pour l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Nannochloropsis gaditana* étudiée dans ce travail.

IV.1 Test au radical $\text{DPPH}^{\bullet}$

Une molécule antioxydante est une substance qui, même à faible concentration, peut entraver ou retarder l'oxydation d'un substrat (Göçer et al.,2013) et capable de réduire le radical stable DPPH, ayant une couleur violette profonde en solution, au 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle de couleur jaune (DPPH_2) (Bouaziz et al, 2016).

Les résultats du pouvoir antiradicalaire des différents extraits de la microalgue étudié, exprimé en pourcentage d'inhibition du radical DPPH sont représentés dans la (Figure 19).

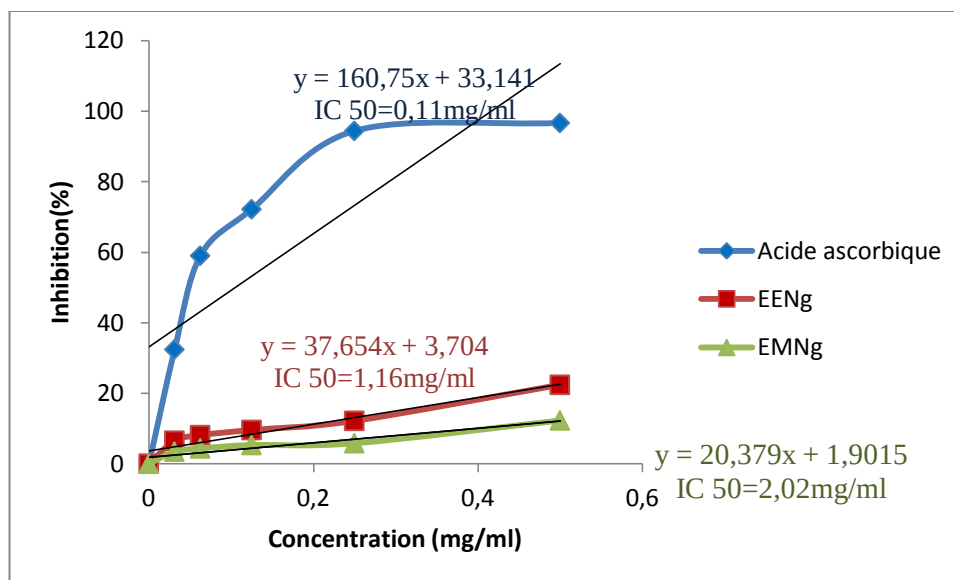


Figure19 : L'évaluation par la méthode de DPPH de IC50 des extrait *N. gaditana* et le niveau d'acide ascorbique (n = 3, test ANOVA, p <0,05)

D'après ces résultats, on remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente significativement ($p \leq 0,05$) avec l'augmentation de la concentration. Les taux d'inhibition du DPPH enregistrés en présence des différents extraits de la microalgue sont inférieurs à ce de l'acide ascorbique.

Sur la base de ce principe, le pourcentage d'inhibition de DPPH dans notre cas est de $22,37 \pm 3,5\%$ et $12,27 \pm 1,4\%$ pour EENg et EMNg respectivement avec des concentrations des extraits de 0.5 mg / ml. Nos résultats sont proche a ceux de (Hemalatha et al.,2013) qui ont trouvé que le pourcentage d'inhibition chez les extraits méthanolique de *Chlorella marina* (23,08%) et *Dunaliella salina* (17,66%) et de *Navicula clavata* (15%) et ceux de (safafar et al, 2015) qui ont rapporté que le pourcentage d'inhibition chez *Nannochloropsis limnetica* et *Nannochloropsis salina* est de 19.44% et 21.26% respectivement avec une concentration de 0.5mg/ml.

➤ Evaluation de l'IC 50

IC50 est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est élevé (Pokorny et al, 2001). La concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50% du DPPH radicalaire, a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition calculés en fonction de différentes concentrations d'extraits préparés.

L'ensemble des extraits révèle des propriétés antiradicalaires modéré. Les IC₅₀ des extraits analysés sont indiquées dans la (Figure 20).

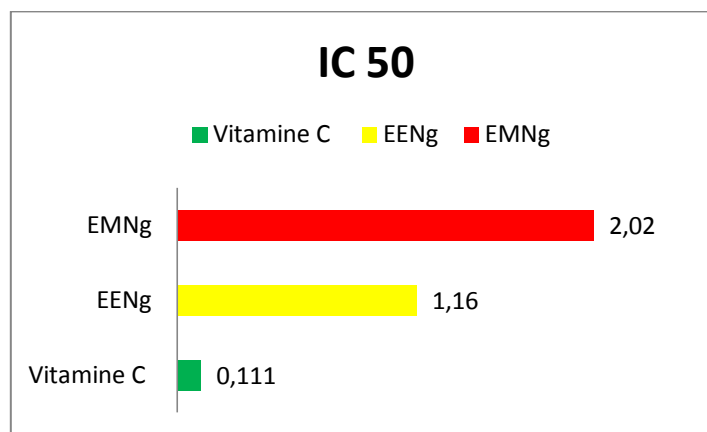


Figure 20: IC₅₀ des différents extraits de *N. gaditana* (mg/ml).

D'après ces résultats, nous remarquons que les valeurs des IC₅₀ des extraits s'échelonnent entre 1.16 ± 0.06 mg/ml pour EENg et 2.02 ± 0.04 pour EMNg comparées à celles de l'acide ascorbique (0.11 mg/ml). Ceci est significatif et montre que la microalgue a une capacité modéré à réduire les dommages oxydatifs induits par les radicaux libres.

Maadane et al., 2015 ont indiqué que IC₅₀ de l'extrait éthanolique de *Nannochloropsis gaditana* est de $365 \mu\text{g/ml}$ comparé à celui de la vitamine C ($2.5 \mu\text{g/ml}$).

Cependant, Cox et al. 2011 ont rapporté des concentrations de IC₅₀ chez des algues brune, *H. elongata*, *L. digitata* et *L. saccharina*, de 0.125 , 1 et $10 \mu\text{g/ml}$ respectivement. Chez les algues rouges et vertes, *P. palmata* et *E. spirulina* l'activité antioxydante est plus faible avec des EC₅₀ à 25 et $50 \mu\text{g/ml}$ respectivement.

Deux autres études réalisées par Wang et al., 2009 et Yan et al., 1999 montrent que les algues brunes contiennent des quantités plus élevées en polyphénols et l'activité de piégeage des radicaux DPPH est plus prononcée que pour les algues rouges et vertes.

Selon Tusevsi et al., 2014, un extrait présentant une faible activité antioxydante ne peut être considéré comme une mauvaise source d'antioxydant car un extrait est composé de produits chimiques avec des groupes fonctionnels et des polarités différentes lui permettant de se comporter différemment selon le mélange réactionnel. Cela indique que les composés phénoliques peuvent ne pas être un contributeur majeur aux capacités antioxydantes pour l'une ou l'autre de ces microalgues qui comme l'ont souligné de nombreux auteurs contiennent divers composés antioxydants tels que les caroténoïdes, les acides gras polyinsaturés et les

polysaccharides (chen, 1996 ; Chen et al., 2005 ; Hua-Bin Lia et al., 2007 ; Mohamed, 2008 ; Holtin et al., 2009 ; Su-Hua Goh et al., 2010 ; [Sushanth et al., 2015](#)).

Des études ont indiqué que le temps de réaction et la concentration du DPPH influencent l'activité antioxydante et les paramètres cinétiques des molécules bioactives des extraits de plantes et de microalgues. Dans la réaction avec le radical DPPH, l'activité antioxydante mesurée après 2h de réaction est significativement supérieure à celle mesurée après 30 min ([Angela et al., 2014](#) [Amal maadane, 2015](#)).

IV.2 Pouvoir réducteur de fer

La réduction directe du complexe Fe^{3+} ferricyanure qu'est une méthode relativement rapide, simple et économique est utilisée pour le screening du pouvoir réducteur des extraits de notre microalgue.

Le pouvoir réducteur d'un l'extrait, qui peut servir comme réflexion de son activité antioxydante, est déterminé en utilisant le test de réduction Fe^{3+} en Fe^{2+} , par lequel la couleur jaune de la solution d'essai change en couleur bleue-verte et cela selon la puissance réductrice de l'échantillon. La présence des antioxydants dans l'échantillon cause la réduction du complexe Fe^{3+} /ferricyanure en Fe^{2+} , Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant l'augmentation de la densité de la couleur bleue dans le milieu réactionnel à 700 nm. L'absorbance la plus importante indique le pouvoir de réduction le plus grand ([Chung et al., 2002](#)).

Les résultats de l'activité réductrice des extraits sont représentés dans ([la Figure °21](#)). Selon nos résultats l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle aux concentrations utilisées de nos extraits 0.156, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5 et 5 mg/ml. Le pouvoir réducteur des différents extraits peut être dû à leur capacité à donner des électrons. Le pouvoir réducteur peut être attribué principalement aux composés bioactifs associés à l'activité antioxydante tels que les composés phénoliques totaux, les flavonoïdes et autres antioxydants hydrophiles et hydrophobes qui sont de bons donneurs d'électrons et peuvent terminer la chaîne de réaction de radicaux libres par conversion des radicaux libres en produits plus stables ([Yen et al., 2008](#)).

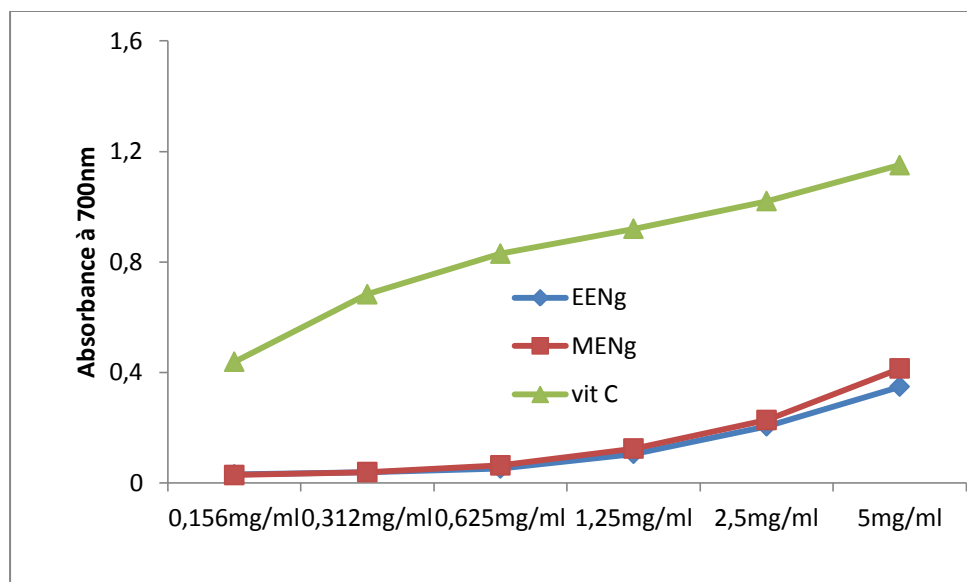


Figure21 :Antioxydant Activités des extraits éthanoliques et méthanoliques de *N. gaditana* et de vitamine C par la réduction du fer (Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type. Les comparaisons ont été effectuées en utilisant un test ANOVA avec $P < 0,05$ $n = 3$)

Dans notre cas, les pouvoirs réducteurs de EENG, EMNg et de l'acide ascorbique déterminés par la méthode FRAP sont exprimés en densité optique et sont respectivement de: 0.031 ± 0.023 ; 0.029 ± 0.009 et de 0.439 ± 0.035 unités de densité optique (DO) à la concentration de 0.15mg/ml. Ces valeurs deviennent aussi respectivement 0.349 ± 0.037 ; 0.414 ± 0.012 et 1.15 ± 0.07 D à la concentration de 5 mg / ml.

Selon les résultats de [Safafar et al., 2015](#) l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle aux concentrations utilisées dans l'extrait de *Nannochloropsis salina*.

V. Evaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits

L'activité antimicrobienne a été testée contre sept bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella abony*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Micrococcus luteus*.) et une levure qui possède différentes propriétés de croissance (*Candida albicans*). Les résultats de la sensibilité des bactéries aux extraits de *N. gaditana* à différentes concentrations obtenues par la méthode de diffusion sur le milieu Muller-Hinton gélosé sont regroupés dans la [Figure 22](#)

Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. La variation de l'activité antimicrobienne des extraits explique les variations de leurs compositions chimiques.

Ce test a montré une grande hétérogénéité dans les résultats, *Escherichia coli*, *Salmonella abony*, *Pseudomonas aeruginosa*, se révèlent les plus résistantes pour tous les extraits (non sensibles).

L'évaluation de l'activité antibactérienne révèle un bon pouvoir antibactérien des deux extraits de *N. gaditana* aussi bien envers les bactéries Gram positif que les Gram négative.

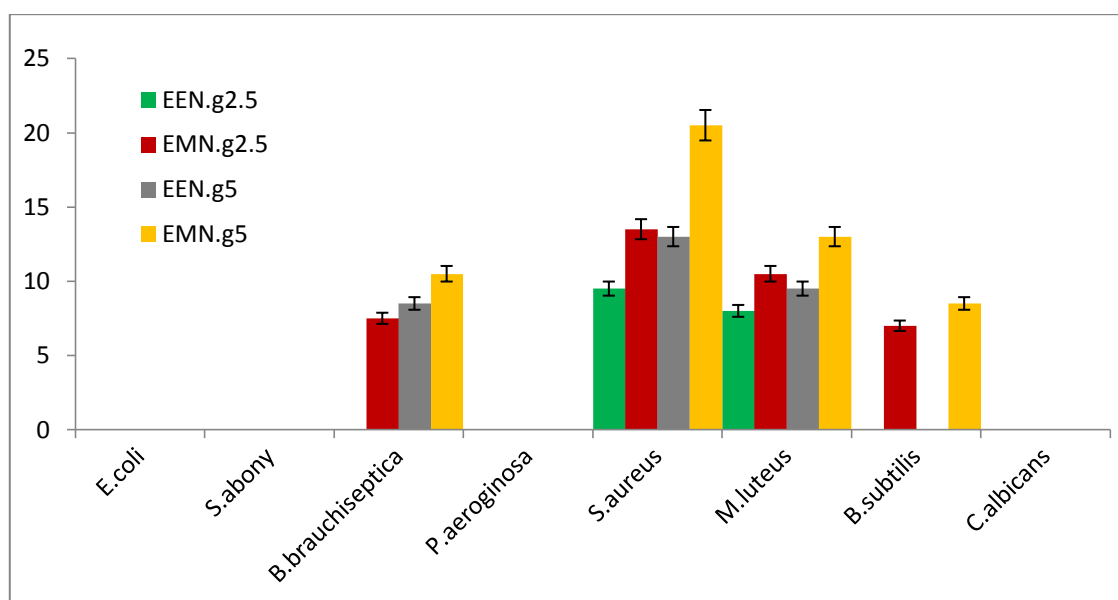


Figure 22 : Zones d'inhibition des extraits de *N. gaditana* sur les souches microbiennes. (Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type avec $n=3$ et $P<0.05$).

L'effet antibactérien des deux extraits de *N. gaditana* a été remarqué vis-à-vis *S. aureus* et *M. luteus* avec des diamètres d'inhibition de 13 ± 2.8 et 9.5 ± 0.7 mm pour EENg à la concentration de 5 mg/ml. Ces diamètres sont respectivement de 20 ± 0.7 et 13 ± 1.4 mm pour EMNg à la même concentration (Tableau 04).

Ces résultats sont en accord avec ceux de Sushanth et Rajashkhar, 2015 qui ont montré que l'extrait hexanique de *Nannochloropsis oceanica* est plus efficace que l'extrait éthanolique de cette microalgue contre *S. aureus*, *S. pyogenes*, et *B. subtilis* avec respectivement des zones d'inhibition de 9.7 ; 17.4 et 9.3 mm mais n'exerce aucun effet sur *Candida albicans*.

Tableau 04 : Diamètres d'inhibition des différents extraits vis-à-vis les germes testés

	<i>E. coli</i>	<i>S. abony</i>	<i>B. branchiseptica</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
EENG (2.5mg/ml)	-	-	-	-	9.5±0.7	8±1.4	-	-
EMNg (2.5mg/ml)	-	-	7.5±0.7	-	13.5±0.7	10.5±0.7	7±0	-
EENG (5mg/ml)	-	-	8.5±0.7	-	13±2.8	9.5±0.7	-	-
EMNg (5mg/ml)	-	-	10.5±0.7	-	20.5±0.7	13±1.4	8.5±0.7	-

L'extract méthanolique de la microalgue *dunaliella salina* montre une sensibilité de 9mm et 8mm respectivement contre *S. aureus* et *B. subtilis* (Fadoul et Juntawong, 2014).

L'extract à l'éthanol de *Chlorella vulgaris* a montré une activité inhibitrice maximale contre *Klebsilla Sp* (17 mm), *E. coli* (15mm) et *Bacillus sp.* (13mm) et avec exposition de zone minimale d'inhibition chez *Pseudomonas* (12mm) (Shabudeen Syed et al.,2015).

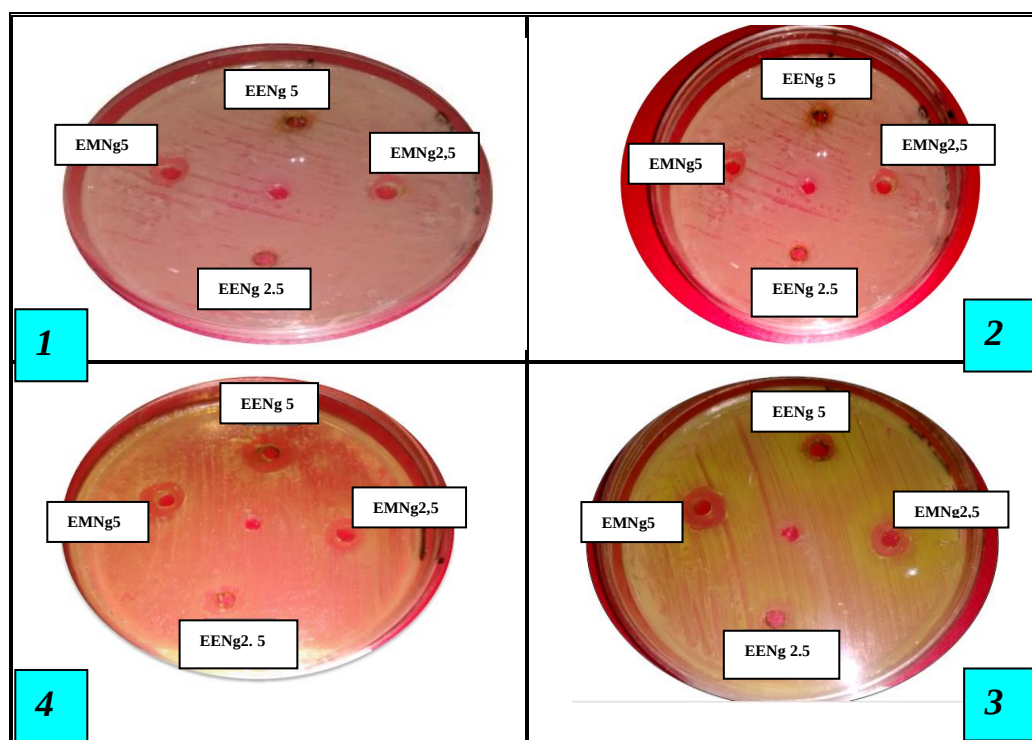


Figure 23: zones d'inhibition des extraits de *N. gaditana* sur le milieu gélosé sur :
1-*Bacillus subtilis* , 2- *Bordetella bronchiseptica* , 3- *Micrococcus luteus* ,4- *Staphylococcus aureus*

Bordetella bronchiseptica est la seule bactérie Gram négatif qui montre une sensibilité vis-à-vis de tous nos extraits.

L'étude de [Krishnika et al., 2011](#) montre que l'extrait méthanolique de *Nannochloropsis sp* a inhibé les bactéries Gram (-) *Salmonella paratyphi*, *Pseudomonas fluorescens* et *Escherichia coli* mais semble inefficace vis-à-vis de *Shigella boydi* et *Klebsiella pneumoniae*.

Des activités similaires ont été réalisées par [Goud et al., 2007](#) ; [Prashant et al., 2006](#) qui ont montré que l'extrait méthanolique d'algue bleu-vert et d'algue verte est d'une bonne activité antimicrobienne.

Aussi [González et Silva, 2001](#), ont rapporté que les extraits de méthanol de sept algues différentes testées avaient une activité à large spectre contre les bactéries pathogènes humaines.

Les travaux de [Kellar et Walker, 1989](#) montrent que 132 microalgues marines testées contre six souches de bactéries ont révélé que les extraits méthanoliques et hexaniques étaient plus efficaces contre *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus faecalis* et moins efficaces à l'égard de *Bacillus subtilis*.

L'extrait de méthanol de *Chlorella marina* a enregistré une activité inhibitrice maximale dans une étude contre *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *S. typhi* ([Srinivasakumar et Rajashekhar, 2009](#)).

Le méthanol a une activité antibactérienne plus élevée que celle des extraits obtenus avec d'autres solvants organiques ([Kumar et al., 2008](#) ; [Seenivasan et al., 2010](#) ; [Lavany et Veerappan, 2011](#)).

[Cox et al., 2010](#) ; [Srivastava et al., 2010](#) ont rapporté que l'extrait méthanolique d'algues contient des composés phénoliques, des alcaloïdes et des acides aminés qui peuvent être responsables de l'activité antimicrobienne.

D'après nos résultats et de ceux de [Karaman et al., 2003](#) on déduit que la nature du solvant et la méthode d'extraction influent directement sur la composition des extraits et par conséquence sur leur activité antimicrobienne.

VI. Potentiel anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique de *N. gaditana*

VI.1 Effet de EENg sur l'œdème de la patte de rat

Le criblage de l'activité anti-inflammatoire est réalisé par le test à la carragénine. Cet agent phlogogène induit au niveau de la patte du rat un œdème considéré comme un signe caractéristique de l'inflammation et paramètre très important dans l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de plusieurs composés (Morris, 2003).

Cette technique a été sélectionnée en raison de sa simplicité d'exécution, de sa rapidité d'induction des symptômes caractéristiques de l'inflammation (développement de l'œdème dans l'heure qui suit l'injection, avec un effet maximal au bout de 5 heures) et également en raison de sa reproductibilité.

Le choix de l'extrait éthanolique est basé sur la richesse de ce dernier en composants responsables de l'effet anti-inflammatoire tels que les polyphénols et les flavonoïdes.

L'injection de 100µl de carragénine à 1% au niveau de la patte postérieure gauche du rat provoque une inflammation visible dans l'heure qui suit cette injection, l'œdème augmente progressivement et atteint une intensité maximale ($7,15 \pm 0,24$ mm) au bout de 6h chez le lot témoin traité par du NaCl 0,9% ($p < 0,001$).

L'EENg ne provoque pas une diminution du volume des œdèmes des rats pendant les deux premières heures. A partir de la 3^{ème} heure on remarque que cet extrait entraîne une diminution du volume de l'œdème de même pour le lot traité par le Diclofenac (Figure 24).

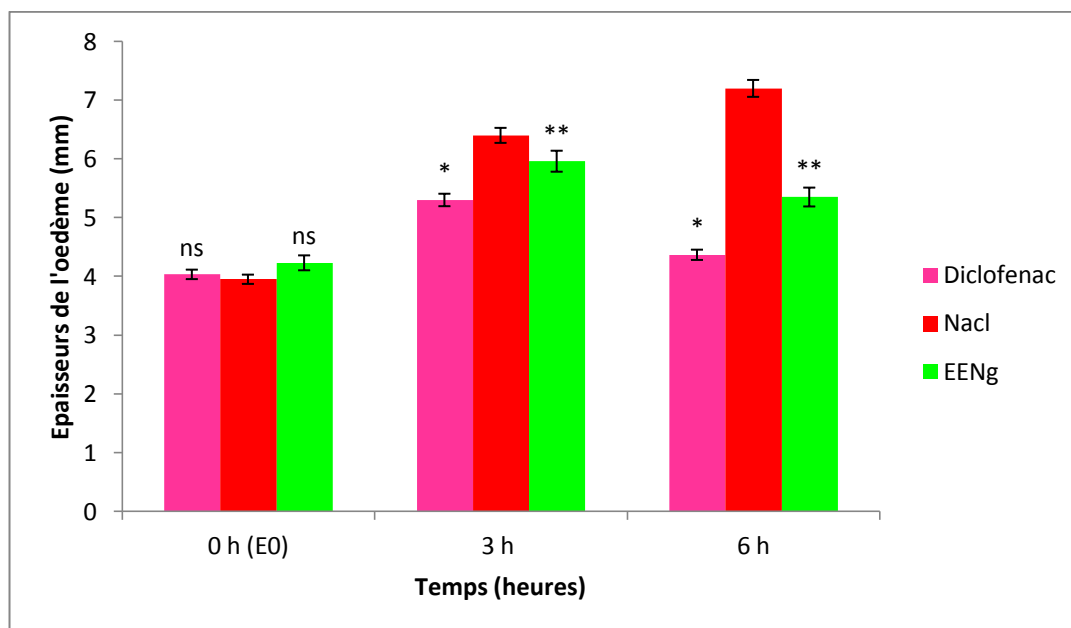


Figure 24 : Effets de l'extrait éthanolique de *N. gaditana* sur l'œdème de la patte induit par la carragénine 1% chez le rat. (ns= non significative, * $P < 0,001$ différences hypersignificatives par rapport au lot témoin (NaCl). Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ écart type)

L'injection de carragénine est à l'origine d'une réaction inflammatoire vasculoexudative, il s'agit d'une vasodilatation artériolaire capillaire dans la zone atteinte localement. Il en résulte une augmentation de l'apport sanguin et un ralentissement du courant circulatoire. La congestion est déclenchée rapidement par un mécanisme nerveux et l'action de médiateurs chimiques. L'œdème inflammatoire résulte du passage dans le tissu conjonctif interstitiel ou les cavités séreuses d'un liquide appelé exsudat constitué d'eau et de protéines plasmatiques. Sa traduction clinique est un gonflement des tissus (Weill et Batteux, 2003 ; Prin et al., 2009).

Dans le cas où l'extrait éthanolique de *N. gaditana* (EENG) est utilisé à raison de 500mg/kg, on constate que l'épaisseur de l'œdème passe de 4.23 ± 0.57 mm à 5.96 ± 0.61 mm, 3 heures après l'injection de carragénine. Ces résultats montrent une diminution de l'œdème évaluée à 30.7% après 03heures. Après 06 heures, le lot de rats traités par EENG présente une moyenne d'épaisseurs de 5.3 ± 0.5 mm correspondant à un pourcentage de diminution de 70.53% (Figure 25).

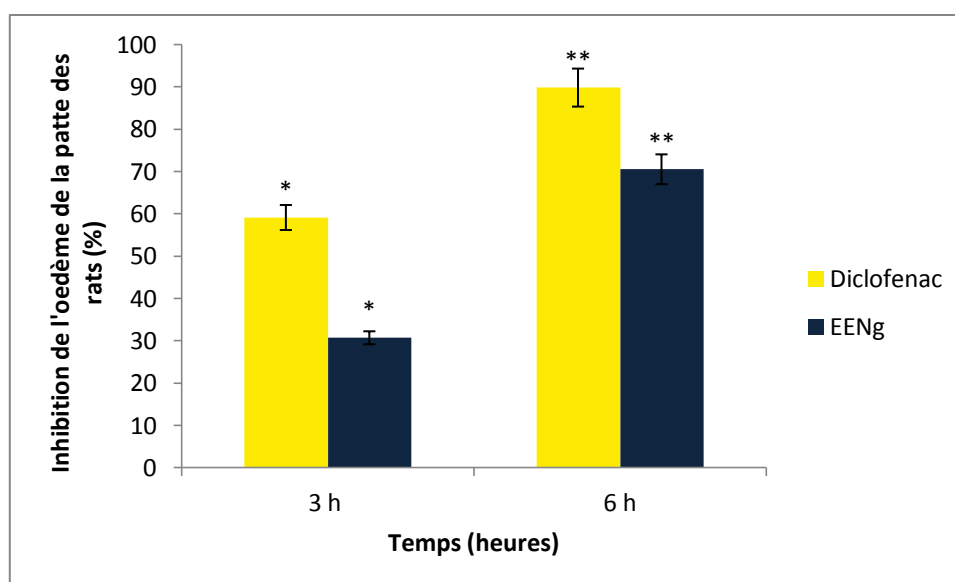


Figure 25: Inhibition de l'inflammation aiguë par l'EENG et le Diclofenac.

Si l'on considère le Diclofénac, un anti-inflammatoire non stéroïdien utilisé chez les rats injectés de carragénine, l'épaisseur de la patte postérieure gauche passe de 4.03 ± 0.7 mm à 5.3 ± 0.29 mm après 03h avec un pourcentage d'inhibition de 59.13%. En outre ces valeurs évoluent après 06 heures d'injection de carragénine pour atteindre 4.36 ± 0.39 mm avec un pourcentage d'inhibition de 89.84%.

En définitive les résultats de notre expérimentation montrent que EENg présente un effet anti-inflammatoire chez les rats injectés par la carragénine à 1% comparativement au lot n'ayant reçu qu'une injection sans effet de NaCl 0,9%. Aussi l'utilisation du Diclofénac montre un effet anti-inflammatoire plus prononcé que celui de l'EENg.

Notre résultat est en accord avec celui de [Syeda Hurmatul Quader et al., 2013](#) qui ont évalué l'effet anti-inflammatoire aigue utilisant l'extrait éthanolique de *Spirulina platensis* par le test de l'œdème induit par la carragénine. Cette microalgue présente un pourcentage d'inhibition de l'œdème de 41.10% pour 500mg/kg à 03heures après l'injection de carragénine. Un rapport similaire a été obtenu par [Riahi et al., 2012](#) qui ont révélé 38% d'inhibition chez 5 algues rouge et brune.

L'évolution du volume de l'œdème suite à l'injection de la carragénine évolue de manière temps dépendante et se divise en deux phases : Une première phase de 0 à 1h et une deuxième phase de 1 à 5h.

En effet l'injection de la carragénine induit une augmentation de la synthèse de cyclooxygénase 2 (COX-2) d'où une élévation de la concentration de cette enzyme avec un pic à 1h. Cette élévation est accompagnée par une augmentation de la synthèse des prostaglandines (PGs), essentiellement la prostaglandine E2 (PGE2) (maximum à 2h) impliquée dans les processus de la douleur et de l'inflammation ([Nantel et al., 1999](#) ; [Posadas et al., 2004](#)). Ceci explique l'effet tardif des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) comme le Diclofénac qui n'a d'effet qu'à 1h. Ceci est en relation avec leur mode d'action qui passe par l'inhibition des PGs par la stimulation des deux enzymes COX-1 et COX-2 ([Vergne et al., 2000](#) ; [Editorial, 2005](#)). On pourrait donc suggérer que *Nannochloropsis gaditana* pourrait supprimer la libération des médiateurs pro-inflammatoires (sérotonine, histamine et bradykinine) ainsi que la production et la libération de prostaglandines.

Les activités anti-inflammatoires de *N. gaditana* peuvent être attribuées à l'un de ses constituants, polyphénols, flavonoïdes, tanins, et qui sont des antagonistes de l'histamine, des inhibiteurs de la phosphodiesterase, des piègeurs de radicaux libres.

Des études menées in vitro ont montré que des flavonoïdes comme la lutéoline ou l'apigénine inhibaient la production de cytokines telles que IL-4, IL-5 et IL-13 et que la quercétine inhibait la production de TNF- α par des macrophages stimulés au lipopolysaccharide (LPS). Aussi le kaempférol inhibait l'expression et la sécrétion du TNF- α , de l'IL-1 β ou de l'IL-6 dans les mastocytes ([Gonzalez-Gallego et al. 2010](#)).

Il a été rapporté que les flavonoïdes, antioxydants naturels, joueraient un rôle très important dans le traitement des inflammations, des tumeurs et des affections bactériennes (He et al., 2005 ; Ezeja et al., 2011 ; Ibrahim & Fagbonun, 2013).

De plus, il est maintenant connu que les polyphénols exercent leur activité anti-inflammatoire en agissant in vitro et in vivo sur l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Santangelo et al. 2007).

Un autre β -carotène phytoconstituant augmente les activités anti-inflammatoires. Des études ont montré que le β -carotène inhibait la production d'oxyde nitrique et de prostaglandine E2 et supprimait l'expression de iNOS, COX-2, TNF- α et IL1 β . Une telle suppression des médiateurs inflammatoires par le β -carotène est vraisemblablement due à son inhibition de l'activation de NF- κ B en bloquant la translocation nucléaire de la sous-unité NF- κ B p65. On sait que le NF κ B est exprimé de façon omniprésente et joue un rôle majeur dans le contrôle de l'expression de la protéine impliquée dans la réponse immunitaire, inflammatoire et en phase aiguë.

En outre, le β -carotène supprime la transcription de cytokines inflammatoires, y compris IL-1 β , IL-6 et IL-12 dans une lignée cellulaire de macrophage stimulée par un lipopolysaccharide (LPS) ou IFN γ (Tian et Brasier, 2003 ; Bai et al., 2005 ; Katsuura et al., 2009).

VI.2. Effet de l'EENg sur les protéines sériques du rat

D'un autre côté, l'activité in vivo de l'EENg a été assurée par le dosage des paramètres biochimiques sériques, et hématologiques des rats.

Les résultats des dosages sériques effectués sur les rats témoins, et les rats traités par l'extrait éthanolique de *N. gaditana* sont résumés dans le **tableau 05**.

Six heures après injection de carragénine à 1% la CRP_r subit une augmentation chez les rats traités par du NaCl à 0,9% comparativement à l'état initial avec respectivement des valeurs de 502.4 μ g/ml vs 840.1 μ g/ml ($p < 0,05$).

Tableau 05: Taux de CRP_r et d'albumines chez les lots témoins, et les lots traités avec le diclofenac, et EENg (Les lettres différentes pour chaque paramètre indiquent un $p < 0,05$. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ écart-type).

Lots expérimentaux	Taux de CRP (mg/l)	Taux d'albumine (g/dl)
E0 (Témoin)	502.4 $\pm$ 30 ^a	4.71 $\pm$ 0.02 ^a
NaCl	840.1 $\pm$ 57.2 ^b	3.64 $\pm$ 0.03 ^b
Diclofenac	580.6 $\pm$ 15.6 ^c	4.23 $\pm$ 0.5 ^c
EENg	685 $\pm$ 10.2 ^d	4.59 $\pm$ 0.02 ^d

La protéine C réactive est une protéine de la phase aiguë de l'inflammation synthétisée principalement par le foie mais aussi par le tissu adipeux (Noriyuki Ouchi et al.,2003). La protéine C réactive a été isolée par Tillett et Francis en 1930 dans le sérum de patients présentant une inflammation aiguë. La Protéine C-Réactive (CRP) est un pentamère cyclique de 115 kDa chez l'homme, et de 129kDa chez le rat (Pepys., 1983).

La CRP exerce de nombreuses fonctions biologiques dont l'élimination des tissus endommagés, la régulation de la réponse inflammatoire, l'activation du complément, le contrôle de la phagocytose et la production de cytokines anti-inflammatoires (Robey et al.,1984 ;Pue et al.,1996 ;Zouki et al.,1997). Elle possède la propriété de se lier sélectivement aux bactéries pathogènes et aux antigènes intracellulaires des cellules endommagées (Geers et al., 2003).

Chez les rats, la CRP (CRP_r) n'est pas une protéine typique de la phase aiguë. Cependant, contrairement aux humains (5mg/ml), les rats ont des concentrations plasmatiques de CRP beaucoup plus élevées dans des conditions basales, soit environ 300-500 mg/l, soit 100 fois plus élevé que la concentration chez les humains (Padilla et al.,2003) contrairement à la CRP_h, la CRP_r est incapable d'activer le complément malgré le fait que le CRP_h et le CRP_r partagent une homologie des acides aminés à 70%. Par conséquent, il est possible que le CRP_r puisse activer le complément lors de la liaison avec d'autres ligands (De Beer et al.,1982 ; Griselli et al.,1999; Padilla et al.,2003).

Dans notre cas la CRP_r des différents lots traités par NaCl, de Diclofenac et l'extrait EENg augmente sensiblement par rapport à l'état initial (E0=502.4 µg/ml) avec des valeurs respectivement de 840.1 µg/ml ; 580.6 µg/ml , et 685µg/ml (p<0,05).

Chez le lot de rat ayant reçu l'EENg 30min avant le traitement par la carragénine, et après la 6^{ème} heure, on note une diminution significative du taux de CRPr chez les rats traités par NaCl 0,9% comparativement à ceux traités avec EENg avec des valeurs respectivement de 840.1µg/ml et 685µg/ml (p<0.05). Quand au lot de rats traités par le Diclofenac, il présente une valeur sensiblement plus diminuée que celle du lot traité à EENg comparativement au lot traité au NaCl 0.9%. En effet le taux de CRP_r, du lot traité au Diclofénac est inférieur à celui traité par NaCl 0.9% avec des valeurs respectivement de 580.6 µg/ml vs 840 µg/ml(p<0.05).

Le lot traité par l'EENg présente cependant un taux de CRP_r de 685 µg/ml supérieur à celui du lot de Diclofénac qui est de 580.6 µg/ml (p<0.05). Ces résultats témoignent de l'effet anti-inflammatoire important de l'EENg comparativement au lot non traité (NaCl).

D'après l'expérimentation de quatorze semaines de [Dimitrov et al., 2014](#) la CRPr atteint un taux élevé de 947.51 µg/ml chez les rats obèses par rapport à celle des témoins (647.34 µg/ml).

Les concentrations en protéines totales diminuent sensiblement dans les premiers jours de la réaction inflammatoire, principalement en raison de la diminution de la synthèse hépatique d'albumine, protéine de la phase aigue négative (PPA). Cependant [Engler, 1995](#) fait remarquer que la plupart des PPA négatives sont des protéines de transport. La diminution de leur concentration plasmatique conduit à l'augmentation de la fraction libre, active, des ligands (vitamines, hormones, acides gras, oligo-éléments) qui jouent un rôle important dans la phase de restauration cellulaire.

L'albumine est la protéine la plus abondante du plasma synthétisé par le foie, cette protéine plasmatique d'un poids moléculaire de 66kda représente environ 50% des protéines plasmatiques. Elle exerce de nombreuses fonctions: action de ligand, propriétés de transporteur, fonctions antioxydantes et enzymatiques. Elle contrôle la pression osmotique, module l'inflammation et influence les dommages liés au stress oxydatif ([Tamion, 2010](#)).

Les résultats obtenus du dosage de cette protéine sont mentionnés dans le [tableau 05](#). On note qu'il ya une diminution remarquable du taux d'albumine sérique chez les rats traités au NaCl 0,9% comparé à celui des rats témoins E0 à raison de 4.71 ± 0.02 g/dl. On peut expliquer cette hypoalbuminémie par la présence d'une réaction inflammatoire persistante chez ces rats après la 6^{ème} heure qui suit l'administration de l'agent phlogogène.

Par contre on remarque que les lots traités au Diclofenac, et à l'ENNg assurent une baisse significative entre eux du taux d'albumine sérique chez ces rats. Cela témoigne de l'effet anti-inflammatoire important de l'ENNg par rapport au lot non traité (NaCl 0,9%). En outre l'effet anti-phlogogène de l'ENNg est presque analogue à celui du médicament de référence, le Diclofenac.

VI.3. Effet de l'ENNg sur l'hémogramme du rat

La numération de la formule sanguine est aussi appelée hémogramme. Cet examen comprend le comptage de toutes les cellules ou éléments figurés du sang et étudie certains paramètres particuliers du sang. Il s'agit d'une étude tant quantitative que qualitative c'est-à-dire qu'il permet de déterminer le nombre d'hématies et de leucocytes/mm³ de sang. La numération de la formule sanguine apporte des renseignements indéniables sur l'existence et la gravité de l'inflammation.

Le tableau suivant comporte les résultats obtenus du décompte cellulaire pour les différents lots de l'expérience :

Tableau 06 : Décompte cellulaire des leucocytes et thrombocytes chez les lots témoins et traités (Les lettres différentes pour chaque paramètre indiquent un $p < 0,05$. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ écart)

Paramètres	Groupes expérimentaux			
	E0 (Témoin)	NaCl 0,9%	Diclofenac	EENg
Plaquettes ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	559,3 $\pm$ 105,95 ^a	987 $\pm$ 39,2 ^b	696 $\pm$ 57,8 ^c	811 $\pm$ 90,1 ^d
Globules blancs ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	6,4 $\pm$ 0,4 ^a	10,35 $\pm$ 1,64 ^b	8,91 $\pm$ 1,68 ^c	9,25 $\pm$ 1,64 ^d

Six heures après injection de carragénine chez le lot traité par du NaCl 0,9% on assiste à une augmentation du nombre de leucocytes qui atteint 1035/mm³ comparé au témoin (640/mm³) ($P < 0,05$). (tableau 06).

Pour les lots traités à l'EENg et au Diclophénac on constate qu'après six heures le nombre de leucocytes diminue par rapport au témoin (NaCl 0,9%) ($P < 0,05$). Les rats traités par le Diclofénac, anti-inflammatoire non stéroïdien, présentent une diminution du nombre de leucocytes par rapport au témoin (NaCl 0,9%) mais de manière plus prononcée que pour l'EENg ($P < 0,05$). Cela montre que notre extrait présente un effet anti-inflammatoire entraînant une variation de la formule leucocytaire mais de manière moins intense que le Diclofénac.

La littérature ne manque pas de références sur les paramètres hématologiques du rat. Cependant, il peut y avoir de grandes variations d'une étude à l'autre et il semble à priori difficile d'établir un hémogramme de référence pour le rat. En effet il existe un très grand nombre de facteurs de variation, parmi lesquels on peut déjà citer le sexe, l'âge, le site de ponction, la lignée, et bien sûr la méthode d'étude de ces paramètres sanguins, manuelle ou automatisée. Tous ces facteurs ne peuvent pas être contrôlés de manière semblable par tous les laboratoires et pour toutes les expérimentations.

Selon Ringler et Dabich, 1979, il est impossible d'établir une quelconque valeur universelle pour un paramètre hématologique ou biochimique.

Les plaquettes sanguines sont des particules anucléées discoïdes provenant de la fragmentation du cytoplasme de grandes cellules de la moelle osseuse, les mégacaryocytes. La fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes aboutit à la formation des plaquettes. Chaque mégacaryocyte produit 2000 à 5000 plaquettes (Jean-Paul Levy et al., 2001).

Dans les conditions de notre expérience, on note une hyperplaquettose significative chez les lots traités par du NaCl, du Diclofénac et de l'EENg comparés au lot témoin E0. Cela témoigne la sévérité de l'inflammation surtout chez le lot traité avec du NaCl qui atteint la valeur maximale de $987 \pm 39.2.10^3/\mu\text{l}$.

Les lots de rats traités au Diclofenac et à l'EENg montrent un abaissement significative des thrombocytes par rapport au lot traité avec du NaCl 0.9%. Cela affirme l'efficacité des composés anti-inflammatoires de notre extrait qui est semblable à celle du traitement de référence utilisé dans notre expérience.

Ces résultats montrent aussi que la microalgue *Nannochloropsis gaditana* présente une activité anti-inflammatoire. Cela reflète la teneur importante de cette microalgue en protéines, lipides, et en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes. Les lipides des microalgues sont connus comme des molécules biologiques importantes pour le traitement des pathologies inflammatoires telles que l'athérosclérose, les maladies de Parkinson et Alzheimer, le psoriasis ou le cancer (Yates et al. 2014).

Talero et al., 2015 ont démontré que les acides gras polyinsaturés (DHA et EPA) des huiles d'algues réduisaient la sécrétion de TNF- α et IL-1 β ainsi que la régression négative de l'expression de COX-2 et la production de PGE2 dans une lignée de cellules mononucléaires périphériques humaines. Ces huiles d'algues ont également réduit l'œdème des pattes dans une mesure similaire à l'indométacine chez les rats, ce qui suggère leurs propriétés anti-inflammatoires (Nauroth et al., 2010).

Conclusion

Conclusion générale

Les microalgues sont consommées depuis des milliers d'années dans le monde. Les microalgues suscitent aujourd'hui un intérêt grandissant tant les applications qui convergent autour de ces cellules sont nombreuses. De la production d'énergie à la nutrition humaine et animale, en passant par le traitement des rejets anthropiques, ce sont aussi les microorganismes faciles à produire en masse en continu, adaptable aux milieux les plus extrêmes, possédant les caractéristiques microbiennes permettant aisément leur manipulation génétique et leur transformation. C'est l'outil biotechnologique par excellence.

Le présent travail a pour but de contribuer à la connaissance de la composition en métabolites primaires, en principes actifs et des effets biologiques *in vitro* et *in vivo* de la microalgue *Nannochloropsis gaditana* produite en Algérie.

Les caractéristiques biochimiques de *Nannochloropsis gaditana* étudiés montrent qu'elle contient 9,33% d'humidité et un taux de cendre est de 6,4%.

Les résultats montrent que les protéines sont le constituant majoritaire (13,38%) alors que les lipides ne représentent que 7% et les sucres 7,13%.

D'autre part, les résultats des dosages montrent que l'extrait éthanolique est le plus riche en composés phénoliques, en flavonoïdes, tanins condensés et hydrolysables comparé à l'extrait méthanolique. Cela confère à cette microalgue une grande aptitude à piéger les radicaux libres et réduire les risques des maladies cardiovasculaires et de cancer comme tous les polyphénols aux propriétés antioxydantes avérées.

L'étude du pouvoir antioxydant *in vitro*, utilisant le radical DPPH et l'activité de réduction du fer par la méthode de FRAP, révèle que *N. gaditana* possède une activités antioxydantes modéré. La meilleure activité est obtenue en piégeant le radical DPPH[•], avec des valeurs de concentration d'inhibition IC₅₀ de 1,16mg/ml pour extrait EENg. Ces activités antioxydantes sont dépendantes du contenu en principes actifs.

L'activité antimicrobienne des extraits éthanolique et méthanolique de *N. gaditana* vis-à-vis d'une gamme de sept bactéries pathogènes et une levure, est réalisée en appliquant la méthode de diffusion en milieu solide. Les souches bactériennes les plus sensibles sont *Bordetella brauchiseptica*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*. Cependant, tous les extraits ne montrent aucune activité vis-à-vis de *Candida albicans*.

L'évaluation de l'effet anti-inflammatoire a été réalisée en mesurant l'œdème induit par injection de la carragénine au niveau de la patte postérieure gauche des rats Wistar.

Les résultats obtenus ont montré que l'extrait éthanolique de *N. gaditana* à 500 mg/kg, est capable de réduire significativement l'œdème de l'inflammation avec un pourcentage d'inhibition de 70.53%. Cet effet se traduit par une diminution du taux des leucocytes, des plaquettes, de la CRP et une augmentation de l'albumine en comparaison avec les résultats du lot recevant du NaCl à 0,9% comme seul traitement. L'effet de notre extrait est comparable à celui obtenu pour le lot de rats de référence traité avec le Diclofenac.

Nos perspectives de recherche sont les suivantes :

- Isoler les molécules contenues dans les extraits actifs de *N. gaditana* par HPLC/MS
- Tester les molécules isolées, in vivo, sur différents modèles biologiques, afin de trouver une application en agro-alimentaire.
- Déterminer la composition en acides gras de la matière grasse par CPG
- Déterminer la composition en acides aminés des protéines par HPLC
- Étudier la cytotoxicité de ces molécules afin de confirmer ou d'infirmer les effets santé attribués à cette microalgue.

Références bibliographiques

- ✚ Abd El-Baky HH, Hussein MM, El-Baroty GS.(2008). Algal extracts improve antioxidant defense abilities and salt tolerance of wheat plant irrigated with sea water. Afr J Biochem Res.2(7):151–164.
- ✚ Abi-ayad. M., (2009). Contribution à l'étude physico-chimique de l'huile essentielle du Pin d'Alep (*Pinus halepensis*) de la région de Tlemcen & de son activité antimicrobienne. Mémoire de magister ; Université Abou-Bakr Belkaïd, Tlemcen. p 50-55.
- ✚ Aboul-Enein AM, Shalaby EA, Abul-Ela F, Nasr-Allah AA, Mahmoud AM, El-Shemy HA, et al. et al.(2011).Back to nature: Spotlight on cancer therapeutics. Vital Signs.10:8–9.
- ✚ Aboun. A., Ammari. H., Belazouz. T., Benslimani. A., Rahal. K., Tali M.H., (2008). Standardisation de l'antibiogramme en médecine vétérinaire à l'échelle nationale. Selon les recommandations de l'OMS. Ministère de l'Agriculture et du développement rural, Ministère de la santé, de la population et de la réforme hospitalière. 4^{ème} Ed., Algérie, 98p.
- ✚ Aboun. A., Aoun. L., Bendimerad. K., Boukerrou. A., Kechich. S., (2001). Antibiogramme en médecine vétérinaire. Standardisation de l'aromatogramme à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS. Algérie édition.
- ✚ Aggarwal, B. B. & Shishodia, S. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. Biochem Pharmacol, Vol. 71, No. 10, pp. 1397-1421.
- ✚ Alcaïne, A.A.(2010).Biodiesel from microalgae. Final degree project. Royal School of Technology Kungliga Tekniska Högskolan, Stockholm, Sweden.
- ✚ Andersen MØ, Markham KR, (2006). FLAVONOIDS, Chemistry, Biochemistry and Applications. Natural Products from Plants. Edition Taylor & Francis Group, LLC.
- ✚ Andersen, R. A.; Brett, R. W.; et al. (1998). "Phylogeny of the Eustigmatophyceae based upon 18s rDNA, with emphasis on Nannochloropsis". Protist. 149 (1): 61–74.
- ✚ Anderson ,R.A(1992).Diversity of eukaryotic algae.Biodiversity and Conservation ,1(4),267-292
- ✚ Angela,F.,Maria,G,M., Emanuela,A.,Antonia,B.,Daniele,S.,2014.reaction time and DPPH concentration influence antioxidant activity and kinetic parameters of bioactive

molecules and plant extracts in the reaction with DPPH radical. J. Food Compos. Anal. 35, 112-119.

- ✚ Ansari K.N. (1997) The free radicals-the hidden culprits-an update. Indian Journal of Medical Sciences, 51, 319-336.
- ✚ Antwerpen P.V. (2006). Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système Myeloperoxydase/ Peroxyde d'hydrogène/ Chlorure. Thèse de doctorat. Université libre de Bruxelles. pp: 3-5.
- ✚ AOAC (1995) Official methods of analysis. Washington, DC, USA: Association of official analytical chemists.
- ✚ Aslan, S., Kapdan, I.K.(2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae, Ecological Engineering, 28, pp. 64–70.
- ✚ Audigie, Cl., Dupont, G. et Zouszain, F. (1984). Principes des méthodes d'analyse biochimique. Tome1. Ed. Doin. pp: 136-155.
- ✚ Baker AL. et al. (2012). Phycokey - an image based key to Algae (PS Protista), Cyanobacteria, and other aquatic objects. University of New Hampshire Center for Freshwater Biology.
- ✚ Balázs Veres (2012). Anti-Inflammatory Role of Natural Polyphenols and Their Degradation Products, Severe Sepsis and Septic Shock - Understanding a Serious Killer, Dr Ricardo Fernandez (Ed.)
- ✚ Bate-Smith EC (1973) Haemanalysis of tannins: the concept of relative astringency. Phytochemistry 12:907-912
- ✚ Batinic D, Robey FA.(1992).The V3 region of the enveloped glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 binds sulfated polysaccharides and CD4-derived synthetic peptides. Journal of Biological Chemistry. 267:6664-6671.
- ✚ Becker, W. (2004). "Microalgae in human and animal nutrition." Handbook of microalgal culture. Blackwell; Oxford
- ✚ Bergendi, L., Benes, L, Duracková, Z Ferencik, M (1999) Chemistry, physiology and pathology of free radicals. Life Sci 65:1865-1874.
- ✚ Bidié A., N'Guessan B.B., Yapo A.F., N'Guessan J.D., Djaman A.J. (2011). Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences et Nature*, 8 (1):1-11
- ✚ Blois MS, (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181: 1199–1201.

- ✚ Blunt JW, Copp RB, Hu WP, Munro MH, Northcote PT, Prinsep MR, (2009). Marine natural products. *Naturals Products Reports* 26: 170-244.
- ✚ Boizot N., Charpentier J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques. In le Cahier des techniques de l'INRA - Amélioration Génétique et Physiologie Forestières, Laboratoire d'Analyses Biochimiques.79-82
- ✚ Bondioli P, Della BL, Rivolta G, Chini ZG, Bassi N, Rodolfi L, Casini D, Prussi M, Chiamonti D, Tredici MR.(2012). Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 and *Tetraselmis suecica* F&M-M33. *Bioresour. Technol.* 114:567–572.
- ✚ Bouaziz, F.; Koubaa, M.; Barba, F.J.; Roohinejad, S.; Chaabouni, SE.(2016). Antioxidant properties of water-soluble gum from flaxseed hulls. *Antioxidants*, 5, 26.
- ✚ Bougaran Gael, Saint-Jean Bruno (2014). Microalgues: de petits végétaux aux grandes promesses ! *Biofutur*, (360), 28-31.
- ✚ Boyd B., Ford C., Koepke M.C., GaryK., Horn E., McAnalley S., and McAnalley B. (2003). Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. *Glycoscience& Nutrition*. 4 (6):7
- ✚ Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 28: 25-30
- ✚ Breuer G, Lamers PP, Martens DE, Draaisma RB, Wijffels RH. (2012). The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresour. Technol.* 124:217–226.
- ✚ Bruneton J, (2009). Pharmacognosie, Phytochimie, Plante médicinales. Lavoisier Technique & Documentation, 4ème Edition. Paris.
- ✚ Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – 3ème Ed Techniques et documentations. Paris. pp: 227-310-312-313-314.494.
- ✚ Bruyne T., Pieters L., Deelstra H. et Vlietink A. (1999). Condensed vegetable tannins:Biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematic and Ecology*. 27: 445-459.
- ✚ Camacho Rodríguez J., Cerón-García M.C., Fernández-Sevilla J.M, González López C.V,&Molina-Grima E.(2009). Effective and low-cost culture media for *Nannochloropsis gaditana* & *Isochrysis galbana* biomass optimized for aquaculture. Chemical Engineering Department, University of Almería, Almería, Spain.

- ✚ Cardozo KHM, Guaratini T, Barros MP, Falcão VR, Tonon AP, Lopes NP, Campos S, Torres MA, Souza AO, Colepicolo P, Pinto E.(2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Toxicology & Pharmacology*. 146:60-78.
- ✚ Carlsson, A.S., van Beilen, J.B., Möller, R., Clayton, D(2007). Micro-and macro-algae: utility for industrial applications, In: Bowles D, editor. *Outputs from the EPOBIO project*. UK: CPL Press. pp. 82.
- ✚ Castro L, Freeman BA.(2001). Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition*, 17(2): 295-307
- ✚ Chaouche,T(2014).Contribution à l'étude des activités anti oxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales. Thèse de doctorat. Université Abou-Bakr-Belkaid, Tlemecen,Algérie.
- ✚ Chaudhry P.S., Cabrera J., Juliani H.R., and Varma S.D. (1983). Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Biochem. Pharmacol*. 32: 1995.
- ✚ Chavan UD, Shahidi F, Naczki M, (2001). Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Food Chemistry*, 75(4): 509-51.
- ✚ Chen F, Li HB, Wong RN, Ji B, Jiang Y.(2005).Isolation and purification of the bioactive carotenoid zeaxanthin from the microalga *Microcystis aeruginosa* by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A*. 4;1064(2):183-6.
- ✚ Chen L., HU J.Y. and Wang S.Q. (2012) The rôle of antioxidants in photoprotection : a critical review. *Journal of American Academy of Dermatology*, 67(5), 1013-1024.
- ✚ Chen, F. (1996). High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends in Biotechnology*, 14, 421–426
- ✚ Cheng-Wu Z, O. Zmora, R. Kopel and A. Richmond(2001).An industrial-size flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp.(eustigmatophyceae). *Aquaculture* 195, 35
- ✚ Chevalier, P. et al. (2002).Technologies d'assainissement et prévention de la pollution, Sainte-Foy (Québec), Université du Québec - Télé-université, 440 p. (Collection Sciences de l'environnement).
- ✚ Chira K., Such J., Saucier C., Teissède L. (2008). Les polyphénols du raisin.Ed:Springer. 6 :75-82
- ✚ Chisti, Y.(2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv*. 25, 294–306.

- ✚ Chiu SY, Kao CY, Tsai MT, Ong SC, Chen CH, Lin CS.(2009). Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresour Technol.* 100(2):833-8.
- ✚ Chung Y.C., Chang C.T., Chao W.W., Lin C.F., et Chou S.T., (2002) Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* (50): 2454–2458p
- ✚ Clifford M.N. (1999). Appendix 1. A nomenclature for phenols with special reference to tea Washington, DC, CRC Press, Boca Raton Florida. 41 (5): 393-397.
- ✚ Costa MRGF et al. (2011) Use of the native forage hay of Brazilian's northeast in the feeding of sheep and goats. *Pubvet*, 5 (7) 17.
- ✚ Cox, S., Abu-Ghannam, N. and Gupta, S.(2011). An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. *International Food Research Journal* 17: 205-22
- ✚ D'Archivio M., Filesì C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C. et Masella R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-dell'Istituto-Superiore-di-Sanità.* 43(4) : 348-361.
- ✚ Dabbadie L.(1992). CULTURES INTENSIVES DE MICROALGUES SUR LISIER DE PORC: PERFORMANCES, CONTRAINTES, UTILISATION DES BIOMASSES. DIPLOME D'AGRONOMIE APPROFONDIE. ECOLE NATIONALE SUPÉRIEURE AGRONOMIQUE DE MONTPELLIER.P :123.
- ✚ Damonte EB, Pujol CA, Coto CE.(2004). Prospects for the therapy and prevention of Dengue virus infections. *Advances in Virus Research.* 63:239-285.
- ✚ Daphné Lorne(2011). Des biocarburants à partir de microalgues.<http://www.ifpenergiesnouvelles.fr/Espace-Decouverte/Tous-les-Zooms/Des-biocarburants-a-partir-de-microalgues> consulté le 05/01/2017.
- ✚ De Beer FC, Baltz ML, Munn EA, Feinstein A, Taylor J, Bruton C, Clamp JR, Pepys MB.(1982). Isolation and characterization of C-reactive protein and serum amyloid P component in the rat. *Immunology.* 45:55–70.
- ✚ De Jesus Raposo MF, de Moraes RMSC, de Moraes AMMB.(2013). Bioactivity and Applications of Sulphated Polysaccharides from Marine Microalgae. *Marine Drugs.* 2013;11(1):233-252.
- ✚ De la Noüe, J., De Pauw, N.(1988). The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. *Biotechnology Advances*, 6, pp.723-770.

- ✚ Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., et Capasso F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life. Sci.* 65 (4): 337-53.
- ✚ Dimitrov I., Kamenov V., Angelova P., Petrov M.(2014) Concentration of C-reactive protein in white adipose tissue, liver and blood serum of male wistar rats. *Trakia Journal of sciences*, 12:29-33.
- ✚ Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82, 47-95
- ✚ Duraiarasan Surendhiran, Mani Vijay, Abdul Razack Sirajunnisa, Thiruvengadam Subramaniam, Ammavasai Shanthalin Shellomith, Kuppusamy Tamilselvam.(2014). A green synthesis of antimicrobial compounds from marine microalgae *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Coastal Life Medicine.* 2(11): 859-863.
- ✚ Duthie GG, Duthie SJ, Kyle JAM.(2000). Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutrition Research Reviews.*13(1):79–106.
- ✚ Editorial. (2005). Dual inhibition of cyclo-oxygenases and 5-lipoxygenase : a novel therapeutic approach to inflammation ? *Revue du Rhumatisme*, 72, 379-382.
- ✚ El Gharras, H. (2009). "Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review." *International Journal of Food Science and Technology* 44(12): 2512-2518.
- ✚ Elion Itou R.D.G., Sanogo R., Etou Ossibi A.W., Nsonde Ntandou F.G., Ondelé R., Pénemé B.M., Okiémy Andissa N., Diallo D., Ouamba J.M., Abena A.A., (2014). Anti-inflammatory and analgesic effects of aqueous extract of stem bark of *Ceiba pentandra* Gaertn. *Pharmacology & Pharmacy*, 5 : 1113-1118
- ✚ Engler, R.(1995). Protéines de la phase aiguë de l'inflammation : Acute phase proteins. *Compte Rendu de la Société de Biologie*,189, 563-578.
- ✚ Epa Charles, Elion Itou RDG, Etou Ossibi AW, Attibayéba, Ongoka Pascal Robin, Abena Ange Antoine.(2015). Effet anti-inflammatoire et cicatrisant des extraits aqueux et éthanolique des écorces du tronc de *Buchholzia coriacea* Engl. (Capparidaceae). *Journal of Applied Biosciences* 94:8858 – 8868
- ✚ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing EUCAST, (2010). M100-S9, (19). 44-67p
- ✚ Ezeja M. I., Ezeigbo I. I, Madubuike K. G. (2011). Analgesic activity of the methanolic seed extract of *Buchholzia coriacea*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, (2): 187-193p.

- ✚ Fadoul, HE & Juntawong, N.(2014). Antimicrobial Activity of Extracts from Aquatic Algae Isolated From Salt Soil and Fresh Water in Thailan. *International Journal of Research Studies in Biosciences*. Volume 2, Issue 11, PP 149-152
- ✚ Farasat M, Khavari-Nejad R-A, Nabavi SMB, 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):163-170.
- ✚ Favier A (2003) Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique* novembre décembre, 108-15
- ✚ Fawley KP, Fawley MW(2007). Observations on the diversity and ecology of freshwater Nannochloropsis (Eustigmatophyceae), with descriptions of new taxa. *Protist*.158(3):325–336.
- ✚ Fernandes Seixas,P.(2009). Composición bioquímica y crecimiento de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797), alimentadas con juveniles de *Artemia* enriquecidos con microalgas y otros suplementos nutricionales. *Universidade de Santiago de Compostela*,pp 105.
- ✚ Filali,R(2012).Estimation et commande robustes de culture de microalgues pour la valorisation biologique de CO. Thèse de doctorat : Ecole Doctoral Sciences et Technologies de l'Information des Télécommunications et des Systèmes » 18p.
- ✚ Finkel, T. (2000) Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett* 476:52-54.
- ✚ Fleuriet A.,(1982). Expression et régulation du métabolisme des derives hydroxycinnamiques au cours de la croissance Thèse Doc. Etat, Montpellier.
- ✚ Floreto, E.A.T., Hirata, H., Ando, S., and Yamasaki, S. (1993) Effects of temperature, light intensity, salinity and source of nitrogen on the growth, total lipid and fatty acid composition of *Ulva pertusa* Kjellman (Chlorophyta). *Bot Mar* 36: 149– 158.
- ✚ Fox J, Robyt F. (1991). Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader. *Anal. Biochem.*, 195: 93-96.
- ✚ Franco, D.; Sineiro, J.; Rubilar, M.; Sánchez, M.; Jerez, M.; Pinelo, M.; Costoya, N.; Núñez, M.J.(2008).Polyphenols from plant materials: Extraction and antioxidant power. *Electron J. Environ. Agric. Food Chem.* 7, 3210–3216.
- ✚ Gentili M, Fletcher D, Mazoit X. and Samii K. (1997). Influence d'un bloc ou d'une section de nerf périphérique sur l'inflammation à la carragénine chez le rat. *Annales françaises d'anesthésie et de réanimation* 16 (6) : R285

- ✚ Ghestem A., Seguin E., Paris M., and Orecchioni A.M. (2001). Le préparateur en pharmacie dossier 2èmeEd TEC&DOC. Paris. pp275.
- ✚ Göçer, H.; Akıncıoğlu, A.; Öztas, N.; Göksu, S.; Gülçin, I.(2013). Synthesis, antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of sulfonamide derivatives of dopamine related compounds. ArchPharm., 346, 783–792.
- ✚ Goiris K, Cooreman C, Foubert I, Muylaert K, De Cooman L. (2012). Antioxidant Potential of Microalgae in Relation to their Phenolic and Carotenoid Content.J Apply Phycol. , Volume 24, Issue 6, pp 1477–1486
- ✚ González F & M Silva.(2001). Biodiversidad química de macroalgas marinas. In: Alveal K & T Antezana (eds). Sustentabilidad de la biodiversidad, un problema actual. Bases científico-técnicas, teorizaciones y proyecciones, 415-496. Universidad de Concepción, Concepción.
- ✚ Gonzalez-Gallego, J., M.V. Garcia-Mediavilla, S. Sanchez-Campos, et al. (2010). "Fruit polyphenols, immunity and inflammation." Br J Nutr 104: S15-S27.
- ✚ Gordillo, F.J.L.; Jiménez, C.; Figueroa, F.L.; Niell, F.X.(1998). Effects of increased atmospheric CO2 and N supply on photosynthesis, growth and cell composition of the cyanobacterium Spirulina platensis (Arthrospira). J. Appl. Phycol. 10, 461–469.
- ✚ Gordon, H. T., Bauernfeind, J. C.(1982). Carotenoids as food colorants. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, pp. 18–59.
- ✚ Goud, M., Seshikala, D. and Singara Charya, M.A. (2007). Antibacterial activity and biomolecular composition of certain fresh water micro-algae from river Godavari. Science World Journal, 2(3):19-23
- ✚ Gouveia L, Oliveira AC. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36:269–274.
- ✚ Govindarajan, R., Vijayakumar, M., Pushpangadan, P., (2005). Antioxidant approach to disease management and the role of “Rasayana” herbs of Ayurveda. J. Ethnopharmacol. 99, 165–178.
- ✚ Griselli M, Herbert J, Hutchinson WL, Taylor KM, Sohail M, Krausz T, Pepys MB.(1999) C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. J Exp Med.190:1733–40
- ✚ Gu, N.; Lin, Q.; Li, G.; Tan, Y.-H.; Huang, L.-M.; Lin, J.-D.(2012). Effect of salinity on growth, biochemical composition, and lipid productivity of Nannochloropsis oculata CS 179. Eng. Life Sci. 12, 631–637

- ✚ Guschina, I.A., and Harwood, J.L. (2006) Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog Lipid Res* 45: 160– 186.
- ✚ Gutteridge, J.M. (1994) Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact* 91:133-140
- ✚ Hanhineva, K.; Törrönen, R.; Bondia-Pons, I.; Pekkinen, J.; Kolehmainen, M.; Mykkänen, H.; et al.(2010). Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int. J. Mol. Sci.*,11, 13651402.
- ✚ Harborne J.B., and Williams C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992 *Phytochemistry*. 55: 481-504.
- ✚ Harrison PJ, Thompson PA, Calderwood GS. (1990) Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. *J Appl Phycol* 2:45–56
- ✚ He YH, Xiao C, Wang YS, Zhao HY, Tong Y,Zhou J, Jia HW,Lu C,Li XM .,Lu AP ., (2013) Antioxidant an anti-inflammatory effects of cyanidin from cherries on rat adjuvant-induced arthritis : *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* . (20).602-5.
- ✚ Hellal Z. (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardinapilchardus*). Mémoire de Magister. Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou.
- ✚ Hemalatha A, Girija K, Parthiban C, Saranya C and Anantharama P.(2013). Antioxidant properties and total phenolic content of a marine diatom, *Navicula clavata* and green microalgae, *Chlorella marina* and *Dunaliella salina*. *Advances in Applied Science Research*, 4(5): 151-157
- ✚ Hemalatha A,Girija K, Parthiban C, Saranya C, and Anantharaman P.(2013).Antioxidant properties and total phenolic content of a marine diatom, *Navicula clavata* and green microalgae, *Chlorella marina* and *Dunaliella salina*. *Advances in Applied Science Research*,4(5): 151-157.
- ✚ Hibberd DJ (1981). Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae (synonym Xanthophyceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 82:93-119
- ✚ Holtin, K., Kuehnle, M., Rehbein, J., Schuler, P., Nicholson, G. & Albert, K. (2009). Determination of astaxanthin and astaxanthin esters in the microalgae *Haematococcus pluvialis* by LC-(APCI)MS and characterization of predominant carotenoid isomers by NMR spectroscopy. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 395(6), 1613-22

- ✚ Hoppe, H.A. (1979). Marine algae and their products and constituents in pharmacy. In: Hoppe HA, Levring T, Tanaka Y (eds), Marine Algae in Pharmaceutical Science. Walter de Gruyter, Berlin -New York, pp: 25-119.
- ✚ Hu, Q.; Sommerfeld, M.; Jarvis, E.; Ghirardi, M.; Posewitz, M.; Seibert, M.; Darzins, A.(2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. Plant J. 54, 621–639.
- ✚ Hu,H et Gao, K (2006). Response of Growth and Fatty Acid Compositions of *Nannochloropsis* sp. to Environmental Factors Under Elevated CO₂ ConcentrationBiotechnol Lett.28: 987.
- ✚ Hua-Bin Lia, Ka-Wing Chenga, Chi-Chun Wonga, King-Wai Fana, Feng Chena, b, Yue Jiang.(2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae.food chemistry 120,771-776.
- ✚ Huggins, T.G., Wells-Knecht, M.C, Detorie, N.A, Baynes, J.W Thorpe, S.R (1993) Formation of o-tyrosine and dityrosine in proteins during radiolytic and metal-catalyzed oxidation. J Biol Chem 268:12341-12347.
- ✚ Hussain, S.P., Hofseth, L.J., Harris, C.C., (2003). Radical causes of cancer. Nat. Rev. Cancer 3, 276–285.
- ✚ Ibrahim T. A. Fagbonun E. D. (2013). Antibacterial and Antifungal Activity of Ethanolic and Methanolic Extract of Dried Seeds of *Buchhlozia coriacea*. Greener Journal of Agricultural Sciences 3:458-463.
- ✚ Inoue K, Garner C, Ackermann BL, Oe T, Blair IA, (2006). Liquid chromatography / tandem mass spectrometry characterization of oxidized amyloid beta peptides as potential biomarkers of Alzheimer's disease. Rapid Communications of Mass Spectrometry, 20(5): 911-918.
- ✚ Jacques B, and André R. (2004). Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris. pp: 217-219 220-223-225.
- ✚ Janakat S., Al-Fakhiri S., Sallal A-K., (2005). Evaluation of antibacterial activity of aqueous and methanolic extracts of the truffle *Terfazia claveryi* against *Pseudomonas aeruginosa*. Phytother. Res. 26 (6): 447-450p.
- ✚ Jean-Paul Levy, Bruno Varet, Jean-Pierre Clauvel, François Lefrère.(2001).Les plaquettes sanguines et leur pathologie quantitative. Hématologie et transfusion ; collection Abrégés Masson, Eds, Paris. pp189-191

- ✚ Jiang, Y., Chen, F., Liang, S.Z.(1999).Production potential of docosaheaxaenoic acid by the heterotrophic marine dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Process Biochemistry*, 34, pp. 633-637.
- ✚ Jiao G., Yu G., Zhang J., Ewart S.H. (2011). Chemical structures and bioactivities of sulphated polysaccharides from marine algae. *Mar. Drugs*.9:196–223.
- ✚ Jinkerson RE, Radakovits R, Posewitz MC(2013). Genomic insights from the oleaginous model alga *Nannochloropsis gaditana*. *Bioengineered*. 4(1):37–43.
- ✚ Jong-Yuh C., Mei-Fen S.(2005). Potential hypoglycemic effects of *Chlorella* in streptozotocin-induced diabetic mice. *Life sciences* 77 (9), 980–990.
- ✚ Jorge M.S. Rocha, Juan E.C. Garcia, Marta H.F. Henriques(2003).Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana**Biomolecular Engineering* 20, 237 - 242.
- ✚ Joslyn M. A., (1970). A serie of monographie. *Food. Sci. techn.* Second Edition Board.
- ✚ Justo G. Z., Silva M. R., Queiroz M. L. S.(2001). Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal ehrlich ascites tumor transplantation in mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 23 :119–132.
- ✚ Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., et al. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 3954-3962.
- ✚ Kandilian, R.; Lee, E.; Pilon, L. (2013). "Radiation and optical properties of *Nannochloropsis oculata* grown under different irradiances and spectra". *Bioresource Technology*. 137: 63–73.
- ✚ Kannan, R.R.R., Arumugam, R. and Anantharaman, P. (2010). In vitro antioxidant activities of ethanol extract from *Enhalus acoroides* (L.F.) Royle. *Asian Pac J Trop Med*; 3(11): 898-901.
- ✚ Karaman I, Sahin F, Güllüce M, Öğütçü H, Sengül M, Adıgüzel A, 2003. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 85(2-3): 231-235
- ✚ Katiyar SK, Agarwal R, Mukhtar H (1993). Protective effects of green tea polyphenols administered by oral intubation against chemical carcinogeninduced forestomach and pulmonary neoplasia in A/J mice. *Cancer Lett* 73: 167-172. 69.

- ✚ Katsuura S, Imamura T, Bando N, Yamanishi R,(2009). Beta-Carotene and betacryptoxanthin but not lutein evoke redox and immune changes in RAW264 murine macrophage. *Mol Nutr Food Res.*53:1396-1405
- ✚ Kellar SJ and Walker JM,(1989).Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture, *Br. Phycol. J*, 24, 191-194.
- ✚ KentM,WelladsenHM,MangottA,LiY.(2015)Nutritional Evaluation of Australian Microalgae as Potential Human Health Supplements.PLoS ONE 10(2).
- ✚ Khoddami, A.; Wilkes, M.A.; Roberts, T.H.(2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18, 2328–2375.
- ✚ King A., and Young G. (1999). characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Jof the American dietetic association.*99:213-218.
- ✚ Knekt P., Kumpulainen J., Jarvinen R., Rissanen H., Heliovaara M., Reunanen A et al. (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *American Journal of Clinical Nutrition.* 76: 560-568.
- ✚ Komori A, Yatsunami J, Okabe S, Abe S, Hara K, et al. (1993).Anticarcinogenic activity of green tea polyphenols. *Jpn J Clin Oncol* 23: 186-190. 70.
- ✚ Konishi F., Tanaka K., Kumamoto S., Hasegawa T., Okuda M., Yano I., Yoshikai Y., Nomoto K.(1990). Enhanced resistance against *Escherichia coli* infection by subcutaneous administration of the hot-water extract of *Chlorella vulgaris* in cyclophosphamide-treated mice. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 32 : 1–7
- ✚ Kraus A.L.(1980). Research methodology. *The laboratory Rat* 2(1):5-9..
- ✚ Krishnika, A, Bhanupriya, P. B and Beena B. Nair.(2011).Antibacterial activity of eight marine microalgae against a few gram negative bacterial pathogens. *Journal of Pharmacy Research.*4(9),3024-3026.
- ✚ Kroth PG1, Chiovitti A, Gruber A, Martin-Jezequel V, Mock T, Parker MS, Stanley MS, Kaplan A, Caron L, Weber T, Maheswari U, Armbrust EV, Bowler C.(2008). A model for carbohydrate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* deduced from comparative whole genome analysis.PLOS ONE3(1):1426.
- ✚ Kumar, G.S., Sarada, D.V.L. and Rengasamy, R. (2008). Seaweed extracts control the leaf spot disease of the medicinal plant *Gymnema sylvestre* *Indian Journal of Science and Technology*, 1(3): 1-5.
- ✚ Kumar, K.S.; Dahms, H.-U.; Won, E.-J.; Lee, J.-S.; Shin, K.-H.(2015). Microalgae— A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 329–352.

- ✚ Kyoung Ah Kang, Hyung Deuk Bu, Dal Soo Park, Gyung Min Go, Youngheun Jee, Taekyun Shin and Jin Won Hyun.(2005). Antioxidant Activity of Ethanol Extract of *Callophyllis japonica*. PHYTOTHERAPY RESEARCH.19, 506–510.
- ✚ Landolfi, R. et al.(1984). Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. *Biochemical Pharmacology*, v.33, p.1525-1530.
- ✚ Laurens LML, Quinn M, Van Wycken S, Templeton DW, Wolfrum EJ(2012). Accurate and reliable quantification of total microalgal fuel potential as fatty acid methyl esters by in situ transesterification. *Anal Bioanal Chem*. 403(1):167–178.
- ✚ Laurienzo P (2010) Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: an overview. *Mar Drugs* 8, 2435-65
- ✚ Lavanya, R. and Veerappan, N. (2011).Antibacterial Potential of six seaweeds collected from Gulf of Mannar of Southeast Coast of India. *Advances in Biological Research*, 5(1): 38-44.
- ✚ Lechevalier, H. A.(1977). Volume II Fungi, Algae, Protozoa, and Viruses. 2ème édition, Floride, Laskin, Allen I., 874 p., CRC handbook of microbiology.
- ✚ Lee KW, Kim YJ, Kim DO, Lee HJ, Lee CY (2003) Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6516–6520.
- ✚ Li HB, Chen F, Zhang TY, Yang FQ, Xu GQ.(2001). Preparative isolation and purification of lutein from the microalga *Chlorella vulgaris* by high-speed counter-current chromatography *Chromatogr.*, 5;905(1-2):151-5.
- ✚ Li, Y.X.; Wijesekara, I.; Li, Y.; Kim, S.K. (2011).Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochem.* 46, 2219–2224. 7.
- ✚ Li, Z.-R.; Wakao, S.; Fischer, B.B.; Niyogi, K.K.(2009). Sensing and responding to excess light. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 239–260.
- ✚ Liua H, Huang C, Donga W, Dub Y, Baib X, Lia x.(2005). Biodegradation of xanthan by newly isolated *Cellulomonas* sp. LX, releasing elicitor-active xantho-oligosaccharides-induced phytoalexin synthesis in soybean cotyledons. *Process Biochemistry*,40: 3701–3706
- ✚ López CV, García Mdel C, Fernández FG, Bustos CS, Chisti Y, Sevilla JM.(2010). Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresour Technol.* 101(19):7587-91.

- ✚ Lu G, Xiao H, You H, Lin Y, Jin H, et al. (2008). Synergistic inhibition of lung tumorigenesis by a combination of green tea polyphenols and atorvastatin. Clin Cancer Res 14: 4981-4988.
- ✚ Lubian, L. M.; et al. (2000). "Nannochloropsis (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments". Journal of Applied Phycology. 12: 249–255.
- ✚ Lugasi A., Hovari J., SagiK., and Biro L. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases.J.Acta.biologica. szegediensis. 47 (1-4):119-125.
- ✚ Maadane A, Merghoub N, Ainane T, El Arroussi H, Benhima R, Amzazi S, Bakri Y, Wahby I.(2015).Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. Journal of Biotechnology 215:13
- ✚ Mabry T J, Markham K R, Thomas M B.(1970).The Systematic Identification of Flavonoids. New York: Springer-Verlag Publication; 1970. pp. 261–266.pp. 294
- ✚ Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C, (2005). Les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d’importance économique. 1ere Edition, Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne2.
- ✚ Makimura M, Hirasawa M, Kobayashi K, Indo J, Sakanaka S, Taguchi T, Otake S.(1993). Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity. J Periodontol. Jul;64(7):630-6.
- ✚ Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols. (2004).Food sources and bioavailability. Am. J. Clin. Nutr. 79, 727–747. 5.
- ✚ Manivannan K, Thirumaran G, Karthikai Devi G, Anantharaman P, Balasubramanian T.(2009). Proximate composition of different group of seaweeds from Vedalai coastal waters (Gulf of Mannar): Southest coast of India. Middle East J Sci. Res. 4:72–77
- ✚ Martínez-Cayuela M. (1995) Oxygen free radicals and human disease. Biochimie. 77, 147-161.
- ✚ Masuda T, Yonemori S, Oyama Y, Takeda Y, Tanaka T, Andoh T. (1999). Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: Activity of the leaf extracts from seashore plants. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 47(4): 1749-1754
- ✚ Mena S., Ortega A. and Estrela J. M. (2009) Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 674(1-2), 36-44.
- ✚ Menon LG, Kuttan R, Kuttan G (1995). Inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells by polyphenolic compounds. Cancer Lett 95: 221-225. 71.

- ✚ Mert Eryalçın, Kamil; Ganuza, Eneko; Atalah, Eyad; Hernández Cruz, Maria Carmen. (2015) *Nannochloropsis gaditana* and *Cryptothecodinium cohnii*, two microalgae as alternative sources of essential fatty acids in early weaning for gilthead seabream *Hidrobiológica*, vol. 25, núm. 2, pp. 193-202
- ✚ Middleton I.J., Kandaswami, C., Theoharide, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implication for inflammation, heart diseases and cancer, *Pharmacological reviews*; 52:673-751.
- ✚ Middleton and Elliott J. (1996). Biological properties of plant flavonoids an overview. *Int. J. Pharmacol.* 34 (5): 344-348.
- ✚ Mizoguchi, T., Takehara, I., Masuzawa, T., Saito, T., Naoki, Y., Sep. (2008). Nutrigenomic studies of effects of *Chlorella* on subjects with high-risk factors for lifestyle-related disease. *Journal of medicinal food* 11 (3), 395–404.
- ✚ Mohamed, Z. A. (2008). Polysaccharides as a protective response against microcystin induced oxidative stress in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* and their possible significance in the aquatic ecosystem. *Ecotoxicology*, 17, 504-516
- ✚ Mole S, Waterman PG (1987) A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies: I. Technologies for chemically define tannins. *Oecologia* 72: 137-14.
- ✚ Monteiro C.M., Castro P.M.L., Malcata FX. (2012). Metal uptake by microalgae: Underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnol. Progress.* 28: 299-311.
- ✚ Morand C. (2013). Les polyphénols du thé et du cacao ont-ils des effets santé? *Phytothérapie* 11, 9299.
- ✚ Morice G; Jamma C. (1992). De l'or vert à la tone. *Science et Vie* 894 :96-99.
- ✚ Morris C.J. (2003). Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol. Biomol.*, 225, 115-121.
- ✚ Muller-Feuga, A., Moal, J. e Kaas, R. (2003). *The Microalgae of Aquaculture*, Støttrup, J. G. & McEvoy, L. A. (Eds.). *Live Feeds in Marine Aquaculture*, 1st ed. Blackwell Science Ltd, Oxford, United Kingdom. Pp 206-253
- ✚ Muñoz, R., Teresa Alvarez, M., Muñoz, A., Terrazas, E., Guieysse, B., Mattiasson, B. (2006). Sequential removal of heavy metals ions and organic pollutants using an algal-bacterial consortium. *Chemosphere*, 63, pp. 903-911.
- ✚ Mussatto SI, Ballesteros LF, Martins S, Teixeira JA, (2011). Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*, 83(15): 173-179.

- ✚ Namgoong S.Y., Son K.H., Chang H.W., Kang S.S., and Kim H.P. (1994). Effects of naturally occurring flavonoids on mutagen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life Sci.* 54 (5): 313-20.
- ✚ Nantel.F, Denis.D , Gordon.R , Northey.A , Cirino.M , Metters .K.M et Chan.C.C (1999). Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, 128, 853-859.
- ✚ Nath M., Sulaxna, Song X., Eng G., Kumar A., 2008. Synthesis and spectral studies of
- ✚ Nauroth, J.M.; Liu, Y.C.; van Elswyk, M.; Bell, R.; Hall, E.B.; Chung, G.; Arterburn, L.M.(2010). Docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA_n-6) algal oils reduce inflammatory mediators in human peripheral mononuclear cells in vitro and paw edema in vivo. *Lipids.* 45, 375–384.
- ✚ NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (2002). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests of bacteria that grow aerobically. Approved Standard M100-S12.
- ✚ Noriyuki Ouchi, Shinji Kihara, Tohru Funahashi, Tadashi Nakamura, Makoto Nishida, Masahiro Kumada, Yoshihisa Okamoto, Koji Ohashi, Hiroyuki Nagaretani, Ken Kishida, Hitoshi Nishizawa, Norikazu Maeda, Hideki Kobayashi, Hisatoyo Hiraoka, and Yuji Matsuzawa.(2003). Reciprocal Association of C-Reactive Protein With Adiponectin in Blood Stream and Adipose Tissue Circulation. 107:671-674
- ✚ O’Connell J.E., Fox P.F. (2001). Signification and applications of phénolic compounds in the production and quality of milk dairy products: a review. *International Dairy Journal.* 11(3):103-120.
- ✚ Oldham KM, Bowen PE,(1998). Oxidative stress in critical care: is antioxidant supplementation beneficial. *Journal of the American Diet Association*, 98(9): 1001-1008.
- ✚ Olguin, E.J.(2003). Phycoremediation: Key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnology Advances* 22, pp. 81-91.
- ✚ Ong K.C., and Khoo H.E. (2000). Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life. Sci.* 67: 1695-1705.
- organotin (IV) 4-amino-3-alkyl-1,2,4-triazole-5-tionates: In vitro anti microbial activity. *Spectrochimica Acta Part ; A*; 70; 766-774.
- ✚ Oyaizu M (1986) Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition* 44: 307315.

- ✚ Ozen T., Demirtas I ., Aksit H. (2011). Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*. *Food Chem*, (124), 58-64p.
- ✚ Park B.S, Lee H.K, Lee S.E, Piao X.L, Takeoka G. R., Wong R. Y., Ahn Y.J., Kim J.H., (2006). Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheeb) against *Helicobacter pylori*. *Journal of Ethnopharmacology*, (105) : 255-262p.
- ✚ Park P. J., Jung W. K., Nam K.S., Shahidi F. and Kim S. K. (2001) Purification and characterization of antioxidative peptides from proteinhydrolysate of lecithin-free egg yolk. *Journal of the American oil Chemists Society*, 78 (6), 651-656
- ✚ Patel S.(2012). Therapeutic importance of sulfated polysaccharides from seaweeds: Updating the recent findings. *3 Biotech*.2:171–185.
- ✚ Patterson G.M.L., Baldwin C.L., Bolis C.M., Caplan F.R., Karuso H., Larsen L.K., Levine I.A., Moore R.E., Nelson C.S., Tschappat K.D., Tuang G.D., Furusawa E., Furusawa S., Norton T.R., Raybourne R.B.(1991).Antineoplastic activity of cultured bluegreen algae (Cyanophyta). *Journal of Phycology*. 27:530-536.
- ✚ Penfield MP, Campbell AM, (1990). Fats and their lipids constituents. Chemical reactions of lipids. *Experimental food science*, 3eme Edition. San Diego: Academic Press.
- ✚ Pepys M.B.(1981).C-reactive protein fifty years on . *Lancet*, 653-657.
- ✚ Pereira H, Custódio L, Rodrigues MJ, de Sousa CB, Oliveira M, Barreira L, Neng Nda R, Nogueira JM, Alrokayan SA, Mouffouk F, Abu-Salah KM, Ben-Hamadou R, Varela J. (2015). Biological Activities and Chemical Composition of Methanolic Extracts of Selected Autochthonous Microalgae Strains from the Red Sea. *Mar. Drugs*, 13, 3531-3549
- ✚ Person J.(2011).Algues filière du futur .livre turquoise. Edition Adebiotech.
- ✚ Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K. et Defraigne J.O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme* 16: 233-239.
- ✚ Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M (2001). Antioxidants in food, Practical applications. Woodhead Publishing Limited.
- ✚ Popovici C. , Ilonka S ., Bartek T.,(2009) Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH *Revue de génie industriel*,(4), 25-39p.

- ✚ Posadas.I , Bucci.M , Roviezzo.F , Rossi.A , Parente.L , Sautebin.L , Cirino.G (2004). Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependant and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. British journal of pharmacology, 142, 331-338.
- ✚ Prashant, P., Angadi, S.B. and Vidyasagar, G.M. (2006). Antimicrobial activity of Blue green and green algae. Department of PG studies and Research in Botany, Gulbarga University, Gulbarga, 68(5):647-648.
- ✚ Pratt R, Daniels TC, Eiler JB, Gunnison JB, Kumler WD et al.(1944). Chlorellin, an antibacterial substance from Chlorella. Science.99:351-352.
- ✚ Prescott L, Herley J, Klein D. (2003). Microbiologie 2^{ème} édition Française. traduction de la 5eme édition Américaine.Université de Liège. 1137p.
- ✚ Prieur, C., J. Rigaud, V. Cheynier et M. Moutounet (1994). "Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds." Phytochemistry 36(3): 781-784.
- ✚ PUE C.A., MORTENSEN R.F., MARSH C.B., POPE H.A., WEWERS M.D.(1996). Acute phase levels of C-reactive protein enhance IL-1 beta and IL-1ra production by human blood monocytes but inhibit IL-1 beta and IL-1ra production by alveolar macrophages. J. Immunol., 156, 1594-1600.
- ✚ Pugh N., Ross S. A., ElSohly H. N., ElSohly M. A., Pasco D. S.(2001). Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from Spirulina platensis, aphanizomenon flos-aquae and Chlorella pyrenoidosa. Planta medica 67 (8): 737–742.
- ✚ Pulz, O., Gross, W.(2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. Minireview, Applied Microbiology and Biotechnology, Volume 65, Number 6, pp. 635-648.
- ✚ Queva,R. (2011).Les algues. Paris : édition Marabout.
- ✚ Rahmoun M. N., (2009). Essai de tests biologiques (antibactériens/ antifongiques) de produits dérivés de la lawsone. *Mémoire de magister*, Université Abou-bakr Belkaïd, Tlemcen. p 3640.
- ✚ Rajeev KJ. and Xu Z, (2004). Biomedical compounds from marine organisms. Marine Drug 2: 123-146.

- ✚ Rebollosa-Fuentes MM, Navarro-Pérez A, García-Camacho F, Ramos-Miras JJ, &Guil-Guerrero JL. (2001). Biomass nutrient profiles of the microalga *Nannochloropsis*. *Journal of agricultural and food chemistry* 49(6),pp:2966-72.
- ✚ Renaud SM, Parry DL. (1994) Microalgae for use in tropical aquaculture II: effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae. *J Appl Phycol* 6:347–356
- ✚ Riahi RC., Tarhouni S., Kharraz R.(2012). Criblage de l'effet anti-inflammatoire et analgesique des algues marines de la mer mediterrannee. *Les Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 88-2011 (1-4), pp.19-28.
- ✚ Ribereau G P, (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Dunod, Paris, 254 p.
- ✚ Ringler DH, Dabich L.(1979). Haematology and Clinical Biochemistry. In: Baker J, Lindsey JR, Weisbroth SH, editors. *The Laboratory Rat*. London: Academic press; pp. 105–118
- ✚ ROBEY F.A., JONES K.D., TANATA T., LIU T.Y.(1984). Binding of C-reactive protein to chromatin and nucleosome core particles. A possible physiological role of C-reactive protein. *J. Biol. Chem.*, 259, 7311-7316.
- ✚ Rodolfi L, GraChini Zittelli G, Barsanti L, Rosati G and M.R. Tredici M.R(2003). Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. mass cultivation. *Biomolecular Engineering* 20, 243
- ✚ Rodolfi, L.; Chini Zittelli, G.; Bassi, N.; Padovani, G.; Biondi, N.; Bonini, G.; Tredici, M.R.(2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 100–112.
- ✚ Rodriguez-Mateos A., Vauzour D., Krueger C.G., Shanmuganayagam D., Reed J., Calani L., Mena P., Del Rio D., Crozier A. (2014). Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. *Arch Toxicol.* 2014. 88, 1803-1853
- ✚ Roleda MY, Slocombe SP, Leahey RJ, Day JG, Bell EM (2013). Stanley MS. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresour Technol.* 129:439–449.
- ✚ Ross, J. A. and Kasum, C. M. (2002). Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects and safety. *Annual Review of Nutrition* 22: 19-34.

- ✚ Rutikanga Adrien , Leonard Mwangi Gitu , Nathan Oyaro.(2014).Mineral composition, Antioxidants and Antimicrobial activities of freshwater algae (spirogyra genus) from Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology (JKUAT). World Rural Observations ;6(2).
- ✚ Safafar, H, van Wagenen,J, Møller,P,& Jacobsen,C.(2015). Carotenoids, Phenolic Compounds and Tocopherols Contribute to the Antioxidative Properties of Some Microalgae Species Grown on Industrial Wastewater.Marine drugs13(12): 7339–7356.
- ✚ Safi, C.; Zebib, B.; Merah, O.; Pontalier, P.-Y.; Vaca-Garcia, C.(2014). Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: A review. Renew. Sustain. Energy Rev. 35, 265–278.
- ✚ Saha A, Kuzuhara T, Echigo N, Suganuma M, Fujiki H (2010). New role of (-)-epicatechin in enhancing the induction of growth inhibition and apoptosis in human lung cancer cells by curcumin. Cancer Prev Res (Phila) 3: 953-962.
- ✚ Sanaa MM Shanab, Soha SM Mostafa, Emad A Shalaby, and Ghada I Mahmoud (2012). Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. Asian Pac J Trop Biomed. Aug; 2(8): 608–615.
- ✚ Sanab SMM, Shalaby EA, El-Fayoumy EA.(2011). Enteromorpha compressa exhibits potent antioxidant activity. J Biomed Biotechnol.726405:1–11.
- ✚ Sánchez-Machado DI, López-Cervantes J, López-Hernández J, Paseiro-Losada P (2004). Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. Food Chem. 85: 439–444
- ✚ Sanchez-Moreno C,Larrauri J.A, Saura-Calixto F.J.(1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols Sci Food. Agr. 76 - 270.
- ✚ Santangelo, C., R. Vari, B. Scazzocchio, et al. (2007). "Polyphenols, intracellular signalling and inflammation." Ann Ist Super Sanita 43: 394-405.
- ✚ Santoyo S, Rodríguez-Meizoso I, Cifuentes A, Jaime L, García-Blairsy Reina G, Señorans FJ, Ibáñez E.(2009). Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potent antimicrobials from Haematococcus pluvialis microalgae. LWT – Food Science and Technology. 42:1213-1218.
- ✚ Sazuka M, Murakami S, Isemura M, Satoh K, Nukiwa T (1995). Inhibitory effects of green tea infusion on in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse lung carcinoma cells. Cancer Lett 98: 27-31. 72.

- ✚ Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C., Jimenez L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45: 287-306
- ✚ Seenivasan, R., Indu, H., Archana, G. and Geetha, S. (2010). The Antibacterial Activity of Some Marine Algae from South East Coast of India. *American- Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science*, 9(5): 480-489.
- ✚ Seyoum A., Asres K., and El-Fiky F.K. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*. 67: 2058–2070.
- ✚ Shabudeen Syed, Ashok Arasu and Indhumathi Ponnuswamy.(2015). The Uses of *Chlorella Vulgaris* as Antimicrobial Agent and as a Diet: the Presence of Bio-active Compounds which caters the Vitamins, Minerals in General. *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology* Vol.7, No.1, pp.185-190.
- ✚ Shalaby EA.(2011). Algae as promising organisms for environment and health. *Plant Signaling and Behavior*. 6(9):1338–1350.
- ✚ Shifrin NS, Chisholm SW. (1981) Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *J Phycol* 17:374–384
- ✚ Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Technology and Viticulture* 16: 144-153.
- ✚ Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A.(2006).Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng*.101(2):87-96.
- ✚ Srinivasakumar KP, Rajashekhar M.(2009). In vitro studies on bactericidal activity and sensitivity pattern of isolated marine microalgae against selective human bacterial pathogens, *Indian Journal of Science and Technology*, 2 :8, 16-23.
- ✚ Srivastava, N., Saurav, K., Mohanasrinivasan, V., Kannabiran, K. and Singh,M. (2010).Antibacterial potential ofmacroalgae collected from the Madappam coast, India. *British J. Pharm. & Toxicol.*, 1(2): 72-76.92 K.
- ✚ Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J. C.,Witztum, J.L.(1989).Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.*, 320 , 915924.
- ✚ Stolz, P., Obermayer B. (2005).Manufacturing microalgae for skin care. *Cosmetics Toiletries*, 120: 99-106.

- ✚ Su X, Duan J, Jiang Y, Shi J & Kakuda Y. (2006) Effects of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. *Journal of Food Composition and Analysis*,; 19(4): 348-353.
- ✚ Suda S, Atsumi M, and Miyashita H.(2002). Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanica* sp. nov. (Eustigmatophyceae). *Phycologia*: May 2002, Vol. 41, No. 3, pp. 273-279.
- ✚ Su-Hua Goh, Fatimah Md Yusoff, Su Peng Loh.(2010).A Comparison of the Antioxidant Properties and Total Phenolic Content in a Diatom, *Chaetoceros* sp. and a Green Microalga, *Nannochloropsis* sp.*journal of agricultural science*.2(3),123-130.
- ✚ Sukarni • Sudjito • Nurkholis Hamidi • Uun Yanuhar • I. N. G. Wardana(2014). Potential and properties of marine microalgae *Nannochloropsis oculata* as biomass fuel feedstock.*Int J Energy Environ Eng* 5:279–290
- ✚ Sukenik A, Cohen Z (1999). *Chemicals from Microalgae*. Cap 3, Taylor& Francis .
- ✚ Sukenik, A.; Carmeli, Y.; Berner, T.(1989). Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *J. Phycol.* 25, 686–692.
- ✚ Sumi, Y(2009). *Microalgae Pioneering the Future -Application and Utilization*, Life Science Research Unit, quarterly review No.34.
- ✚ SushanthV.R.& Rajashekhar.M.(2015). Antioxidant and antimicrobial activities in the four species of marine microalgae isolated from Arabian Sea of Karnataka Coast.*Indian Journal of Geo-Marine Sciences* 44(1):69-75.
- ✚ Syeda Hurmatul Quader, Shoaib Ul Islam1, Arm Saifullah, Md. Fakhar Uddin Majumder, Jma Hannan.(2013). In-vivo Studies of the Anti-inflammatory Effects of *Spirulina platensis*. *THE PHARMA INNOVATION – JOURNAL*. Vol. 2 No. 4
- ✚ Talero, E., García-Mauriño, S., Ávila-Román, J., Rodríguez-Luna, A., Alcaide, A., & Motilva, V. (2015). Bioactive Compounds Isolated from Microalgae in Chronic Inflammation and Cancer. *Marine Drugs*, 13(10), 6152–6209.
- ✚ Tamion F. (2010) Albumine dans les états infectieux graves Albumin in sepsis *Annales Françaises d’Anesthésie et de Réanimation* 29 629–634
- ✚ Tapiero H., Tew K.D., Nguyen B.G., and Mathé G. (2002). Polyphenol do they play a role in the prevention, of the human pathologies? *Biomed.pharmacother.* 56: 200-207.
- ✚ Taviano MF, Marino A, Trovato A, Bellinghieri V, Melchini A, Dugo P, Cacciola F, Donato P, Mondello L, Guvenc A, De-Pasquale R, Miceli N,(2013). *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* L. subsp.*macrocarpa* (Sibth.

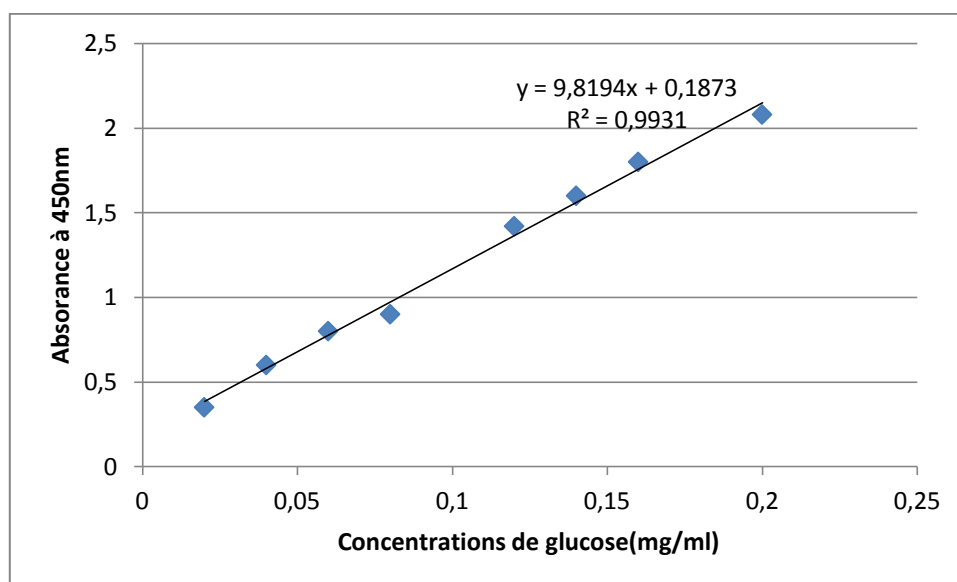
- & Sm.) Ball. “berries” from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities. *Food and Chemical Toxicology*, 58: 22-29.
- ✚ Thomas, N.V.; Kim, S.K.(2011). Potential pharmacological applications of polyphenolic derivates from marine brown algae. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 32, 325–335.
 - ✚ Tian B, Brasier AR,(2003).Identification of a nuclear factor κ B-dependent gene network, *Recent Prog Horm Res* . 58: 95–130. 59.
 - ✚ Tillett W, Francis T,(1930).Serological reactions in pneumonia with non-protein somatic fraction of pneumococcus , *J Exp Med*, 52:561–571
 - ✚ Trabelsi N, Megdiche W, Ksouri R, Falleh H, Oueslati S, Bourgou S, Hajlaoui H, Abdelly C, (2010). Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *Food Science and Technology*, 43(4): 632-639.
 - ✚ Tusevski, O.; Kostovska, A.; Iloska, A.; Trajkovska, L.; Simic, S.G.(2014). Phenolic production and antioxidant properties of some Macedonian medicinal plants. *Cent. Eur. J. Biol.* 9, 888–900.
 - ✚ Uma R, V. Sivasubramanian and S.Niranjali Devaraj.(2011). Evaluation of in vitro antioxidant activities and antiproliferative activity of green microalgae, *Desmococcus olivaceus* and *Chlorococcum humicola*. *J. Algal Biomass Utiln.* 2 (3): 82– 93
 - ✚ Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M T D, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 39, 44-84
 - ✚ Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic and M. Mazur (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 140.
 - ✚ Vazquez G, Fontenla E, Santos J, Freire MS, Gonzalez-Alvarez J, Antorrena G, (2008). Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Industrial crops and products*, 28(3): 279-285.
 - ✚ Vergne. P, Bertin. P et Trèves. R (2000). Aspirine, douleurs et inflammation. *Rev. Méd. Interne*, 21(11), 89-96.

- ✚ Wang X., Ouyang Y., Liu J., Zhu M., Zhao G., Bao W., Hu F.B.(2014). Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *BMJ*. 349, g4490
- ✚ Wang, T., Jónsdóttir, R. and Ólafsdóttir, G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry* 116: 240-248.
- ✚ Wang, Y. (2013)Microalgae as the Third Generation Biofuel : Production, Usage, Challenges and prospects Master thesis in Sustainable Development at Uppsala University, No. 166 31 pp, 30
- ✚ Wei Wang, Shi-Xin Wang, and Hua-Shi Guan .(2012). The Antiviral Activities and Mechanisms of Marine Polysaccharides: An Overview.*Mar Drugs*.10(12): 2795–2816.
- ✚ Weill B., Batteux F., Dhainaut J. (2003). Immunopathologie et réaction inflammatoires.Eds, De Boeck Université (Paris), pp :12-23.
Weiss J., Taylor G.R.Zimmermann F., Nebendahl K. (2000). Collection of body fluids-In: Kreinke G.J.The laboratory Rat, The handbook of experimental Animal Academic press, 25:485-495.
- ✚ Wen ZY, Chen F.(2003).Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnol Advances* 21, 273.
- ✚ Wen, Z., Johnson, M. B.(2009). Microalgae as a feedstock for biofuel production, Virginia Cooperative Extension Publication, pp. 442-886. 2009.
- ✚ Wijesekara I, Pangestuti R, Kim S-K.(2011). Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydr Polym*. 84: 14–21.
- ✚ Williamson, G. (2013).Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Mol. Nutr. Food Res*.57, 48-57.
- ✚ Winston R et Goldberg S.(2003).Methods and compositions for helping the body resist the effects of the aging process.Brevet N°WO2002100329 A3.
- ✚ Winter CA, Risley EA. and Nuss GW: (1962). Carrageenan-induced edema in hind paws of the rats as an assay of antiinflammatory drugs. *Proceed Soc Exper Biol And Med* 3: 544-547.
- ✚ Xiao JB and Högge P.(2015). Dietary Polyphenols and Type 2 Diabetes: Current Insights and Future Perspectives. *Current Medicinal Chemistry*.22(1):23-38.

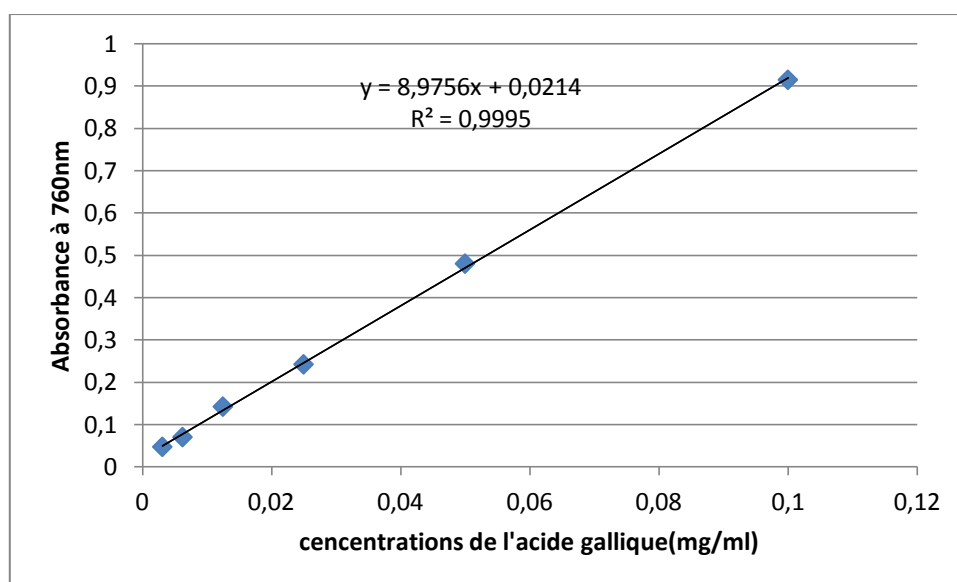
- ✚ Yan, X. J., Chuda, Y., Suzuki, M. and Nagata, T. (1999). Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 63: 605-607
- ✚ Yang CS, Yang GY, Landau JM, Kim S, Liao J (1998). Tea and tea polyphenols inhibit cell hyperproliferation, lung tumorigenesis, and tumor progression. *Exp Lung Res* 24: 629-639. 73.
- ✚ Yates, C.M.; Calder, P.C.; Ed Rainger, G.(2014). Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease. *Pharmacol. Ther.* 141, 272–282.
- ✚ Yeesang, C., and Cheirsilp, B. (2011) Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. *Bioresour Technol* 102: 3034–3040.
- ✚ Yuan ZP, Chen LJ, Fan LY, Tang MH, Yang GL, et al. (2006). Liposomal ueracetin efficiently suppresses growth of solid tumors in murine models. *Int J Cancer Res* 12: 3193-3199. 74.
- ✚ Yusuf Y., (2006). Catechins in foods, *Trends Food Science Technology* ,17: 64-71.
- ✚ Z.Bi,B.B.He.(2013).Characterization of microalgae for the purpose of biofuel production. *Transactions of the ASABE (American Society of Agricultural and Biological Engineers)* 56(4):1529-1539 .
- ✚ Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64: 555-559.
- Zimmermann M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 16:109-10.
- ✚ ZOUKI C., BEAUCHAMP M., BARON C.M., FILEP J.G.(1997).Prevention of in vitro neutrophil adhesion to endothelial cells through shedding of L-selectin by C-reactive protein and peptides derived from C-reactive protein. *J. Clin. Investig.*,100, 522-529.

Annexe

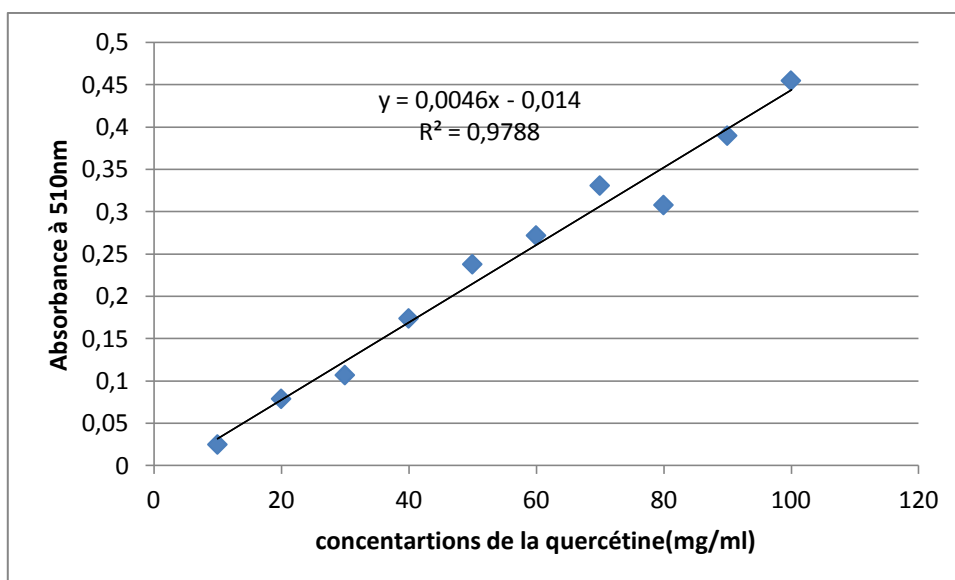
Annexe01



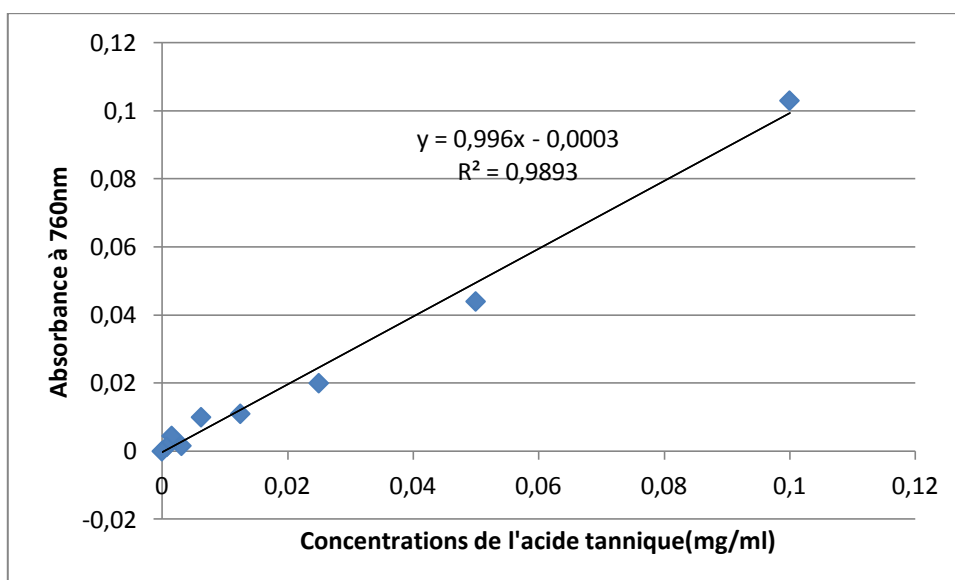
Courbe d'étalonnage du glucose pour le dosage du sucre



Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols



Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes



Courbe d'étalonnage de l'acide tannique pour le dosage des tanins condensés

**REGULAR ARTICLE**

Determination of the nutritional and functional metabolites of *Nannochloropsis gaditana* produced in Algeria and evaluation of its antioxidant activity

Asmaa Kherraf¹, Wafaa Tehami¹, Wahiba Boufeldja^{1,2}, Imène Yahla^{1,3}, Ghislaine Amira Dra¹, Insaf Fatima Zohra Mansour^{1,4}, Mohammed Benali^{1*}

¹Biotoxicology Laboratory, University of Djilali Liabes, Sidi Bel Abbès 22000, Algeria

²Sciences Institute, Department of Biology, University Center, El Bayadh, 32000, Algeria

³Laboratory of beneficial microorganisms, functional foods and health. University of Mostaganem, 27000, Algérie

⁴Faculty of Nature and Life Sciences, Department of Biology, University of Oran 1, 31000, Algeria

ARTICLE INFO**Article History:**

Received: 26 Feb 2017

Revised: 04 Apr 2017

Accepted: 25 Apr 2017

***Corresponding Author:**

Email: benalimo@yahoo.fr

Telephone: 00213771291104

Keywords: *Nannochloropsis gaditana*; primary metabolites; secondary metabolites; antioxidant activity

ABSTRACT

The aim of this work was to valorize the microalgae *Nannochloropsis gaditana* grown in Algeria for the purpose of producing human and animal food supplements as well as bioactive substances. The microalga had a fresh matter content of $9.33 \pm 1.15\%$. The amount of ash ($6.4 \pm 0.23\%$) was high and reflected mineral richness. Total sugars represented $7.13 \pm 0.23\%$. Proteins and lipids represented $13.38 \pm 0.2\%$ and $7 \pm 1\%$, respectively. The ethanolic (EENG) and methanolic (MENg) extracts obtained from 10 g of lyophilisates of *N. gaditana* represented respectively $24 \pm 1.65\%$ and $14.2 \pm 0.7\%$. The evaluation of the polyphenols in these extracts showed interesting rates representing 41.53 ± 0.41 mg gallic acid equivalent (GAE)/g of EENG dry extract and 38.72 ± 0.33 mg GAE/g for the MENg. The flavonoid contents were 19.82 ± 1.65 and 18.61 ± 1.45 mg quercetin equivalent (QE)/g respectively for the ethanolic and methanolic extracts of this microalgae. The condensed and hydrolyzable tannins represented respectively 0.35 ± 0.04 and 0.63 ± 0.09 mg of tannic acid/g of dry EENG. They also represented respectively 0.50 ± 0.08 and 0.18 ± 0.02 mg of tannic acid/g of dry MENg. The antioxidant activity generated by the extracts EENG and MENg against 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) and by the reducing power of iron (FRAP) seems appreciable compared to that of ascorbic acid. These results are in favor of the development of the microalgae sector constituting a futuristic vision to allow the development of the sector with a view to sustainability.

1. Introduction

Microalgae are known as sources of structurally new and biologically active metabolites (Li et al., 2007; Abd El-Baky et al., 2008). They can produce lipids, proteins vitamins, pigments and other molecules exploited for health, food and feed additives,

cosmetics and for energy production (De Jesus Raposo et al., 2013 ; Barra et al., 2014). There is a wide range of compounds that could potentially be used as antioxidants such as phenolic compounds, long- chain polyunsaturated fatty acids, terpenoids, amino acids and carotenoids (Hajimahmoodi et al., 2009 ; Abd El-Baky et al., 2009 ; Goiris et al., 2012).

Antioxidants are increasingly being used in food supplements as bioactive compounds and in functional foods to increase their shelf life and prevent unwanted lipid oxidation. Nearly all commercially available natural antioxidants are derived from terrestrial plants (Safafar et al., 2015). Furthermore, the qualities of the microalgal cells can be controlled, so that they contain no herbicides and pesticides, or any other toxic substances, by using clean nutrient media for growing the microalgae (Chen, 1996). *Nannochloropsis* sp., on the other hand, is a unicellular green alga, spherical in shape, with diameter of about 2-5 μm , belonging to the eustigmatophyceae class. It has five species and they are *N. gaditana*, *N. salina*, *N. oculata*, *N. oceanica* and *N. limnetica* (Hibberd, 1981 ; Lubian, 1982 ; Karlson et al., 1996 ; Krienitz et al., 2000 ; Suda et al., 2002).

It plays an important role in the food chain system and is also commonly used as live feed. Thus, it is widely cultivated in fish hatcheries and shrimp farm (Gwo et al., 2005). Until now *Nannochloropsis* species were known to occur almost exclusively in marine or saline habitats (Anderson et al., 1998). *N. gaditana* was used in aquaculture for the cultivation of fish, either directly or via rotifers (Cheng-Wu et al., 2001). *N. gaditana* is also recognised as a good potential source of eicosapentaenoic acid (EPA), an important polyunsaturated fatty acid for human consumption for prevention of several diseases (Abedi and Sahari, 2014).

The purpose of this work was to evaluate the nutritional and functional principles of *N. gaditana* a species of microalgae produced in Algeria and to evaluate the antioxidant activity of its ethanolic and methanolic extracts by the radical Diphenyl picrylhydrazyl (DPPH $^{\bullet}$) and iron reducing power (FRAP).

2. Material and Method

2.1. Biological material

N. gaditana is a biomass produced by the company Partisano Biotech Algeria in Sidi Bel-Abbes and the samples were supplied to us in the form of powder obtained after cultivation and freeze-drying.

2.2. Biochemical analyzes

Water content was determined by weight difference after drying of sample, following the official method of AOAC (1995). The inorganic matter content was conventionally the residue of the sub-

stance after mineralization of dry matter sample in a muffle furnace (Heraeus Instruments). It was obtained by burning at 500-600°C (AOAC, 1995). Total carbohydrates were determined by phenol-sulfuric acid method (Fox and Robyt, 1991). The total lipid of *N. gaditana* was extracted using a Soxhlet extractor system. Approximately 3 g of biomass powder was weighed into a cellulose thimble inside the extraction chamber. A total of 150 ml pure n-hexane was used to extract the lipid for 6 h at the rate of 10 refluxes per hour to achieve maximum extraction efficiency. The extracted lipid was measured after removing the solvent using vacuum rotary evaporator (Heidolph instruments) to evaporate the n-hexane at 35°C for 60 min, and then lipid content was calculated (Sukarni et al., 2014). The crude proteins of samples were determined by the Kjeldahl method and were calculated using a nitrogen conversion factor of 5.95 (López et al., 2010). The results were expressed as percent of dry weight.

2.3. Preparation of antioxidants extracted from the *N. gaditana*

The ethanolic and methanolic extracts were prepared from 10 g of the sample, macerated in 100 ml of 70% ethanol or methanol at ambient temperature and protected from light for 24 hours, with magnetic stirring. The resulting extract was filtered with Whatman paper. The procedure was repeated a second time with the dry residue. The resulting filtrates were added and evaporated to dryness using a rotary evaporator (Heidolph instruments) at a temperature of 60°C. The dry extract was stored at 4 °C until use.

2.4. Determination of secondary metabolic compounds

2.4.1. Determination of total polyphenols

The total polyphenols were determined by the method of Singleton et al. (1999) using the Folin Ciocalteu reagent. 0.4ml of each extract was mixed with 2 ml of Folin-ciocalteu reagent diluted (1:10 with distilled water) and 1.6 ml of Na₂CO₃ 7.5%. After 30 min incubation, optical density of the samples with blue color was measured at 765 nm. Gallic acid was used as a standard. Results were expressed as gallic acid equivalent (GAE)/g dry weight of *N. gaditana* and calculate as mean value $\pm$ Standard Deviation (n=3).

2.4.2. Determination of total flavonoids

The total flavonoids of extracts were measured using a colorimetric assay slightly modified according Zhishen et al. (1999). In a test tube, 0.1 mL of the extract was diluted with water, mixed with 0.2 mL of 5% NaNO₂ and left to stand for 6 min, then added 0.2 mL of 10% AlCl₃ and mixed. After 6 min, 2 mL of 4% NaOH was added. The mixture was then made to 5 mL with distilled water. The absorbance of the mixture was measured at 510 nm against a prepared blank using a spectrophotometer UV-VIS (Shimadzu Scientific Instruments). The results were expressed in mg equivalent quercetin per gram of dry matter (mg EQ/g DM).

2.4.3. Determination of hydrolysable tannins (gallic tannins)

The method of Mole and Waterman, (1987) was based on a reaction with ferric chloride. The mixture of tannic extract with ferric chloride reagent results in the formation of purple-red color complex with Fe³⁺ ion formation (Bate-Smith, 1973). A solution of 0.01 M FeCl₃ was mixed with a solution of 0.001 M HCl (v/v). Add 3.5 ml of this reagent in 1 ml of the extract. After 15 seconds, read the absorbance at 660 nm. The hydrolysable tannins were expressed by the relationship: $T\% = \frac{OD}{E_{moles}} \times P$, with OD: optical density, E_{moles}: 2169 of gallic acid, M: 300, V: volume of extract used, W: weight of sample and T%: percentage of hydrolysable tannins.

2.4.4. Determination of condensed tannins

Condensed tannins were determined according to the method proposed by the European Community (Joslyn, 1970). 1 ml of each extract was mixed with 7.5 ml of distilled water, then added 5 ml of Folin Denis Reagent (FDR) and 10 ml of saturated solution of CO₃ Na₂. This saturated solution was prepared from 43.75 g of sodium carbonate dissolved in 100 ml of hot water (70° - 80°C). After cooling the solution was filtered and then adjusted to 125 ml. After mechanical agitation, the preparation rests for 30 minutes, the absorbance of the mixture was measured at 760 nm using a spectrophotometer UV-VIS (Shimadzu Scientific Instruments). A tannic acid standard range was prepared in the same conditions with concentrations ranging from 0 to 0.1 g/l. A witness with distilled water instead of the extract was performed under the same conditions.

2.5. Antioxidant activity

2.5.1. DPPH scavenging assay

The hydrogen atom donation ability of chemical compounds in leaves and stems was measured on the basis to scavenge the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil free radical (Sanchez-Moreno et al., 1998). Fifty microliter of various concentrations of the extracts in methanol were added to 1950 ml of a 0.025 g/l methanol solution DPPH. After a 30 min incubation period at room temperature, the absorbance was read against a blank at 515 nm. DPPH free radical scavenging activity in percentage (%) was calculated using the following formula:

DPPH scavenging activity (%) = $\frac{(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{blank}}} \times 100$ where A_{blank} was the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the test compound). A sample is the absorbance of the test compound. The positive control was represented by a standard solution of an antioxidant; ascorbic acid, whose absorbance was measured in the same conditions as the samples and for each concentration the test was repeated 3 times. Graphically the effective concentration 50 (EC₅₀) was calculated by linear regression corresponding to that in antioxidants needed to reduce by half the amount DPPH initially present in the medium (Blois, 1958 ; Brand-Williams et al., 1995).

2.5.2. Ferric-reducing antioxidant power analysis

The reducing power of the extract was determined according to the method described by Oyaizu, (1986). 1 ml of various concentrations of the extracts (mg/ml) in distilled water was mixed with phosphate buffer (2.5 ml, 0.2 M, pH 6.6) and 1% of potassium ferricyanide water solution (2.5 ml, K₃[Fe(CN)₆]). The mixture was incubated at 50°C for 20 min. Aliquots of trichloroacetic acid (2.5 ml, 10% aqueous solution) were added to the mixture which was then centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The supernatant (2.5 ml) was mixed with distilled water (2.5 ml) and a freshly prepared FeCl₃ solution (0.5 ml, 0.1%). Reading the absorbance of the reaction medium was carried out at 700 nm against a blank prepared similarly by replacing extract with distilled water which was used to calibrate the apparatus (UV-VIS spectrophotometer Shimadzu Scientific Instruments). The positive control was represented by a standard solution of an antioxidant; ascorbic acid, whose absorbance was measured, under the same conditions as the samples. An increase in absorbance corresponding to an increase of the reducing power of the extracts tested (Singleton and Rossi, 1965).

3. Results and Discussion

The analysis of the chemical composition of the microalga *N. gaditana* showed a moisture content of 9.33% (Table 1) corroborated by that of Eryalçın

Parameters (%)	<i>N. gaditana</i>
Moisture	9.33±1.15
Ash	6.4±0.23
Total sugar	7.13±0.23
Proteins (N×5.95)	13.38±0.26
Fat	7±1

Table 1: Nutritional composition of *N. gaditana*. Values are presented as mean ± SD (n = 3).

et al. (2015), which yielded 9.56% for the same species. These same authors obtained an ash rate of 7.21% approximately comparable to our result (6.4%). According to kent et al. (2015), *Nannochloropsis* sp contains 1.84% moisture and 11.32% ash. According to Bi and He, (2013) *Nannochloropsis salina* has a moisture and ash content of 2.9% and 13.8%, respectively. Also, Fernandes Seixas, (2009) reports a total sugar content of *N. gaditana* determined by phenol-sulfuric acid of 8.7% in accordance with our results (7.13%). Changes in crop parameters may affect the composition of carbohydrates in microalgae. Shifrin and Chisholm, (1981) ; Harrison et al. (1990), showed that nitrogen deficiency leads to an increase in carbohydrates.

The protein content of *N. gaditana*, determined by the Kjeldahl method using the nitrogen conversion factor 5.95 (Lopez et al., 2010) was 13.38%. This rate was considerably lower than that reported by Mert Eryalçın et al., 2015 (67.61%) for the same species. Other authors have reported that an increase in CO₂ concentration induces a decrease in protein in *Spirulina platensis* (Gordillo et al., 1998). High phosphorus and nitrogen treatments as well as temperature changes induce an increase in protein levels and total lipids in cultured *N. gaditana* (Hu et al., 2006). The lipid content of *N. gaditana* was 7%. Hu et al., (2006) reported values ranging from 9 to 62% in *Nannochloropsis* sp. This variation was due to the cultivation parameters which demonstrated a nearly 4-fold increase in the lipid content of *Nannochloropsis* sp grown in low nitrogen. According to Renaud et al., (1994), salinity has a great influence on lipid content and according to Chiu et al., (2009) *Nannochloropsis oculata* showed an increase in lipid content from 30.8% to 50.4% in a medium of 2 % CO₂. Slightly limited light conditions also increase the lipid content (Sukenic et al., 1989).

3.1. Secondary metabolic compounds of *N. gaditana*

Phenolic compounds such as flavonoids, phenolics and tannins were considered to be major factors in the ability of plant antioxidants. They also possess various biological activities such as anti-inflammatory, anti-atherosclerotic and anti-carcinogenic (Hua-Bin Li et al., 2007). These activities may be linked to their antioxidant activity. The yields of *N. gaditana*'s ethanolic (EENG) and methanolic (MEN) extracts were 24±1.65% and 14.2±0.7%, respectively. The extraction yield, the composition of the extracts obtained and their biological activity depend on the polarity and the nature of the solvents used (Franco et al., 2008, lee et al., 2003). In this work, the powder of *N. gaditana* was extracted with ethanol and methanol, solvents having an affinity for a great diversity of bioactive compounds, in this case the phenolic compounds (Khoddami et al, 2013).

The results show that the mean total phenol contents of EENG and MENG with respect to dry weight (PS) were respectively 41.53±0.42 mg GAE/g and 38.74±0.33 mg GAE/g (figure 1). The phenolic content of EENG was higher than that of MENG (P <0.05). Hugo Pereira, (2015) reported a value of 83.3 mg GAE/g PS in the methanolic extract of *Nannochloris* sp, while Amal et al., (2015) reported only 32 mg EAG/g PS in *N. gaditana*.

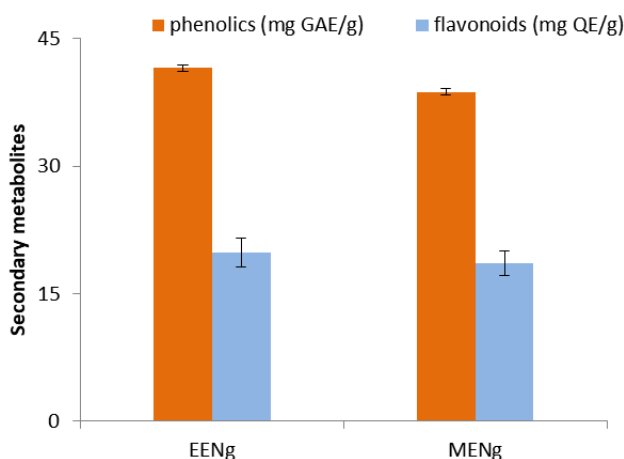


Figure 1: Contents of phenolics and flavonoids in *N. gaditana* (Values are expressed as mean ± standard deviation. The comparisons were made using ANOVA test with P<0.05 n=3).

The flavonoid content of the EENG and MENG extracts revealed respective values of 19.82±1.66 and 18.61±1.45 QE/g PS (Figure 1). The content of these EENG compounds appears to be significantly greater than that of the MENG (P <0.05). According to Safaar et al., (2015), the methanolic extract of *Nannochloropsis* sp contains 6.45 mg GAE/g of pol-

phenols and 5.296 mg QE/g of flavonoids.

Condensed tannins of the EENg and MENg were respectively 0.35 ± 0.05 and 0.50 ± 0.08 mg tannic acid/g while those which were hydrolyzable represent 0.63 ± 0.09 and 0.18 ± 0.02 mg gallic acid/g ($P < 0.05$). Condensed tannins were slightly higher in EENg than in MENg ($P = 0.03$). The same is true for the hydrolyzable tannins in the two extracts ($P < 0.05$). This is consistent with the results reported by Rutikanga et al., (2014) which showed that the green alga *Spirogyra* contains 0.399 g of tannic acid per 100 g of substrate (Figure 2).

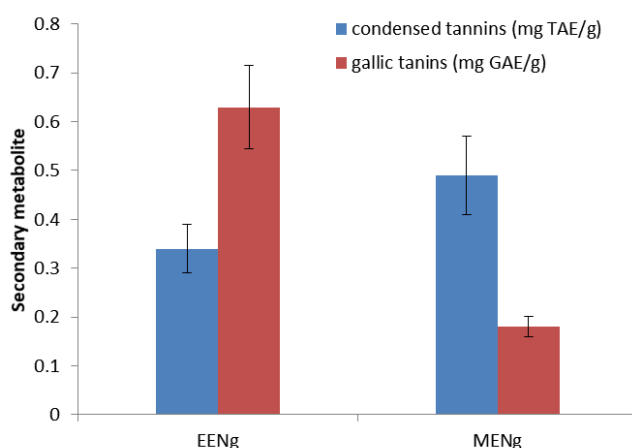


Figure 2: Contents of condensed and hydrolyzed tannins in *N. gaditana* (Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation. The comparisons were made using ANOVA test with $P < 0.05$ $n=3$).

3.2. Antioxidant activities

An antioxidant molecule is a substance which, even at low concentrations, can inhibit or retard the oxidation of a substrate (Göçer et al., 2013). In this study, the antioxidant capacity of *N. gaditana* was measured using the free radical scavenging assay and employing 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl in its free radical form (DPPH $^{\bullet}$) involving atom transfer of hydrogen and electron transfer. DPPH $^{\bullet}$, initially purple, discolours when the single electron pair. The activity of trapping DPPH radicals makes it possible to evaluate the antioxidant activity of the ethanolic and metanolic extracts of *N. gaditana* (Bursal, et al 2011). Based on this principle, the percentage inhibition of DPPH in our case was respectively $22.37 \pm 3.5\%$ and $12.27 \pm 1.4\%$ for EENg and MENg at the concentration of the extracts of 0.5 mg/ml (Figure 3). For the median concentration of inhibition (IC 50) which represents the concentration of the extracts responsible for 50% inhibition of the DPPH radicals, they were respectively 1.16 ± 0.06 and 2.02 ± 0.04 mg/ml for EENg and

MENg and is lower than that of ascorbic acid (0.11 ± 0.02 mg/ml). *N. gaditana* has a moderate ability to reduce oxidative damage induced by free radicals.

Our results are consistent with those of Safafar et al., (2015), who reported that the inhibition percentages in *Nannochloropsis limnetica* and *Nannochloropsis salina* were 19.44% and 21.26%, respectively, with a concentration of 0.5 mg/ml. Amal Maadane et al., (2015) reported that the IC50 of the ethanolic extract of *N. gaditana* is 365 μ g/ml compared to an IC50 of vitamin C of 2.5 μ g/ml. According to Tusevsi et al., (2014), an extract with low antioxidant activity cannot be considered a bad source of antioxidant because an extract is composed of chemicals with different functional groups and polarities allowing it to behave differently according to the reaction mixture. This indicates that phenolic compounds may not be a major contributor to the antioxidant capabilities of either of these microalgae, which as noted by many authors contain various antioxidant compounds such as carotenoids, polyunsaturated fatty acids and Polysaccharides (Goh et al., 2010, Sushanth et al., 2015). Studies have indicated that the reaction time and concentration of DPPH influence the antioxidant activity and kinetic parameters of bioactive molecules and plant extracts and microalgae. In the reaction with the DPPH radical, the antioxidant activity measured after 2 h of reaction was significantly greater than that measured after 30 min (Angela et al., 2014 ; Amal maadane, 2015).

3.3. Ferric reducing antioxidant power

The reducing activity of the microalgae extracts was estimated by the chemical reduction reaction of Fe $^{3+}$ present in the K $_3$ Fe(CN) $_6$ complex to Fe $^{2+}$. The antioxidant activities of the extracts EENg, MENg and ascorbic acid were respectively 0.031 ± 0.03 ; 0.022 ± 0.009 and 1.67 ± 0.035 units of optical density at a concentration of 0.15 mg/ml and 0.349 ± 0.037 ; 0.414 ± 0.012 and 2.66 ± 0.007 units of optical density at the concentration of 5 mg/ml (Figure 4).

Safafar et al., (2015), reported strong iron reduction capacity due to polyphenols of some species of microalgae grown on industrial wastewater.

4. Conclusion

The microalga *N. gaditana* produced in Algeria is rich in primary metabolites. The production unit of this microalga located in Sidi Bel-Abbes, Algeria,

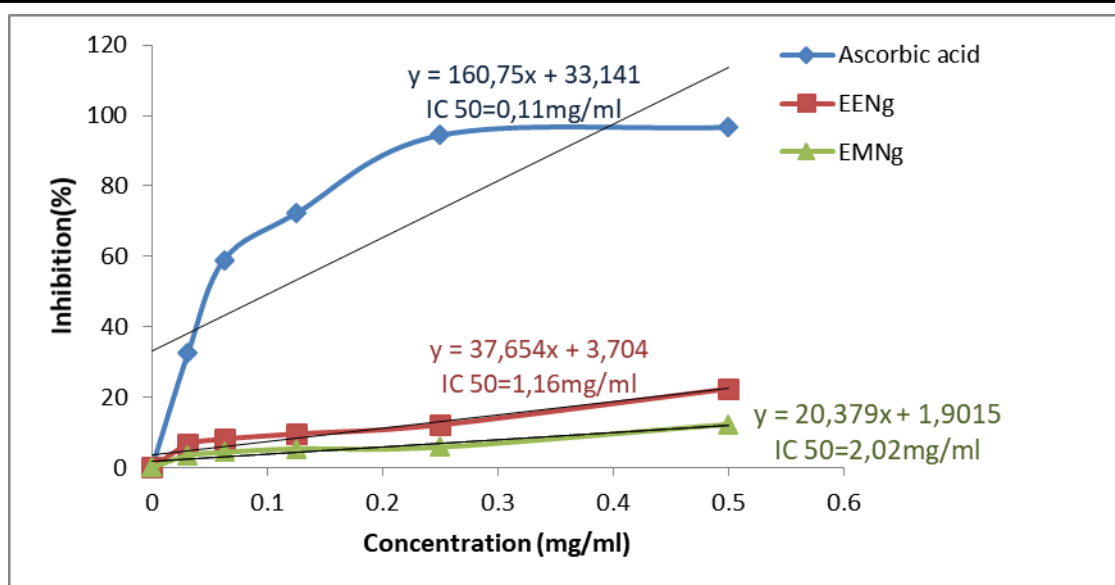


Figure 3: Evaluation by DPPH method of IC₅₀ of the *N. gaditana* extract and standard ascorbic acid (n=3, ANOVA test, P<0,05).

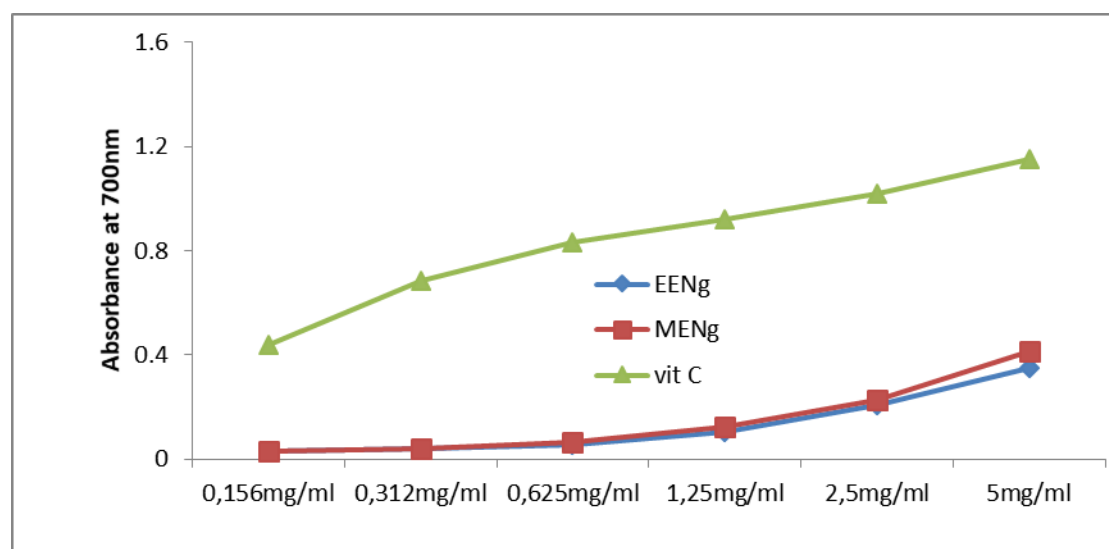


Figure 4: Antioxidant Activities of ethanolic and methanolic extracts of *N. gaditana* and vitamin C by the reduction of iron (Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation. The comparisons were made using ANOVA test with P <0.05 and n=3).

intends to develop it in nutritional terms with a view to its use as a replacement for imported and expensive cereals intended for feeding livestock. These microalgae can offer a wide range of possibilities for the development of healthier food products by using them as food or as a source of functional ingredients promoting health. The functional profile of *N. gaditana* demonstrated by the presence of phenolic compounds and antioxidant activity is promising. It is certainly not wrong to think that microalgal production offers an exceptional opportunity, particularly for Mediterranean countries, to create new types of food production, from production to processing into high-value ingredients added.

Conflict of Interest

No conflict of interest exists in the submission of this manuscript.

References

- Abd El-Baky HH, El Baz FK, El-Baroty GS (2009) Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects in vitro toward hepatotoxicity model. African Journal of Pharmacy and Pharmacology 3:133-139
- Abd El-Baky HH, El-Baz FK, El-Baroty GS (2008) Evaluation of marine alga *Ulva lactuca* L. as a source of natural preservative ingredient. American-Eurasian journal of agricultural & environmental sciences 3:434-444

- Abedi E, Sahari MA (2014) Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties. *Food Science and Nutrition* 2:443-463
- Amal Maadane A, Merghoub N, Tarik A, El Arroussi H, Benhima R, Amzazi S, Bakri Y, Wahby I (2015) Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. *Journal of Biotechnology* 215:13-19
- Anderson RA, Brett RW, Potter D, Sexton JP (1998) Phylogeny of the Eustigmatophyceae based upon 18S rDNA, with emphasis on *Nannochloropsis*. *Protist* 149:61-74
- Angela F, Maria GM, Emanuela A, Antonia B, Daniele S (2014) Reaction time and DPPH concentration influence antioxidant activity and kinetic parameters of bioactive molecules and plant extracts in the reaction with DPPH radical. *Journal of Food Composition and Analysis* 35: 112-119
- AOAC (1995) Official methods of analysis. Washington, DC, USA: Association of official analytical chemists.
- Barra L, Chandrasekaran R, Corato F, Brunet C, (2014) The challenge of ecophysiological biodiversity for biotechnological application of marine microalgae. *Marine Drugs* 12:1641-1675
- Bate-Smith EC (1973) Haemanalysis of tannins: the concept of relative astringency. *Phytochemistry* 12:907-912
- Bi Z, He BB (2013) Characterization of microalgae for the purpose of biofuel production. *Transactions of the ASABE (American Society of Agricultural and Biological Engineers)* 56:1529-1539
- Blois MS, (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1201
- Bouaziz F, Koubaa M, Barba FJ, Roohinejad S, Chaabouni SE (2016) Antioxidant properties of water-soluble gum from flaxseed hulls. *Antioxidants* 5: 26-36
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 28: 25-30
- Bursal E, Gülçin I (2011) Polyphenol contents and in vitro antioxidant activities of lyophilized aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Research International* 44: 1482-1489
- Chen F (1996) High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends in Biotechnology*, 14:421-426
- Cheng-Wu Z, Zmora O, Kopel R, Richmond A (2001) An industrial-size flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. (eustigmatophyceae). *Aquaculture* 195: 35-49
- Chiu SY, Kao CY, Tsai MT, Ong SC, Chen CH, Lin CS (2009) Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource Technology* 100: 833-838
- De Jesus Raposo MF, De Morais RM, De Morais AM, (2013) Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sciences* 93:497-486
- Eryalç KM, Ganuza E, Atalah E, Cruz MCH (2015) *Nannochloropsis gaditana* and *Cryptocodinium cohnii*, two microalgae as alternative sources of essential fatty acids in early weaning for gilthead seabream. *Hidrobiológica* 25:193-203
- Fernandes Seixas P (2009) Biochemical composition and growth of octopus parallels (*Octopus vulgaris Cuvier*, 1797), fed with juveniles of Artemia enriched with microalgae and other nutritional supplements. University of Santiago de Compostela, pp 105
- Fox J, Robyt F (1991) Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader. *Analytical Biochemistry* 195: 93-96
- Franco D, Sineiro J, Rubilar M, Sánchez M, Jerez M, Pinelo M, Costoya N, Núñez MJ (2008) Polyphenols from plant materials: Extraction and antioxidant power. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 7:3210-3216
- Göçer H, Akıncioğlu A, Öztaşkın N, Göksu S, Gülçin I (2013) Synthesis, antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of sulfonamide derivatives of dopamine related compounds. *Archiv der Pharmazie* 346: 783-792
- Goh SH, Yusoff FM, Loh SP (2010) A Comparison of the Antioxidant Properties and Total Phenolic Content in a Diatom *Chaetoceros* sp and a Green Microalga *Nannochloropsis* sp. *Journal of Agricultural Science* 2: 123-130
- Goiris K, Muylaert K, Fraeya I, Foubert I, De Brabanter J, De Cooman L (2012) Antioxidant potentiel of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology* 24:1477-1486
- Gordillo JFL, Jiménez C, Figueroa FL, Niell FX (1998) Effects of increased atmospheric CO₂ and N supply on photosynthesis, growth and cell composition of the cyanobacterium *Spirulina platensis* (Arthrospira). *Journal of Applied Phycology* 10:461-469
- Gwo JC, Chiu JY, Chou CC, Cheng HY (2005) Cryopreservation of a marine microalga, *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae). *Cryobiology* 50:338-343
- Hajimahmoodi M, Faramarzi MA, Mohammadi N, Soltani N, Oveisi MR, Nafissi-Varcheh N, (2009) Evalutaion of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *Journal of Applied Phycology* 22:43-50
- Harrison PJ, Thompson PA, Calderwood GS (1990) Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. *Journal of Applied Phycology* 2:45-56
- Hibberd DJ (1981) Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae (synonym Xanthophyceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 82:93-119
- Hu H, Gao K (2006) Response of Growth and Fatty Acid Compositions of *Nannochloropsis* sp. to Environmental Factors Under Elevated CO₂ Concentration. *Biotechnology Letters* 28: 987-992
- Joslyn MA (1970) A serie of monographies. Food Science and Technology 2nd Edition Board.
- Karlson B, Potter D, Kuylentierna M, Andersen RA (1996) Ultrastructure, pigment composition, and 18S rRNA gene sequence for *Nannochloropsis granulata* sp. nov. (Monodopsidaeaceae, Eustigmatophyceae), a marine ultraplankter. *Phycologia* 35:253-260
- Kent M, Welladsen HM, Mangott A, Li Y (2015) Nutritional Evaluation of Australian Microalgae as Potential Human Health Supplements. *PLoS ONE* 10: e0118985
- Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH (2013) Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* 18:2328-2375
- Krienitz L, Hepperle D, Stich HB, Weiler W (2000) *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae), a new species of picoplankton from freshwater. *Phycologia* 35:219-227
- Lee KW, Kim YJ, Kim DO, Lee HJ, Lee CY (2003) Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6516-6520

- Li H-B, Cheng K-W, Wong C-C, Fan K-W, Chen F, Jiang Y (2007) Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry* 102:771-776
- López CV, García Mdel C, Fernández FG, Bustos CS, Chisti Y, Sevilla JM (2010) Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresource Technology* 101:7587-7591
- Lubian LM (1982) *Nannochloropsis gaditana* spec. nov., una nueva Eustigmatophyceae marina. *Lazaroa* 4:287-293
- Mole S, Waterman PG (1987) A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies: I. Technologies for chemically define tannins. *Oecologia* 72: 137-14
- Oyaizu M (1986) Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition* 44: 307-315
- Pereira H, Custódio L, Rodrigues MJ, De Sousa CB, Oliveira M, Barreira L, Da Rosa Neng N, Nogueira JMF, Alrokayan SA, Mouffouk F, Abu-Salah KM, Ben-Hamadou R, Varela J (2015) Biological Activities and Chemical Composition of Methanolic Extracts of Selected Autochthonous Microalgae Strains from the Red Sea. *Marine Drugs*, 13:3531-3549
- Renaud SM, Parry DL (1994) Microalgae for use in tropical aquaculture II: effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology* 6:347-356
- Rutikanga A, Mwangi GL, Oyaro N (2014) Mineral composition, Antioxidants and Antimicrobial activities of freshwater algae (*Spirogyra* genus) from Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology (JKUAT). *World Rural Observations* 6: 86-91
- Safafar H, van Wagenen J, Møller P, Jacobsen C (2015) Carotenoids, Phenolic Compounds and Tocopherols Contribute to the Antioxidative Properties of Some Microalgae Species Grown on Industrial Wastewater. *Marine drugs* 13:7339-7356
- Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto FJ (1998) A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 76: 270-276
- Shifrin NS, Chisholm SW (1981) Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *Journal of Phycology* 17:374-384
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Technology and Viticulture* 16: 144-153
- Suda S, Atsumi M, Miyashita H (2002) Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanic* sp. nov. (Eustigmatophyceae). *Phycologia* 41:273-279
- Sukarni, Sudjito, Hamidi N, Yanuhar U, Wardana ING (2014) Potential and properties of marine microalgae *Nannochloropsis oculata* as biomass fuel feedstock. *International Journal of Energy and Environmental Engineering* 5: 279-290
- Sukenik A, Carmeli Y, Berner T (1989) Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *Journal of Phycology* 25: 686-692
- Sushanth VR, Rajashekhar M (2015) Antioxidant and antimicrobial activities in the four species of marine microalgae isolated from Arabian Sea of Karnataka Coast. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* 44 : 69-75
- Tusevski O, Kostovska A, Iloska A, Trajkovska L, Simic SG (2014) Phenolic production and antioxidant properties of some Macedonian medicinal plants. *Central European Journal of Biology* 9: 888-900
- Wang L, Weller CL (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology* 17:300-312
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64: 555-559



**South Asian Journal
of Experimental Biology**



ABOUT THE JOURNAL: SAJEB (eISSN: 2230-9799) is a peer-reviewed, open-access and online journal aimed at advancement and rapid dissemination of scientific knowledge generated by the highly motivated researchers in the field of biological sciences through publication of high-quality original research and critical up-to-date review articles covering all the aspects of biological sciences. Every year, it publishes six issues. SAJEB has received Global Impact Factor (GIF)-2015, 0.765; Index Copernicus Value-2015, 93.0 and NAAS (ICAR)-India 2017 rating, 4.79. SAJEB has been included in the ISI master list of journals of Thomson Reuters under Zoological Record. The SAJEB is also covered by CABI (UK), AGRICOLA, NLM catalogue, CAS (ACS, USA), DOAJ, Journal TOCs (ICBL, Edinburgh), Directory of research Journals Indexing (DRJI) and Indian Science Abstracts (ISA, NISCAIR).