

Résumé

Les molécules naturelles de différentes origines et essentiellement celles issues des algues marines renferment une panoplie de principes bioactifs naturels à fort potentiel thérapeutique. Actuellement, plusieurs recherches sont consacrées à l'isolement de nouveaux composés bioactifs à partir des ressources marines qui auraient des effets bénéfiques prometteurs pour la santé. Les algues pouvant contenir des métabolites secondaires avec des activités biologiquement pertinentes incluant des activités chélatrice, anti-oxydante, anti-inflammatoire et des propriétés neuroprotectives. Le Maroc, avec sa double façade Atlantique et Méditerranéenne, longue de plus de 3500 Km, reste un pays profondément riche par l'existence de milliers d'espèces marines animales et végétales. Au Maroc, les algues marines constituent une source peu explorée et inexploitée, alors qu'elles constituent un potentiel considérable de développement économique. Ce travail est consacré à la valorisation de quatre algues brunes (*Bifurcaria bifurcata*, *Cystosiera humulis*, *Cystosiera stricta* et *Fucus spiralis*) et une algue rouge, *Gelidium sesquipedale* de la côte atlantique marocaine. Le but principal est d'étudier l'activité antioxydant des cinq algues en utilisation des tests chimiques et d'identifier le profil antioxydant de ces algues. Ainsi étudier *in-vitro* l'effet de l'algue qui est riche en molécules anti-oxydantes sur un modèle cellulaire (protozoaire: *Tetrahymena pyriformis*) pour rechercher l'effet protecteur contre la toxicité induite par le peroxyde d'hydrogène comme agent induisant le stress oxydatif. De plus, étudier *in vivo* sur un modèle animal (rat) l'effet protectif contre le stress induit par les lipopolysaccharides. Les résultats obtenus ont montré que l'espèce *F. spiralis* possède une teneur plus élevée en métabolites secondaires avec une meilleure activité antioxydante et activité inhibitrice des enzymes acétylcholinestérase, butyrylcholinestérase. L'identification du profil antioxydant a détecté différents antioxydants majoritaires dans les cinq algues. Les résultats obtenus *in-vitro* ont montré que *F. spiralis* est efficace contre la cytotoxicité et les changements redox induits par H₂O₂. Les résultats obtenus *in vivo* sur les rats traités par *F. spiralis* ont montré que le LPS induit une toxicité accompagnée des troubles moteurs et comportement anxieux et dépressif chez les rats. Le traitement des rats par l'algue *F. spiralis* capable de protéger l'animal contre les effets toxiques de LPS. L'ensemble de ces données révèle l'intérêt d'extraire et d'utiliser des principes actifs provenant de ces algues dans le but de se protéger contre les dégâts causés par les espèces réactives oxygénées à court et à long terme.

Mot clé : Les algues, stress oxydatif, *Fucus spiralis*, *Bifurcaria bifurcata*, *Cystosiera humulis*, *Cystosiera stricta*, *Gelidium sesquipedale*, les antioxydants, peroxyde d'hydrogène, lipopolysaccharides

Prénom et NOM : Fatiha GRINA

TITRE : Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de certaines algues de la côte atlantique marocaine

Année, 2020/2021
Initiale Formation doctorale : Biologie- Santé et Environnement

Université Hassan 1^{er}
Faculté des Sciences et Techniques
Settat
CeDoc UHP 1^{er} Settat



THÈSE DE DOCTORAT

Pour l'obtention de grade de Docteur en Biologie

Formation Doctorale : Biologie, Santé et Environnement

Spécialité : Biochimie et Biologie cellulaire

Sous le thème

Potentiel antioxydant de cinq algues de la côte atlantique marocaine, caractérisation biochimique et essais cytotoxiques et biologiques

Présentée par :

Fatiha GRINA

Soutenue le : 21 /12/2020 à 10 h

A la Faculté des Sciences et Techniques de Settat devant le jury composé de :

| | | | |
|--------------------------|-----|--|--------------------|
| Pr. Khadija ESSAFI | PES | Université Hassan 1 ^{er} , Settat. | Présidente |
| Pr. Saïd EL ANTRI | PES | Université Hassan II, FST Mohammedia | Rapporteur |
| Pr. Brahim SABOUR | PES | Université Chouaib Doukkali, FS El Jadida | Rapporteur |
| Pr. Bouchaib BENCHARKI | PES | Université Hassan 1 ^{er} , FST Settat | Rapporteur |
| Pr. Boubker NASSER | PES | Université Hassan 1 ^{er} , FST Settat | Examineur |
| Pr. Abderahmane MOUJAHID | PES | Université Hassan 1 ^{er} , FST Settat | Examineur |
| Pr. AbdelKhalid ESSAMADI | PES | Université Hassan 1 ^{er} , FST Settat | Directeur de thèse |

Année Universitaire : 2020/2021

Remerciements

C'est avec un réel plaisir que je réserve ces lignes en signe de gratitude et de profonde reconnaissance à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation et à l'aboutissement de ce travail.

Je tiens à remercier le professeur **Khadija Essafi**, présidente de l'université Hassan 1^{er} de Settat, Maroc pour m'avoir autorisé à entreprendre et finaliser ma thèse au sein de l'établissement dont il a la charge. De même, mes remerciements s'adressent également au professeur **Bouchaib Bencharki** directeur du centre d'études doctorales pour le bon suivi de la formation doctorale et pour toute l'aide administrative.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire Biochimie et Neurosciences, sous la direction du Professeur **Abdelkhalid ESSAMADI**. Pendant ces années de recherche, les travaux obtenus n'auraient pas pu aboutir sans la précieuse collaboration de toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide tout au long de cette thèse, je tiens ici à les remercier.

Je tiens à remercier sincèrement et chaleureusement mon directeur de thèse, **Mr. Abdelkhalid ESSAMADI**. D'abord, je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre équipe, pour votre confiance, pour m'avoir proposé ce sujet sur la valorisation des macroalgues marines et pour m'avoir dirigé tout au long de la réalisation de ce travail, pour son esprit scientifique, ses précieux conseils et ses encouragements. De m'avoir guidé et encadré avec patience et d'avoir su me donner goût à la recherche scientifique. Ensuite, je vous remercie d'avoir su, à travers nos discussions scientifiques et extrascientifiques me donner cette confiance en moi, essentielle lorsqu'on veut accomplir une thèse.

Je tiens à remercier Professeur **Khadija Essafi**, Professeur et présidente à l'université Hassan I, qui m'a fait l'honneur de juger mon travail et d'en présider le jury de soutenance. Lisez ici ma profonde reconnaissance et toute ma gratitude.

Je remercie également, Professeur **Bouchaib Bencharki** directeur du centre d'études doctorales, ainsi que Professeur **Saïd EL ANTRI**, Professeur à l'université Hassan II, Faculté des Sciences et Techniques de Mohammedia et le Professeur **Brahim SABOUR**, Professeur à l'université Chouaib Doukkali, Faculté des Sciences El Jadida pour avoir accepté cette lourde tâche d'être rapporteurs. Trouvez ici, l'expression de ma profonde reconnaissance et gratitude.

Mes remerciements vont également à mon Professeur Mr **Boubker NASSER**, Professeur à l'université de Hassan first et Vice-Doyen de la faculté des sciences et Techniques de Settat, pour sa gentillesse, ses qualités humaines et sa rigueur scientifique. Qu'il trouve ici le témoignage de mon profond respect et ma haute considération.

Je remercie sincèrement Monsieur le Professeur **Abderrahmane MOUJAHID** de la Faculté des sciences et Techniques de Settat pour son aide efficace et sans faille et pour sa contribution à la réalisation de ce travail. Lisez Monsieur, l'expression de mes sentiments les plus respectueux.

Egalement, je tiens à remercier Mr **Mehmet Ozturk**, Professeur à l'université de Sitki kocman de Mugla, Faculté des Sciences, pour leur encadrement, leur accueil bienveillant dans son laboratoire de Recherche des Produits Naturels durant mon stage. Qu'elles ont su me réserver au sein de leurs équipes et leurs orientations. Qu'elles soient rassurées de ma profonde gratitude. Sans oublier également de remercier le professeur **Said Nadeem** et toute l'équipe de recherche « Dr. Zain ULLAH, Dr. Erhan KAPLANER, Selçuk Küçükaydın et Meltam Tas » pour leurs aides durant toute ma période de stage.

J'adresse mes sincères remerciements à Mr **Khalid Taghzouti**, Professeur à l'université Mohamad V de Rabat de m'avoir accueillie dans son équipe de « physiologie et physiopathologie », pour sa grande disponibilité, sa générosité et sa gentillesse.

Mes remerciements sincères et respectueux vont à Professeur **Nezha BOUHADOU** à la Faculté des sciences de rabat de l'Université Mohamad V, un grand Merci pour l'ensemble des discussions que nous avons pu avoir, du soutien matériel et moral et de toute l'aide qu'elle a pu apporter pendant mon stage au laboratoire de physiologie et pathologie. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je voudrais également remercier chaleureusement tous les compagnons d'équipage et membres du laboratoires de biochimie et neurosciences pour leur présence, leur aide, leur humeur et tous les moments passés ensemble à la paillasse, Merci à vous tous, **Karim, Asmae, Soufiane, Talal, Youssef K, Youssef C, Zineb, Soukaina, Habiba, Rahim, Koutar, Marwa, Zouhra**, pour leur amitié, leur soutien et les échanges scientifiques, le travail de mon thèse n'était pas toujours facile mais vous avez toujours fait preuve de motivation et d'enthousiasme.

Mes derniers remerciements vont aux personnes qui me sont les plus chères pour leur amour, leur soutien et leur patience. Un immense merci, venant du fond du cœur, à mes parents, à mes deux frères Hassan et Houssin, à mes sœurs, et à toute ma famille.

Enfin, un grand merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie cette thèse

Tout d'abord, je tiens à remercier mon DIEU de m'avoir donné la patience et du courage pour réaliser ce travail que je dédie à :

A mes chers parents, pour leur amour inconditionnel, leurs sacrifices, leurs multiples soutiens, sans vous je ne serais jamais arrivé jusque-là. Je pris le tout puissant de vous donner une longue vie.

A mes très chères sœurs, Siham et Karima pour leurs aides, leurs générosités, leurs encouragements et leurs disponibilités

A mes chers frères, Hassan et Houssine

A mes tantes et mes oncles surtout Mohamed pour son soutien

A mes cousins et cousines.

A l'ensemble de ma famille

A mes professeurs

A mes amis

Et à toutes les personnes qui me sont chères ...

A tous ceux que j'aurais oublié de citer, mais qui existent au fond de mon cœur et de ma pensée

Avant-propos

Les travaux de cette thèse ont reçu le soutien financier de l'école doctorale des sciences et Techniques de l'Université Hassan 1^{er} (Maroc).

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé dans les laboratoires suivants :

- Laboratoire de Biochimie et Neurosciences (LBN) de la faculté des sciences et techniques, Université Hassan 1^{er}, Settat, Maroc sous la direction du Professeur **Abdelkhalid ESSAMADI**.

- Laboratoire de chimie, Faculté des sciences, université de mugla sitki kocman turkiye sous la direction de Monsieur le Professeur **Mehmet OZTURK**.

- Laboratoire de physiologie et physiopathologie, Faculté des sciences, université Mohamad V, Rabat, sous la direction du Professeur **Nezha Bouhadou**.

Liste des travaux scientifiques

Une partie des travaux relatés dans ce manuscrit de thèse a donné lieu à des communications scientifiques dont trois par affiche et quatre en communication orale. Deux articles ont été publiés dans des journaux internationaux.

1. Communications orales

❖ Communication orale 1

Fatiha Grina, Zain Ullah, Erhan Kaplaner, Boubker Nasser, Abderrahman Moujahid, Abdel Khalid Essamadi, And Mehmet Öztürk. « *Tyrosinase, acetyl and butyryl-cholinesterase inhibitory activity of *Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira compressa* and *Cystoseira stricta* collected from Morocco*. Symposium on Euroasian Biodiversity (SEAB-2016), 23-25 Mai 2016. Antalya, Turquie

❖ Communication orale 2

Fatiha GRINA, Zain Ullah, Erhan Kaplaner, Boubker Nasser, Abderrahman Moujahid, Abdel Khalid Essamadi, And Mehmet Öztürk. *Screening of Antioxidant Activity of Selected Seaweeds Collected from Morocco*. Symposium on Euroasian Biodiversity (SEAB-2016), le 23-25 Mai 2016. Antalya, Turquie

❖ Communication orale 3

Grina F., Rahim A., Nasser B., Benbachir M., Eddoha R., Moujahid A. et Essamadi A.K. *Effet protecteur des algues sur la cytotoxicité induite par le peroxyde d'hydrogène : Étude in-vitro chez le protozoaire *Tetrahymena pyriformis**. Colloque International sous le thème : Substances Naturelles : Stress et métabolisme cellulaires (SNSMC 2016), 15-16 décembre 2016, Faculté des Sciences et Techniques Settat – Université Hassan 1^{er} Maroc.

❖ Communication orale 4

Grina Fatiha., Rahim Abed latif, Nasser Boubker, Benbachir Meriem, Eddoha Rabiaa, Moujahid Abdrrahman, Essamadi A. Khaled. *Contribution à l'évaluation de l'effet protecteur contre le stress oxydatif par des extraits d'algues marocaine*. 2^{ème} Symposium Santé-Environnement-Développement durable Impact de l'environnement et des changements climatiques sur la santé et la biodiversité, 25 Février 2017, Faculté des Sciences – El Jadida.

2. Communications Affichées

❖ Communication Affichée 1

Grina F., Rahim A., Nasser B., Benbachir M., Eddoha R., Moujahid A. et Essamadi A.K. *Extraction et l'évaluation de l'activité antioxydante de quatre espèces d'algues récoltées de*

la côte atlantique Marocaine. Colloque International Substances Naturelles : Stress et métabolisme cellulaires (SNSMC 2016), 15-16 décembre 2016, Faculté des Sciences et Techniques Settat, Université Hassan 1^{er} Maroc.

❖ **Communication Affichée 2**

Grina F, Nasser B, Benbachir M, Eddoha R, Moujahid A, Essamadi A.K. ***Determination of the total phenolic, flavonoids content and the antioxidant activity of Selected Seaweeds Collected from Morocco***. 30 Mars 2017, 5^{me} édition de la « Journée Doctorant », CEDoc Sciences et Techniques. Settat.

❖ **Communication Affichée 2**

Grina F., Rahim A., Nasser B., Benbachir M., Eddoha R., Moujahid A. et Essamadi A.K. ***Determination of the total phenolic, flavonoids content and the antioxidant activity of Selected Seaweeds Collected from Morocco***. 22-23 Mars 2017. IV^{èmes} journées Internationale « Matériaux et environnements ». Faculté des Sciences et Techniques Settat, Université Hassan 1^{er} Maroc.

3. Publications de Recherche

❖ **Article 1**

Fatiha Grina, Zain Ullah, Erhan Kaplane, Abderrahman Moujahid, Rabia Eddoha, Boubker Nasser, Pınar Terzioğlu, Mustafa Abdullah Yilmaz, Abdulsalam Ertaş, Mehmet Öztürk, Abdelkhalid Essamadi. ***In vitro enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phytochemical fingerprints of five Moroccan seaweeds***. South African Journal of Botany 128 (2020) 152-160. doi:10.16/j.sajb.2019.10.021 (2019).

❖ **Article 2**

Fatiha Grina, Rahim Abdellatif, Talal Sabraoui, Boubker Nasser, Abderrahman Moujahid, Rabiaa Eddoha, Evan A.N. Marks, Maryam Benbachir, Abdel Khalid Essamadi (2021). ***Could the algal extract of *Fucus spiralis* prevent the oxidative stress in *Tetrahymena pyriformis* model?***. Biointerface Research in Applied Chemistry. volume 11, Issue 2, pp 8978-899511. <https://doi.org/10.33263/BRIAC112.89788995>.

Liste des figures

| | |
|---|------------|
| Figure 1 : Production annuelle d'algues par culture et par récolte (données Ifremer 2012). | 12 |
| Figure 2 : Production aquacole par groupe d'algues (données Ifremer 2012)..... | 13 |
| Figure 3 : Principaux pays producteurs d'algues dans le monde en 2013 (FAO, 2014)..... | 14 |
| Figure 4 : les différentes classes de composés phénoliques (Rezzag, 2010). | 23 |
| Figure 5 : la structure de noyau flavane | 24 |
| Figure 6 : Exemples de structures du phlorotannins qui contiennent du polymères de sous-unités de phloroglucinol, d'eckol (4), de dieckol (5), de triphlorethol A (6), de phlorofucofuroeckol (7) et d'eckstolonol (8). | 26 |
| Figure 7 : Structure moléculaire de la fucoxanthine (Mikami & Hosokawa, 2013). | 28 |
| Figure 8 : l'usage des algues (FAO, 2014) | 29 |
| Figure 9 : Les réactions d'élimination des radicaux lipidiques par les vitamines E et C. (LOO [•]) : radical peroxy lipidique, (LOOH) : hydroperoxyde lipidique, (Vit. E) : vitamine E, (Vit. C) : vitamine C, (GSH) : glutathion réduit, (GSSG) : glutathion oxydé, (LA) : acide lipoïque, (DHLA) : acide dehydrolipoïque. | 48 |
| Figure 10 : <i>Bifurcaria bifurcata</i> | 52 |
| Figure 11 : <i>Cystoseira humilis</i> | 53 |
| Figure 12 : <i>Cystoseira stricta</i> | 54 |
| Figure 13 : <i>Fucus spiralis</i> | 55 |
| Figure 14 : <i>Gelidium sequepedale</i> | 56 |
| Figure 15 : Extraction par des solvants de polarité croissante | 72 |
| Figure 16 :a) Division du champ ouvert de la plateforme, l'activité générale dans la zone centrale jaune est un indicateur du niveau d'anxiété exprimé chez les rats. b) photographie du dispositif du champ ouvert | 85 |
| Figure 17 : Photographie d'un appareil de Rota-Rod utilisé pour mesurer la coordination motrice. | 86 |
| Figure 18 : Dispositif expérimental du test du labyrinthe en croix surélevé..... | 88 |
| Figure 19 : Test de la nage forcée..... | 89 |
| Figure 20 : Effet du H ₂ O ₂ sur la croissance de <i>T. pyriformis</i> . <i>T. pyriformis</i> a été cultivé en milieu PPYG en présence de différentes concentrations de H ₂ O ₂ (100-300 µM). (a) : Effet du H ₂ O ₂ sur la croissance de <i>T. pyriformis</i> . (b) Effet du H ₂ O ₂ sur l'activité cellulaire de <i>T. pyriformis</i> . Les résultats présentés en moyenne ± Ecartype des trois mesures indépendantes. La signification suivant le test de Student-t est indiquée par : p <0,05 pour *; p <0,01 pour **; p <0,001 pour *** | 117 |
| Figure 27 : Effet de l'algue sur l'activité cellulaire de <i>T. pyriformis</i> . Les cellules ont été cultivés pendant 24 heures dans un milieu PPYG s en présence de différentes concentrations de la fraction chloroforme (a) ou d'acétate d'éthyle (b) (0,03 à 0,6 mg / mL). L'activité cellulaire est évaluée par le test MTT. p <0,001 pour *** (comparaison entre le groupe contrôle et le groupe traité pour chaque condition)..... | 119 |
| Figure 221 : L'évolution du poids corporel moyen des rats contrôle, des rats traités par LPS, 7% de l'algue + LPS, 14% de l'algue+ LPS, 7% de l'algue, 14% de l'algue, et Vitamine C. Chaque courbe représente la moyenne ± SEM de 5 rats par traitement. | 125 |
| Figure 232 : Performances comportementales des rats mesurées dans l'EPM. (a) le nombre d'entrée dans les (BO) et (b) : le temps passé dans les (BO) en secondes. Les résultats sont exprimés en moyennes± erreur standard moyenne (SEM). Avec * p <0,001, par rapport au contrôle. #p <0,001, par rapport LPS | 126 |
| Figure 243 : Durée d'immobilisation chez les rats traités par LPS. Les histogrammes montrent la durée d'immobilité dans le test de la nage forcée. Les données rapportées en moyen ± SEM. Les comparaisons ont été réalisées en utilisant le test t: Avec * p <0,001, par rapport au groupe contrôle. #p <0,001, par rapport au groupe LPS. | 127 |
| Figure 254 : L'effet du traitement sur la coordination motrice mesurée dans le Rotarod. Les résultats sont représentés en moyenne ± SEM. Avec * p <0,001, par rapport au contrôle. #p <0,001, par rapport LPS. | 128 |

Liste des tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 1 : Caractéristiques des principales lignées d'algues (Reviere, 2002)..... | 7 |
| Tableau 2 : Les différents groupes de rats..... | 83 |
| Tableau 3 : Composition chimique de différentes algues..... | 92 |
| Tableau 4 : Résultats des tests phytochimiques des cinq algues étudiées..... | 97 |
| Tableau 5 : la teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux des extraits des algues étudiés..... | 97 |
| Tableau 6 : l'activité antioxydante des extraits par le test DPPH DPPH., β -carotène- acide linoléique, ABTS et chélation des métaux..... | 100 |
| Tableau 7 : l'activité inhibitrice d'Acetylcholinestrase, butyryl-cholinestrase, tyrosinase et uréase des algues étudiées..... | 104 |
| Tableau 8 : l'identification et quantification des composés phénoliques des extraits ethanoliqes des algues par LC-MS/MS..... | 109 |
| Tableau 9 : Teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes des extraits bruts et ses fractions des cinq espèces d'algues étudiés | 110 |
| Tableau 10 : Activités antioxydantes des extraits bruts et ses fractions de cinq espèces d'algues par le test FRAP, DPPH et ABTS..... | 113 |
| Tableau 11 : Effet du traitement sur les paramètres mesurés dans le test d'exploration dans un champ ouvert..... | 128 |

Liste des abréviations

4HNE : 4-hydroxy-2-nonenal

ABTS : 2, 2'-Azinobis (3-ethylbenzotriazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AGI : Acides gras insaturés

AGPI : Acides gras polyinsaturés

AOAC : The Association Of Analytical Communities

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine tri-phosphate

BF : Bras fermé

BHA : ButylHydroxyAnisole

BHT : L'hydroxytoluène butylé

BO : Bas ouvert

BSA : Sérumalbumine bovine

CAT : Catalase

CHCl₃ : Chloroforme

CI₅₀ : Concentration Inhibitrice à 50%

CUPRAC : Cupric Reducing Antioxidant Capacity

CuSO₄ : Sulfate de cuivre.

DMSO : Dimethylsulfoxyde

DO : Densité optique

DPPH : 1,1-Diphényl-2-PicrylHydrazyl

DTNB : 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque-acide)

EAG : Equivalent d'acide gallique

EDTA : Acide éthylène-diamine-tétra-acétique

EP : Equivalent de pyrocatechol

EPM : Elevated Plus Maze

ERN : Espèces Réactives de l'Azote

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

EtOAc : acétate d'éthyle **HCl** : Acide chlorhydrique

FAO: Organisation Mondial de l'Agriculture et de l'Alimentation

Fe²⁺ : Le fer ferreux

Fe³⁺ : Le fer ferrique

FeCl₃ : Chlorure de fer

FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power

GPX: Glutathion peroxydase

GR : Glutathion réductase

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxydé

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

H₂SO₄ : Acide Sulfurique

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

IC₅₀ : Concentration inhibitrice de 50 % d'une activité

INRH: Institut National de Recherches Halieutiques

K₃ Fe(CN)₆ : Ferricyanure de potassium

LC/MS : Chromatographie Liquide
couplée à spectrométries de masse

MAA : Mycosporine-like amino-acides

MDA : Malonedialdéhyde

MPM: Ministère de la pêche maritime

Na₂CO₃ : Le carbonate de sodium

NaCl : Chlorure de sodium

NADPH : Nicotinamide adénine
dinucléotide phosphate oxydase

NaOH : Hydroxyde de sodium

NBT : Nitrobleu de Tétrazolium

O₂ : Oxygène

O₂⁻ : Anions superoxydes

OF : Open feild

OH° : Radicaux hydroxyls

ONOO⁻ : Peroxynitrites

ONOOH : Radical nitrosyl

ROO° : Radical peroxyde

R-OOH : Hydroperoxydes

SOD : Superoxyde dismutase

T.pyriformis : *Tetrahymena pyriformis*

TBA : Acide thiobarbiturique

TCA : Acide trichloracétique

TNF : Tumor necrosis fact

Résumé

Résumé : Les molécules naturelles de différentes origines et essentiellement celles issues des algues marines renferment une panoplie de principes bioactifs naturels à fort potentiel thérapeutique. Actuellement, plusieurs recherches sont consacrées à l'isolement de nouveaux composés bioactifs à partir des ressources marines qui auraient des effets bénéfiques prometteurs pour la santé. Les algues pouvant contenir des métabolites secondaires avec des activités biologiquement pertinentes incluant des activités chélatrice, anti-oxydante, antiinflammatoire et des propriétés neuroprotectives. Le Maroc, avec sa double façade Atlantique et Méditerranéenne, longue de plus de 3500 Km, reste un pays profondément riche par l'existence de milliers d'espèces marines animales et végétales. Au Maroc, les algues marines constituent une source peu explorée et inexploitée, alors qu'elles constituent un potentiel considérable de développement économique. Ce travail est consacré à la valorisation de quatre algues brunes (*Bifurcaria bifurcata*, *Cystociera humuli*, *Cystociera stricta* et *Fucus spiralis*) et une algue rouge, *Gelidium sesquipedale* de la côte atlantique marocaine. Le but principal est d'étudier l'activité antioxydante des cinq algues en utilisation des tests chimiques et d'identifier le profil antioxydants de ces algues. Ainsi étudier *in-vitro* l'effet de l'algue qui est riche en molécules anti-oxydantes sur un modèle cellulaire (protozoaire: *Tetrahymena pyriformis*) pour rechercher l'effet protecteur contre la toxicité induite par le peroxyde d'hydrogène comme agent induisant le stress oxydatif. De plus, étudier *in vivo* sur un modèle animal (rat) l'effet protectif contre le stress induit par les lipopolysaccharides. Les résultats obtenus ont montré que l'espèce *F. spiralis* possède une teneur plus élevée en métabolites secondaires avec une meilleure activité antioxydante et activité inhibitrice des enzymes acétylcholinestérase, butyrylcholinestérase. L'identification du profil antioxydant a détecté différentes antioxydantsdes majoritaire dans les cinq algues. Les résultats obtenus *in-vitro* ont montré *F. spiralis* est efficace contre la cytotoxicité et les changements redox induits par H₂O₂. Les résultats obtenus *in vivo* sur les rats traités par *F. spiralis* ont montré que le LPS induit une toxicité accompagnée des troubles moteurs et comportement anxieux et dépressif chez les rats. Le traitement des rats par l'algue *F. spiralis* capable de protéger l'animal contre les effets toxiques de LPS. L'ensemble de ces données révèlent l'intérêt d'extraire et d'utiliser des principes actifs provenant de ces algues dans le but de se protéger contre les dégâts causés par les espèces réactives oxygénées à court et à long terme.

Mot clé : Les algues, stress oxydatif, *Fucus spiralis*, les antioxydants, peroxyde d'hydrogène, lipopolysaccharides

Abstract

ABSTRACT : Natural molecules of different origins and mainly those from marine algae contain a variety of natural bioactive principles with high therapeutic potential. Currently, much research is devoted to the isolation of new bioactive compounds from marine resources that would have promising health benefits. Algae may contain secondary metabolites with biologically relevant activities including chelating, anti-oxidant, anti-inflammatory and neuroprotective properties. Morocco, with its double Atlantic and Mediterranean frontage, over 3,500 km long, remains a country deeply rich in the existence of thousands of marine animal and plant species. In Morocco, marine algae constitute a little explored and unexploited source, while they constitute a considerable potential for economic development. This work is devoted to the valuation of four brown algae (*Bifurcaria bifurcata*, *Cystociera humulis*, *Cystociera stricta* and *Fucus spiralis*) and a red alga, *Gelidium sesquipedale* from the Moroccan Atlantic coast. The main goal is to study the antioxidant activity of the five algae with the use of chemical tests and to identify the antioxidant profiles of these algae. Thus to study in vitro the effect of the alga which is rich in antioxidant molecules on a cellular model (protozoan: *Tetrahymena pyriformis*) to seek the protective effect against the toxicity induced by hydrogen peroxide as an agent inducing stress. In addition, to study in vivo on an animal model (rat) the neuroprotective effect against the stress induced by lipopolysaccharides. The results obtained showed that the species *F. spiralis* has a higher content of secondary metabolites with a better antioxidant activity and inhibitory activity of the enzymes acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase. The identification of the antioxidant profile detected different antioxidants in the five algae. The results obtained in vitro showed *F. spiralis* is effective against cytotoxicity and redox changes induced by H₂O₂. The results obtained in vivo on rats treated with *F. spiralis* showed that LPS induces a toxicity. This is accompanied by motor disturbances and anxious and depressive behavior in rats. Treatment of rats with the algae *F. spiralis* capable of protecting the animal against the toxic effects of LPS. All of these data reveal the interest of extracting and using active ingredients from algae in order to protect against damage caused by reactive oxygenated species in the short and long term.

Keyword : Algae, oxidative stress, *Fucus spiralis*, antioxidants, hydrogen peroxide, lipopolysaccharides

ملخص

ملخص : تحتوي الجزيئات الطبيعية ذات الأصول المختلفة وخاصة تلك المشتقة من الأعشاب البحرية على مجموعة متنوعة من المبادئ الطبيعية النشطة بيولوجياً ذات الإمكانيات العلاجية العالي. في الوقت الحالي، يتم تخصيص الكثير من الأبحاث لعزل المركبات النشطة بيولوجياً الجديدة عن الموارد البحرية التي سيكون لها فوائد صحية واعدة. قد تحتوي الطحالب على مستقبلات ثانوية ذات أنشطة ذات صلة بيولوجياً بما في ذلك الخالب، ومضادات الأكسدة، ومضادة للالتهابات، وخصائص الحماية العصبية. لا يزال المغرب، بواجهته المزوجة الأطلسية والمتوسطية، التي يزيد طولها عن 3500 كيلومتر، بلدًا غنيًا للغاية بوجود آلاف الأنواع من الحيوانات والنباتات البحرية. في المغرب، تعتبر الأعشاب البحرية مصدرًا تم استكشافه قليلاً وغير مستغلة، في حين أنها تشكل إمكانيات كبيرة للتنمية الاقتصادية. هذا العمل مكرس لتقييم أربعة طحالب بنية *Bifurcaria* *Gelidum* ، *Fucus spiralis* وطحلب أحمر، *Cystociera stricta*•*bifurcata* *Cystociera humilis* *sesquipedale* من الساحل الأطلسي المغربي. الهدف الرئيسي هو دراسة النشاط المضاد للأكسدة للطحالب الخمسة باستخدام الاختبارات الكيميائية وتحديد ملامح مضادات الأكسدة لهذه الطحالب. وبالتالي للدراسة في المختبر تأثير الطحالب الغنية بجزيئات مضادات الأكسدة على نموذج خلوي (أولي: رباعي الغشاء الكثرى) للبحث عن التأثير الوقائي ضد السمية التي يسببها بيروكسيد الهيدروجين كعامل يسبب الإجهاد. بالإضافة إلى ذلك، للدراسة في الجسم الحي على نموذج حيواني (الجرذ) التأثير الوقائي ل ل للإجهاد ضد الإجهاد الناتج عن السكريد الدهني.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن النوع *F. spiralis* النشاط المضاد للأكسدة والنشاط التثبيطي لأنزيمات أستيل كولينستراز ، بوتيريل كولينستراز ، كشف تحديد خصائص مضادات الأكسدة عن وجود مضادات أكسدة مختلفة في معظم الطحالب الخمسة. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها في المختبر أن *F. spiralis* فعال ضد السمية الخلوية وتغيرات الأكسدة الناتجة عن H_2O_2 .

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها في الجسم الحي على الفئران المعالجة بالفطر *F. spiralis* أن *LPS* يسبب السمية. ويصاحب ذلك اضطرابات حركية وسلوك قلقي واكتنابي في الفئران. معالجة الفئران بالطحالب *F. spiralis* القادرة على حماية الحيوان من التأثيرات السامة لـ *LPS* تكشف كل هذه البيانات عن الاهتمام باستخراج واستخدام المكونات النشطة من الطحالب من أجل الحماية من الأضرار التي تسببها الأنواع المؤكسدة التفاعلية على المدى القصير والطويل.

الكلمات الرئيسية: الطحالب، الإجهاد التأكسدي، فوق الحلزون، مضادات الأكسدة، بيروكسيد الهيدروجين، عديدات السكريد الدهنية.

Table des matières

Remerciements

Dédicace

Avant-propos

Liste des travaux scientifiques

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

Abstract

ملخص

Table des matières

| | |
|---|----|
| Introduction générale..... | 11 |
| Étude bibliographique | 4 |
| Chapitre 1: Chimiodiversité et biodiversité des algues | 5 |
| I. Généralités sur les algues | 5 |
| 1. Introduction | 5 |
| 2. Habitat et écologie | 5 |
| 3. Les bases de classification des algues | 6 |
| 3.1. La pigmentation..... | 6 |
| 3.2. Les polysaccharides de réserve | 7 |
| 3.3. Les polysaccharides pariétaux..... | 7 |
| 4. Les Reproduction des algues | 8 |
| 4.1. Reproduction asexuée..... | 8 |
| 4.2. Reproduction sexuée..... | 9 |
| 5. Les grands groupes des macroalgues..... | 9 |
| 5.1. Les algues vertes (Chlorophycées) | 9 |
| 5.2. Les algues brunes (Phéophycées)..... | 10 |
| 5.3. Les algues rouges (Rhodophycées) | 10 |
| 6. Intérêt économique des algues | 11 |
| 6.1. Les algues dans le monde..... | 11 |
| 6.2. Les algues au Maroc | 14 |

| | |
|---|-----------|
| 7. Les métabolites des algues..... | 15 |
| 7.1. Les métabolites primaires | 15 |
| 7.1.1 Protéines, acides aminés, composés azotés | 15 |
| 7.1.2. Les pigments..... | 17 |
| 7.1.3. Lipides et dérivés..... | 17 |
| 7.1.4. Minéraux | 18 |
| 7.1.5. Les vitamines | 19 |
| 7.1.6. Régulateurs de croissance végétale – Phytohormones | 20 |
| 7.1.7. Glucides | 20 |
| 7.2. Les métabolites secondaires | 21 |
| 7.2.1. Polyphénols | 21 |
| 7.2.2. Flavonoïdes..... | 24 |
| 7.2.3.Tannins | 24 |
| 7.2.3.1.Tannins hydrolysables..... | 25 |
| 7.2.3.2. Tannins condensés | 26 |
| 7.2.3.3. Phlorotannins | 26 |
| 7.2.4. Mycosporine-like amino-acides (MAA) Acides aminés de type mycosporine (MAA)..... | 27 |
| 7.2.5. Caroténoïdes | 27 |
| 7.2.6. Terpénoïdes..... | 28 |
| 8. Applications des algues marines | 29 |
| 8.1. L'utilisation dans l'alimentation humaine..... | 30 |
| 8.2. L'utilisation dans l'alimentation animale | 30 |
| 8.3. L'utilisation des algues dans la Santé et bien-être..... | 30 |
| 8.4. L'utilisation des algues dans l'environnement..... | 31 |
| 8.5. L'utilisation des algues dans l'énergie..... | 31 |
| Chapitre 2 : Stress oxydatif et les antioxydants..... | 32 |
| I. Généralités sur le stress oxydant et ses marqueurs | 32 |
| 1. Introduction | 32 |
| 2. Les Radicaux libres..... | 32 |
| 3. Les principales espèces réactives oxygénées dans la cellule | 33 |
| 3.1. EOR radicalaires..... | 34 |
| 3.1.1. L'anion superoxyde $O_2^{\circ -}$ | 34 |
| 3.1.2. Le radical hydroxyl HO° | 34 |
| 3.1.3. L'oxyde nitrique NO° | 34 |
| 3.1.4. Les radicaux peroxy ROO° | 35 |
| 3.2. EOR non radicalaires..... | 35 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.1. L'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ | 35 |
| 3.2.2. Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 | 35 |
| 3.2.3. Le peroxydinitrite NO_3^- | 35 |
| 3.2.4. L'acide hypochloreux..... | 36 |
| 4. Source des espèces réactives de l'oxygène..... | 36 |
| 4.1. Sources exogènes | 36 |
| 4.2. Sources endogènes..... | 36 |
| 5. Les cibles spécifiques du stress oxydant | 38 |
| 5.1. Effet du stress oxydant sur les protéines | 38 |
| 5.2. Effet du stress oxydant sur les lipides | 39 |
| 5.3. Effet du stress oxydant sur l'ADN..... | 40 |
| 5.4. Oxydation des glucides..... | 41 |
| 6. Stress oxydant et maladies..... | 42 |
| II. Les systèmes de défenses antioxydantes..... | 44 |
| 1. Les antioxydants enzymatiques | 44 |
| 1.1. Les superoxydes dismutases (SODs)..... | 44 |
| 1.2. La catalase | 45 |
| 1.3. Le glutathion peroxydase | 45 |
| 1.4. Les Thioridoxine (Trx)..... | 46 |
| 2. Les systèmes endogènes non enzymatiques..... | 46 |
| 2.1. Oligoéléments | 47 |
| 2.2. Glutathion..... | 47 |
| 2.3. Vitamine E et vitamine C | 47 |
| 2.4. L'Acide urique | 48 |
| 2.5. L'Ubiquinone et cytochrome c..... | 48 |
| Matériels et méthodes | 50 |
| I. Screening phytochimique..... | 51 |
| 1. Préparation des extraits | 51 |
| 1.1. Présentation du site de récolte | 51 |
| 1.2. Présentation des espèces étudiées | 52 |
| 1.2.1. <i>Bifurcaria bifurcata</i> R.ROSS (1958)..... | 52 |
| ❖ Taxonomie | 52 |
| ❖ Caractéristiques botaniques et phénotypiques | 52 |
| 1.2.2. <i>Cystoseira humilis</i> Schousboe de Kützing (1860) | 52 |
| ❖ Taxonomie..... | 52 |
| ❖ Caractéristiques botaniques et phénotypiques | 53 |

| | |
|--|----|
| 1.2.3. <i>Cystoseira stricta</i> Sauvageau (1911)..... | 53 |
| ❖ Taxonomie..... | 54 |
| ❖ Caractéristiques botaniques et phénotypiques | 54 |
| 1.2.4. <i>Fucus spiralis</i> Linnaeus (1753)..... | 55 |
| ❖ Taxonomie..... | 55 |
| ❖ Caractéristiques botaniques et phénotypiques | 55 |
| 1.2.5. <i>Gelidium sequipedale</i> (Clemente) Thuret (1876)..... | 56 |
| ❖ Taxonomie..... | 56 |
| ❖ Caractéristiques botaniques et phénotypiques | 56 |
| 1.3. Séchage..... | 57 |
| 1.4. Préparation de la poudre | 57 |
| 1.5. Extraction par solvant organique | 57 |
| 1.6. Rendement d'extraction | 57 |
| 2. Détermination des propriétés chimiques | 58 |
| 2.1. Détermination de la teneur en eau..... | 58 |
| 2.2. Détermination de teneur de la matière minérale..... | 58 |
| 2.3. Détermination de la teneur en lipides | 59 |
| 2.4. Détermination de la teneur en protéine..... | 59 |
| 2.5. Détermination de la teneur en sucre | 60 |
| 3. Analyses phytochimiques des métabolites secondaires..... | 60 |
| 3.1. Analyse qualitative | 60 |
| 3.1.1. Estimation des polyphénols totaux | 60 |
| 3.1.2. Estimation des flavonoïdes :..... | 60 |
| 3.1.3. Estimation des tanins | 61 |
| 3.1.4. Estimation des stéroïdes | 61 |
| 3.1.5. Estimation des saponines :..... | 61 |
| 3.1.6. Estimation des terpènes..... | 61 |
| 3.2. Analyse quantitavie..... | 61 |
| 3.2.1. Dosage des polyphénols totaux | 61 |
| 3.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux | 62 |
| 4. Evaluation du potentiel anti-oxydant..... | 62 |
| 4.1. Test DPPH | 63 |
| 4.2. Test de sels de 2,2'-azino-bis (acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) de dia-mmonium (ABTS) 64 | |
| 4.3. Essai de blanchiment β -carotène / acide linoléique | 65 |
| 4.4. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC) | 66 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.5. | L'activité chélatrice des ions ferreux..... | 66 |
| 5. | Les activités inhibitrice des enzymes | 67 |
| 5.1. | Activité anticholinéterase | 67 |
| 5.2. | Activité d'inhibition de la tyrosinase | 68 |
| 5.3. | Activité inhibitrice d'uréase..... | 69 |
| 6. | Identification et quantification des composés phénoliques | 69 |
| 6.1. | Préparation des solutions chromatographiques..... | 69 |
| 6.1.1. | Les solutions standards | 69 |
| 6.1.2. | Échantillon à analyser..... | 70 |
| 6.1.3. | Les conditions chromatographiques | 70 |
| II. | Etude in vitro sur le protozoaire <i>T. pyriformis</i> | 70 |
| 1. | Préparation des extraits méthanoliques et ses fractions..... | 70 |
| 2. | Dosage des phénols Totaux..... | 72 |
| 3. | Dosage des flavonoïdes..... | 73 |
| 4. | Test d'activité antioxydante | 73 |
| 4.1. | Test de DPPH | 73 |
| 4.2. | Test d'ABTS..... | 73 |
| 4.3. | Test de la Réduction du fer | 73 |
| 5. | L'évaluation de l'effet protecteur de <i>F. spiralis</i> | 74 |
| 5.1. | L'organisme choisi : <i>T. Pyriformis</i> | 74 |
| 5.2. | Entretien des cellules | 75 |
| 5.2.1. | La pré-culture | 75 |
| 5.2.2. | Culture cellulaire | 75 |
| 5.3. | Traitement des cellules | 75 |
| 5.3.1. | Traitement par le peroxyde d'hydrogène | 75 |
| 5.3.2. | Détermination de la dose non létale de l'extrait | 75 |
| 5.4. | Mise en évidence de l'effet protecteur..... | 76 |
| 5.4.1. | Détermination de Cl_{50} | 76 |
| 5.4.2. | Evaluation de la viabilité..... | 77 |
| 5.5. | Evaluation de l'activité cellulaire par le test MTT | 77 |
| 5.6. | Evaluation du stress oxydatif..... | 78 |
| 5.6.1. | Préparation de l'extrait brut protéique..... | 78 |
| 5.6.2. | Dosage des Protéines | 78 |
| 5.6.3. | Dosage de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase (SOD)..... | 79 |
| 5.6.3. | Dosage de l'activité enzymatique de la Catalase (CAT)..... | 79 |
| 5.6.4. | Dosage de l'activité enzymatique de GPx | 80 |

| | |
|---|-----|
| 5.6.5. Evaluation de marqueurs de stress | 81 |
| 5.6.5.1. Dosage MDA | 81 |
| 5.6.5.2. Dosage de la glutathion réduit (GSH) | 82 |
| III. Etude in-vivo sur des rats | 82 |
| 1. Condition d'élevage | 82 |
| 1.1. Déclaration d'éthique | 82 |
| 1.2. Choix des animaux | 82 |
| 2. Traitement des animaux | 83 |
| 3. Etude comportementale | 84 |
| 3.1. Tests moteurs | 84 |
| 3.1.1. Champ Ouvert ou "Open Field" | 84 |
| 3.1.2. Rota-rod | 85 |
| 3.2. Tests non-moteurs | 87 |
| 3.2.1. Labyrinthe en Croix Surélevé (EPM) | 87 |
| 3.2.2. Nage forcée | 88 |
| 4. Sacrifice des animaux et prélèvement des organes | 90 |
| IV. Analyses statistiques | 90 |
| Résultats et discussion | 91 |
| I. Screening chimique des extraits | 92 |
| 1. Détermination des paramètres chimiques des cinq algues | 92 |
| 1.1. Teneur en eau | 92 |
| 1.2. Teneur en matière minérale | 93 |
| 1.3. Teneur en lipides | 94 |
| 1.4. Teneur en protéines | 95 |
| 1.5. Teneur en sucres totaux | 96 |
| 2. Analyses phytochimiques des métabolites secondaires | 96 |
| 2.1. Analyse qualitative | 96 |
| 2.2. Analyse quantitative | 97 |
| 2.2.1. Rendement d'extraction | 97 |
| 2.2.2. Détermination de la teneur en polyphénols | 98 |
| 2.2.3. Détermination de la teneur en flavonoïdes | 99 |
| 2.3. L'activité antioxydante | 99 |
| 2.3.1. Test de DPPH | 100 |
| 2.3.2. Test ABTS | 101 |
| 2.3.3. Test d'acide linoléique-β carotène | 101 |
| 2.3.4. Test CUPRAC | 102 |

| | |
|--|------------|
| 2.3.5. Test de chélation des ions ferreux | 102 |
| 2.4. L'activité inhibitrice des enzymes..... | 103 |
| 2.4.1. l'activité anticholinestérase | 104 |
| 2.4.2. Activité inhibitrice de la tyrosinase | 105 |
| 2.4.3. Activité inhibitrice de l'uréase..... | 106 |
| 2.5. Identification des composés phénoliques par LC-MS/MS..... | 107 |
| II. Etude <i>in-vitro</i> sur le protozoaire <i>T. pyriformis</i> | 109 |
| 1. Extraction par solvant de polarité croissante..... | 109 |
| 2. Teneur en métabolites secondaires | 110 |
| 2.1. Teneur en polyphénols..... | 110 |
| 2.2. Teneur en flavonoïdes | 111 |
| 3. Activités antioxydantes des extraits et ses fractions | 112 |
| 3.1. Réduction de fer | 113 |
| 3.2. Le piégeage du radical libre DPPH..... | 114 |
| 3.3. Activité antiradicalaire ABTS | 115 |
| 4. Evaluation de l'effet protecteur de <i>F.spiralis</i> | 116 |
| 4.1. Caractérisation de la cytotoxicité de H ₂ O ₂ | 116 |
| 4.2. Effet de l'extrait d'algues sur la viabilité cellulaire..... | 118 |
| 4.3. Evaluation de l'effet protecteur | 119 |
| 4.4. Effet de l'extrait sur le stress oxydant | 121 |
| III. Effet protecteur de <i>F.spiralis in vivo</i> | 125 |
| 1. Evolution pondérale | 125 |
| 2. Effets de <i>F. spiralis</i> sur le comportement..... | 126 |
| 2.1. Test non moteurs | 126 |
| 2.1.1. Tests du labyrinthe en croix surélevé (Elevated Plus Maze) | 126 |
| 2.1.2. Nage forcée | 127 |
| 2.2. Test moteurs..... | 127 |
| 2.2.1. Coordination motrice (Test rotarod) | 127 |
| 2.2.2. Test du champ ouvert (open Field Test) | 128 |
| Conclusion et perspectives | 131 |
| Références bibliographiques | 135 |
| Publications de recherches | 158 |

Introduction générale

Depuis l'antiquité, les molécules d'origines naturelles, notamment ceux d'origine végétale ont toujours été une source importante d'agents thérapeutiques (**Dumay et al. 2012**). De ce fait, la valorisation des ressources naturelles est une préoccupation qui devient de plus en plus importante dans de nombreux pays. Actuellement, environ 25-30% de tous les médicaments disponibles pour le traitement des maladies sont dérivés des produits naturels (des plantes, des animaux, des bactéries et des champignons) ou sont des dérivés de produits naturels (**Moreau, 2003**).

Dans ce contexte, la valorisation des ressources marines peut s'avérer viable d'un point de vue économique. Parmi les ressources marines, l'isolement de nouveaux composés bioactifs à partir de nombreuses espèces d'algues qui renferment des propriétés nutritionnelles et pharmaceutiques particulièrement intéressantes. Les composés phénoliques comptent actuellement parmi les molécules naturelles qui sont le plus largement étudiées de par leurs multiples propriétés biologiques et/ou fonctionnelles. Leur présence à des taux significatifs dans les algues pourrait constituer une voie de valorisation pour la biomasse algale.

Les algues marines se présentent parmi les végétaux les plus productifs de la planète. Pour faire face à l'absence de racines, ces végétaux marins ont dû développer des stratégies de développement et de nutrition particulièrement performantes. Leur ingéniosité biochimique les a ainsi amenée à développer différentes stratégies d'adaptation et de lutte tout à fait exceptionnelles, pour résister et survivre aux différents stress abiotiques (hydrique, osmotique, thermique, ...) et biotiques (herbivores, champignons, ...). Ces stratégies ont abouti à la mise en place de tout un arsenal biologique d'une remarquable efficacité. Les algues ont aussi une faculté extraordinaire à concentrer les principes actifs présents dans l'eau de mer (jusqu'à 50000 fois) (**Mérigout, 2006**).

La valorisation de la biomasse algale est considérée parmi les programmes internationaux les plus intéressants dans l'exploitation du milieu marin. On effet, les algues ont constitué pour longtemps un grand espoir économique, pour les pays qui en possèdent d'importants littorales. Les algues ont déjà une valeur commerciale reconnue dans des domaines variés, tels que : l'alimentation, la cosmétique, le textile, la papeterie, le pharmaceutique et la médecine. Elles sont une source importante de polysaccharides (agars, carraghénines, alginates) utilisés comme agents émulsifiants, épaississants et stabilisateurs dans les industries alimentaires (**Casillo et al., 2018; V. Brito et al., 2016**). Leurs propriétés antibiotiques, antivirales et anti

inflammatoires leur confèrent une valeur appréciée en pharmacie et en médecine (**Ariede et al., 2017; Sanjeewa et al., 2016; Shu et al., 2013**).

Le Maroc est un pays maritime par excellence. Il dispose 3500 Km de façade atlantique et méditerranéenne, constitue un des plus grands champs naturels d'algues marines qui présentent une biomasse très importante par rapport à d'autres pays. Riche d'une biodiversité, environ 489 espèces d'algues sont actuellement recensées sur les façades atlantique et méditerranéenne. Les deux côtes renferment presque, 303 Rhodophyceae (Algues rouges), 99 Phaeophyceae (Algues brunes) et 87 Chlorophyceae (Algues vertes) (**Benhissoune et al., 2002**).

Le secteur des algues au Maroc est très peu développé reposant surtout sur l'exportation de la matière brute des algues. Des sites importants le long des côtes Marocains qui n'ont jamais été explorés de manière scientifique, des études purement systématiques sur les richesses en phytoplancton n'ont pas encore été réalisées. Les potentialités sont pourtant immenses et constituent une source riche en algues marines, qui restent cependant inexploitées. Les algues seraient de très bons stimulants de la croissance économique à savoir l'alimentation, santé, cosmétique et environnement.

La conception et la réalisation de ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de ressources algales de la cote atlantique marocaine par des recherches scientifiques, aussi bien pour une contribution à l'étude de la valorisation de certaines algues. La démarche poursuivie dans la réalisation de cette thèse consiste à faire un screening phytochimique des algues étudiées, suivie par une extraction et une analyse qualitative et quantitative de différents composés chimiques susceptibles d'avoir une activité pharmacologique. Parmi ces composés, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à ceux doués d'une activité antioxydante.

L'objectif de cette thèse a été dans un premier temps d'enrichir les connaissances sur cette biomasse et d'étudier les effets protecteurs de ces algues contre le stress oxydatif.

Notre recherche est axée sur l'évaluation et l'identification de composés phénoliques (polyphénols, flavonoïdes), visant à utiliser les molécules issus des algues dans la prévention et/ou traitement des maladies dont le stress oxydatif est impliqué.

Le premier volet vise à évaluer l'action des extraits des algues étudiés à travers des tests physicochimiques basés sur la capacité des extraits d'algues à piéger des radicaux, et l'identification du profil antioxydant des cinq algues étudié par LC-MS.

Le deuxième volet a consisté en un screening des fractions issus des extraits méthanoliques afin de sélectionner les fractions les plus efficaces. Ces derniers ont ensuite été utilisés dans la prévention contre le stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène chez un modèle cellulaire (protozoaire : *Tetrahymena pyriformis*).

Le troisième volet a consisté à chercher les effets préventifs de *Fucus spiralis* sur des rats contre la toxicité induite par les lipopolysaccharides (LPS).

Étude bibliographique

Chapitre 1: Chimiodiversité et biodiversité des algues

I. Généralités sur les algues

1. Introduction

Les algues sont des organismes vivants photosynthétiques, thallophytiques, autotrophes dont le cycle de vie se déroule en milieu aquatique marins ou d'eau douce, mais également sur le milieu terrestre. L'ensemble des algues compte entre 20 000 à 30 000 espèces dans le monde, ce qui correspond à environ 18 % du règne végétal (**Ramade, 2009**).

Les algues peuvent néanmoins être classées en une dizaine d'embranchements selon des critères basés sur leurs compositions biochimique et de leurs caractéristiques structurales (**Ruiz, 2005**). Elles peuvent être uni ou pluricellulaires. Leur taille est très variable, de microscopique pour les microalgues et cyanobactéries jusqu'à plusieurs dizaines de mètres comme des algues du genre *Macrocystis* qui peuvent mesurer jusqu'à 45 mètres (**Garon-lardiere, 2004**).

Les macroalgues sont en général (macroscopiques et pluricellulaires) classées en trois groupes selon leur pigmentation. Il existe ainsi les algues vertes (Chlorophytes), les algues brunes (Chromophytes) et les algues rouges (Rhodophytes).

Chez les algues macroscopiques, la description n'utilise pas les mêmes termes botaniques des végétaux supérieurs. L'appareil végétatif, ou thalle n'a pas la même complexité qu'une tige. Ainsi, les algues ne possèdent ni feuilles (ce qui peut ressembler à une feuille chez une algue est appelé fronde), ni racines. Les algues peuvent posséder un crampon qui leur permet de rester fixées à leurs supports, mais qui n'a pas le rôle de nutrition que possède une racine chez les végétaux supérieurs. Chez les algues microscopiques, ce terme on peut regrouper des organismes variés à savoir des procaryotes ou des cyanobactéries et des eucaryotes.

Les microalgues vivent dans des milieux fortement aqueux, la plupart d'entre elles peuvent posséder un ou plusieurs flagelles lui conférant ainsi une mobilité flagellaire. Elles peuvent aussi former une fine pellicule gluante ou biofilm, constitué par des algues, des sécrétions adhésives et des microorganismes (**Reijnders et al., 2014 ; Faller, 2011**).

2. Habitat et écologie

Les macroalgues peuvent être considérées comme des organismes généralement inféodés aux zones humides (d'eaux marines, d'eaux saumâtres ou d'eaux douces) (**Person, 2010**). La

plupart des algues vivent en effet dans les océans et y représentent plus de 90 % des végétaux **(Leclerc and Floch, 2010)**.

En effet, les macroalgues ne vivent pas seulement dans les océans, il y en a aussi sur les systèmes terrestres. Elles se développent dans les lacs, les rivières, les étangs et les mares. C'est dans ces milieux d'eau douce aux conditions si variées que l'on rencontre le plus grand nombre d'espèces **(Leclerc and Floch, 2010)**.

3. Les bases de classification des algues

Les algues sont très variées. Malgré les différentes couleurs, bleue, rouge, brune ou verte avec lesquelles elles peuvent être perçues, elles possèdent toutes de la chlorophylle a (pigment vert). Il existe de nombreux critères de différenciation pour répartir les algues en différents groupes. Ils concernent notamment, le mode de nutrition, les structures cellulaires, la présence et la nature d'un flagelle, l'habitat ou même la nature et la localisation des pigments et des glucanes de réserve.

Malgré cette importante diversité et complexité structurale, une dizaine d'embranchements permettent de classer ces végétaux. Différents critères rentrent en considération; à savoir, leurs compositions pigmentaires, leurs caractéristiques structurales, leurs modes de reproduction ainsi que leurs polysaccharides de réserve **(Reviere, 2002)**.

En général, les algues regroupent quatre groupes qui sont différenciées par rapport à la couleur, chaque groupe contient des classes, et chaque classe contient des centaines d'espèces **(Garon-lardiere, 2004)**.

3.1. La pigmentation

Les pigments photosynthétiques sont des composés bioactifs qui sont capables de capter l'énergie solaire. La couleur des algues est due à la présence ou absence de pigments **(Hamed, 2014)**.

Les pigments ont dès le début du 19^{ème} siècle constitué un critère important dans la classification des algues. Le rôle physiologique de ces molécules consiste à capter l'énergie lumineuse. Selon la nature des pigments surnuméraires associés à la chlorophylle, les plastes sont tantôt verts (Chlorophytes), tantôt jaunes ou bruns (Chromophytes), ou encore rouges (Rhodophytes) **(Ruiz, 2005)**.

3.2. Les polysaccharides de réserve

Les polysaccharides ou glucanes sont des polymères de glucides qui résultent du mécanisme photosynthétique. Cependant, il en existe deux familles, les polysaccharides de réserve et les polysaccharides pariétaux. Il existe des glucanes de réserve solubles en solution dans les vacuoles et d'autres insolubles qui forment des grains observables en microscopie. Composés de D-glucose, les glucanes de réserve se rencontrent sous deux formes : liés en (α -1,4) ils appartiennent à la catégorie des amidons et liés en (β -1,3), ils font partie de la catégorie des laminarines (Ruiz, 2005).

En outre, malgré une large diversité et complexité structurale que morphologique des algues, il est possible de réaliser une classification des différentes lignées d'algues, sur la base de caractères chimiques (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques des principales lignées d'algues (Reviere, 2002)

| Embranchements | Types de Chlorophylles | caractéristiques Phycobiliprotéines | Polysaccharides de réserve |
|------------------------|------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| Bacillariophyta | a, c | - | Chrysolaminarane |
| Chlorophyta | a, b | - | Amidon intraplastidial |
| Chrysophyta | a, c | - | Chrysolaminarane |
| Cryptophyta | a, c | PE | Amidon périplastidial |
| Cyanophyta | a | PC, PE | Glycogène |
| Dinophyta | a, c | - | Amidon cytoplasmique |
| Euglenophyta | a, b | - | Paramylon cytoplasmique |
| Phaeophyta | a, c | - | Laminarane, mannitol |
| Rhodophyta | a, d | PC, PE, APC | Amidon floridéen |
| Xantophyta | a, c | - | Chrysolaminaranes |

3.3. Les polysaccharides pariétaux

La classification des grandes familles d'algues repose également sur la nature chimique des colloïdes qu'elles produisent à la périphérie de leurs cellules (Mc Candless, 1978). La paroi des cellules végétales est parfois considérée par les biologistes comme un organe à part entière. Chez les algues, leurs parois diffèrent significativement de celles des autres organismes végétaux par son organisation et sa composition.

Elle peut être interprétée comme étant généralement une structure biphasique, composée d'une phase fibrillaire cristalline squelettique et d'une phase matricielle dont les structures de

compositions variables selon les espèces, sont parmi les plus complexes connues dans la nature (McNeil et al., 1984).

4. Les Reproduction des algues

Les algues montrent toutes les formes de reproduction sexuée et asexuée observées dans le règne vivant.

Il existe deux modes de reproduction chez les algues : la reproduction asexuée (ou multiplication végétative) et la reproduction sexuée (l'union ou gamie d'un gamète male et d'un gamète femelle).

Chez certaines cyanobactéries, le mode asexué est le seul connu ; chez d'autres, il coexiste avec la reproduction sexuée, notamment chez les characées pour lesquelles ce dernier mode est prépondérant.

4.1. Reproduction asexuée

Il s'agit de tous les phénomènes aboutissant à la production de nouveaux individus sans processus de fusion des gamètes. Ce type de reproduction se fait chez les Algues selon deux types :

❖ Par le biais de divisions :

- Division cellulaire par scissiparité chez les procaryotes (cas des cyanobactéries) et par mitose chez les eucaryotes. Les cellules filles obtenues sont morphologiquement et cytologiquement identiques à la cellule mère.

- Simple fragmentation du thalle, comparable à un bouturage chez la cyanobactérie (hormogonies).

❖ Par le biais de cellules ou organes spécialisés :

- Les akinètes présents chez certaines cyanobactéries (Nostoc, cylindrospermum) et chez les chlorophycées (Oedogonium, Cladophora)

- Les bulbilles de certaines characées (cas des Nitellopsis).

- Les spores. Le contenu d'une cellule se divise, ses parois se transforment, puis après un certain temps, le sporocyste libère de nouvelles cellules en s'ouvrant.

Dans des conditions favorables, ses organes (et cellules) germent pour donner un nouvel individu (Laplace-treuture, 2014).

4.2. Reproduction sexuée

Le mode de reproduction sexuée est rencontré exclusivement chez les algues eucaryotes. La reproduction sexuée est caractérisée par la fusion de 2 gamètes (mâle et femelle) (**Laplace-treuture, 2014**).

On parle de planogamie si les gamètes sont mobiles, d'isogamie si les gamètes sont de structure identique (exemple : *Ulothrix zonata*) ou d'anisogamie dans le cas contraire (exemple : *Ulva*). Dans certaines cas, Une alternance des phases de reproduction asexuée et sexuée dans le cycle de la reproduction de l'Algue permet ainsi la pérennité des algues (**Laplace-treuture, 2014**).

5. Les grands groupes des macroalgues

Un des critères de classification des macroalgues est leur pigmentation, qui permet de définir plusieurs grandes groupes (**Woelkerling, 2004**). Chaque groupe contient des classes, et chaque classe contient des centaines d'espèces.

5.1. Les algues vertes (Chlorophycées)

Les Chlorophycées sont des algues vertes, à chloroplastes pariétaux porteurs de paranoïdes et élaborant de l'amidon. Membrane cellulosique, souvent avec couche pectiques externe. Le thalle peut être unicellulaire, filamenteux ou colonial.

Les chlorophycées comportent environ 10000 espèces. La plupart des algues vertes se développent dans les eaux douces, mais les algues marines sont nombreuses dans les Ulotrichales et les Cladophorales, et dominent dans les Siphonales. Une partie des Chlorococcales et des trentepholiales sont aérophiles (**Paul, 2006**).

Le thalle est de couleur typiquement vert en raison des chlorophylles a et b dominant dans les chloroplastes. Toutefois, l'exposition prolongée aux fortes intensités lumineuses provoque la synthèse de pigments photoprotectants (caroténoïdes), qui donne aux thalles de couleurs orangées à jaunâtres.

Les algues vertes sont peu diversifiées dans les eaux tempérées est au contraire riche en espèces et en formes dans les eaux tropicales. Les algues vertes sont présentes dans tous les systèmes aquatiques depuis les milieux marins jusqu'aux eaux douces.

5.2. Les algues brunes (Phéophycées)

Les algues brunes, aussi appelées phéophycées, de couleur brune ou olivâtre, elles sont presque exclusivement marines. La couleur brune de ces algues résulte de la dominance du pigment xanthophylle, la fucoxanthine, qui masque les autres pigments (chlorophylle a et c, ainsi que le bêta-carotène).

Elles sont pluricellulaires, à appareil végétatif souvent complexe, leurs dimensions varient depuis les éléments microscopiques jusqu'aux très grands spécimens. La grande majorité des algues brunes sont marines (**Garon-lardiere, 2004**).

Les Phéophycées montrent une grande diversité morphologique depuis les formes filamenteuses relativement simples aux grandes algues brunes dont l'organisation morphologique complexe évoque les tiges feuillées des végétaux supérieurs.

Les algues brunes se sont principalement diversifiées dans les mers froides et tempérées où elles forment les grandes forêts sous-marines. Dans les eaux tropicales, elles sont moins diversifiées, mais représentent les plus grands thalles et forment les populations les plus denses. Les cellules reproductrices sont généralement flagellées (zoïdes) à 2 flagelles inégaux, l'antérieure pourvus de barbules, plus rarement elles sont immobiles (aplanospores). L'étude des Phéophycées est particulièrement intéressante par ce qu'elle montre une variation continue et parallèle dans trois caractères : l'organisation du thalle, le type de fécondation et l'équilibre des phases du cycle (**Paul, 2006**).

5.3. Les algues rouges (Rhodophycées)

Les Rhodophytes sont des organismes pluricellulaires, macroscopiques, environ 6600 espèces d'algues rouges qui ont été décrites (**Guiry 2013**). Elles produisent un amidon floridéen comme réserve énergétique. Ce dernier, est un glucide de plus faible poids moléculaire, analogues au glycogène, qui se colore en brun et non en bleu par l'iode (**Paul, 2006**).

Les algues rouges possèdent une originalité particulière avec leurs pigments surnuméraires rouges (Phycoérythrine) et bleus (Phycocyanine) qui viennent masquer la chlorophylle a. Ces deux phycobiliprotéines qui donnent la coloration de ces algues.

De plus, dans la même espèce, la couleur des algues dépend à un degré remarquable de la longueur d'onde de la lumière qui atteint l'algue, plus souvent les individus qui se développent

en surface montrent des couleurs délavées, où dominent les jaunes orangés en raison de la forte concentration en pigments caroténoïdes photoprotectants. Cependant, les quantités de chlorophylles restent inchangées pour les algues en surface ou en profondeur ; on parle alors d'adaptation chromatique.

Les algues rouges peuvent se reproduire de façon sexuée et/ou asexuée. Elles font partie de la flore inter et subtidale et sont souvent associées et vivent fixées sur des substrats variés.

La grande majorité des algues rouges vit en milieu tempéré, mais certaines d'entre-elles ont été trouvées dans des régions froides et d'autres dans des zones tropicales (**Chopin et al. 1999a, Hurtado et al. 2013**).

L'étude des algues rouges est difficile, au grand nombre de leurs représentant répond la diversité des types d'organisation, des modes de vie et surtout des cycles de reproduction qui sont plus compliqués que dans les autres classes.

6. Intérêt économique des algues

Les algues marines ouvrent de nombreuses perspectives pour la recherche et pour de nombreux secteurs économiques. Elles sont utilisées en alimentation, la cosmétique, la santé, l'environnement et l'industrie.

6.1. Les algues dans le monde

À l'échelle mondiale, les algues constituent un enjeu majeur de développement économique. Actuellement, les algues présentent une source nutritionnelle et un produit à valeur montante. Elles sont utilisées en agriculture comme engrais et fourrage, dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (Agar, alginates, carraghénanes sont des produits extraits d'algues), dans le textile, les biocarburants de seconde et surtout de troisième génération.

La production des macro-algues représente 88 % de la production mondiale d'algues. Depuis le développement de l'algoculture et de la mariculture pour beaucoup d'espèces d'intérêt commercial, elle est devenue largement plus importante que la cueillette : 14,8 millions de tonnes produites en 2005 contre 1,3 million de tonnes collectées.

La quasi-totalité de ces cultures se fait en Asie. En 2005, les algues brunes sont les macro-algues les plus cultivées (7,8 millions de tonnes), suivies des algues rouges (4,8 millions de tonnes). Les algues vertes ne représentent alors que 13 000 tonnes. L'essentiel de la production se fait en Asie.

En 2010, La production liée à la culture augmente régulièrement, alors que la cueillette stagne. La production étant de 19 millions de tonnes pour l'algoculture et de 900 000 tonnes pour la collecte et 99% de cette production à lieu en Asie, notamment en Chine, en Indonésie, au Japon, aux Philippines et en Corée du Sud (FAO, 2012) (Figure 1).

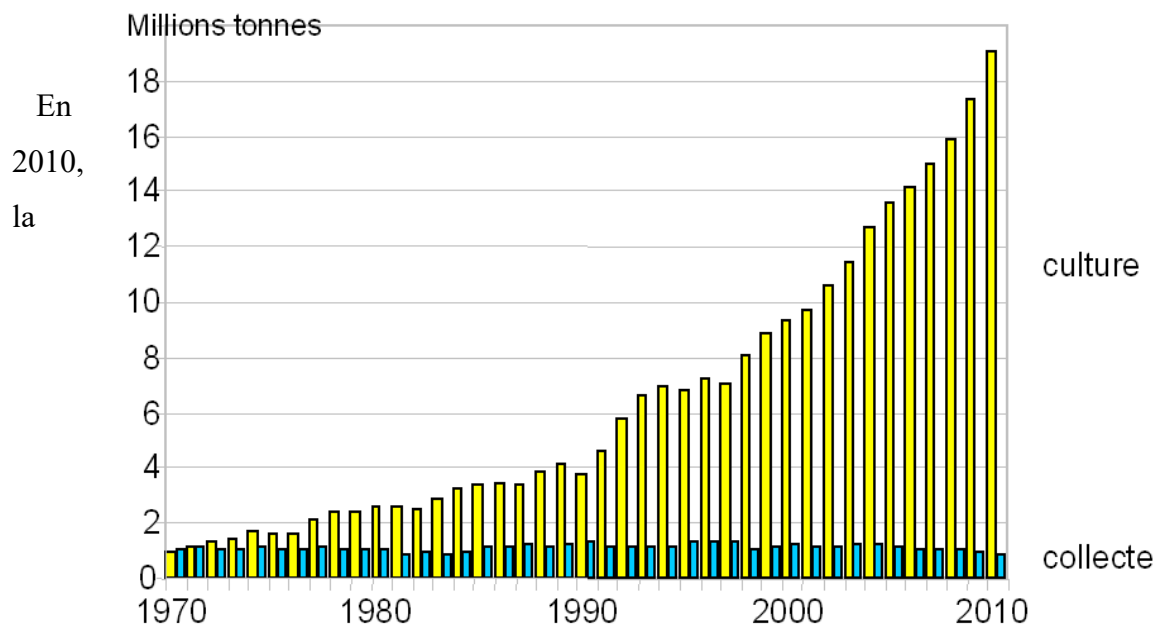


Figure 1 : Production annuelle d'algues par culture et par récolte (données Ifremer 2012).

production des algues brunes stagne à 6.7 millions de tonnes, celle des algues rouges atteint 9 millions de tonnes. La culture des algues vertes reste limitée à 22 000 tonnes. Les algues bleues apparaissent depuis 2003 pour une production proche de 100 000 tonnes. Les autres végétaux aquatiques représentent plus de 3 millions de tonnes (humides) (FAO, 2012) (Figure 2).

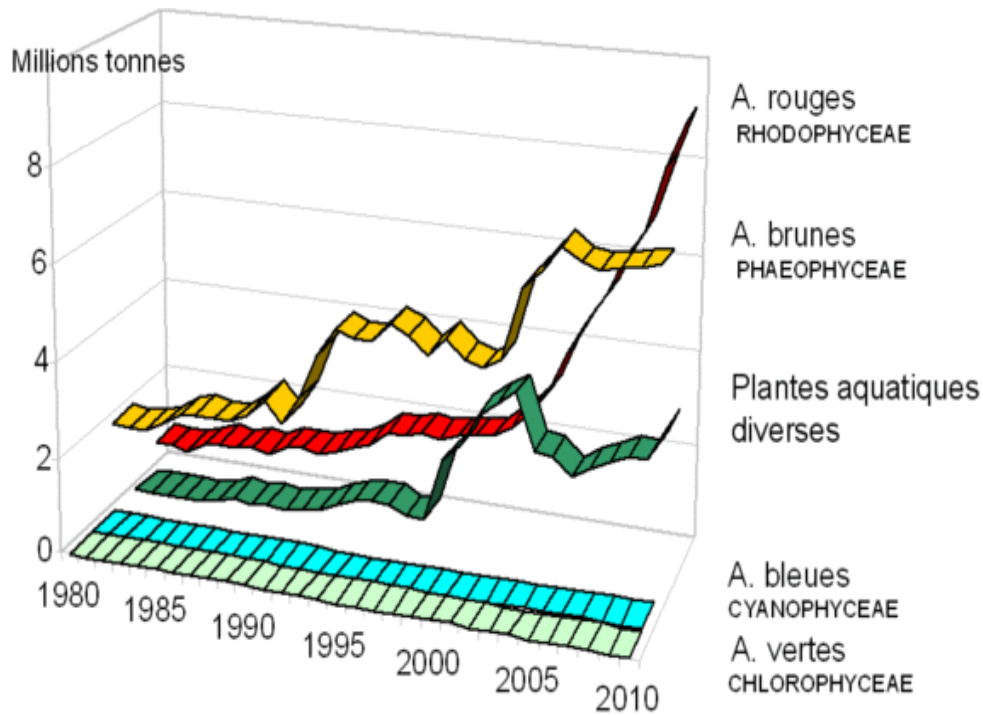


Figure 2 : Production aquacole par groupe d'algues (données Ifremer 2012).

Au niveau international, en 2012, les algues (essentiellement des macroalgues) représentaient environ 30 % du tonnage et presque 4,5 % du chiffre d'affaires généré par l'aquaculture.

En 2012, le tonnage de l'aquaculture est estimé à 90,4 millions et le chiffre d'affaires à 144,4 milliards de dollars. Durant cette même année, la production d'algues est alors estimée à 23,8 millions de tonnes et à 6,4 milliards de dollars.

En 2013, les pays asiatiques et notamment la Chine, l'Indonésie et les Philippines participaient à hauteur de 90 % de cette production (la Chine produit à elle toute seule 13,5 millions de tonnes d'algues) (Figure 3) (Bourgougnon & Stiger-Pouvreau, 2011, FAO 2014). Par rapport aux chiffres de 2004, la production mondiale d'algues a alors plus que doublé en 8 ans.

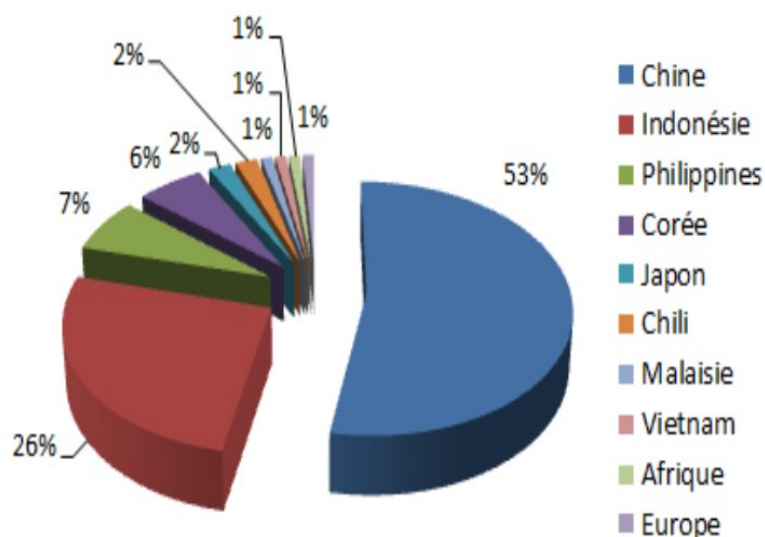


Figure 3 : Principaux pays producteurs d’algues dans le monde en 2013 (FAO, 2014).

En 2018, la production de macroalgues à l’échelle mondiale a triplé, passant de 10,6 Mt en 2000 à 32,4 Mt en 2018 à des fins alimentaires et de production de molécules d’intérêt, comme les carraghénates (**Gouletquer and Lacroix, 2022**).

6.2. Les algues au Maroc

Le Maroc, avec sa double façade Atlantique et Méditerranéenne, qui s’étale sur plus de 3500 Km, est un pays possédant une biomasse algale non exploitable et très importante par rapport à d’autres pays, notamment du Maghreb. Cependant, le secteur des algues marines au Maroc est très peu développé, il repose en grande majorité sur l’exportation de la matière brute. Les travaux portant sur l’inventaire des ressources algales sont très peu développés (**MPM, 2015**).

Au Maroc, la particularité des courants marins, les conditions hydro climatiques particulières et la salinité favorisent le développement d’une biomasse algal importante. De point de vue économique, les côtes marocaines présentent actuellement une richesse importante en biomasse d’algues avec un intérêt économique et écologique (**Riadi and Kazzaz, 1998**).

L’abondance de cette ressource a permis d’installer dès les années 50 une industrie de valorisation des algues. En effet, ce secteur emploie plus de 500 personnes à plein temps, fournit un travail saisonnier à 9000 personnes et réalise un chiffre d’affaires de près de 170 millions de MAD (**Rapport National du Ministère de l’agriculture et de la pêche maritime, 2012**).

Les algues marocaines récoltées sont destinés pour l'exploitation vue le prix élevé auquel les acheteurs étrangers les procurent 15 MAD/Kg, alors que les industries de transformation locales proposent 8 MAD pour un kilogramme.

Au Maroc, les algues rouges sont les plus exploitées à des fins industrielles. La principale espèce d'algue marine exploitée est le *Gelidium sesquipedale*. Elle représente seule 90% de la collecte au Maroc. El Jadida concentrant 80% de la production nationale de cette dernière ressource (**Faraj, 1987**).

En 2013, ces produits sont soumis au régime de licence d'exportation. Les quantités en jeu sont de 1.218 tonnes pour le *Gelidium* et le Colagar, 300 tonnes pour le *Gigartina*, 50 tonnes pour les laminaires et 805 tonnes pour l'Agar Agar. L'espèce *Gelidium sesquipedale* est connu comme l'une des meilleures sources en matières premières pour l'extraction de l'agar – agar. En outre, il existe d'autres espèces telles que : *Gigartina* qui représente 5 %, *Pterocladia* 0,5% et *Gracilaria* qui représente 0,5 % également pour l'extraction de l'agar – agar (**Rapport National du Ministère de l'agriculture et de la pêche maritime, 2012**).

Les observations de l'INRH sont très alarmantes. En effet les indicateurs font état d'une baisse considérable du stock en biomasse sur le littoral d'El Jadida, principal gisement productif. La densité quant à elle tend à diminuer actuellement de façon alarmante (**Elmtili and Essa, 2016**).

En 2020, la production du Maroc provient principalement de la récolte sauvage d'algues rouges et brunes. À titre de rappel, la production nationale des algues au Maroc est passée de 19,071 tonnes à 22.219 tonnes en 2020. En valeur, la culture des algues a généré 83,385 millions de dirhams en 2020 contre 66,131 MDH en 2015 (**Source Ministère des Pêches maritimes**).

7. Les métabolites des algues

7.1. Les métabolites primaires

7.1.1 Protéines, acides aminés, composés azotés

Les protéines sont des molécules essentielles à toutes formes de vie. Elles jouent de nombreux rôles dont ceux de transporter des ions, d'adhérer aux cellules, d'assister des réactions biochimiques cellulaires ou encore de détoxifier les cellules. De plus, face à des pathogènes ou en cas de blessure, les protéines des parois peuvent être impliquées dans la protection de l'algue (**Garon-Lardiere, 2004**).

Des études récentes ont montré le rôle fondamental des protéines dans la nutrition, la physiologie et l'écologie des algues (**Angell et al., 2016**).

Des chercheurs ont étudié la composition en acides aminés pour certaines algues. Parmi les trois principaux groupes de macro algues, ce sont les algues rouges qui possèdent le plus de protéines, à hauteur de 10 à 50 % de leur poids sec, alors que la teneur en protéine est généralement petite chez les algues brunes (5-24% matière sèche) (**Fleurence, 1999; Matanjun et al., 2009**).

Chez certaines algues comme, *Palmaria palmata* et *Porphyra tenera* (sushi), les protéines peuvent représenter respectivement jusqu'à 35 % et 47 % de la matière sèche de l'algue. Ces teneurs peuvent être comparables de point de vue quantitatif, à celles des légumineuses comme le soja (**Burtin, 2003**). Généralement, la fraction protéique la plus élevée est enregistrée chez les algues vertes et rouges (10-47% de matière sèche),

Les profils des acides aminés varient en fonction de l'espèce, mais la plupart des algues contiennent tous les acides aminés essentiels (**Mišurcová, 2011**). Pour la plupart des algues, l'acide glutamique et l'acide aspartique sont deux acides aminés présentent en grande quantité. Avec l'alanine, ces trois acides aminés sont les principaux constituants qui donnent la saveur aux algues. Les algues rouges possèdent quelques acides aminés essentiels tels que la valine, la leucine, la méthionine, l'isoleucine et la thréonine. Leurs teneurs sont proches de celles retrouvées dans le blanc d'œuf et chez le soja (**Fleurence, 1999**).

Depuis quelques années, la richesse des algues en protéines suscite l'intérêt de la recherche appliquée. En effet, de nombreuses activités pour divers domaines d'applications ont été démontrées. Ces dernières peuvent s'étendre de la nutrition, de la santé humaine et animale (**Fleurence, 1999**) des fertilisants (**Salehi et al., 2019**), jusqu'aux cosmétiques (**Ariede et al., 2017 ; Thomas and Kim, 2013**). En effet, les séquences en acides aminés ont été caractérisées chez de nombreux peptides, dont l'activité antioxydante, anticoagulante, anticancéreuse ou encore immunostimulante ont été démontré (**Samarakoon and Jeon, 2012**).

En outre, les algues possèdent des composés azotés autres que les protéines, peptides et acides aminés. L'azote non protéique est présent dans les pigments, dans les nitrates, nitrites et dans les ions ammonium, sans oublier dans chaque cellule sous forme d'acides nucléiques (**Mišurcová, 2011**).

Il existe trois types de phycobiliprotéines : l'allophycocyanine, la phycocyanine et la phycoérythrine (**Tierney et al., 2010**). Les phycobiliprotéines ont montré en plus des propriétés

antioxydantes qui sont bénéfiques pour la prévention et le traitement des maladies neurodégénératives, le cancer et les ulcères gastriques, des propriétés anti-inflammatoires et antivirales (**Holdt and Kraan, 2011**). La lectine est une autre protéine active qui peut être extraite à partir des macroalgues, elle intervient dans les communications intracellulaires (par exemple lors de réponses immunitaires, d'infections). Des études ont démontré que les lectines possèdent des activités antibactériennes, antivirales ou anti-inflammatoires (**Mansur et al., 2020**).

7.1.2. Les pigments

Les pigments sont des molécules photosynthétiques, leur rôle physiologique est primordial chez les algues, ils sont capables de capter l'énergie lumineuse nécessaire à la photosynthèse.

Les algues marines sont des sources potentielles de pigments naturels. En fonction de leur teneur en pigments, les algues marines peuvent être classées en algues brunes (Phéophycée), rouges (Rhodophycée) et vertes (Chlorophycée) (**Khan et al., 2010**). La couleur des algues est due à la présence ou absence de pigments (**Hamed et al., 2015**)

Les pigments ne fonctionnent pas seulement comme des colorants, mais leurs présences contribuent également à l'activité antioxydante des algues marines. Il a été démontré que les pigments naturels des algues marines ont une activité antioxydante potentielle, dont diverses classes de pigments comme la fucoxanthine, la phycoérythrobiline, la chlorophylle a et leurs dérivés, se sont révélées être de puissants antioxydants (**Pereira, 2018**).

Chez les algues, la couleur verte est due aux pigments chlorophylliens représentés par quatre types de chlorophylles qui diffèrent par de légères modifications structurales (**Sirbu, 2006**)

Cependant, la présence de chlorophylle est nécessaire à la photosynthèse chez toutes les algues photosynthétiques. Leur différence réside notamment dans leur structure et par conséquent dans les longueurs d'ondes absorbées. Les algues rouges possèdent principalement des chlorophylles (a et d), des caroténoïdes et des phycobiliprotéines (**Salehi et al., 2019**).

7.1.3. Lipides et dérivés

Chez les algues, la teneur en lipides est très faible et varie de 1-5% de la matière sèche (**Person, 2011**). Les algues sont riches en acides gras essentiels, particulièrement l'acide oméga 3 et oméga 6 qui présentent des niveaux significativement plus élevés et qui agissent comme des antioxydants puissants (**Holdt and Kraan, 2011**).

Les algues représentent une source précieuse d'un large éventail de lipides complexes avec différentes applications potentielles (**Silva et al., 2013**). Les composés lipidiques issus des algues sont connus par leurs rôles dans la prévention des maladies cardiovasculaires et l'arthrose (**Khotimchenko, 2003 ; Mendis et Kim, 2011**).

les lipides des algues marines sont caractérisés principalement par des acides gras saturés et monoinsaturés, mais de nombreuses algues présentent le potentiel d'accumuler des acides gras polyinsaturés (AGPI) à longue chaîne (**Khozin-Goldberg et al., 2000 ; Khozin-Goldberg et Boussiba, 2011**).

7.1.4. Minéraux

Les minéraux sont des composés inorganiques fondamentaux pour la survie des organismes vivants comme les algues. En effet, ces dernières nécessitent de l'eau, de la lumière et de la matière minérale sous forme ionique pour leurs fonctions physiologiques.

Les algues possèdent une composition minérale élevée qui varie selon le phylum et divers autres facteurs (variation saisonnière, environnementale, géographique et physiologique), La fraction minérale varie entre 8 et 40% de la matière sèche (**MacArtain et al., 2007**).

La teneur en matières minérales totales chez les trois espèces d'algues (algues brunes, vertes) est à peu près équivalente. Cependant, les algues brunes et rouges ont un contenu très élevé en matières minérales (15-36% d'algues séchées) par rapport aux algues vertes qui possèdent un contenu un peu inférieur en matières minérales (**Person, 2011**).

La matière minérale peut être classée en deux catégories : les macroéléments et les micro- ou oligo-éléments. Chez les algues, les macroéléments sont nécessaires en quantité importante, par contre les oligoéléments leur présence en petite quantité est aussi essentielle à la croissance et au fonctionnement des algues.

Les macroalgues ont une grande diversité en macroéléments tels que le sodium, le magnésium, le potassium, le calcium, le phosphore, le chlore, le soufre, mais également une grande variété d'oligoéléments. Parmi lesquels : de l'iode, du cuivre, du molybdène, du fluor du zinc, du fer, , du manganèse, du sélénium, du cuivre, du molybdène, du cobalt ainsi que bien d'autres oligo-éléments (**MacArtain et al., 2007**).

Les minéraux participent en tant que catalyseurs pour certaines étapes de la photosynthèse. Cependant, les atomes qui les composent peuvent s'incorporer dans des composés organiques vitaux (**Lobban and Harrison, 1994**).

7.1.5. Les vitamines

Les vitamines sont des macronutriments organiques endogènes qui interviennent dans de nombreuses réactions métaboliques chez l'algue, au bien chez l'homme.

Ils peuvent être de nature hydrosoluble ou liposoluble. Chez les algues, les vitamines hydrosolubles sont les vitamines C, B1, B2 et B12.

Les travaux concernant les teneurs en vitamines de différentes algues marines sont peu nombreux. **Schiewer (1970)** a mené une étude sur les proportions vitaminiques de plusieurs algues de la mer baltique, il a démontré des différences non significatives entre les trois groupes d'algues (brunes, vertes et rouges).

Cependant, des variations en vitamines chez une même espèce sont très élevées pour trois raisons :

- ❖ L'état de développement annuel,
- ❖ L'influence du lieu de prélèvement
- ❖ Variations annuelles saisonnières, maxima estival, minima hivernal.

Selon **Marfaig (2004)**, la composition vitaminique des algues est très intéressante, malgré de grandes variations saisonnières. Les principales vitamines sont :

-Vitamine B12: Les algues contiennent une proportion non négligeable en vitamine B12, contrairement aux plantes terrestres qui en sont complètement dépourvues (**Watanabe et al., 1999**). Les travaux les plus récents semblent indiquer que la vitamine B12 des algues est bien bio disponible.

L'intérêt principal des macroalgues réside dans la présence de vitamine B12 dont les teneurs sont assez importantes, contrairement aux plantes terrestres qui en sont totalement dépourvues. Certaines algues renferment autant de vitamines B12 que le foie.

-Vitamine C: La vitamine C est présente en quantités importantes dans certaines algues vertes et brunes, leur contenu en vitamine C varie entre (500 et 3000mg/Kg sec) alors que les algues rouges ont des teneurs en vitamine C de l'ordre de (100 à 800 mg/Kg sec).

-Vitamine E: Les algues brunes sont plus riches en vitamine E que les algues vertes et rouges. Chez les algues brunes, les teneurs les plus élevées sont trouvés chez les Fucales (fucus *Ascophyllum* et *Fucus spiralis*) qui contiennent entre (200 et 600 mg de tocopherols/Kg MS)

Une consommation de 100 g d'algues apporte plus que les besoins requis pour l'homme en vitamines A, B2, B12 et apportent les deux tiers des besoins en vitamine C (**Hamed et al., 2015**).

Les algues sont utilisées en nutraceutique pour des troubles digestifs ou dans des régimes alimentaires spécifiques notamment pour les végétariens en raison de leur apport en vitamine.

En plus de leur importance physiologique, les vitamines d'algues A, C et E ont montré une activité antioxydante intéressante.

Les recherches sur l'usage des vitamines d'algues en tant que molécules bioactives montrent de possibles perspectives pour le développement de nutraceutiques pour les industries alimentaires (**Matanjun et al., 2009**).

7.1.6. Régulateurs de croissance végétale – Phytohormones

Les algues sont aussi une source riche en substances stimulatrices ou hormones de croissance végétale (cytokinines, auxines, gibbérellines, acide abscissique, éthylène, bétaine et polyamines) (**Rengasamy et al., 2014; Stirk & Van Staden, 2014; Moujahid & Najim, 2004**) qui sont détectées chez les algues vertes, brunes et rouges, aussi bien que dans des extraits algaux préparés de différentes espèces de Kelp.

Les algues sont aussi riches en phytostérols (qui appartiennent aux stéroïdes) qui peuvent avoir des activités biologiques particulières (**Hamed et al., 2015**).

7.1.7. Glucides

Les hydrates de carbone ou glucides sont des molécules primordiales dans la structure et dans le fonctionnement de tout organisme vivant. Chez les algues, les glucides sont issus de la photosynthèse. Ces carbohydrates peuvent être répartis en trois familles : les carbohydrates de réserve, les carbohydrates de faible poids moléculaire et les polysaccharides pariétaux (**Andrade et al., 2013; Paul, 2014**).

Les algues sont riches en polysaccharides en particulier les phycocolloïdes (18 à 45% de la masse sèche chez les algues brunes). Les polysaccharides les plus répandus chez les algues sont les alginates, les agars, les carraghénanes, les ulvanes et les fucoidanes, qui sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique et d'autres branches de l'industrie.

Les parois cellulaires des algues marines sont riches en polysaccharides sulfatés (SP) tels que les fucoidanes dans les algues brunes, les carraghénanes dans les algues rouges et les ulvanes dans les algues vertes (**Wijesekara et al., 2011**).

Cependant, les polysaccharides présentent de nombreuses activités biologiques bénéfiques telles que les activités anticoagulantes, antivirales, antioxydantes, anticancéreuses et immunomodulatrices (**Raposo et al., 2015; Brito et al., 2016; Zhang et al., 2010**). Aujourd'hui, ils sont devenus une source importante de composés naturels bioactifs (**Raposo et al., 2015; Ngo and Kim, 2013; Wijesekara et al., 2011**).

7.2. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des composés qui sont synthétisés par les algues dans des conditions de stress pour se protéger contre les agressions biotiques et abiotiques de leur environnement. Ainsi, ces métabolites secondaires vont servir aussi en tant que vecteurs de communications chimiques, appelés économes.

Généralement, les algues en milieu aquatiques sont capables de produire une large gamme de métabolites secondaires avec une large activité biologique

7.2.1. Polyphénols

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes (**Vermerris and Nicholson, 2006**), ils constituent l'un des groupes les plus répons dans le règne végétal, avec plus de 8000 structures phénoliques connues (**Tsao, 2010**). Ils résultent de deux voies synthétiques principales: la voie shikimate et acétate (**Bravo, 1998**).

L'élément structural fondamental qui caractérise les composés phénoliques est la présence d'un cycle aromatique portant au moins un groupement hydroxyle. Le groupe hydroxyle phénolique, cependant, est influencé par la présence du noyau aromatique. À cause de ce noyau aromatique, l'hydrogène de l'hydroxyle phénolique est labile, ce qui les rend des acides phénoliques faibles. Ainsi, le phénol est la structure de base de tout le groupe.

Les phénols se trouvent comme des esters liés aux acides organiques ou de glycoside lié aux sucres (**Vermerris and Nicholson, 2006**).

Les polyphénols peuvent être divisés en plusieurs classes différentes selon leur structure chimique de base (**Bravo, 1998**). Ils peuvent s'étendre de molécules simples, comme les acides phénoliques, jusqu'aux composés hautement polymérisés, comme les tanins. On classe : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tannins hydrolysables et condensés, les phlorotannins, les stilbènes, les lignanes, les saponines et les phytostanols (Figure 4).

Ces substances chimiques sont connues par avoir plusieurs activités biologiques, y compris des propriétés antioxydantes meilleures que celles de la vitamine E (**Rice-evans et al., 1995**). des études antérieurs ont montré que des extraits d'algues brunes, rouges et vertes, en particulier leurs polyphénols ont une activité antioxydante très intéressante (**Balboa et al., 2013; Cornish and Garbary, 2010; Kang et al., 2014; Lee et al., 2010**).

Les composés phénoliques sont particulièrement réputés pour leurs vertus sur la santé. Ils présentent plusieurs actions bénéfiques telles que des activités antiprolifératives, anti-inflammatoires et antimicrobiennes (**El Wahidi et al., 2015; Moubayed et al., 2017; Oumaskour et al., 2013; Raman et al., 2014 ;Murugan and Iyer, 2014; Paul and Kundu, 2013**).

En outre, les polyphénols peuvent protéger les neurones contre le stress oxydatif, stimuler la vasodilatation et améliorer la sécrétion d'insuline (**Kang et al., 2012; Pangestuti and Kim, 2011; Sánchez-Muniz et al., 2013 ; Kang et al., 2011**).

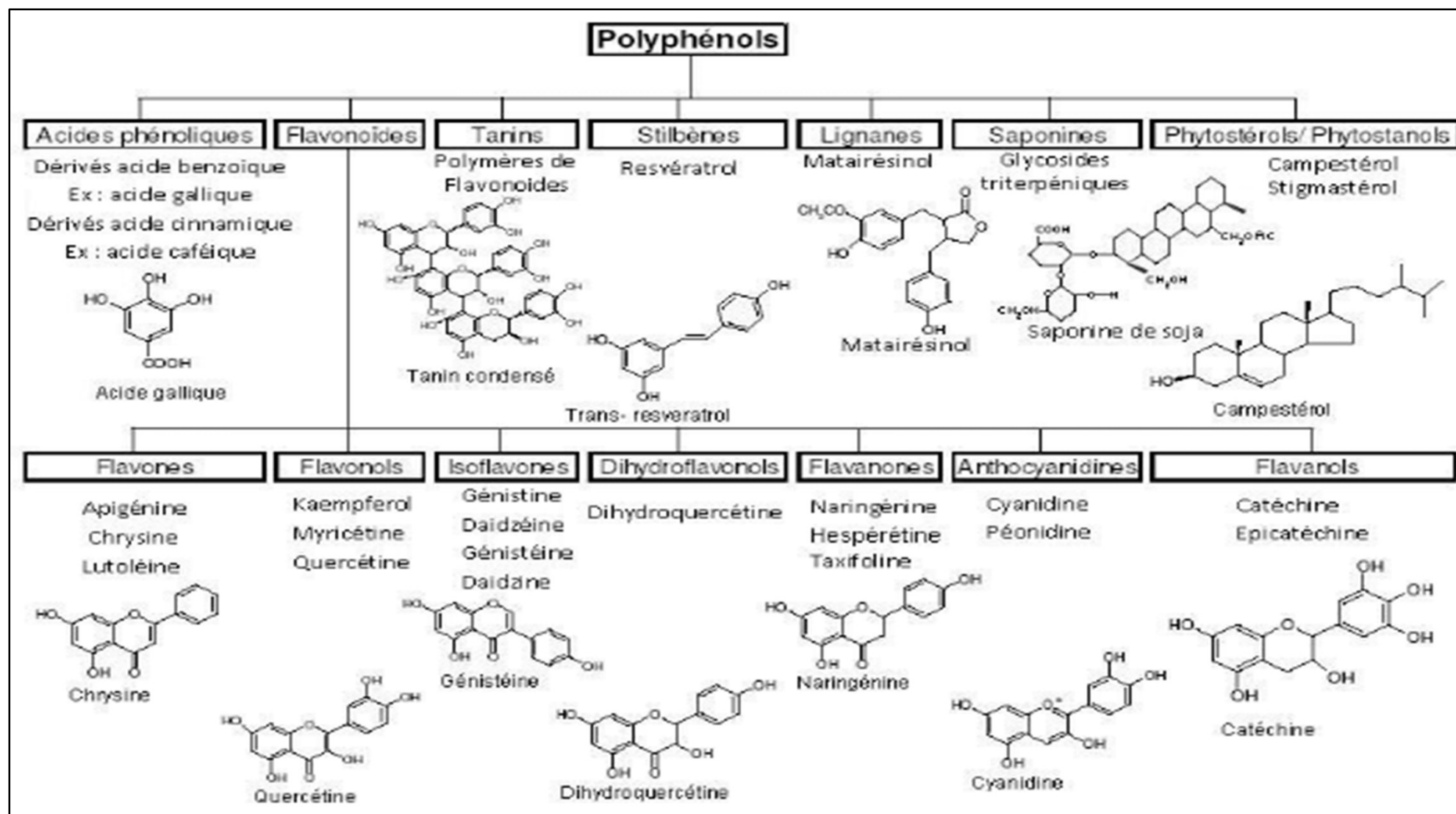


Figure 4: les différentes classes de composés phénoliques (Rezzag, 2010).

7.2.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes se sont des composés naturels qui possèdent le même élément structural de base : le noyau flavane (Figure 5).

De nos jours, plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés (**Middleton and Kandaswami, 1993**). De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti tumorale, antioxydants, antivirale, neuroprotective, antiallergique, anti-inflammatoire et antimicrobienne (**Ben Mansour et al., 2017; Demirkiran et al., 2013; Maheswari et al., 2016; Rauf et al., 2016; Xiao et al., 2011**). Egalement, les flavonoïdes jouent un rôle dans la prévention des maladies cardiovasculaires (**Maheswari et al., 2016**).

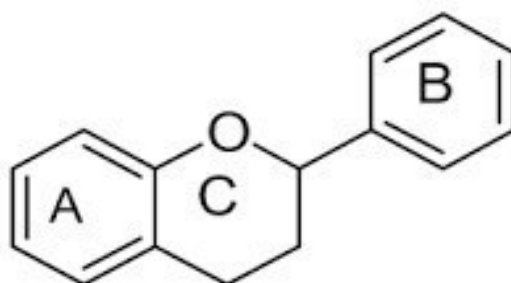


Figure 5 : la structure de noyau flavane

Des travaux ont mis en évidence l'effet des flavonoïdes sur l'inhibition des enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la cyclooxygénase et la lipooxygénase et la xanthine oxydase (**López-Posadas et al., 2010 ;Lin et al., 2002**)

Les flavonoïdes peuvent également interférer comme des piègeurs efficaces des radicaux hydroxyles et peroxydes impliqués dans la peroxydation lipidique (en particulier la quercétine), ce qui est composé phénoliques important dans la protection des membranes cellulaires contre le stress oxydatif et qui complète les systèmes enzymatiques de défense cellulaire (**Milane, 2004**).

7.2.3.Tannins

Bate-Smith et Swain (1962) définissaient les tanins végétaux comme des composés phénoliques hydrosolubles ayant un poids moléculaire compris entre (500 et 3000 Da), et qui ont à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les

alcaloïdes, la gélatine, et d'autres protéines». Même si cette définition reste valable, elle a été complétée grâce aux méthodes récentes d'analyse qui ont permis d'éclaircir la structure de ces polyphénols. Ainsi, les tannins sont désormais définis comme des polyphénols de masse moléculaire allant jusqu'à 20000 Da (**Hagerman, 2002**).

Les tannins sont des composés phénoliques naturels solubles dans l'eau, qui à l'origine sont connus par leur la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines.

Les tannins ont une capacité antioxydants importante due à leur noyau phénol. Cependant, l'efficacité des tannins hydrolysables et condensés sont 15 à 30 fois plus importantes que les phénols simples. Ils contiennent de nombreux groupements hydroxyles (sur les noyaux phénoliques), ce qui leur permet de former des complexes insolubles avec les hydrates de carbone, des ions métalliques et des protéines. Cette réaction avec les protéines est à l'origine de nombreux effets biologiques, les enzymes complexés de cette façon montrent une réduction marquée de leurs activités (**Peronny, 2005**).

Les tannins possèdent des propriétés biologiques intéressantes. Par voie externe, ils sont capables de former des complexes avec les protéines, et ils imperméabilisent les couches superficielles de la peau, et limitent la perte en fluides. Ainsi, ils ont un effet antiseptique, en font des molécules intéressantes pour la régénération des tissus en cas de blessures superficielles ou de brûlures (**Bruneton, 1999**).

Les tanins peuvent, selon leurs caractéristiques structurales, être divisés en trois classes :

7.2.3.1. Tannins hydrolysables

Les tannins hydrolysables sont définis comme des oligo ou polyesters d'un sucre, en général le glucose, et de molécules d'acide-phénol (**Bruneton, 1999**). Ils sont classés selon la nature de l'acide-phénol : l'acide gallique pour le groupe des gallotannins ou l'acide éllagique pour le groupe des éllagitannins (**Hagerman, 2002**).

Le terme tannins hydrolysables indique leur sensibilité à l'hydrolyse acide. Leur hydrolyse par action des acides, des bases ou certains enzymes libère le glucose ainsi que les acides galliques ou phénoliques liés (**Ghestem et al., 2001**).

7.2.3.2. Tannins condensés

Les tannins condensés sont connus sous le nom de proanthocyanidines (**Porter, 1989**). Ce sont des polymères de flavan-3-oles (catéchine) et de flavan-3,4-dioles (leucoanthocyanidines), ou un mélange des deux.

Ils ont une structure plus complexe, composés de chaînes de polymères comptent de 2 à 20 unités environ, et il existe de nombreux hydroxylations possibles en différents endroits de chaque monomère. Cette diversité structurale explique la variation de leurs activités biologiques (**Peronny, 2005**).

7.2.3.3. Phlorotannins

Chez les algues brunes, le seul groupe de tannins présent est représenté par les phlorotannins où ils peuvent constituer jusqu'à 15% du poids sec des algues brunes (**Rengasamy R R Kannan et al., 2013; Sathya et al., 2017; N. Y. Yoon et al., 2009; Yoon et al., 2008**). Ils sont constitués de polymères de phloroglucinol (1,3,5- trihydroxybenzene). Parmi les phlorotannins des macroalgues qui contiennent la sous-unité de phloroglucinol: eckol, dieckol, triphlorethol A, phlorofucofuroeckol et eckstolonol (**Tierney et al., 2013a**) (Figure 6).

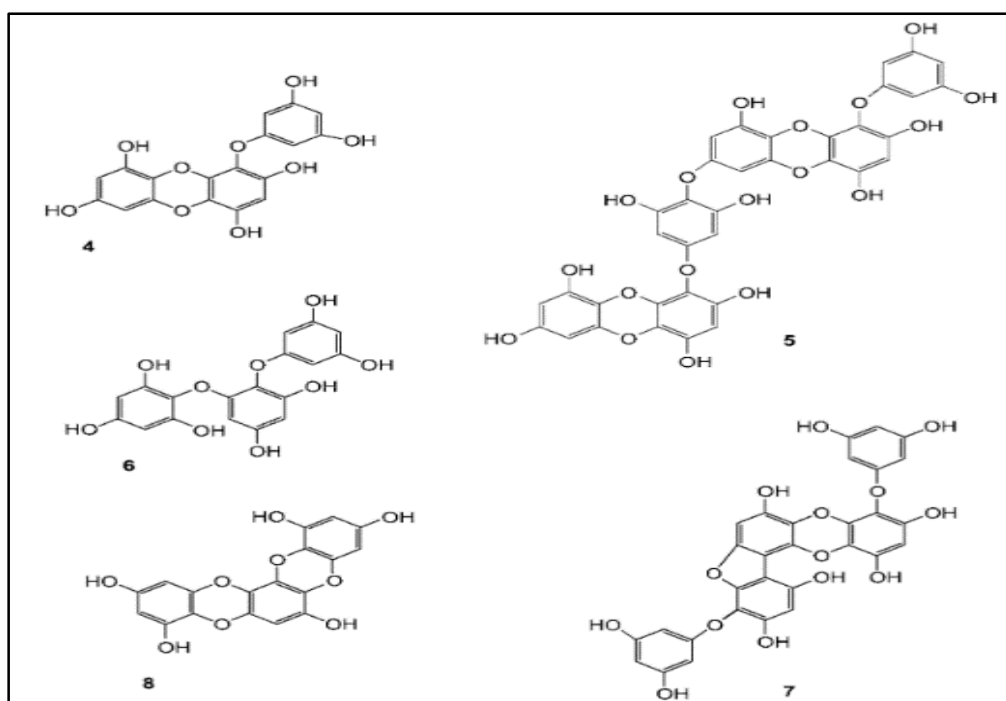


Figure 6 : Exemples de structures du phlorotannins qui contiennent du polymères de sous-unités de phloroglucinol, d'eckol (4), de dieckol (5), de triphlorethol A (6), de phlorofucofuroeckol (7) et d'eckstolonol (8).

Du fait de leur rôle d'antioxydants naturels, ces composés suscitent beaucoup d'intérêts pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives (**Li et al., 2011**).

Kim et al., (2009) ont été démontrés que les phlorotanins présents dans les algues brunes sont capables de réduire la formation des radicaux libres oxydants.

En outre, les propriétés de piégeage de divers phlorotanins contre le peroxy-nitrite (**Jung et al., 2006**) et les espèces réactives de l'oxygène (ROS)(**Kim et al., 2009; Shibata et al., 2009**) ont été récemment étudiées avec des bioactivités prometteuses observées.

Shibata et al., (2009) ont examiné le pouvoir antioxydant d'un complexe de phlorotanins bruts et de protéines de soja afin d'évaluer l'application potentielle des phlorotanins comme ingrédients alimentaires fonctionnels.

7.2.4. Mycosporine-like amino-acides (MAA) Acides aminés de type mycosporine (MAA)

Les algues ont également développé différentes stratégies de protection contre les rayons ultraviolets (UV). Elles synthétisent des composés qui agissent comme un écran solaire (mycosporine-like amino-acides). Ces composés sont de petite taille (<400 Da), hydrosolubles, et consistent en un anneau de cyclohexenone ou cyclohexenimine, conjugué à une grande variété de substitués azotés d'acides aminés, par exemple : la mycosporine-glycine(**Nakamura et al., 1982**).

Les MAA présentent une activité antioxydante et antiproliférative (**Cornish and Garbary, 2010; Yuan et al., 2005**). Le contenu en MAA chez les macroalgues varie entre les classes des algues, la profondeur et la latitude. Cependant, les espèces de rhodophycées accumulent plus de MAA que les espèces de phéophycées et de chlorophycées (**Singh et al., 2008**).

7.2.5. Caroténoïdes

Les macroalgues contiennent des caroténoïdes qui sont des pigments liposolubles composés d'unités isoprènes. Ils représentent en moyenne 0,1% du poids sec de l'algue mais certaines espèces produisent beaucoup plus dans certaines conditions environnementales (**Person, 2011**).

Les caroténoïdes sont divisés en deux classes : les carotènes et les xanthophylles. Les principaux caroténoïdes des algues rouges sont le β -carotène, la lutéine et la zéaxanthine, ainsi

que la violaxanthine et néoxanthine chez les algues vertes et principalement de la fucoxanthine chez les algues brunes (**Lordan et al., 2011**).

Des études récentes ont démontré les capacités antioxydantes des caroténoïdes extraites à partir des algues marines. Les caroténoïdes jouent un rôle important dans la prévention de plusieurs maladies dont le stress oxydatif est impliqué, mais également ils possèdent des activités antibactériennes, antivirales, antifongiques, anti-inflammatoires et antitumorales (**Murray et al., 2013**).

La fucoxanthine, xanthophylles (violaxanthine) et β -carotène se sont des caroténoïdes couramment distribués chez les algues brunes. La fucoxanthine est un puissant antioxydant qui peut être utilisé comme un excellent anti-inflammatoire, antiprolifératif contre les cellules cancéreuses, et anti-obésité par son effet angiogénique (Figure 7) (**Heo et al., 2010 ; Mikami and Hosokawa, 2013**).

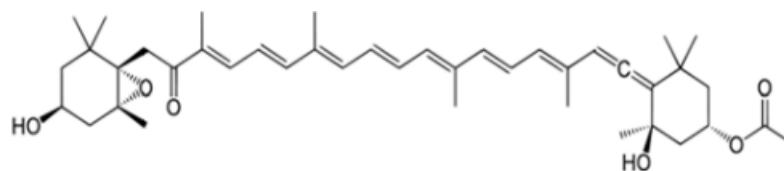


Figure 7 : Structure moléculaire de la fucoxanthine (**Mikami & Hosokawa, 2013**).

7.2.6. Terpénoïdes

Les diterpènes sont des métabolites secondaires produites par les algues et les plantes terrestres, se sont composés halogénés non volatils, avec différentes structures carbonées : dolabellanes, hydroazulenoides, xenicanes et sesquiterpenoides (**Gupta and Abu-Ghannam, 2011**).

Les terpénoïdes sont constitués d'unités isoprénoïdes (C₅). Ils sont classés en plusieurs catégories : monoterpènes, diterpènes, triterpènes, sesquiterpènes et tetraterpènes

Les algues brunes produisent des terpénoïdes et des acétogénines (**Harper et al., 2001**). Également, les algues rouges produisent un nombre impressionnant de composés halogénés. Chez les algues vertes, principalement les espèces de Bryopsidales produisent des composés sesquiterpenoides et diterpénoïdes (**Blunt et al., 2011**).

La grande diversité des structures des terpénoïdes et leurs fonctions ont suscité une grande importance commerciale. Ils sont utilisés dans divers produits industriels tel que les agents

aromatisants, des insecticides et des agents antimicrobiens. Ils entrent également dans la composition des produits pharmaceutiques et cosmétiques.

Les algues rouges sont connues par leur production d'une variété des terpénoïdes chloré et bromé. Ces terpénoïdes halogénés ont montré une activité antifongique forte contre *Penicillium oxalicum*, une activité antibactérienne contre *Micrococcus luteus* et une activité antitumorale (Tringali, 1997).

8. Applications des algues marines

Les algues marines ouvrent de nombreuses perspectives pour la recherche et pour de nombreux secteurs économiques. Elles sont utilisées en alimentation, la cosmétique, la santé, les biocarburants de seconde et surtout de troisième génération, l'environnement et l'industrie :

Les derniers chiffres 2014 de l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) montrent que l'algoculture englobe plus de 95% des algues produites, dont la majorité se situe en Asie (Figure 8).

L'utilisation des macroalgues est variée, et la demande en constante évolution Agroalimentaire en tant que texturants, légumes pour l'alimentation humaine, chimie, cosmétique, traitement des eaux, engrais ou aliments pour bétail. Dans le monde, 58% de la production sert de texturants. Pour la production de biocarburants, toute une chaîne technologique est à mettre en place. Les coûts de production restent trop élevés.

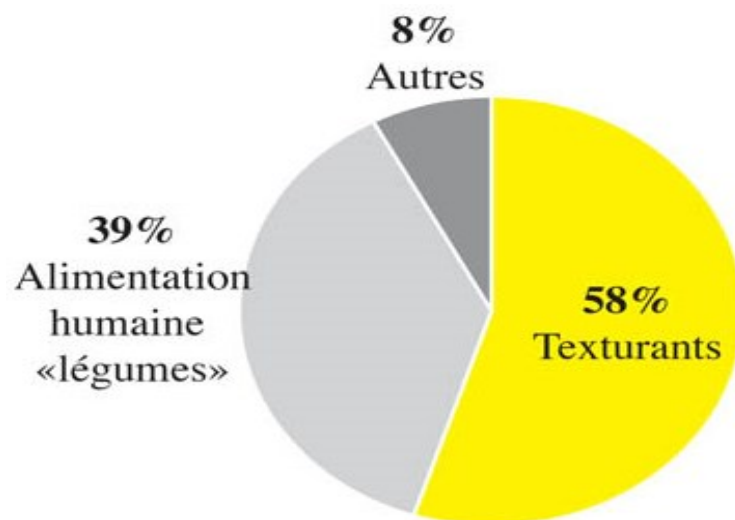


Figure 8: l'usage des algues (FAO, 2014)

8.1. L'utilisation dans l'alimentation humaine

Les algues ont été d'abord utilisées depuis très longtemps par l'Homme pour son alimentation dans les pays occidentaux et en Extrême-Orient.

Des espèces d'algues sont utilisées dans le secteur de l'alimentation humaine comme le cas des algues microscopiques : Spiruline, Diatomée et Chlorelle en raison de ses valeurs nutritionnelles très élevées en acides aminés et protéines (**Person, 2011**).

D'autres algues sont utilisées comme source de produits nutraceutiques, comme des ingrédients actifs présents à l'état naturel dans un aliment qui procurent un effet bénéfique pour la santé. C'est le cas par exemple des acides aminés, des acides gras polyinsaturés comme le DHA (acide docosahexaénoïque ou l'oméga-3) (**Domínguez, 2013**).

Les phycocolloïdes des algues rouges sont utilisés aussi bien dans le domaine agroalimentaire que dans le domaine médical et industriel. Ces polysaccharides possèdent des propriétés (gélifiants, épaississants, stabilisants) utilisées dans divers produits, comme les crèmes, les flans, les soupes et les charcuteries (**Person, 2011**).

8.2. L'utilisation dans l'alimentation animale

Traditionnellement, dans de nombreuses régions côtières notamment en Europe du Nord, les animaux de fermes ont été habitués à se nourrir des algues. Actuellement, plusieurs compagnies produisent des aliments pour bétail incluant des farines d'algues, le plus souvent brunes comme le *Fucus*, l'*Ascophyllum* et la *Laminaria*, ce qui permet un apport d'oligo éléments entraînant une meilleure production laitière et une laine ovine de bonne qualité (**Chopin et Whalen, 1993** ;)

8.3. L'utilisation des algues dans la Santé et bien-être

Les algues marines sont largement impliquées dans le domaine de la santé et de bien-être. Selon les espèces considérées, les algues contiennent des immunostimulants, des agents antiviraux et antibactériens, des agents anticancéreux ou antiproliférateurs, des agents anticoagulants et anti-inflammatoires (**Bitencourt et al., 2015; Gómez-Ordóñez et al., 2014; Sithranga Boopathy and Kathiresan, 2013**), ainsi que des antioxydants puissants et des agents antinociceptifs (**Rauf et al., 2016; Foo et al., 2017**).

Les algues possèdent des vertus intéressantes pour les soins de la peau. Elles sont douées d'une action revitalisante et amincissante. Les effets hydratants et stimulants des extraits d'algues ont été démontrés par des études cliniques (**Le Lann et al., 2016; Wang et al., 2015**).

8.4. L'utilisation des algues dans l'environnement

Les macroalgues jouent un rôle écologique considérable dans l'épuration des eaux usées, les algues ont un rôle important dans de nombreux domaines comme le captage du carbone, ou la dépollution. Les polysaccharides sulfatés (Ulvanes) extraits à partir des Ulves, présentent des potentialités d'applications dans la dépollution de l'air (**Robic, 2008**).

8.5. L'utilisation des algues dans l'énergie

Les végétaux possèdent la capacité de produire des carburants aux propriétés analogues à celles du pétrole ou de l'éthanol. Dans un premier temps, la recherche des alternatives au pétrole s'est orientée vers la production de biocarburants (hydrogène, bioéthanol, biodiesel et biométhane) à partir des espèces consommées par l'homme comme le colza, le tournesol ou le maïs.

Dans un second temps, un intérêt particulier a été consacré aux micro et macroalgues pour la production de biocarburants (**Hankamer et al., 2007**).

Actuellement, une industrie de production de biocarburants de seconde et surtout de troisième génération se développe à partir de la lignocellulose (**Didderan et al., 2008**). Cet intérêt est basé sur la capacité remarquable des algues à produire une biomasse plus importante que les plantes de l'agriculture conventionnelle.

Chapitre 2 : Stress oxydatif et les antioxydants

I. Généralités sur le stress oxydant et ses marqueurs

1. Introduction

L'oxygène, apparu voici trois milliards d'années dans l'atmosphère terrestre est un gaz indispensable à la vie. Au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale l'oxygène est transformé en molécules d'eau. Au cours de cette réaction 38 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) à haut potentiel énergétique (contre 2 seulement dans un processus anaérobie) sont produites.

Cette réaction de réduction implique quatre électrons et est rendue possible grâce à un système complexe de protéines et d'enzymes (cytochromes) localisées au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Cette réaction apporte à la cellule toute l'énergie nécessaire sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) pour assurer ses fonctions vitales. Ce processus mitochondrial n'est toutefois pas parfait, car 2 à 3 % de l'oxygène sont transformés en espèces réactives oxygénées (ERO).

Dans les circonstances quotidiennes normales, ces ERO sont produites en faible quantité comme des médiateurs tissulaires ou des résidus des réactions énergétiques ou de défense et cela, sous le contrôle de systèmes de défense adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents (**Favier, 2003**).

Dans ces conditions, on dit que la balance pro-oxydants/anti-oxydants est en équilibre. Cette dernière peut être rompue pour diverses raisons en faveur du système pro-oxydant et est alors à l'origine d'un stress oxydant.

2. Les Radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques atomiques ou moléculaires instables, possédant un ou plusieurs (s) électron (s) célibataire (s) sur leur couche périphérique, ce qui leur confère un fort degré de réactivité (**Halliwell et Gutteridge, 1999**). Ils peuvent être dérivés de l'oxygène (ERO) ou d'autres atomes comme l'azote (ERN).

La présence d'un électron célibataire confère aux radicaux libres une grande réactivité (demi-vie courte) et ils peuvent être aussi bien des espèces oxydantes que réductrices. L'instabilité rend difficile leur mise en évidence au niveau des différents milieux biologiques ; leurs

constantes de vitesse réactionnelles variables selon leurs natures, sont très élevées et peuvent aller de 10^5 à 10^{10} mol⁻¹.L.s⁻¹ (Bonnefont-Rousselot et coll., 2003).

3. Les principales espèces réactives oxygénées dans la cellule

Les espèces réactives sont relativement instables et ont de fait une durée de vie généralement très courte : leur demi-vie est de 10^{-9} à 10^{-6} sec pour les plus instables, jusqu'à quelques dizaines de secondes pour $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 (Tessier and Marconnet, 1995).

Il existe des ERO qui dite « primaires », qui jouent un rôle particulier en physiologie, et de celles dites "secondaires" qui dérivent des premières par réaction avec des composés biochimiques de la cellule (Yoshikawa et al., 2000).

Les EOR sont capables à produire des réactions en chaîne ; en effet chaque espèce pourra générer à son tour une nouvelle espèce (Figure 9). Dans la cellule, ils existent des espèces radicalaires et des espèces non radicalaires.

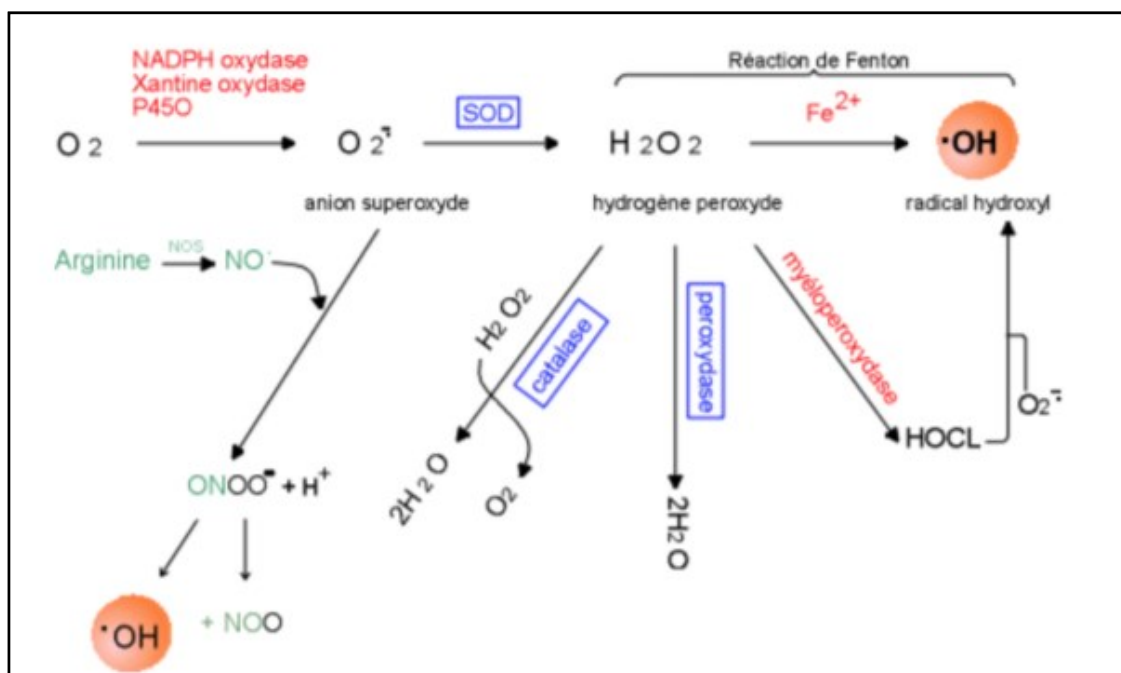
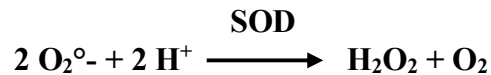


Figure 9 : Schéma voies biochimiques impliquées dans la production et le métabolisme de radicaux libres de l'oxygène (Favier, 2003).

3.1. EOR radicalaires

3.1.1. L'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$

C'est l'une des premières EOR à être formées, par réduction d'une molécule d' O_2 . Sa demi-vie longue, comparée aux autres EOR est contrebalancée par le fait que les membranes biologiques lui sont relativement imperméables ; il reste ainsi moyennement dangereux. Il peut conduire à la formation du peroxyde d'hydrogène par la réaction suivante :



Cette réaction peut être bénéfique ou délétère pour l'organisme :

- bénéfique, car le radical superoxyde qui est une espèce moins oxydante se transforme au peroxyde d'hydrogène
- délétère, car le peroxyde d'hydrogène formé peut être à l'origine d'autres EOR, par la réaction de Fenton.

3.1.2. Le radical hydroxyl HO°

C'est l'EOR la plus destructrice pour la cellule et ses composants. Il possède une grande réactivité liée à un potentiel oxydant très élevé. Malgré une durée de vie très courte et l'impossibilité pour lui de franchir les membranes, il est à l'origine de la formation des radicaux peroxy (**Powers and Jackson 2008**).

Il peut réagir avec la plupart des molécules organiques et inorganiques dans la cellule, y compris l'ADN, les protéines, les lipides, les acides aminés, les sucres et les métaux (**Gardès-Albert et al., 2003**).

3.1.3. L'oxyde nitrique NO

C'est un gaz qui ainsi diffuse à travers les membranes. Il est synthétisé par l'oxyde nitrique synthase NOS à partir d' O_2 et d'un acide aminé, la L-arginine. **Mandelker, 2008**, mentionne qu'il n'est vraiment délétère pour la cellule que lorsqu'il est présent en quantité importante et qu'il génère ainsi une autre EOR : le peroxyde nitrite NO_3^- .

3.1.4. Les radicaux peroxy ROO°

C'est un radical très réactif avec la plupart des molécules, il est impliqué notamment dans la propagation de l'oxydation des acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires (**Powers and Jackson 2008**).

3.2. EOR non radicalaires

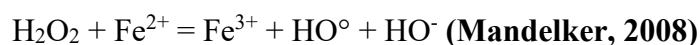
3.2.1. L'oxygène singulet $^1\text{O}_2$

Il correspond à la forme très réactive de l'oxygène O_2 , son état excité lui confère un potentiel oxydant supérieur à celui de l'oxygène. Cependant, il n'apparaît que dans des cas particuliers comme pendant les processus de photosensibilisation où une molécule excitée transfère son énergie à l'oxygène et l'active en oxygène singulet.

À l'état excité qui peut réagir avec différents accepteurs d'électrons pour produire des peroxydes. Il a pour cible biologique les membranes, les acides nucléiques et les protéines (**Halliwell and Gutteridge 2007**).

3.2.2. Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2

Le peroxyde d'hydrogène est une molécule stable avec tous ses électrons appariés. Il possède une demi-vie longue et diffuse rapidement à travers les membranes cellulaires. Il est peu dangereux en soi pour la cellule, mais en présence des cations métalliques comme Fe^{2+} ou Cu^+ , le peroxyde d'hydrogène peut se décomposer en HO° et HO^- par la réaction de Fenton :



Le H_2O_2 et $\text{O}_2^{\circ-}$ donnent aussi naissance au radical hydroxyle via une réaction dite de Haber et Weiss (**Gardès-albert et al., 2003**).

3.2.3. Le peroxydinitrite NO_3^-

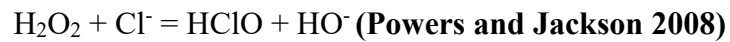
Son apparition est extrêmement rapide au cours du processus oxydant, et se produit par une réaction entre le monoxyde d'azote et l'anion superoxyde :



Le peroxydinitrite cause beaucoup de dommages aux composants cellulaires. Ainsi, il peut à son tour générer des composés toxiques tels que le dioxyde d'azote.

3.2.4. L'acide hypochloreux

C'est un très fort oxydant qui agit comme agent bactéricide dans les cellules phagocytaires. Ainsi, il peut passer facilement à travers les membranes biologiques, et altérer les constituants protéiques de la cellule à cause de son fort pouvoir oxydant. Il est formé à partir du peroxyde d'hydrogène par la réaction suivante :



4. Source des espèces réactives de l'oxygène

L'organisme est exposé à une grande variété d'ERO et d'ERN, dont peuvent être d'origines exogènes ou endogènes et l'on peut identifier plusieurs sources **(Finkel and Holbrook, 2000)**.

4.1. Sources exogènes

Les facteurs exogènes sont capables de générer des radicaux libres dans l'organisme, ils sont surtout d'origine physique et chimique tels que :

les champs électromagnétiques, les rayonnements X ou gamma, et les rayons ultraviolets du soleil (315-400 nm) **(Favier, 2006; Valko et al., 2007)**. Les ERO peuvent se former à partir de la radiolyse de l'eau et à partir des réactions photochimiques **(Favier, 2006)**.

Des divers métaux toxiques issus de l'alimentation tels que le cuivre et le fer, peuvent causer au promouvoir la formation des radicaux libres **(Finkel and Holbrook, 2000)**.

Certains médicaments comme des antibiotiques anticancéreux tels que l'anthracyclines, sont également capables de générer des radicaux libres **(Valko et al., 2007)**.

4.2. Sources endogènes

Les ERO et ERN, pourtant réactifs et toxiques, sont produits par divers mécanismes physiologiques afin de détruire les bactéries et réguler des fonctions cellulaires létales **(Favier, 2003)**.

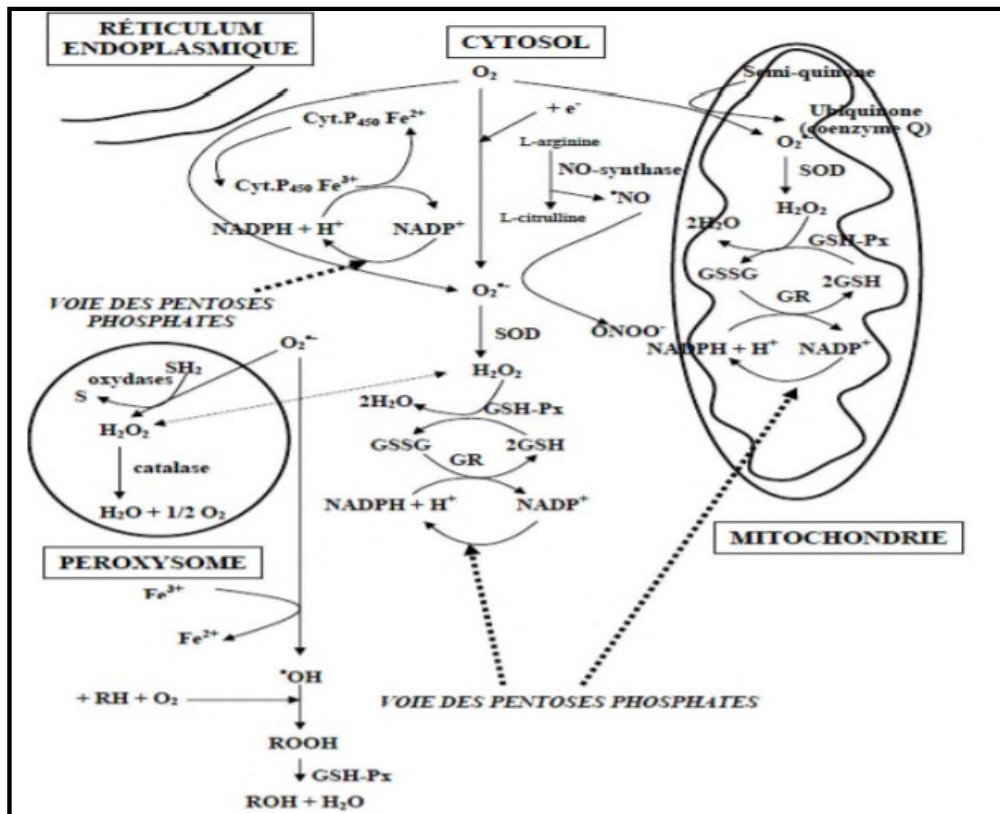


Figure 10 : Principales sources cellulaires des radicaux libres (**Bonnefond-Rousselot et al., 2003**). RH : acide gras polyinsaturé, ROOH : hydroperoxyde lipidique, SH₂ : substrat réducteur, S : substrat oxydé, SOD : superoxyde dismutase, GSH-Px : glutathion peroxydase, GR : glutathion réductase, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé

❖ Mitochondrie

La principale source des ERO est la mitochondrie par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire, s'accompagne d'une production non réductible des radicaux libres. Elle produirait en effet 90% des ERO cellulaires (**Housset, 1990**).

Les électrons dérivés du NADH et du FADH de la chaîne respiratoire mitochondriale peuvent directement réagir avec l'oxygène ou d'autres accepteurs d'électrons pour générer les radicaux libres, donc la respiration cellulaire sera l'origine de lésions mitochondriales due aux radicaux qui limiteraient dans le temps la survie de la cellule (Figure 10) (**Cadenas and Davies, 2000**).

❖ Peroxysomes

Les peroxysomes sont une importante source de production de H₂O₂ cellulaire. Ce dernier apparait suite à la présence de nombreuses enzymes qui génèrent le peroxyde pour être utilisé

comme substrat par la catalase peroxysomiale afin de réaliser des réactions de peroxydation avec d'autres substrats (**Schisler and Singh, 1989**).

❖ **Réticulum cytoplasmique**

Le réticulum cytoplasmique renferme des enzymes qui catalysent des réactions pour détoxifier les drogues liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques (**Schisler and Singh, 1989**). La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques, produisant ainsi des radicaux libres (**Morel et al., 1999**). De manière générale, toute réaction biochimique faisant intervenir de l'oxygène moléculaire est susceptible d'être à l'origine d'une production d'ERO.

5. Les cibles spécifiques du stress oxydant

5.1. Effet du stress oxydant sur les protéines

Les protéines sont des constituants cellulaires structurels et fonctionnels, essentiels, qui peuvent être comme un cible des ROS. Les acides aminés des acides aminés soufrés et acides aminés aromatiques, peuvent subir une oxydation qui entraîne des modifications structurales des protéines, facilitant de ce fait leur agrégation ou leur digestion par les protéases (**Squier, 2001**).

L'oxydation des acides aminés soufrés entraîne une perte des groupements thiol (**Davis et al., 2001**). Les protéines oxydées concernent aussi les enzymes antioxydants qui contiennent des groupements thiols (SH). Les membranes cellulaires sont également menacées par l'oxydation des protéines du fait de la modification du caractère antigénique et des propriétés fonctionnelles des protéines membranaires (**Jacob et al., 2006**). Les protéines oxydées peuvent entraîner une perte des propriétés biologiques, ainsi elles deviennent très hydrophobes et très sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome (Figure 11).

Les marqueurs de l'oxydation des protéines sont les aldéhydes, les composés cétonique et carbonyles qui peuvent à la fois endommager l'ADN aussi être considéré comme des marqueurs d'oxydation des protéines, mais le marqueur le plus connue dans l'endommagement des protéines sont les carbonyles qui sont également très utilisés comme marqueurs des dommages liés au stress oxydant (**Stadtman, 1993**). L'accumulation de protéines oxydées est également considérée comme jouant un rôle important dans le vieillissement cellulaire (**Dean et al., 1993**).

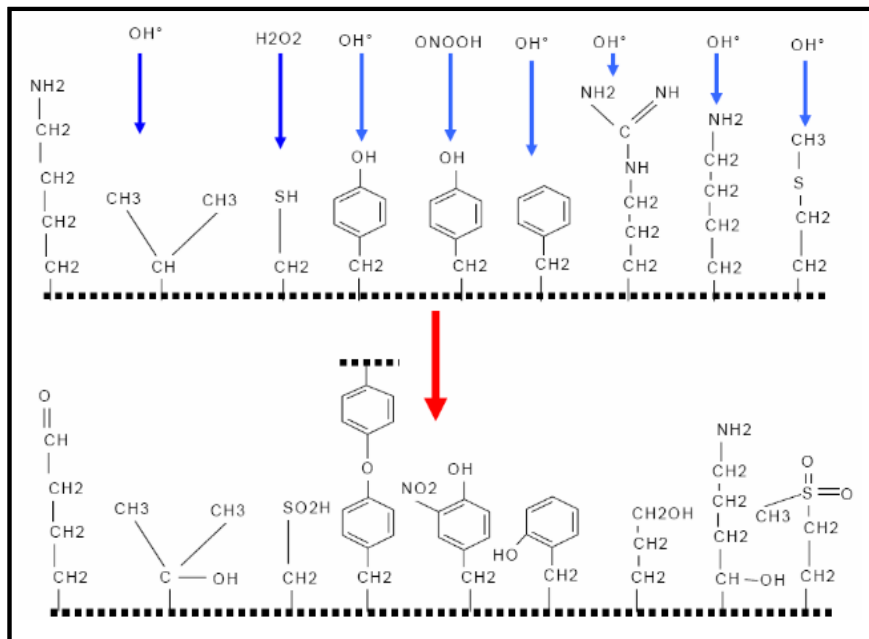


Figure 11: Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).

5.2. Effet du stress oxydant sur les lipides

Les acides gras polyinsaturés (RH) comme l'acide linoléique ou arachidonique sont les cibles privilégiées des EOA et plus particulièrement des radicaux libres (Pincemail, 1999).

La chaîne de peroxydation lipidique initiée principalement par HO° affecte l'intégrité de la membrane, sa fluidité, sa perméabilité et peut entraîner sa rupture.

Ainsi, l'attaque des lipides circulants aboutissant à la formation de LDL (lipoprotéines de densité légère) oxydées qui sont captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires (Favier, 2003).

La réaction de la chaîne de peroxydation lipidique implique trois étapes générales : initiation, propagation et terminaison (Figure 12) (Halliwell and Gutteridge 1999).

Initiation : Cette étape se caractérise par une génération des premiers radicaux alkyle (R°) à partir des acides gras insaturés (RH)

L'initiation est favorisée par une élévation de température, peut être produite par des radiations ionisantes, des générateurs chimiques, des systèmes enzymatiques ou chimiques produisant des espèces activées de l'oxygène, ou de traces métalliques (Favier, 2006; Valko et al., 2007)

Propagation : Au cours de cette étape le radical alkyle précédemment formé réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxy (ROO^\bullet). Ce radical est suffisamment réactif pour arracher un atome d'hydrogène à autre acide gras et forme des hydroperoxydes (Atkin et al., 2005).

Terminaison : c'est la dernière étape, Les radicaux formés réagissent entre eux pour conduire à un produit qui n'est pas un radical libre mettant ainsi fin aux cycles réactionnels.

Le malonedialdéhyde (MDA) et 4- hydroxy-2-nonenal (4-HNE) sont les principaux produits de l'oxydation des lipides (Valko et al., 2007). Le dosage de MDA est souvent utilisé pour déterminer des dommages causés par les ERO lors d'un stress oxydant (Ohkawa et al., 1979). La peroxydation lipidique dans les mitochondries entraîne des dysfonctionnements de la production d'ATP mais peut également induire l'apoptose (Halliwell and Gutteridge 1999).

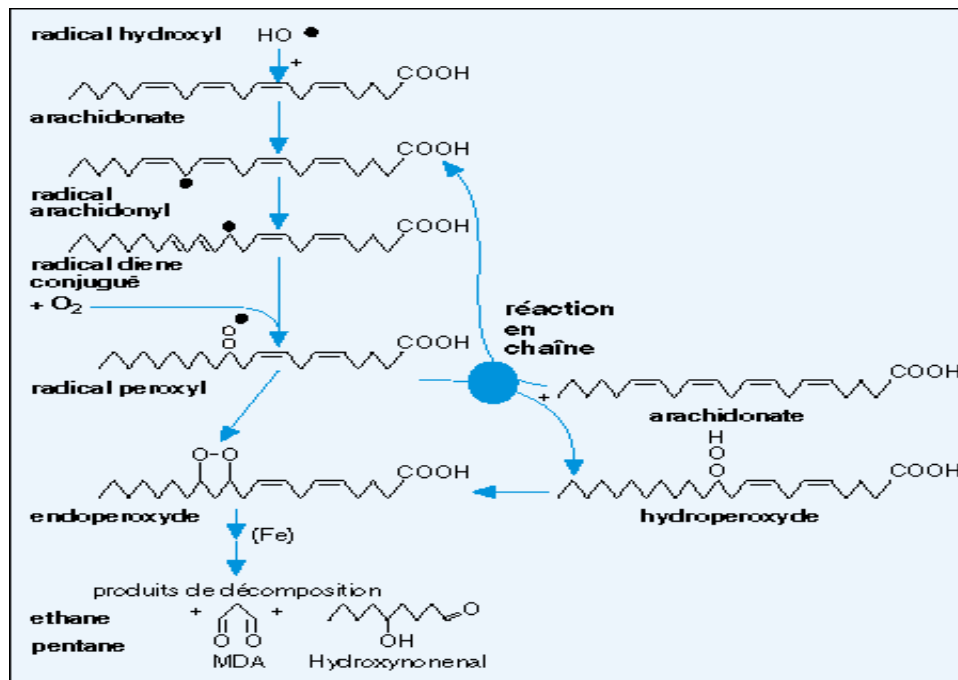


Figure 12 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (Favier, 1997).

5.3. Effet du stress oxydant sur l'ADN

Les acides ribo et désoxyribonucléiques (ARN et ADN) constituent des cibles cellulaires importantes pour les attaques radicalaires (Halliwell and Gutteridge, 1990). Ces attaques sont essentiellement causées par le radical hydroxyle HO^\bullet . La plupart des dommages incluent les cassures au niveau de la simple et double hélice, ainsi l'addition des bases et des groupes de

sucres et des dommages à la réparation du système de l'ADN (Figure 13) (Beckman And Ames, 1998).

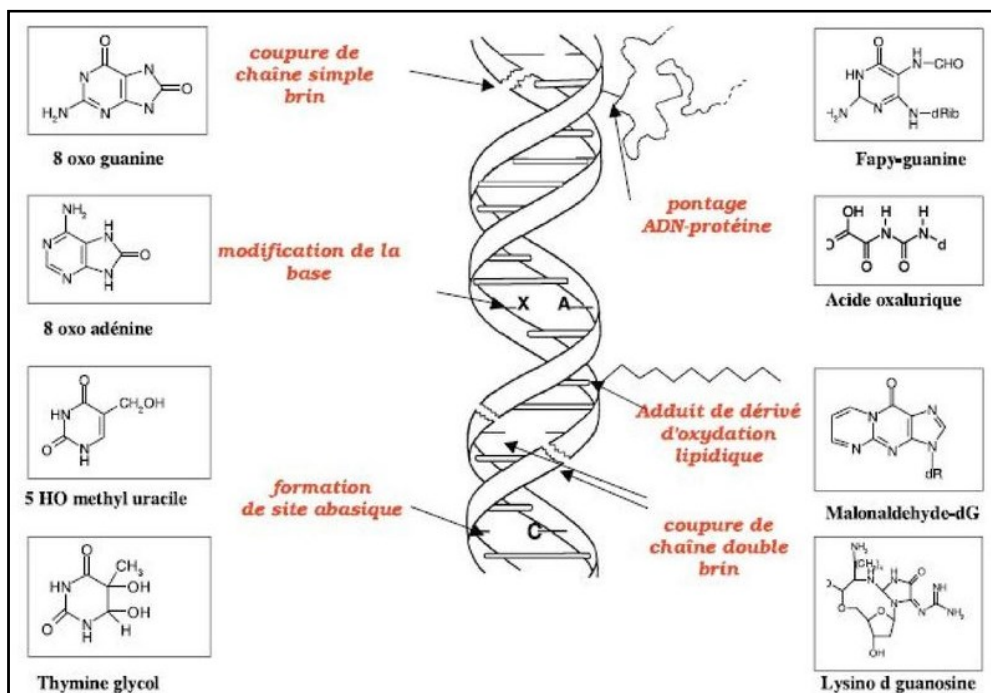


Figure 13 : Lésions de l'ADN

La thymine et la guanine sont plus susceptibles aux modifications suivies de la cytosine et l'adénine. La thymine glycol est le produit d'oxydation majeur, et sa présence dans l'urine sert d'indicateur du dommage de l'ADN. Le radical hydroxyle interagit également avec l'adénine pour donner comme produit l'hydroxyadénine.

Le radical OH agit au niveau de la guanine dans la position C-8 et forme la 8-hydroxy-2' déoxyguanosine (8-OHdG), un produit majeur dont la présence dans l'urine sert de biomarqueur du dommage oxydatif de l'ADN et qui est capable d'induire des mutations spécifiques conduisant au développement du cancer (Pincemail et al., 1999).

Cependant, il existe d'autres types d'oxydation avec l'ADN et les ERO comme O_2° et H_2O_2 , qui ne cause pas de dégât à concentration physiologique, mais peuvent avoir un effet néfaste comme des sources intermédiaire d'ERO (Beckman and Ames, 1998).

5.4. Oxydation des glucides

Les ERO attaquent les glucides et notamment le glucose qui peut s'oxyder en présence des ions métalliques conduisant à la libération des acétaldéhydes, H_2O_2 et OH° qui peuvent entraîner

la coupure des protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde. Ce phénomène de glycooxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (**Favier, 2003**).

6. Stress oxydant et maladies

Le stress oxydative est un déséquilibre de la balance antioxydants/pro-oxydants, ce déséquilibre est due soit suite à une surproduction endogène d'ERO, ou suite à l'exposition a un phénomène toxique endogène ou même à un déficit nutritionnel d'une substance antioxydants (**Browne et al., 2008; Powers et al., 2010**). La grande quantité formée des ERO deviennent «pathologiques» avec activation de l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires ou des protéines d'adhésion.

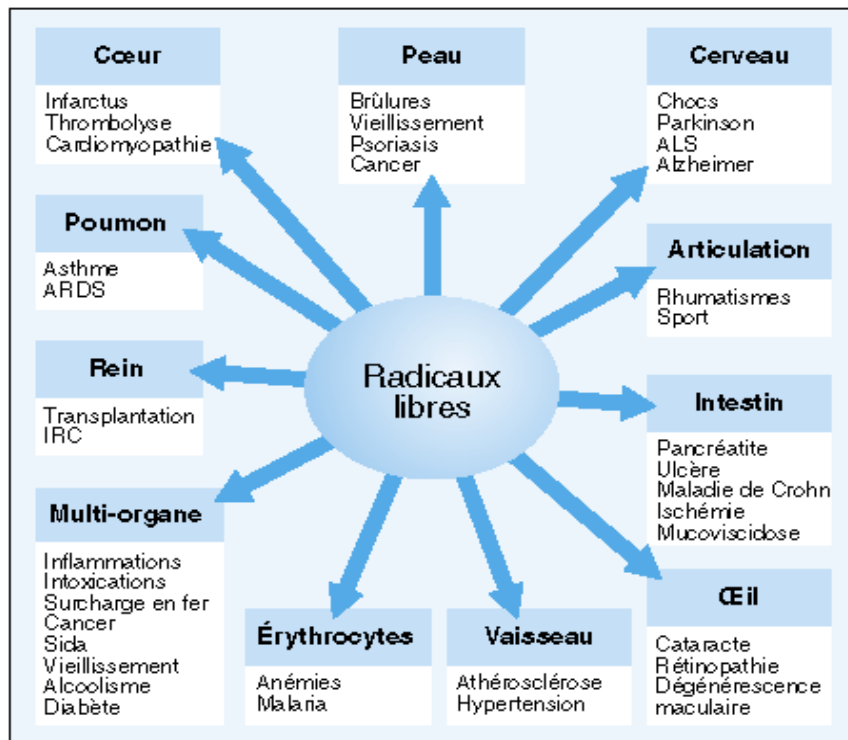


Figure 14: Exemples d'affections rencontrées chez l'homme causées par les EOR, classées par organe cible (**Favier, 1997**)

Cependant, la nature instable des ERO permet de les rendre très réactifs vis-à-vis des molécules biologiques et capables d'induire des modifications oxydatives délétères potentiellement impliquées dans l'apparition de plusieurs pathologies (Figure 14) (**Haleng et al., 2007**).

Plusieurs études, épidémiologiques, indiquent que les ERO jouent un rôle majeur dans le développement de plusieurs pathologies humaines (**Pincemail et al., 2002 ; Favier, 2003**). Ils

sont impliqués dans des maladies comme l'athérosclérose, des dommages de la rétine, les maladies inflammatoires, l'arthrite, les maladies neurodégénératives (**Cochrane, 1991**). Ainsi, le rôle du stress oxydant est évoqué dans des processus physiologiques tel que le vieillissement (**Valko et al., 2007**). Néanmoins, la majorité des pathologies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale des radicaux (**Favier, 2003**).

Cependant, le diabète de type I que de type II, est caractérisé par une augmentation du nombre de radicaux libres et diminution des défenses antioxydants, tout en ayant également des produits inflammatoire (**Cadet. J et al., 1997**).

Chez les malades de Parkinson, des dommages oxydatifs ont été observés après une analyse post mortem du cerveau. Ainsi, il a été rapporté une diminution de la quantité du glutathion réduit (GSH) et de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Di Monte et al., 1992 ; Schapira et al. 1989**). Une diminution de GSH suggère l'induction d'un stress oxydant.

La maladie d'Alzheimer touche les personnes âgées de 60 et 65 ans, atteignant jusqu'à près de 35 % des personnes de plus de 95 ans (**Deschamps et al., 2001**). Cette maladie se caractérise par le dépôt de protéines caractéristiques, les plaques amyloïdes qui se trouvent au niveau extracellulaire des neurones ainsi que le dépôt intracellulaire des protéines tau (**Nourhashémi et al., 2000**). Des auteurs ont suggéré le rôle du stress oxydant dans la maladie d'Alzheimer après l'observation de l'augmentation de la peroxydation lipidique, de l'oxydation des protéines l'altération de l'ADN mitochondrial et l'augmentation de 50% de l'activité de la Cu/Zn SOD dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer (**Mecocci et al., 1994 ; Smith et al. 1995**).

La majorité des pathologies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, car le vieillissement augmente la production mitochondriale de radicaux libres et diminue les défenses antioxydants (**Sohal et al., 2002**).

En outre, plusieurs études ont montré la place prépondérante du stress oxydant dans le déclenchement et le développement du cancer. L'existence d'un stress oxydant chez les malades cancéreux peut être à la fois montrée par une baisse des défenses antioxydants et par l'augmentation des produits issus du stress oxydant. Chez des malades cancéreux, des dérivés d'oxydation de l'ADN ont été retrouvés dans le sang et les tissus (**Malins and Haimanot 1991**).

Par ailleurs, un déficit en ERO et ERN est délétère pour l'organisme, il conduit à une vulnérabilité par rapport aux attaques virales ou bactériennes. Cependant, un système de contrôle adapté est donc primordial pour maintenir des concentrations optimales en ERO/ERN pour l'organisme, ce qui est défini par l'homéostasie.

II. Les systèmes de défenses antioxydantes

Pour contourner les dommages causés par les ERO, la cellule fait appel à des systèmes de défense appelés antioxydants. Les antioxydants sont définis comme toute substance qui présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, sont capable de retarder, prévenir ou réparer un dommage oxydatif d'une molécule cible (**Halliwell et Gutteridge, 2007**). En outre, les antioxydants servent à réguler le niveau des espèces réactives pour diminuer le dommage oxydatif résultant du métabolisme aérobie (**Tang and Halliwell, 2010**).

Le système de défense contient 3 types de défenses :

1. Des antioxydants enzymatiques endogènes, défendent les cellules contre les radicaux libres. Ce groupe est représenté principalement par les superoxydes dismutases (SOD), la catalase (CAT), les peroxydases oxydases et réductases (GPx et GRase) et le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase.

2. Les protéines chélatrices du fer comme la transferrine et l'hémosidérine ou du cuivre comme la céruloplasmine et l'albumine. Ces protéines agit en bloquent les ions métalliques impliqués dans la réaction de Fenton.

3. Les antioxydantes non enzymatiques comme la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes, l'acide urique, le glutathion et les thiols, les métallothionéines. Le glutathion et les métallothionéines.

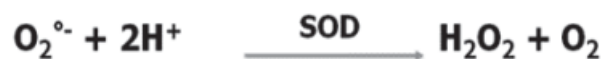
1. Les antioxydants enzymatiques

1.1. Les superoxydes dismutases (SODs)

Les SOD, ce sont des métalloenzyme ubiquitaire, il existe trois isoformes de SOD chez les mammifères. Ces trois isoformes diffèrent par leur structure, cofacteurs et localisations cette enzyme représente une partie importante du système de défense contre les radicaux libres (**Valko et al., 2007**).

Une forme (Cu/Zn-SOD) cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc, et est répartie dans la majorité des types cellulaires. Les ions Cu^{2+} et Zn^{2+} assurent respectivement l'activité et la stabilité de la molécule. Tandis que, la forme Mn-SOD est associée au manganèse, elle est localisée dans la mitochondrie. D'autres formes de SOD existent telles que la SOD extracellulaire et Fe-SOD chez les plantes.

Les différentes SODs catalysent la même réaction avec une efficacité comparable. L'activité enzymatique consiste à la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et le peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :

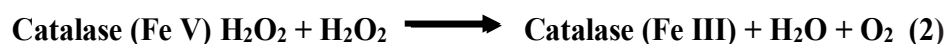


Cette réaction a été découverte pour la première fois par **(McCord and Fridovich, 1969)**. Au cours de cette réaction, la disponibilité en $\text{O}_2^{\circ-}$ est réduite, la cascade radicalaire (OH° , ONOO^-) est limitée. Le H_2O_2 est pris en charge par des enzymes de relai.

1.2. La catalase

Le produit final de la dismutation (H_2O_2) peut être décomposé en H_2O et O_2 par l'activité de l'enzyme catalase et/ou les éléments de la famille des peroxydases, y compris la glutathion peroxydase **(Chance et al., 1979)**.

La catalase est un enzyme hémique ubiquitaire situé à l'intérieur des globules rouges et dans les peroxysomes. Son activité a été découverte pour la première fois par **(Thénard, 1818)**. La catalase humaine est formée de quatre sous-unités, chacune comportant un groupement ferriprotoporphyrine dans son site actif avec un atome de fer à l'état Fe^{3+} **(Ko et al., 2000)**. Elle élimine le peroxyde d'hydrogène par dismutation qui se fait en deux étapes :

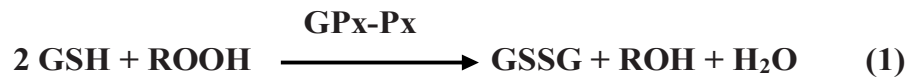


1.3. Le glutathion peroxydase

Le glutathion peroxydase est une sélénoprotéine ubiquitaire, dont il existe 7 isoformes réparties différemment dans la cellule. Elle élimine les peroxydes d'hydrogène H_2O_2 et lipidiques ROOH

respectivement en eau et alcool ROH, en présence d'une molécule antioxydant non enzymatique qui est le glutathion réduit GSH (**Powers and Jackson, 2008**).

Au cours de cette réaction, 70 % des peroxydes organique et 94 % de H₂O₂ par réduction selon les réactions suivantes :



1.4. Les Thioridoxine (Trx)

Les thioredoxine sont constituées d'une protéine possédant un groupement thiol, la thioredoxine, et d'un enzyme, la thioredoxine réductase. Elles contribuent à maintenir les protéines intracellulaires à l'état réduit. Chez les mammifères, ils sont associés aux noyaux et aux membranes. Les thiorédoxines sont localisées dans les mitochondries, le cytosol, et les peroxyosomes. Elles font l'objet de nombreux travaux concernant leurs capacités antioxydantes (**Valko et al., 2007**).

La thioredoxine réductase est un enzyme sélénodépendante NADPH dépendantes, éliminent H₂O₂, ROOH, ONOO⁻ par réduction selon la réaction suivante :



Malgré une activité plus faible que les GPx ou la catalase, elles pourraient jouer un rôle majeur dans l'élimination des hydroperoxydes, du fait de leur quantité importante (0,1 à 0,8 % de protéines soluble cellulaires) et de leur large distribution dans la cellule (**Favier, 2003**).

2. Les systèmes endogènes non enzymatiques

Le système enzymatique non-enzymatique referme les antioxydants des sources endogènes ou exogènes. Ils existent des composés antioxydants exogènes comme les vitamines E, C, l'ubiquinone ou les caroténoïdes et les oligoéléments qui agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou en ions stables. Des composés endogènes jouent le même rôle, dont le glutathion réduit qui protège non seulement

contre les radicaux libres, mais aussi contre les peroxydes. D'autres composés antioxydants ont été identifiés, notamment les métallothionéines.

2.1. Oligoéléments

Les métaux jouent un rôle essentiel dans la défense contre le stress oxydant comme le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe). Toutes les enzymes antioxydants nécessitent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Cependant, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action prooxydante (réaction de Fenton, d'Haber-Weiss).

2.2. Glutathion

Le glutathion est un tri-peptide composé de trois acides aminés l'acide glutamique, la cystéine et la l-glycine, présent essentiellement sous sa forme réduite (GSH) et en très faible concentration sous sa forme oxydée (GSSG). Le GSH est synthétisé par l'action séquentielle de la glutamate-cystéine ligase et la glutathion synthétase. Il est utilisé comme un substrat de glutathion peroxydase (**Forman et al., 2009**).

Le glutathion sous forme réduite (GSH) se lie à une autre molécule de glutathion radicalaire pour former le glutathion oxydé sous forme du disulfure GSSG. Le ratio réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme marqueur du niveau d'oxydation de la cellule, car plus le flux d' H_2O_2 est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé est augmenté (**Hermes-Lima, 2005**).

Le GSH peut être aussi comme un donneur direct d'atome d'hydrogène au radicaux libres (**Powers and Jackson, 2008**).

2.3. Vitamine E et vitamine C

Les vitamines E appartiennent à la famille des tocophérols (α -tocophérol) et semblent être les plus importants dans la lutte contre le stress oxydant. Elle est liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres afin d'empêcher ou d'arrêter la propagation des réactions de peroxydation lipidique (**Evans, 2000**).

La vitamine C, hydrosoluble, elle est cofacteur de nombreuses enzymes. Elle permet de piéger différentes EOR, et aussi de régénérer la vitamine E (**Powers and Jackson, 2008**), elle se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire ; c'est un bon capteur de radicaux libres oxygénés comme $l'O_2^{\bullet}$ et $l'OH^{\circ}$. Elle peut aussi réduire le radical α -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E (Figure 7)(**Evans, 2000**).

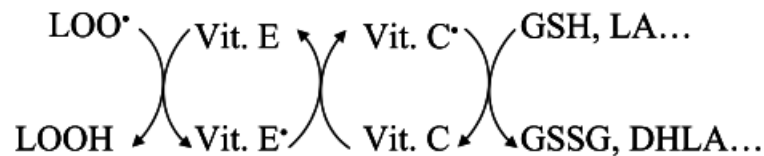


Figure 9 : Les réactions d'élimination des radicaux lipidiques par les vitamines E et C. (LOO^{\bullet}) : radical peroxyde lipidique, ($LOOH$) : hydroperoxyde lipidique, (Vit. E) : vitamine E, (Vit. C) : vitamine C, (GSH) : glutathion réduit, (GSSG) : glutathion oxydé, (LA) : acide lipoïque, (DHLA) : acide dehydrolipoïque.

2.4. L'Acide urique

L'acide urique est issu du métabolisme des purines, il a un potentiel rôle antioxydant dans les fluides biologiques humains (**Ames et al., 1981**). Dans les conditions physiologiques, l'acide urique est majoritairement ionisé sous sa forme urate (UrH_2^-). Ainsi, l'urate est capable de chélater des ions métalliques comme le fer et le cuivre et les empêcher de catalyser les radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton (**Powers and Jackson, 2008**).

La bilirubine est le produit final de catabolisme de protéines hémiques en présence de deux enzymes, l'hème oxygénase et la biliverdine réductase. Elle est considérée comme le meilleur antioxydant physiologique. En effet, la bilirubine possède un potentiel antioxydant puissant contre les radicaux peroxydes (ROO^{\bullet}) et aussi protège les cellules contre le peroxyde d'hydrogène (**Powers and Jackson, 2008**).

2.5. L'Ubiquinone et cytochrome c

La coenzyme Q10 est un transporteur d'électrons présente dans la chaîne oxydative mitochondriale, dans les membranes cellulaires, dans le plasma et dans les lipoprotéines. Elle peut fonctionner comme un antioxydant non enzymatique en piégeant les radicaux par inhibition de la peroxydation lipidique (**Powers and Jackson, 2008**). Elle assure également un recyclage de la vitamine E par réduction de la forme, ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ERO (**Ernster and Forsmark-Andrée, 1993**).

Le cytochrome c présent dans l'espace intermembranaire jouent un rôle de détoxification des ROS. Il capte l'électron libre d' $O_2^{\cdot-}$ produit au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi, il cède cet électron au complexe IV formant du cytochrome c oxydé et de l' H_2O (Skulachev, 1996).

Matériels et méthodes

I. Screening phytochimique

1. Préparation des extraits

1.1. Présentation du site de récolte

Les algues étudiées ont été collectées à marée basse descendante pendant la période de Mars en 2015 sur la plage de sable d'or, à Temara qui se trouve au sud de Rabat (position GPS : 33°55'20.23"N ; 6°58'9.89"O) (Figure 15).



Figure 15: site de récolte des algues étudiées (Temara- Sable d'or).

Parmi les espèces d'algues collectées, cinq sont retenues pour cette étude, Il s'agit de quatre algues brunes (Phéophycées), et une algue rouge (Rhodophycées).

L'Identification des cinq espèces ont été faite par Dr. Moujahid Abderahman Professeur Biologiste de la Faculté des Sciences et Techniques de Settat selon la nomenclature adoptée dans l'inventaire préliminaire des algues benthiques de la côte marocaine (**Riadi and Kazzaz, 2000**).

Des échantillons d'algues ont été identifiés : *Bifurcaria bifurcata* R.ROSS (1958), *Cystoseira humilis* Schousboe de Kützing (1860), *Cystoseira stricta* Sauvageau (1911), *Fucus spiralis* Linnaeus (1753) et *Gelidium sequepedale* (Clemente) Thuret (1876).

1.2. Présentation des espèces étudiées

1.2.1. *Bifurcaria bifurcata* R.ROSS (1958)

❖ Taxonomie

Embranchement : Ochrophyta

Classe : Phaeophyceae

Ordre : Fucales

Famille : Sargassaceae

Genre : *Bifurcaria*

Espèce : *Bifurcaria bifurcata*



Figure 10 : *Bifurcaria bifurcata*

❖ Caractéristiques botaniques et phénotypiques

Bifurcaria bifurcata est une algue brune autotrophe et pérennante, elle se caractérise par son axe cylindrique, de couleur verdâtre à brunâtre, non iridescents et qui peut atteindre 50 cm de long s'élèvent à partir d'un rhizome rampant tuberculeux fixé par des disques circulaires de petite taille (Figure 16).

Bifurcaria bifurcata est une espèce particulière parmi les sargassaceae, son rhizome est pérenne et adhère aux rochers par de petits disques. Leur ramification part de la partie basale de rhizome, elle montre des rameaux dressés, cylindriques et une organisation radiale.

C'est une algue vivace qui fructifie en général de novembre à janvier. Elle se développe dans la zone littorale inférieure. Toutes ces caractéristiques sont sujettes à variations, car le développement de *Bifurcaria bifurcata* est influencé par divers facteurs. La saison est le facteur le plus déterminant, mais la position bathymétrique et géographique intervient également, provoquant des décalages dans les différents stades (Méndez-Sandín and Fernández, 2016).

1. 2.2. *Cystoseira humilis* Schousboe de Kützing (1860)

❖ Taxonomie

Embranchement : Ochrophyta

Classe : Phaeophyceae

Ordre : Fucales

Famille : Sargassaceae

Genre : *Cystoseira*

Espèce : *Cystoseira humilis* Schousboe de Kützinger (1860)



Figure 11 : *Cystoseira humilis*

❖ Caractéristiques botaniques et phénotypiques

Cystoseira humilis est une espèce généralement de petite taille, cespiteuse (plusieurs axes principaux se développent directement à partir du disque basal), elle se caractérise par la ramification alterne et distique de ses axes, qui se fait dans un plan (Figure 17), et par la présence de rameaux aplatis rappelant des feuilles, comme les frondes que l'on peut observer chez les spécimens du genre *Sargassum*.

Elle se développe en milieux battus, dans les cuvettes de l'étage médiolittoral, les rameaux se développent en tous sens, de sorte qu'ils n'ont aucunement l'aspect d'une feuille plane (Figure 17). Les réceptacles sont apicaux, fusiformes et lisses.

Cette espèce est présentée pour la première fois par Schousboe à partir de l'herbier Sonder de Tanger, mais la description valide a été démontrée par Kützinger (1860). L'espèce colonise l'Est-Atlantique, depuis les îles Britanniques jusqu'en Mauritanie, et est observée globalement dans toute la Mer Méditerranée (Guiry & Guiry, 2011).

1.2.3. *Cystoseira stricta* Sauvageau (1911)

❖ **Taxonomie**

Embranchement : Ochrophytes

Classe : Phéophycée

Ordre : Fucales

Famille : Sargassaceae

Genre : *Cystoseira*

Espèce : *Cystoseira stricta* Sauvageau (1911)



Figure 12 : *Cystoseira stricta*

❖ **Caractéristiques botaniques et phénotypiques**

Cystoseira stricta est une algue brune dont le thalle très ramifié brun à brun vert de consistance très dure (calcifiée). Sa consistance lui permet de résister à l'arrachement et aux chocs des vagues.

La croissance du thalle est apicale. La structure de cette algue est multiaxiale et la taille du thalle varie de 2 à 12 cm (**Fischer et al., 1987**).

C'est une espèce de grande taille, facile à observer et à récolter, *Cystoseira stricta* se développe au niveau de la frange littorale dans des zones rocheuses plus ou moins exposées à un fort hydrodynamisme (**Ollivier, 1929**).

C'est une algue qui se développe sur les substrats rocheux superficiels exposés aux vagues. Elle se développe dans les zones bien éclairées, soumises à un fort hydrodynamisme marquant la limite supérieure de l'étage infralittoral (0 m de profondeur). Elle peut former un tapis végétal sur les petits fonds éclairés en mode battu (**Sauvageau, 1912**).

Cette espèce est présente en Méditerranée, et plus particulièrement l'occidentale : Maroc, Tunisie, Espagne, France, Italie (**Boudouresque, 1971**).

1.2.4. *Fucus spiralis* Linnaeus (1753)

❖ Taxonomie

Embranchement : Ochrophyta

Classe : Phaeophyceae

Ordre : Fucales

Famille : Fucaceae

Genre : *Fucus*

Espèce : *Fucus spiralis* Linnaeus (1753)



Figure 13: *Fucus spiralis*

❖ Caractéristiques botaniques et phénotypiques

Fucus spiralis est une algue brune dont leur thalle est brune foncé de 10 à 20 cm de long, parfois plus. Elle se fixe sur les rochers par un disque que surmonte un court stipe cylindrique étroit à la base, et qui s'élargit en lanières ou en lames souvent ondulées et enroulées sur elle-même. Ces lames possèdent une nervure médiane bien apparente, sans vésicules aérifères sphériques et leurs bords ne sont pas dentelés. Cette algue se développe accrochée sur les rochers en mode battus ou semi-battus.

Fucus spiralis est une algue autotrophe, pérennante forme une ceinture au niveau haut de l'étage médiolittoral sous le niveau d'une autre algue brune *Pelvetia canaliculata*.

Elle se reproduit à la fin de l'hiver et au printemps, et l'on voit apparaître alors aux extrémités des lames, des petites boursouflures ou réceptacles de couleur jaune-marron qui sont les organes reproducteurs. Leur reproduction est sexuée, produisant des gamètes mâles et femelles par des ouvertures appelées ostioles (**Julien, 2008**).

Fucus spiralis est largement distribuée en Atlantique, Manche et Mer du Nord, sur les rochers et dans les eaux peu profondes, jamais au-delà de 6 m de profondeur.

1.2.5. *Gelidium sesquipedale* (Clemente) Thuret (1876)

❖ Taxonomie

Embranchement : Rhodophyta

Classe : Florideophyceae

Ordre : Gelidiales

Famille : Gelidiaceae

Genre : *Gelidium*

Espèce : *Gelidium sesquipedale* (Clemente) Thuret (1876)



Figure 14 : *Gelidium sesquipedale*

❖ Caractéristiques botaniques et phénotypiques

Gelidium sesquipedale est une algue rouge appartenant à la classe des rhodophycées, leur thalle de couleur rouge à rouge brun possède un aspect robuste et une consistance cartilagineuse (Figure 20). Il est formé d'un ensemble de frondes de taille variant entre 10 à 40 cm, et regroupées en touffes, s'élevant à partir de filaments rampants (stolons ou rhizoïdes) qui assurent la fixation de l'algue au substrat.

La fronde est constituée d'un ensemble d'axes principaux à croissance illimitée, porteurs de ramifications latérales à croissance limitée, ce qui donne au thalle une forme pyramidale. La largeur des axes varie de 0,2 à 0,5 mm (Alberto et al, 1997 ; Mouradi et al., 2007).

Elle se reproduit par voie sexuée, la propagation de l'espèce est due à la dissémination des spores, le cycle de reproduction est de type haplodiplophasique et sa durée de vie peut aller jusqu'à 6 ans (Zidane et al., 2006).

G. sesquipedale est une espèce originaire de l'atlantique boréal (Riadi and Kazzaz, 1998). Elle est observée le long des côtes atlantiques européennes, depuis la grande Bretagne, la France, l'Espagne, le Portugal, le détroit de Gibraltar au Maroc ainsi que les Açores, les îles Canaries, les îles du Cap-Vert (Guiry, 2011) jusqu'au Mauritanie (Ouhssine et al., 2006).

1.3. Séchage

Les thalles des différentes espèces d'algues sont récoltés à marée basse descendante. Les algues sont conservées dans des bacs en plastiques, remplis d'eau de mer, et transportées immédiatement dans une glacière jusqu'à leur traitement au laboratoire.

Après l'élimination des débris, les épiphytes, les sels et les sables, les algues sont lavés avec l'eau de mer puis rincés à l'eau distillée. Les échantillons sont ensuite séchés dans l'étuve à 50 °C avec ventilation pendant 48 à 72 h afin de préserver au maximum l'intégrité de leur composition chimique.

1.4. Préparation de la poudre

Après séchage, les échantillons des algues séchés ont été broyés finement à l'aide d'un broyeur électrique pour obtenir une poudre fine, puis criblées sur des tamis. La poudre obtenue est conservée dans des flacons propres à - 20°C, jusqu'à leur utilisation.

1.5. Extraction par solvant organique

25 g de Chaque poudre d'algue a été extraite avec de l'éthanol à 70% (200 mL) à 60 ° C pendant 2 h. La procédure d'extraction a été répétée deux fois et les extraits combinés ont été filtrés à travers un entonnoir de Buchner sous vide. L'éthanol est éliminé par distillation sous-vide par un rotavapor (évaporateur rotatif). L'extrait sec obtenu est finalement lyophilisé. Les extraits lyophilisés ont été stockés à -20 °C jusqu'à utilisation ultérieure.

1.6. Rendement d'extraction

Une fois les extraits ont été obtenus, on a déterminé leurs rendements par rapport à la quantité initiale des algues sèches :

$$\text{Rdt} = \frac{m_{\text{extrait}}}{m_{\text{algue}}} \times 10$$

Avec

m_{extrait} : La masse de l'extrait.

m_{algue} : La masse de l'algue sèche. ($m_{\text{algue}} = 25\text{g}$)

2. Détermination des propriétés chimiques

2.1. Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau est déterminée selon la méthode no. 934.06. 1990, recommandée par l'association AOAC (The Association Of Analytical Communities) (**AOAC International, 1990**). 5 g d'algues fraîches ont été introduits dans un creuset préalablement taré dans une étuve réglée à 50 °C pendant une nuit. La matière sèche est retirée de l'étuve après refroidissement dans un dessiccateur, l'échantillon séché est pesé. Le pourcentage d'humidité est calculé selon la formule suivante :

$$\mathbf{H\% = ((Pf - Ps) / Pf) \times 100}$$

Avec :

Pf : Poids de l'algue fraîche, **Ps** : Poids de l'algue sèche, **H %** : Taux d'humidité exprimé en pourcentage.

2.2. Détermination de teneur de la matière minérale

La teneur en matière minérale est déterminée selon la méthode no. 923.03.1990, recommandée par A.O.A.C (**AOAC International, 1990**). Cette analyse permet le calcul de la quantité des sels minéraux contenus dans l'échantillon. 3g d'échantillon préalablement séchés sont pesés dans des creusets, et sont ensuite placés dans un four à moufle à 550°C jusqu'à l'obtention d'une cendre blanchâtre de poids constant. Les creusets sont pesés après refroidissement dans un dessiccateur.

L'expression des résultats est faite comme suit :

$$\mathbf{M (\%) = ((Mi - Mf) / P) \times 100}$$

Avec :

M % : Teneur en matière organique, **Mi** : Masse initiale du creuset contenant l'algue en g, **Mf** : Masse finale de creuset et des cendres en g, **P** : Masse de la prise d'essai

2.3.Détermination de la teneur en lipides

La teneur en lipides est déterminée selon la méthode AOAC (*AOAC International, 1990*). Les graisses ainsi dosées se nomment extrait étheré. L'appareil de soxhlet comporte 3 parties, respectivement de bas en haut, un ballon à col rodé, un extracteur recevant une cartouche et un réfrigérant à reflux. 5g d'échantillon (PE) ont été ajoutés dans les cartouches en papier filtre, puis placés sur le Soxhlet, après introduction de 180 mL d'éther diéthylique dans le ballon à col rodé.

L'éther diéthylique est alors porté à ébullition pendant 6h sur des plaques chauffantes jusqu'à obtention d'un maximum d'éther dans l'extracteur. Une fois l'éther éliminé, les cartouches sont séchées à l'étuve à 105 °C pendant 1h30 à 2h00. AOAC, 920.39 (1990). L'expression des résultats se fait comme suit :

$$L (\%) = ((P2 - P1) / P3) \times 100$$

Avec :

P1 : poids du ballon vide (g), **P2** : poids du ballon avec extrait étheré (g), **P3** : poids de la prise d'essai (g)

2.4.Détermination de la teneur en protéine

La teneur en protéine est déterminée selon la méthode de Kjeldhal no. 960.52. 2000, recommandée par A.O.A.C (*AOAC International, 1990*). Cette méthode est basée sur la quantification de la teneur en azote, puis la teneur en protéine est calculée en multipliant le taux d'azote total N (%) par le coefficient 6,25. Cette méthode comprend trois étapes : la minéralisation, la distillation et la titration.

La première est la phase de **minéralisation** qui consiste en une attaque chimique par l'acide sulfurique pour éliminer la matière organique. 1g d'échantillon a été mélangé avec 1g de catalyseur Kjeldhal (sulfate de cuivre et de potassium) et 15 mL d'acide sulfurique, le mélange a été préparé dans un matras de minéralisation en appliquant un chauffage progressif. Quand la solution devient limpide, elle est refroidie et complétée jusqu'à 100 mL avec de l'eau distillée. La deuxième étape est la **distillation** qui consiste à solubiliser l'azote minéral sous forme d'ammoniac, cette étape est réalisée dans un rotavapor en ajoutant 20 mL de soude à 35 % dans le matras et 25 % d'acide borique dans une fiole de 250 mL. L'ammoniac est récupéré dans une solution d'acide borique. La dernière étape est la **titration**, elle a été réalisée par l'ajout de quelques gouttes de l'indicateur de TACHIRO (mélange de bleu de méthylène et

rouge de méthyle) dans la fiole contenant l'ammoniac et l'acide borique. L'excès d'ammoniac est alors dosé par l'acide sulfurique 0,05 N par simple titration. La teneur en azote total est déterminée par la formule suivante :

$$N (\%) = (C_0 \times 2 \times V \times 14) / P$$
$$P (\%) = N (\%) \times 6,25$$

N : Pourcentage d'azote (%)

P : Pourcentage de protéine (%)

C₀ : Normalité de l'acide sulfurique (0.05)

V : Volume de l'acide sulfurique versé (mL)

P : Poids de l'algue sèche (g)

2.5.Détermination de la teneur en sucre

La teneur en sucre est calculée simplement selon la formule suivante :

$$S (\%) = 100 - (H + P + L + M)$$

H : Humidité (%) (= teneur en eau), **P** : Protéine (%), **L** : Lipide (%), **M** : Matière minérale (%) (= teneur en cendre)

3. Analyses phytochimiques des métabolites secondaires

3.1. Analyse qualitative

3.1.1. Estimation des polyphénols totaux

Pour mettre en évidence les polyphénols, la réaction au chlorure ferrique (FeCl₃) a été utilisée. Ainsi, à 2 mL de chaque solution d'extrait, est ajoutée une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2 %. Le chlorure ferrique provoque en présence de dérivés phénoliques l'apparition d'une coloration bleue noirâtre ou verte plus ou moins foncée. Le témoin est effectué avec la solution alcoolique d'acide gallique.

3.1.2. Estimation des flavonoïdes :

Pour mettre en évidence les flavonoïdes, la réaction dite 'la cyanidine' a été utilisée. 2 mL de chaque extrait ont été évaporés et le résidu a été repris dans 5 mL d'alcool chlorhydrique dilué 2 fois. En ajoutant 2 à 3 copeaux de magnésium, il y a un dégagement

de chaleur puis une coloration rose-orangée ou violacée. L'addition de 3 gouttes d'alcool isoamylique a intensifié cette coloration qui a confirmé la présence de flavonoïdes. Une solution alcoolique de quercétine a été utilisée comme témoin.

3.1.3. Estimation des tanins

L'évaluation de la teneur en tanins est basée sur une méthode colorimétrique permettant d'avoir des informations préliminaires sur la présence ou l'absence de ce métabolite. L'addition de trichlorure de fer (FeCl_3) à 2% aux tubes à essais avec 2 mL d'extrait permet de détecter la présence ou l'absence des tanins. La couleur vire au brun noir en présence de tanins galliques (tanins hydrolysables), et au bleu verdâtre en présence de tanins catéchiques (tanins condensés).

3.1.4. Estimation des stéroïdes

L'évaluation de la teneur en stéroïdes est basée sur une méthode colorimétrique permettant d'avoir des informations préliminaires sur la présence ou l'absence de ce métabolite. Dans ce cas, l'extrait est dissous dans 1 mL de chloroforme, 1 mL d'acide sulfurique concentré est ajouté. Un test positif est révélé par l'apparition d'une couche supérieure rouge.

3.1.5. Estimation des saponines :

La présence des saponines est recherchée sur un décocté à 20 %. Après agitation, la réaction est dite positive lorsqu'il y a formation d'une mousse, d'une hauteur de 1 cm, stable pendant 10 min.

3.1.6. Estimation des terpènes

1mg de l'extrait est solubilisé dans quelques gouttes d'acide acétique auquel on ajoute 3ml du mélange (anhydride acétique-acide sulfurique concentré (50-1)). Une coloration verte apparaît en cas de réaction positive.

3.2. Analyse quantitative

3.2.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en composés phénoliques des différents extraits a été déterminée par la méthode de Folin – Ciocalteu (FCR) décrite par (Slinkard and Singleton, 1977).

La réaction est basée sur la réduction de l'acide phosphomolybdique du réactif Folin-ciocalteu (un acide de couleur jaune, constitué de polyhétérocycles acides contenant du molybdène et tungstène) par les polyphénols en milieu alcalin (**Catalano, 1999**). Elle se traduit par le développement d'une coloration bleu foncée due à la formation d'un complexe molybdène tungstène mesuré au spectrophotomètre (Shimadzu 1601, Japon) à 760 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon.

Brièvement, 1 mL d'extrait d'algues (1 mg d'extrait préparé dans le méthanol) est ajouté à 46 mL d'eau distillée et 1 mL de réactif de Folin. Après 3 minutes, 3 mL de carbonate de sodium (2%) sont ajoutés au mélange. Le mélange est agité pendant 2 heures à la température ambiante. L'absorbance est lue à 760 nm par un spectrophotomètre contre un blanc sans extrait.

La quantification des polyphénols totaux a été calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec le pyrocatechol (0-0,25 µg/mL) dans les mêmes conditions que l'échantillon. Le pyrocatechol a été utilisé comme standard et les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent pyrocatechol par mg d'extrait (µg EP/ mg d'extrait).

3.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par la méthode colorimétrique de chlorure d'aluminium adaptée par (**Tel et al., 2012**) avec une légère modification (**Öztürk et al., 2014**). 1ml de chaque extrait d'algues ou standard (1 mg préparé dans un mL de MeOH) est ajouté à des tubes à essai contenant 0,1 de nitrate d'aluminium (Sigma Aldrich) à 10 %, 0,1 mL d'acétate de potassium 1 M (C₂H₃NaO₂) (Sigma Aldrich) et 3,8 mL de méthanol. Le mélange est agité puis incubé à l'obscurité à température ambiante pendant 40 minutes. L'absorbance a été déterminée à 415 nm.

La concentration des flavonoïdes est déduite à partir de la courbe d'étalonnage établie avec la quercétine comme contrôle positive. La teneur en flavonoïdes est exprimée en microgrammes d'équivalents de quercétine par mg d'extrait (µg EQ/mg d'extrait).

4. Evaluation du potentiel anti-oxydant

Des nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des produits naturels. La plupart de ces méthodes sont basées sur le changement de la coloration ou décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel.

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant d'un échantillon. C'est pourquoi, on effectue différents tests de mesure de pouvoir antioxydant.

Le pouvoir antioxydant ne peut être mesuré qu'indirectement à partir de ses effets. La plupart des méthodes de mesure de l'activité antioxydante sont basées sur l'utilisation de systèmes générant des radicaux très variés. Ce sont principalement des méthodes dites "d'inhibition" dans lesquelles une espèce chimique capable de générer des radicaux libres, qui sont utilisés avec une substance capable de détecter ces espèces. L'échantillon dont on souhaite mesurer le pouvoir antioxydant est capable d'inhiber la génération des radicaux libres.

4.1. Test DPPH

Pour étudier l'activité anti radicalaire des différents extraits, nous avons opté pour la méthode qui utilise DPPH 2,2-diphényl picryl-hydrazine (C₁₈H₁₂N₅O₆) (Sigma Aldrich) comme un radical libre relativement stable, selon la méthode décrite par (Blois, 1958) avec une légère modification (Öztürk et al., 2014).

Dans ce test, les antioxydants réduisent le DPPH ayant une couleur violette en un composé jaune, le DPPH, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno, 2002).

Brièvement, 40 µL des solutions d'extraits à différentes concentrations (de 0,1 à 1 mg/ml) sont ajoutés à 160 µL DPPH (0,1mM préparée dans l'éthanol), Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 40µl d'éthanol avec 160µl de la solution éthanolique de DPPH. Après agitation du mélange par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité, à température ambiante pendant 30 minutes.

La lecture est effectuée par mesure de l'absorbance à 517 nm en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits (SpectraMax PC340, Molecular Devices, États-Unis). Le DPPH absorbe à 517 nm, mais lorsqu'il est réduit par un antioxydant ou une espèce radicalaire, son absorption diminue. L'éthanol a été utilisé comme contrôle, tandis que l'hydroxytoluène butyle (BHT) et l' α -tocophérol ont été utilisés comme des antioxydants standards pour comparer l'activité antioxydante des extraits d'algues.

Calcul des pourcentages d'inhibitions : nous calculons le pourcentage d'inhibition par la formule suivante :

$$I (\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

I (%) : pouvoir d'inhibition en %.

A₀ : absorbance de la solution de DPPH en absence de l'extrait

A₁ : absorbance de la solution de DPPH en présence de l'extrait

Calcul des CI₅₀ :

CI₅₀ est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. CI₅₀ sont calculées graphiquement en représentant les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits testées et les standards.

4.2. Test de sels de 2,2'-azino-bis (acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) de diammonium (ABTS)

Le test ABTS⁺ a été déterminé selon la méthode de (Re et al., 1999), avec de légères modifications (Tel et al., 2013).

Le radical cationique ABTS⁺ a été généré par la réaction entre ABTS (Sigma Aldrich (7 mM) dans de l'eau et 2,45 mM de persulfate de potassium. Le mélange est ensuite conservé dans l'obscurité à température ambiante pendant 24 heures. Avant l'utilisation, la solution d'ABTS⁺ est diluée par l'éthanol jusqu'à l'obtention d'une absorbance de $0,703 \pm 0,025$ à 734 nm.

40 µl de chaque extrait sont ajoutés à 140 µl de solution d'ABTS⁺, et la lecture est faite à 734 nm après une minute d'incubation à température ambiante.

L'éthanol a été utilisé comme un contrôle, tandis que le BHT et l'α-tocophérol ont été utilisés comme des antioxydants standards pour comparer l'activité antioxydante des extraits d'algues.

Calcul des pourcentages d'inhibitions : Nous calculons ainsi les pourcentages d'inhibition par la formule suivante :

$$I (\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

I (%) : pouvoir d'inhibition en %.

A₀ : absorbance de la solution d'ABTS en absence de l'extrait

A₁ : absorbance de la solution d'ABTS en présence de l'extrait.

Calcul des IC₅₀ :

CI₅₀ est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical ABTS. CI₅₀ sont calculées graphiquement en représentant les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits testées et les standards.

4.3. Essai de blanchiment β -carotène / acide linoléique

L'activité antioxydante totale a été évaluée par le test β -carotène / acide linoléique (**Sabudak et al., 2013**), avec de légères modifications.

Dans ce test du blanchissement du β -carotène, la présence des 11 paires de doubles liaisons rend le β -carotène extrêmement sensible aux radicaux libres dérivés d'hydroperoxydes qui sont formés à partir de l'oxydation d'acide linoléique dans un système émulsion aqueux en résultant le blanchissement du β -carotène (**Unten et al., 1997**).

Brièvement 0,5 mg de β -carotène ont été dissous dans 1 mL de chloroforme. 25 μ l d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 sont ajoutés à la solution obtenue. Après l'évaporation complète du chloroforme sous vide à 40 °C, 100 mL d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutés avec agitation vigoureuse. Un volume de 150 μ l de la solution obtenue est additionné à 40 μ l à l'échantillon à différentes concentrations ou les standards. L'absorbance est mesurée immédiatement à 470 nm ce qui correspond à t = 0 min. L'oxydation de l'émulsion est suivie par la mesure de l'absorbance de chaque extrait dans un intervalle de 30 min jusqu'à ce que la couleur de contrôle disparu (t = 120 min).

L'éthanol a été utilisé comme un contrôle. Le BHA et l' α -tocophérol ont été utilisés comme des antioxydants standards.

La dernière absorbance de l'émulsion a été lue après une incubation de la plaque pendant 2 heures à 50 ° C. Le taux de blanchiment (R) du β -carotène a été calculé selon l'équation suivante.

$$R = (\ln a / b) / t$$

ln = logarithme naturel,

a = représente l'absorbance du contrôle au temps zéro,

b = représente l'absorbance en présence de l'extrait au temps t (120 min).

L'activité antioxydante des extraits est évaluée en termes de blanchissement du β -carotène par rapport au contrôle, en employant l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = (\mathbf{R}_{\text{Contrôle}} - \mathbf{R}_{\text{échantillon}}) / \mathbf{R}_{\text{Control}} \times 100$$

La valeur CI_{50} est définie comme la concentration des antioxydants correspondant à 50% d'inhibition. Elle est calculée en traçant la courbe des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait ou standards.

4.4. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

La capacité antioxydante par réduction de cuivre a été déterminée selon la méthode de (**Apak et al., 2004**), avec de légères modifications. Cette méthode est basée sur la suivie de la diminution de l'absorbance accrue du complexe Néocuproïne (Nc), cuivre (Cu^{2+}) [$Nc_2 - Cu^{2+}$]. En effet, en présence d'une molécule antioxydante, le complexe cuivre-néocuproïne est réduit. La réaction est quantifié spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 450 nm



Une solution est préparée avec le mélange des volumes de : 50 μ l $Cu^{(II)}$ (10 mM), 50 μ l neocuprine (7,5 mM), et 60 μ l de solution tampon NH_4Ac (1 M, pH = 7,0). Un volume de 40 μ l des extraits d'algues à différentes concentrations a été ajouté au mélange initial, afin de rendre le volume final de 200 μ l. Les microplaques de 96 puits ont été mises à l'abri de la lumière, et après 1 h d'incubation à 37 °C, l'absorbance est mesurée à 450 nm. Le complexe réduit Cu^+-Nc est quantifié en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits (Spectra Max 340PC384, Molecular Devices, USA).

La capacité de réduction des extraits éthanoliques des algues a été exprimée en (μ g Equivalent de trolox / mg extrait).

4.5. L'activité chélatrice des ions ferreux

L'activité chélateur de fer des extraits a été mesurée selon la méthode décrite par (**Decker and Welch, 1990**), avec de légères modifications. L'activité de chélation des ions métalliques a été déterminée par mesure du taux de réduction de la couleur rouge violacée qui a été quantitativement formé par la ferrozine avec les ions ferreux. Les extraits de différentes concentrations et de volume de 40 μ l ont été ajoutés à une solution de : 40 μ l $FeCl_2$ (0.2 mM) et 40 μ l d'éthanol. La réaction a été initiée par l'addition de 80 μ l de ferène (0.5 mM). Le mélange a été agité vigoureusement et laissé à température ambiante pendant 10 minutes.

Après que le mélange a atteint l'équilibre, l'absorbance a été mesurée à 593 nm. L'EDTA a été utilisé comme contrôle positif pour la comparaison de l'activité.

Les résultats ont été donnés en pourcentage d'inhibition et l'activité a été calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

I (%) : pouvoir d'inhibition en %.

A0: absorbance de la solution en absence de l'extrait

A1: absorbance de la solution en présence de l'extrait

Calcul des CI₅₀ :

CI₅₀ est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour la chélation de 50 % des ions ferreux. CI₅₀ sont calculées graphiquement en représentant les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits testées et les standards.

5. Les activités inhibitrice des enzymes

5.1. Activité anticholinérase

L'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE, type VI-S, EC 3.1.1.7, 425,84 U / mg) et la butyrylcholinestérase (BChE, EC 3.1.1.8, 11,4 U / mg) des extraits éthanoliques ont été déterminées selon la méthode colorimétrique décrite précédemment par Ellman (**Ellman et al., 1961**).

Les anticholinestérases utilisés sont celles de l'AChE de l'anguille électrique et le BChE du sérum de cheval, tandis que l'iodure d'acétylthiocholine et le chlorure de butyrylthiocholine ont été utilisés comme des substrats. Le DTNB [5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoïque)] a été utilisé pour mesurer l'activité du cholinestérase. L'éthanol a été utilisé comme solvant pour dissoudre les extraits et les contrôles.

Brièvement, 130 µl de tampon phosphate de sodium (100 mM, pH 8,0), 10 µl d'une solution des extraits dissoute dans de l'éthanol à différentes concentrations et un volume de 20 µl de l'AChE ($5,32 \times 10^{-3}$ U) ou BChE ($6,85 \times 10^{-3}$ U) ont été ajoutés. Le mélange est incubé pendant 15 min à 250 °C. Après incubation, 10 µl de DTNB (0,5 mM) ont été ajoutés au mélange. Ensuite, la réaction a été initiée par l'addition de 20 µl l'iodure d'acétylthiocholine (0,71 mM) ou le chlorure de butyrylthiocholine (0,2 mM).

Les hydrolyses de ces substrats ont été suivies par spectrophotométrie par la formation d'une couleur jaune d'anion 5-thio-2-nitrobenzoate de méthyle, selon le résultat de la réaction de DTNB avec thiocholine, libéré par l'hydrolyse enzymatique de l'iodure d'acétylthiocholine ou le chlorure de butyrylthiocholine, respectivement, à une longueur d'onde de 412 nm, en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits (SpectraMax PC340, Molecular Devices, États-Unis).

Les mesures et les calculs ont été évalués en utilisant le logiciel PRO Softmax v5.2. Le pourcentage d'inhibition de l'AChE ou BChE a été déterminé par comparaison des vitesses de réaction de l'extrait par rapport au contrôle (éthanol dans du tampon phosphate, pH 8) en utilisant la formule suivante :

$$I = (E - S) / E \times 100$$

Où

E= l'activité de l'enzyme sans l'extrait,

S= l'activité de l'enzyme avec l'extrait.

La galantamine a été utilisée comme composé standard dans l'évaluation des effets inhibiteurs de de l'AChE ou BChE (**Sabudak et al., 2017**).

5.2. Activité d'inhibition de la tyrosinase

L'activité inhibitrice de la tyrosinase des extraits a été mesurée en utilisant la méthode décrite par (**Hearing, 1987**) avec une légère modification.

La L-DOPA a été utilisée comme substrat. 150 µl de tampon phosphate de potassium (50 mM, pH 6,5) sont mélangés avec 10 µl extrait dissous dans de l'éthanol absolu à différentes concentrations et 20 µl de tyrosinase (13,3 U / puits). Après 10 min d'incubation à température ambiante, 20 µl L-DOPA à 8,4 mM sont ajoutés.

L'absorbance a été mesurée à 475 nm pendant 10 minutes à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits (Spectra Max 340PC384, Molecular Devices, États-Unis d'Amérique) (**Sabudak et al., 2013**). Les inhibiteurs de la tyrosinase l'acide kojique et la L-mimosine ont été utilisés comme standards.

5.3. Activité inhibitrice d'uréase

L'uréase de *Canavalia ensiformis* (haricot Jack) a été utilisée pour déterminer l'activité inhibitrice lorsque l'urée était utilisée comme substrat (Zahid et al., 2015).

La solution enzymatique et le substrat (0,1 M) ont été préparés dans un tampon phosphate (0,01 M, pH 8,2). Dans chaque puits, 10 µl d'extrait dissous dans l'éthanol et 25 µl ($8,3 \times 10^{-3}$ U) d'uréase (1 mg enzyme dissous dans 1 mL tampon phosphate à pH 8.2) ont été ajoutés à 50 µl urée (0,2553g urée est dissoute dans 25 mL tampon). Ensuite, le mélange est incubé pendant 15 minutes à 30 °C.

Après incubation, 45 µl de réactif au phénol contenant 0,005% de nitroprussiate de sodium et 1% de phénol, et 70 µl de réactif basique contenant 0,1% de NaOCl et 0,5% de NaOH. Le mélange est ensuite incubé pendant 50 nm. L'absorbance a été mesurée de manière cinétique à 630 nm en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits (Spectra Max 340PC384, Molecular Devices, USA). La thiourée a été utilisée comme standard pour comparer les résultats.

6. Identification et quantification des composés phénoliques

6.1. Préparation des solutions chromatographiques

6.1.1. Les solutions standards

Vingt-sept composés phénoliques, y compris des flavonoïdes, des glucosides flavonoïdes, des acides phénoliques, de l'aldéhyde phénolique, de la coumarine et trois acides organiques non phénoliques ont été identifiés dans tous les extraits.

L'acide malique (95-100%), la quercétine (95%), acide protocatéchique (97%), la chrysrine (97%), la rutine (94%), hespérétine (95%), la naringénine (95%), l'acide rosmarinique (96%), vanilline (99%), l'acide p-coumarique (98%), l'acide caféique (98%), l'acide chlorogénique (95%), hyperoside ($\geq 97\%$), carotène ($\geq 93\%$), l'acide myricétine ($\geq 96\%$), coumarine ($\geq 99\%$), kaempférol ($\geq 97\%$), l'acide formique ($\leq 100\%$) ont été obtenus auprès sigma (Allemagne).

L'acide quinique (98%), acide tr-aconitique (98%), acide 4-hydroxybenzoïque ($\geq 99\%$), fisétine ($\geq 98\%$) ont été obtenus auprès Sigma-Aldrich (Allemagne).

L'acide gallique ($\geq 99\%$), l'acide tannique, l'acide salicylique ($\geq 99\%$) ont été obtenus auprès Sigma-Aldrich (Allemagne). hespéridine ($\geq 97\%$), la lutéoline ($\geq 99\%$), l'apigénine ($\geq 99\%$),

rhamnétine ($\geq 99\%$) ont été obtenus auprès de la société R-Biopharm. Tous les solvants étaient de qualité analytique.

6.1.2. Échantillon à analyser

L'analyse des composés phénoliques et les acides organiques des extraits d'algues a été effectuée en utilisant l'instrument HPLC-MS /MS (Nexera, Shimadzu, Kyoto, Japon). Le lyophilisat des extraits d'algues a été dissous avec du méthanol à 250 mg/l, puis tous les échantillons ont été filtrés à l'aide d'un filtre en microfibre de 0,22 micron. LC-MS/MS.

6.1.3. Les conditions chromatographiques

La chromatographie en phase liquide est équipée d'une pompe binaire LC-30AD, un dégazeur à vide (DGU-20A3R), un échantillonneur automatique (SIL-30AC), et d'un four à colonne CTO-10ASvp. La colonne utilisée pour la séparation chromatographique est une phase inverse ODS- C18 (L : 150 mm ; diamètre : 4,6 mm, granulométrie : 3 μm). La température du four à 40 °C. Les composés ont été séparés selon le gradient de solvants (A) eau (5 mM formiate d'ammonium/L et 0,1% d'acide formique) et (B) Méthanol (5 mM formiate d'ammonium/L et 0,1% d'acide formique). Le programme de gradient avec les proportions suivantes de solvant A/B à été utilisé % (0,40), (20, 90), (23,90), (24,40), (29,40). Le débit de la colonne a été maintenu à 0,5 mL / min, et le volume d'injection automatique a été réglé à 4 μL aussi bien de la solution standard que des échantillons à analyser. Les Chromatogrammes obtenus ont été analysés par un logiciel Lab Solution (Nexera, Shimadzu, Kyoto, Japon)

Les paramètres de l'optimisation et la validation de la méthode de LC-MS/MS sont les mêmes que ceux utilisés précédemment (Ertas et al., 2015).

II. Etude in vitro sur le protozoaire *T. pyriformis*

1. Préparation des extraits méthanoliques et ses fractions

Une prise d'essai de 25g de poudre d'algue a subi une macération dans 200 mL de méthanol 80% (MeOH/H₂O; 80:20 ; V/V) pendant une nuit à température ambiante et après une macération à chaud pendant 2 heures à 50°C (Sathya et al., 2017).

L'extraction est répétée 2 fois, et les 2 filtrats sont recombines. Le méthanol est ensuite éliminé par distillation sous vide à 50°C à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi Rotavapor).

L'extrait brut obtenu est dilué avec de l'eau distillée, cette solution aqueuse est subit à des extractions liquide-liquide par des solvants de polarité croissante.

L'extrait brute est initialement lavé avec l'hexane (V:V), après décantation, la phase organique supérieur est récupéré. Cette étape est refaite 3 fois avec renouvellement du solvant jusqu'à devient transparent. L'hexane est par la suite évaporé à basse pression 40 °C, et l'extrait résultant est considéré comme étant la fraction (Hex). La phase aqueuse inferieure est soumise à un autre fractionnement pour donner la fraction (CHCl₃), puis un troisième fractionnement par l'acétate d'éthyle pour donner la fraction (AcOEt), et enfin par le n- Butanol pour donner la fraction (n-But) (Figure 21).

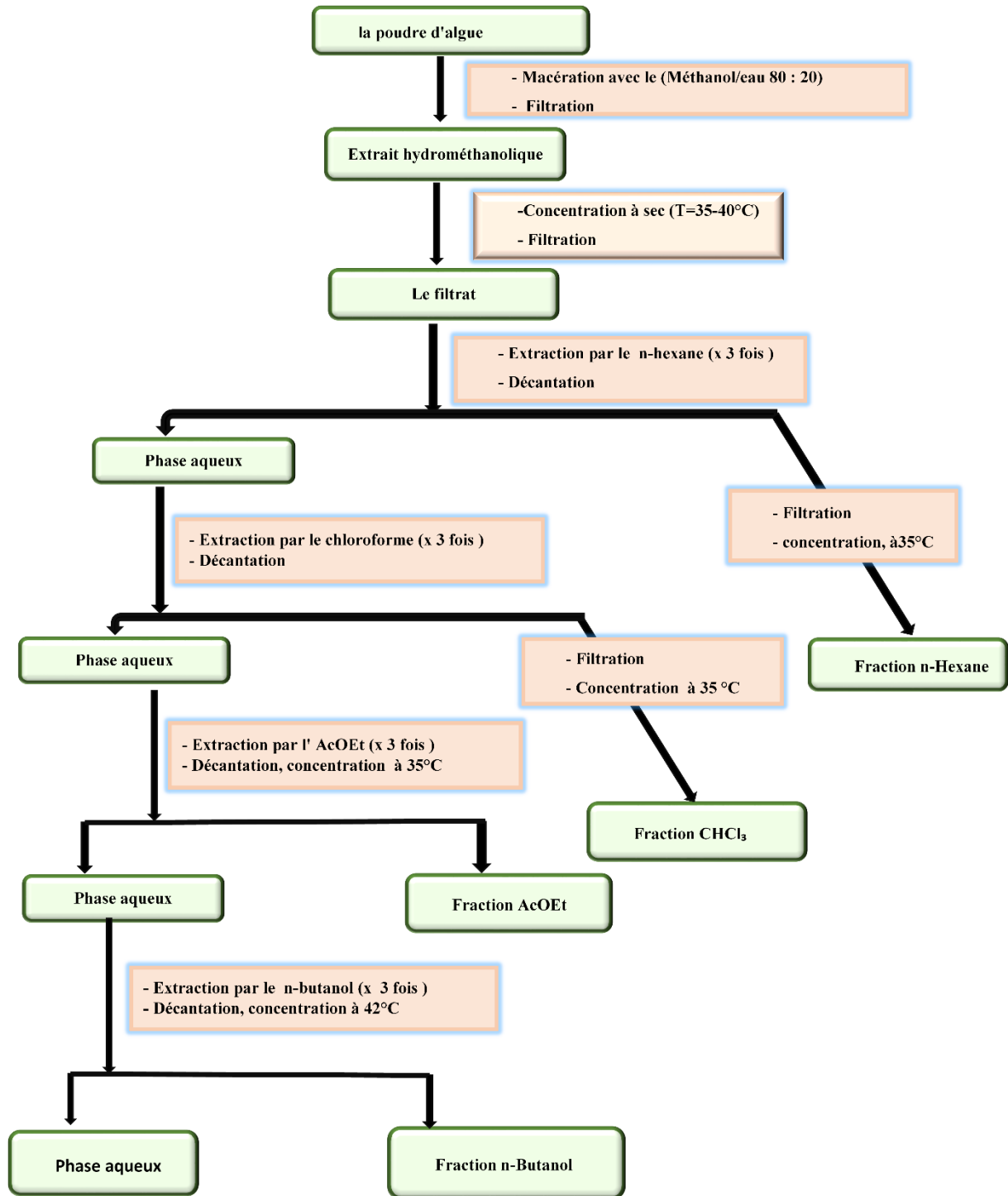


Figure 151: Extraction par des solvants de polarité croissante

2. Dosage des phénols Totaux

Le dosage des polyphénols est réalisé selon la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par (Slinkard and Singleton, 1977), le protocole a été effectué de la même manière dans la partie I-3.1.1 du matériel et méthode.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique et exprimée en μg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait ou fraction (μg EAG/mg d'extrait ou fraction).

3. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium (Tel et al., 2012) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les différents extraits d'algues. Le protocole a été effectué de la même manière dans la partie I-3.1.2 du matériel et méthode.

La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine et est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (μg EQ/mg d'extrait).

4. Test d'activité antioxydante

4.1. Test de DPPH

Le test de piégeage radicalaire DPPH a été réalisé avec la méthode décrite par (Blois, 1958), comme décrite précédemment dans la partie I-3.1.3 du matériel et méthode.

CI_{50} est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. CI_{50} sont calculées graphiquement en représentant les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits méthanoliques ou les fractions et le standard (BHT).

4.2. Test d'ABTS

L'essai ABTS est réalisé selon (Re et al., 1999), comme précédemment décrite dans la partie I-3.1.4 du matériel et méthode.

CI_{50} est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical ABTS. CI_{50} sont calculées graphiquement en représentant les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits méthanoliques ou les fractions et le standard (BHT).

4.3. Test de la Réduction du fer

Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite

par Oyaizu (**Oyaizu, 2011**), L'activité réductrice d'un extrait est évaluée par la réaction d'oxydo- réduction entre l'extrait et les ions métalliques de transition, notamment le fer (**Huang et al., 2005**).

Une quantité (0,5ml) de chaque extrait à différentes concentrations (de 0,2 à 1mg/ml) est mélangée avec 1.25 mL de tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 1.25 mL de solution aqueuse d'hexacyanoferrate de potassium K₃ [Fe (CN) ₆] à 1%.

L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min ensuite, 1.25 mL d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction et les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10min.

Une aliquote (1.25 mL) de surnageant est combinée avec 1.25 mL d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution aqueuse de FeCl₃ à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre).

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les extraits. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Singleton et al., 1965**).

5. L'évaluation de l'effet protecteur de *F.spiralis*

5.1. L'organisme choisi : *T. Pyriformis*

Tetrahymena Pyriformis fut choisi simplement pour sa facilité d'utilisation et de sa ressemblance aux cellules humaines. Il est facile de maintenir une culture viable en laboratoire dans un milieu axénique qui contient tout ce qui est nécessaire pour leur survie. Ce milieu n'est pas dispendieux puis qu'il contient 1% de protéose-peptone, 0.25% d'extrait de levure et 0.2 % de glucose, des produits relativement peu dispendieux (**Nicolau et al., 2001**).

L'avantage majeur d'utiliser des protozoaires est bien sur le fait que ce sont des eucaryotes unicellulaires. Ils possèdent donc des systèmes comparables aux animaux plus évolués comme un noyau, mitochondrie, cytosquelette, etc. Ainsi, leurs réponses aux produits toxiques ont donc plus de chance de s'approcher à ceux des animaux plus évolués que d'autres organismes unicellulaires comme une bactérie.

5.2. Entretien des cellules

5.2.1. La pré-culture

Les cultures souches *Tetrahymena pyriformis* ont été maintenues à 4 °C dans un milieu de conservation dépourvu de glucose pour minimiser le taux de croissance des cellules (Mori et al., 2011). Le milieu de culture contient 1.5% de protéose peptone et 0.25% d'extrait de levure. Les premières cultures souches sont incubées à 28°C sans agitation pendant trois jours pour que les cellules atteignent la phase exponentielle.

5.2.2. Culture cellulaire

À partir de cultures souches, on réalise une pré-culture dans un nouveau milieu préparé dans l'eau distillé contenant 1.5% de protéose peptone, 0.25% d'extrait de levure et 0.2% de glucose, la culture est incubé dans l'étuve à 28°C sans agitation pendant 72 h (Nicolau et al., 2001) .

Pour l'ensemble des tests, les cultures de *T. pyriformis* étaient toujours en phase de croissance exponentielle, et ils ont été ajustés à une densité de 10^4 cellules/mL dans un milieu de PPYG frais juste avant les traitements.

5.3. Traitement des cellules

5.3.1. Traitement par le peroxyde d'hydrogène

Les cellules sont traitées par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour induire un stress oxydatif. Dans le but de déterminer la concentration sublétales du peroxyde d'hydrogène qui inhibe 50% de la croissance cellulaire (CI_{50}), une gamme de différentes concentrations de H_2O_2 ont été ajoutés à la culture de *T. pyriformis*.

Le stress oxydatif est induit grâce à l'utilisation d'une gamme de H_2O_2 et les cellules servant de contrôle sont incubé sans traitement par H_2O_2 . L'évaluation de l'effet protecteur des fractions d'algue sera évaluée sur la dose qui correspond à CI_{50} du H_2O_2 . Toutes les incubations sont incubées à 28°C pendant 24h.

5.3.2. Détermination de la dose non létale de l'extrait

Après évaluation de l'activité antioxydant des fractions de méthanol, Hexane, chloroforme, acétate d'éthyle, n- butanol de cinq espèces d'algues, nous avons choisis les deux fractions qui

ont un grand pouvoir antioxydant. Les deux fractions éthyle acétate et chloroforme de *F. spiralis* ont été utilisés pour évaluer leurs effets protecteurs chez *T. pyriformis*.

Dans le but de déterminer la dose non létale des extraits d'algues, des cultures de *T. pyriformis* en milieu PPYG ont été incubés pendant 24h avec une gamme de différentes concentrations de la fraction acétate d'éthyle (AcOEt) et de chloroforme (CHCl₃) de l'espèce *Fucus spiralis*. La dose non létale correspond à la dose qui ne modifie pas la viabilité ou la croissance cellulaire, cette dose a été évaluée à l'œil nu en regardant la turbidité des tubes. Les résultats ont été confirmés par un comptage des cellules vivantes et mortes par le test MTT (Gieger et al., 2013).

5.4. Mise en évidence de l'effet protecteur

Dans le but d'évaluer l'effet protecteur des fractions d'acétate d'éthyle et chloroforme sur la toxicité induite par le H₂O₂, *T. pyriformis* a été incubée en présence des concentrations non létales des fractions et/ou en présence de 300µM de H₂O₂.

Dans les mêmes conditions, nous avons préparé d'autres tubes contrôles négatifs et positifs nécessaires pour une meilleure interprétation des résultats. Une culture en absence de H₂O₂ ou des extraits, culture en présence de H₂O₂ tout seul (contrôle positif), culture en présence des fractions (contrôle interne). Après 24h d'incubation des cultures cellulaires, la suspension est récupérée pour les analyses suivantes :

5.4.1. Détermination de CI₅₀

L'IC₅₀ c'est la concentration qui inhibe 50% de l'accroissement d'une population protiste (Bonnet et al., 2005). Les taux d'inhibition sont corrigés par la formule d' Abbott (1925) qui permet de connaître la toxicité réelle de la substance toxique.

La formule d'Abbott est la suivante :

$$100 \frac{X - Y}{X}$$

Où :

X : Nombre de vivants des témoins.

Y : Nombre de vivants des traitées.

5.4.2. Evaluation de la viabilité

Pour déterminer le nombre de cellules mortes, 6 μ L de la suspension ont été prélevée et mise sur une lame de microscope. Le comptage consiste au dénombrement des cellules immobiles dans 5 champs différents pour chaque lame.

Normalement, le protozoaire *T. pyriformis* est très mobile et possède une morphologie cellulaire qui ressemble à une poire. Pour que ces cellules soient considérées mortes, elles doivent être premièrement immobiles et deuxièmement, elles doivent avoir perdu leur morphologie en forme de poire.

Pour évaluer le nombre de cellules vivantes, 1 mL de la suspension a été prélevé et déposée dans un tube eppendorf auquel 1 mL de formaldéhyde 4% a été ajouté pour fixer et immobiliser les cellules. À partir de ce tube un volume de 6 μ L a été transféré par capillarité entre la lame et la lamelle. Le nombre de cellules dans 5 champs a été compté. Ce dénombrement permet de déterminer le nombre de cellules totales (morte + vivante).

D'après les résultats obtenus à partir de comptage avant et après la fixation, on peut en déduire le nombre de cellules vivantes.

5.5. Evaluation de l'activité cellulaire par le test MTT

La méthode MTT utilisée est celle décrite par **Lizard et al. (1997)**. C'est une technique colorimétrique, dont le principe est basé sur la transformation d'un sel de tétrazolium MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide) en formazan par réduction enzymatique.

En bref, le noyau tétrazolium qu'il contient est réduit, par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives en formazan. Le formazan est un produit coloré (violet foncé), insoluble dans l'eau et l'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes lors du test, mais aussi à leur activité métabolique. En présence de composés toxiques, un certain nombre de cellules meurent ou deviennent moins actives et ne présentent donc plus d'activité enzymatique mitochondriale. Le MTT n'est donc plus métabolisé en cristaux de formazan.

L'évaluation de l'activité cellulaire après les prétraitements est réalisée par l'ajout d'une solution de MTT à une concentration finale de 0,05 mg/ml. Après 3 heure d'incubation à 37°C,

la coloration violette est développée, la suspension cellulaire est centrifugée pendant 5 minutes. Les cristaux de formazan dans le culot sont solubilisés par l'ajout de 500 μ L de DMSO. La densité optique (DO) de chaque puits est mesurée à 492 nm sur un Spectrophotomètre Elisa.

La détermination de CI_{50} est déterminée par interpolation linéaire sur des courbes donnant le pourcentage de viabilité en fonction de logarithme de la concentration testée.

On note que le pourcentage de viabilité est donné par la relation :

$$\% \text{ Viabilité} = \frac{\text{D.O Contrôle} - \text{D.O échantillon}}{\text{D.O Contrôle}} \times 100$$

5.6. Evaluation du stress oxydatif

5.6.1. Préparation de l'extrait brut protéique

Les cellules de protozoaire cultivées en présence de H_2O_2 , des extraits seuls et des extraits plus H_2O_2 ont été récupérés par une centrifugation 12000g pendant 15min, le culot obtenu est solubilisé par 1ml de tampon phosphate 50mM a Ph 7,4. L'extrait protéique brute est obtenu après homogénéisation par l'ultraturax pendant 20min, suivi d'une sonication.

5.6.2. Dosage des Protéines

La méthode de Lowry est une technique colorimétrique particulièrement sensible se basant sur deux réactions colorimétriques (**Lowry et al., 1951**):

La réaction de Biuret, dans laquelle Cu^{2+} , en présence d'une base, réagit avec la liaison peptidique en donnant une couleur bleu-profond et la chimie de Folin-Ciocalteu, dans laquelle un mélange complexe de sels inorganiques réagit avec les résidus tyrosine et tryptophane des protéines en donnant une intense couleur bleu-vert.

Dans un premier temps on prépare la solution A constituée : d'hydroxyde de sodium – NaOH- (4 mg/ml), de carbonate de sodium Na_2CO_3 (20 mg/mL) et 500 mL d' H_2O .

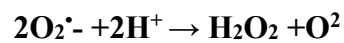
La solution B est constituée de potassium sodium tartrate $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ (10 mg/ml), sulfate de cuivre $CuSO_4$ (5 mg/ml) et 10 mL d' H_2O . 10 μ L de l'homogénat est mis en présence de la solution de Lowry A et B (50 :1). Le mélange est ensuite agité. Ensuite, on ajoute 0.1 mL de réactif de Folin- Ciocalteu (1 N). Après 30 minutes à 37°C, l'intensité de la coloration a été mesurée à 750 nm au spectrophotomètre. La concentration protéique des échantillons a été

calculée à partir d'une gamme d'étalonnage de BSA. La quantité de protéine est exprimée en mg/g de tissus.

5.6.3. Dosage de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase (SOD)

La détermination de l'activité enzymatique de la SOD utilisée, est basée sur l'inhibition du nitrobleu de tétrazolium (NBT) et la réduction de riboflavine utilisée comme générateur de superoxyde.

La SOD catalyse la dismutation des anions superoxydes (O_2^-) pour donner H_2O_2 et l'oxygène moléculaire (O_2) selon la réaction suivante :



La méthode utilisée est celle décrite par (Paoletti et al., 1986). Un mélange de 1ml est constitué de 520 μ l de tampon phosphate 50mM (PH 7,4) ,100 μ l de Triton X100 à 0,025%, 100 μ l de EDTA à 1mM, 100 μ l de L-méthionine à 12mM, 60 μ l de NBT à 70 μ M, 20 μ l d'échantillon et 100 μ l de riboflavine à 2 μ M. Ce mélange est exposé à la lumière d'une lampe de 15 Watt pendant 10 min pour induire la photoréaction de la riboflavine.

La réduction de NBT est suivie par le spectrophotomètre à 560 nm. L'activité de SOD est mesurée selon la relation décrite par (Sun et al. 1988) .

$$\% \text{ Inhibition} = (A \text{ blanc} - A \text{ échantillon} / A \text{ blanc}) \times 100$$

(Une unité d'activité de SOD est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber 50% la réduction de NBT).

5.6.3. Dosage de l'activité enzymatique de la Catalase (CAT)

La détermination de l'activité enzymatique de la catalase est basée sur la diminution de l'absorbance à 240, qui est due à la dismutation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la catalase avec un facteur d'extinction de 43,6 $M^{-1}.cm^{-1}$ (Ni et al., 2001) durant deux minute en prenant les valeurs toutes les 30 secondes et à une température de 25°C selon la réaction suivante :



La solution d' H_2O_2 (Sigma-Aldrich) a été fraîchement préparée à une concentration de 0.019M dans le tampon phosphate 50 Mm (Sigma-Aldrich), à partir d'une concentration initiale qui a été déterminée avant chaque utilisation, car la solution de H_2O_2 se dégrade avec le temps.

$$A = C \cdot L \cdot \epsilon M$$

Dont

A : l'absorbance à 240 nm de H₂O₂

L : longueur de la cuve (cm) = 1cm

εM : coefficient d'extinction molaire de H₂O₂ (M⁻¹.cm⁻¹) = 43,6 M⁻¹.cm⁻¹

La méthode utilisée est celle décrite par (Aebi, 1984). La réaction s'effectue dans une cuve en quartz en utilisant un spectrophotomètre.

La réaction se déclenche par l'ajout de 1 mL de peroxyde d'hydrogène 0.019 M dans un milieu

réactionnel contenant 1,95 mL de tampon phosphate de potassium (0,05 M, pH 7,4), et 0,05 mL de l'extrait. La lecture de l'absorbance est effectuée tous les 30 seconds pendant 2 min à 240nm

Une unité de l'enzyme est définie comme 1 μmol de H₂O₂ consommée par minute et l'activité spécifique a été normalisée par rapport à la quantité de protéine totale, elle a été exprimée en unités catalase par mg de protéine (UI / min/mg de protéine). L'activité de la catalase est déterminée selon la formule suivante :

$$UI/g = (2.3033/\Delta T) \times (\log A1/A2) /g \text{ de protéine.}$$

Dont

K : Constante de vitesse de la réaction d'ordre 1.

T : Intervalle de temps en minute.

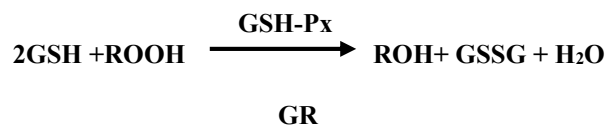
A1 : Absorbance à t₀

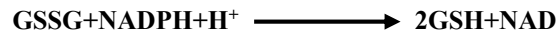
A2 : Absorbance à t₁

5.6.4. Dosage de l'activité enzymatique de GPx

L'activité de la glutathion peroxydase (GPx) est mesurée selon la méthode de (Flohe and Gunzler, 1984).

En présence de glutathion réduit (GSH), la glutathion peroxydase réduit un hydroperoxyde (ROOH), tandis que GSH est oxydé en glutathion disulfure (GSSG).





L'activité enzymatique de GPx a été calculée par la diminution du taux de glutathion réduit (GSH) en utilisant H₂O₂ comme substrat. Pour réaliser le dosage de la GPx, un milieu réactionnel de volume de 1 mL a été préparés contenant 0,3 mL de l'homogénat, 0,3 mL de tampon phosphate (0,1M pH 7.4), 0,2 mL de GSH 2 mM 0,1 mL de sodium azide 10 mM et 0,1 mL de H₂O₂ 1 mM.

Après incubation à 37°C pendant 15 minutes, la réaction a été arrêtée par l'ajout de 0,5 mL d'acide trichloroacétique TCA (5 %). Une centrifugation 1 500 g pendant 5 minutes a été effectuée afin de récupérer 0,1 mL du surnageant qui a été ajouté à 0,2 mL de tampon phosphate 50 mM et à 0,7 mL de DTNB [5-5'-dithiobis (acide -2- nitrobenzoïque)] (0,4 mg/ml, préparé dans le tampon phosphate à 0,4 M).

L'absorbance est lue à 420 nm et l'activité a été exprimée en µmol de GSH/min/mg de protéine (une gamme GSH est réalisée dans les mêmes conditions).

5.6.5. Evaluation de marqueurs de stress

5.6.5.1. Dosage MDA

Au cours de la peroxydation lipidique, un nombre important d'aldéhydes est formé par cassure des hydroperoxydes lipidiques. Les aldéhydes les mieux étudiés sont le 4-hydroxynonéal (4-HNE), le 4-hydroxyhexenal et le dialdéhyde malonique (MDA). Ils réagissent avec des antioxydants comme le glutathion, augmentant le stress radicalaire. Ainsi, une partie des produits de la peroxydation est rapidement métabolisée et un changement de concentration sera donc plus difficile à mettre en évidence. La méthode la plus employée est la mesure du dialdéhyde malonique par fluorimétrie après réaction avec l'acide thiobarbiturique (TBA) qui permet la quantification des complexes formés.

La réaction de dosage du malondialdéhyde, décrite par (**Ohkawa et al., 1979**), repose sur la formation en milieu acide et à chaud entre le malondialdéhyde et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA), d'un pigment absorbant à 532 nm, extractible par les solvants organiques comme le butanol.

À 100µl de l'homogénat, nous avons ajouté 100µl de l'acide trichloroacétique (TCA) 20% et 200µl de l'acide thiobarbiturique (TBA) 0.67 %, le mélange est chauffé à 100°C pendant 15 minutes. Après refroidissement, on ajoute 1 mL de n-butanol. Une centrifugation à 3000 g

pendant 15 minutes a été effectuée. L'absorbance du surnageant contenant le pigment rose est lue à 532 nm. L'activité MDA est exprimée :

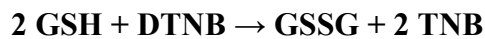
$$[\text{MDA}] = A^\circ / \xi \text{ (n mol)}$$

A° : La valeur de l'absorbance a 532 nm

ξ MDA : Coefficient d'extinction molaire du MDA = 1.56 10⁵ M⁻¹cm⁻¹ Dosage

5.6.5.2. Dosage de la glutathion réduit (GSH)

Le principe de dosage est basé sur la réduction du réactif d'Ellman (5,5' dithio bis (Acide 2-nitrobenzoïque) (DTNB) par le groupement thiol pour former une mole d'acide nitromercaptobenzoïque par mole de glutathion, selon la réaction :



Après préparation des extraits protéiques, le taux du glutathion a été déterminé dans un milieu réactionnel de volume contenant, 200 µl de l'acide trichloracétique (TCA) (5 %) et 400 µl de l'extrait protéique. Après centrifugation à 12000g pendant 10 min, 50 µL du surnageant ont été prélevés et additionné 100 µL DTNB (acide 5, 5'-dithiobis- 2-nitrobenzoïc) (6mM) et 850 µL de tampon phosphate (50 mM, pH = 8).

La lecture de la densité optique est effectuée à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA (5 %).

III. Etude in-vivo sur des rats

1. Condition d'élevage

1.1. Déclaration d'éthique

Toutes les expériences sur les animaux ont été approuvées par le comité d'éthique de l'Université Mohammed V (Rabat, Maroc), et étaient en conformité avec les recommandations de l'Institut national américain du Règlement sanitaire pour le soin et l'utilisation des animaux. Tous les efforts ont été faits pour réduire au maximum la souffrance de l'animal selon les règles d'éthiques recommandés.

1.2. Choix des animaux

Afin d'éviter la variabilité intersexe, nous n'avons utilisé que des rats males de la souche Wistar (1 ans d'âge, 240 ± 15 g de masse) en provenance de l'élevage de l'Université

Mohammed V. Les animaux sont hébergés au niveau de l'animalerie de laboratoire de physiologie et physiopathologie de la faculté des sciences de Rabat dans des cages en plexiglas (cinq rats par cage : n =5).

Les rats sont soumis pendant 10 jours à une période d'adaptation dans des conditions environnementales standards (cycle de lumière-obscurité de 12 heures, et de 20-25 ° C). La nourriture et l'eau étaient fournies à volonté.

2. Traitement des animaux

Après acclimatation, les rats ont été répartis en fonction de leurs traitements en 7 groupes de 5 rats. Pendant la durée de traitement, les animaux ont été nourris d'une alimentation solide, et l'eau de boisson étant l'eau de robinet.

Le traitement a duré 28 jours au cours desquelles les rats ont reçu une nourriture enrichie en 7% ou 14% de la poudre d'algue *F. spiralis* (Tableau 2).

Les rats ont reçu une injection une semaine avant le sacrifice de Lipopolysaccharides (Sigma) (solution 1mg/ml dans de NaCl 0,9%), à raison de 500µg/ kg de poids vif de rat et par voie intra-péritonéale. Dans les mêmes conditions expérimentales, les rats contrôles négatif ont reçu une injection intra-péritonéale du NaCl 0,9%. Les rats contrôles positives ont reçu de l'eau potable additionnée de vitamine C (10%), La vitamine C sert d'antioxydant commun, il est utilisée comme contrôle positif dans la présente étude (Pal and Sarkar, 2014).

Tableau 2 : Les différents groupes de rats.

| Traitement | Les lots | | | | | | |
|-----------------------|----------|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| NaCl (0,9%) | + | | | | | | |
| LPS (500µg/kg) | | + | | | + | + | |
| <i>F.spiralis</i> 7% | | | + | | + | | |
| <i>F.spiralis</i> 14% | | | | + | | + | |
| Vit C (10%) | | | | | | | + |

3. Etude comportementale

3.1. Tests moteurs

3.1.1. Champ Ouvert ou "Open Field"

L'activité dans l'Open Field est un test classique qui permet d'étudier l'activité locomotrice horizontale et le redressement d'un animal vis-à-vis un d'un environnement nouveau et spacieux de façon spontanée ou après administration de drogues.

La procédure implique généralement une confrontation forcée du rat avec la situation, produisant une négligence de la zone centrale de dispositif au profit de la périphérie de celui-ci.

De ce fait, les animaux ont la tendance à passer plus de temps dans les coins et la périphérie de l'appareil plutôt que dans le centre, qui est alors considérée comme la zone la plus anxiogène (**Crawley, 1981; Elizalde et al., 2010**). Ce comportement ou le rongeur préfère se déplacer près des cloisons se nomme la thigmotaxie. L'augmentation de la distance parcourue et de l'activité générale dans la zone centrale peut être interprétée comme effet anxiolytique (**Prut and Belzung, 2003**). Le test du champ ouvert, a été initialement utilisé pour étudier l'émotivité chez les rongeurs (**Prut and Belzung, 2003**). La diapositive expérimentale se présente sous forme d'une boîte rectangulaire en bois peinte ouverte sur sa base supérieure de 72 cm², aux bords surélevés (36 cm) à l'aide de tracés blancs (Figure 22a).

Ce test est effectué dans une salle isolée du bruit et faiblement éclairée. Le rat est initialement placé au centre de l'enclos et ses comportement exploratoires sont mesurés pendant une période de 10 minutes, les enregistrements se font par une caméra vidéo. Nous considérons que l'open Field est divisé en deux parties : une partie périphérique et une partie centrale marquée en jaune dans le schéma (Figure 22b).

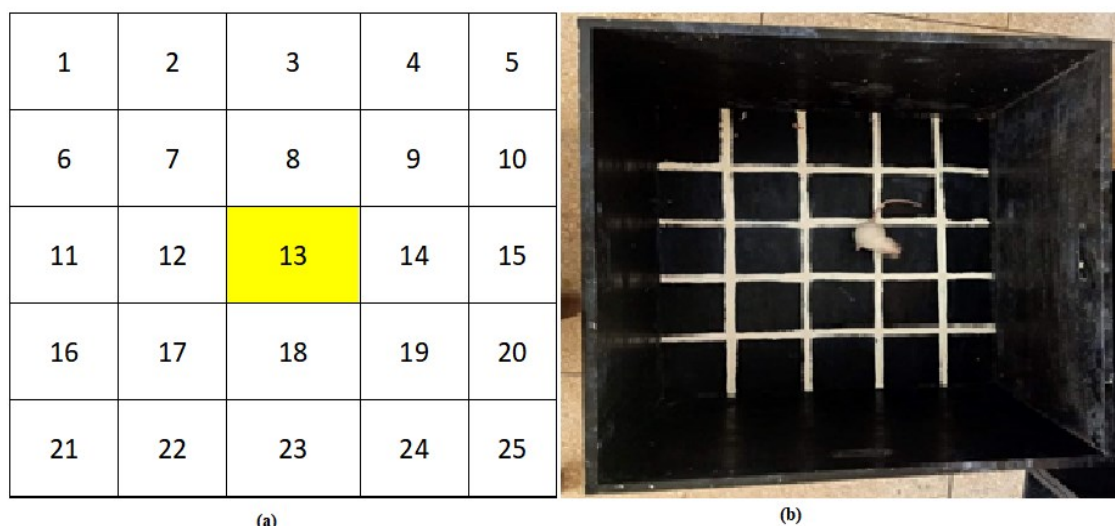


Figure 162:a) Division du champ ouvert de la plateforme, l'activité générale dans la zone centrale jaune est un indicateur du niveau d'anxiété exprimé chez les rats. b) photographie du dispositif du champ ouvert

Dans ce test, les paramètres quantifiés sont le nombre total de carreaux périphériques, ainsi les carreaux traversés dans la zone centrale. Un carreau traversé est défini comme correspondant au passage des quatre pattes de l'animal au-delà de l'une des lignes délimitant le carreau. Le nombre total de redressement dans la partie centrale, ou rearing, défini comme le soulèvement par l'animal des pattes avant au-dessus du plan horizontal avec extension du corps, ainsi que le temps passé dans la zone centrale, ont été comptabilisés. À la fin des 10 minutes imparties, l'animal est retiré et remis dans sa cage. Le fond de l'open Field est minutieusement nettoyé entre chaque test. Toutes les séances ont été effectuées entre 8h et 14h.

3.1.2. Rota-rod

Parmi les nombreux tests comportementaux développés pour évaluer les performances motrices des rats, le test du Rota-Rod est particulièrement adapté pour tester la coordination motrice, fonction généralement associée au cervelet (Crawley, 1999).

L'appareil est un Rota-Rod modèle (Panlab Modèle, Harvard Apparatus, U.S) se composant d'un cylindre qui comporte 4 voies permettant d'y placer 4 rats à la fois, sans interférence. Le cylindre entraîne en mouvement de rotation autour de son axe, par un moteur électrique à vitesse réglable. L'appareil est muni d'un détecteur de chute mécanique et une minuterie pour chaque voie.

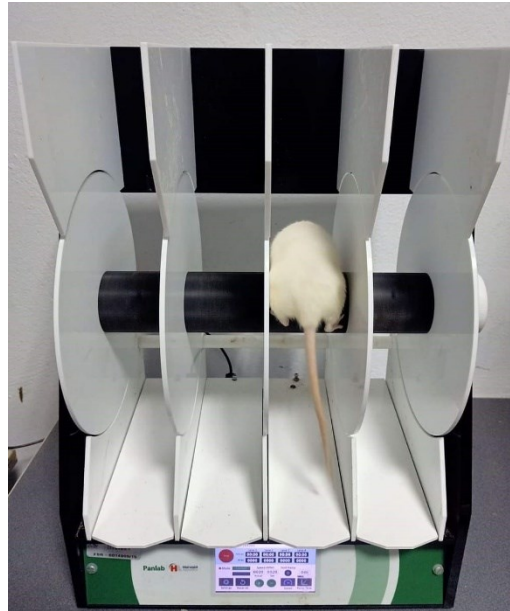


Figure 173: Photographie d'un appareil de Rota-Rod utilisé pour mesurer la coordination motrice.

Lorsque l'appareil est mis en marche, le cylindre tourne sur lui-même à une vitesse constante de 12 rpm. L'expérimentateur place l'animale sur le cylindre et répète l'opération après chaque chute. Placé sur le cylindre, l'animal doit se mouvoir dans le sens inverse du mouvement du cylindre et maintenir son équilibre à fin de ne pas tomber.

L'expérimentation a été réalisée comme décrite auparavant (**Papp and Bal, 1987 ; Rozas et al., 1997**). Tous les rats ont été entraînés au Rotarod, pendant deux jours pour se familiariser avec l'appareil à fin que leur performance lors du traitement ne subisse pas de biais par la nouveauté de la tâche ainsi qu'à vérifier les habilités motrices de base. Pendant cette période d'adaptation, chaque rat a été placé sur le cylindre qui tourne à une vitesse graduelle de 4 à 20 rotations par minutes, pour une durée maximale de 10 à 15 minutes. Au terme de ces deux jours, un niveau constant de performance est atteint.

Au troisième jour, c'est-à-dire, le jour test, la performance au Rota Rod a été enregistrée pour chaque rat pendant cinq tentatives, pour une durée maximale de 3 minutes et la moyenne a été prise en considération. Plus la durée pendant laquelle le rat est resté sur le dispositif est élevée plus l'animal est performant. Le test et l'entraînement ont été effectués durant le jour, entre 9h et 14h (Figure 23).

3.2. Tests non-moteurs

3.2.1. Labyrinthe en Croix Surélevé (EPM)

Le comportement anxieux a été mesuré par le test du labyrinthe en croix surélevé (EPM). C'est un test qui permet de mesurer la peur et l'anxiété chez les rongeurs. Ce test exploite, chez le rat, la préférence des endroits sombres et fermés comme zone de confort et le désir d'explorer un nouvel environnement. Un rat anxieux, a tendance à rester dans le bras fermé, plutôt que d'explorer le bras ouvert.

Ainsi, le comportement anxieux est évalué à partir des pourcentages du nombre d'entrées et du temps passé dans les bras fermés par rapport au nombre d'entrées et du temps total passés dans les deux bras.

En fait, le labyrinthe en croix surélevé est construit en bois et possède deux bras d'une largeur de 10 cm et d'une longueur de 50cm. Les bras se croisent perpendiculairement eu centre du dispositif en laissant un espace de forme carré (10cm x 10cm) à leur intersection. Un bras est « fermé » (BF) de ses deux cotés par des murs dont la hauteur est de 40 cm, tandis que l'autre bras est « ouvert » (BO) sans murs. L'ensemble du dispositif se trouve à environ 75cm au-dessus du sol, afin d'augmenter l'anxiété du rat qui se déplace sur le bras découvert (Figure 24). La hauteur et l'ouverture du bras ouvert sont considérées comme un stimulus anxiogène que l'animal aura tendance à éviter. Un conflit d'approche- évitement entre l'envie naturelle d'explorer un nouvel environnement et sa peur des espaces ouverts sera créé chez l'animal (Salum et al., 2003).

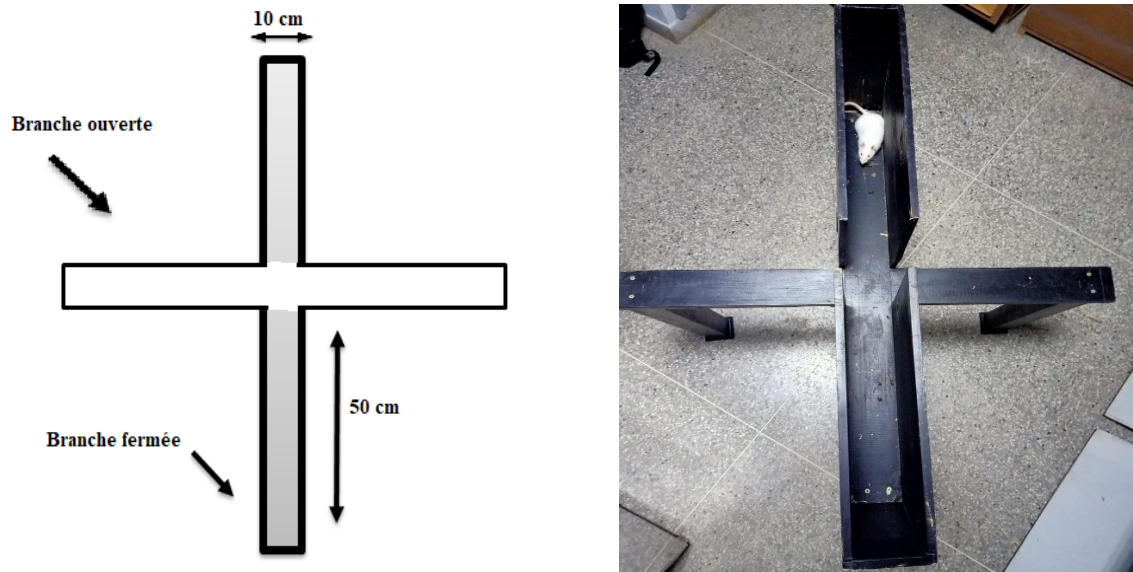


Figure 184: Dispositif expérimental du test du labyrinthe en croix surélevé.

Chaque rat est testé une seule fois pendant 5 minutes, sans jamais avoir été exposés à l'appareil auparavant. En effet, il semble que la réponse comportementale de l'animale soit déterminante pendant les cinq premières minutes qui suivent son placement sur le labyrinthe (**Walf and Frye, 2007**).

L'essai débute lorsque l'animal est placé sur la plate-forme centrale, la tête tournée vers une des branches ouvertes, la même pour tous les rats, et chaque rat se mouvoir librement sur le dispositif pendant cinq minutes. Le comportement de l'animal pendant 5 minutes a été enregistré. Au bout de cette période, le temps passé à explorer le bras ouvert (une entrée n'est prise en compte que si les quatre pattes de l'animal sont dans le bras), le nombre d'entrées total et le pourcentage du temps passé dans le bras ouvert ($\text{temps passé dans le BO} \times 100 / \text{temps BO} + \text{temps BF}$) ont été mesurés.

L'ensemble de l'expérimentation se déroule dans une salle isolée du bruit et faiblement éclairée. Toutes les séances ont été effectuées pendant le jour, entre 9h et 14h.

3.2.2. Nage forcée

Le test de la nage forcée ou test de Porsolt, développé par **Porsolt et al., 1977**. Ce test est largement utilisé pour mettre en évidence les propriétés antidépressives potentielles de nouvelles molécules.

Dans ce test, l'animal est placé dans un seau d'eau tiède (Figure 25), suffisamment rempli pour qu'il ne puisse ni poser sa queue sur le fond, ni s'échapper. Le rat tente dans un premier temps

de nager et de s'échapper, mais finit par se rendre compte qu'il ne peut pas. Au bout de quelques minutes, la proportion de temps passés à nager diminue au profit du comportement d'immobilité, c'est-à-dire que l'animal flotte passivement en n'effectuant que les mouvements nécessaires au maintien de sa tête hors de l'eau. Le temps d'immobilité est un indicateur de l'état pseudo-dépressif ou résigné de l'animal. Il est réduit par l'administration de la plupart des antidépresseurs classiques. Le principe du test est de mesurer la durée de la nage, l'incidence de sa combativité naturelle, et de l'immobilisation preuve de sa résignation.



Figure 195 : Test de la nage forcée

La procédure du test utilisée est celle décrite par **Tazi et al., 1992**. Le test est divisé en deux étapes. La première étape est la phase d'habituation pendant laquelle chaque rat est introduit pendant 10 min dans un cylindre en plexiglas (45 cm de hauteur et 30 cm de diamètre) contenant 35 cm d'eau maintenue à la température de 25 ± 2 °C. La profondeur du seau empêche l'animal de poser ses pattes postérieures sur le fond du cylindre. Vingt-quatre heures après le pré-test, un test de 10 min est réalisé dans les mêmes conditions. Après chaque session de la nage, l'animal est séché rapidement avec serviette et placé sous une source de chaleur pendant environ 30 min, puis replacé dans sa cage d'hébergement. C'est la réduction du temps d'immobilité des rats qui est mesuré dans ce test.

Ce test a été réalisé pour tous les groupes d'animaux. Toutes les séances ont été effectuées pendant le jour, entre 9h et 14h.

4. Sacrifice des animaux et prélèvement des organes

Après 4 semaines de traitement, le sacrifice des rats a été réalisé sous anesthésie, à l'aide d'une solution d'hydrate de chloral.

Les organes prélevés (foie, Reins, le cœur), ont été d'abord lavés immédiatement avec de l'eau physiologique avant d'être pesés. Les cerveaux sont aussi rapidement extraits de la boîte crânienne et placés sur un support en verre en contact avec de la glace (+4°C). Différentes structures cérébrales (hippocampe, cortex et cervelet). La moitié de toutes les structures cérébrales, sont immédiatement congelées dans la carboglace et stockées à -80°C jusqu'à leurs utilisations. D'autres échantillons de cerveaux ont été fixés dans une solution tamponnée de formol (10%) pour servir à des études histologique.

Le sang a été prélevé lors de la décapitation des rats, puis immédiatement centrifugé à 4°C (8000 g pendant 10 minutes), le plasma recueilli a été conservé à -80°C jusqu'à utilisation pour l'analyse des paramètres plasmatiques.

Des échantillons d'organes ont été prélevés, pesés et immédiatement broyés dans le Tris HCl à une température de 4 °C. Les surnageant ont été conservés à -80°C pour servir à des dosages biochimiques. D'autres échantillons de cerveaux ont été fixés dans une solution tamponnée de formol (10%) pour servir à des études histologiques.

IV. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués in vitro et in vivo sont exprimés en moyenne \pm SD et moyenne \pm SEM respectivement. Les valeurs de CI_{50} (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)].

La différence entre le contrôle et les différents tests, est déterminée par le test de Student pour les comparaisons simples. Les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées statistiquement significatives.

Résultats et discussion

I. Screening chimique des extraits

1. Détermination des paramètres chimiques des cinq algues

Le Tableau 3 montre les paramètres chimiques des cinq espèces d'algues, *F. spiralis*, *G. sesquipedale*, *B. bifurcata*, *C. stricta*, *C. humilis*, en terme de la teneur en eau (humidité), cendres (matière minérale), lipides, protéines et en sucres totaux.

Tableau 3: Composition chimique de différentes algues

| Espèce | l'humidité % | cendres % | Les lipides % | les protéines % | les sucres % |
|------------------------|-----------------|--------------|------------------|--------------------|-----------------|
| <i>F. spiralis</i> | 69 | 6,08 | 2,5 | 6,67 | 15,81 |
| <i>G. sesquipedale</i> | 50 | 5,74 | 1,09 | 23,59 | 19,58 |
| <i>B. bifurcata</i> | 67 | 6,15 | 2,4 | 8,09 | 16,36 |
| <i>C. stricta</i> | 62 | 12,22 | 2,2 | 6,28 | 17,30 |
| <i>C. humilis</i> | 62 | 6,315 | 3 | 5,45 | 23,23 |

1.1. Teneur en eau

D'après le Tableau ci-dessus, les résultats obtenus démontrent une variation quantitative de l'humidité entre 62% et 69%. La composition chimique des algues se caractérise par une richesse importante en pourcentage de l'eau. Cette dernière, varie de (62 à 69%) de la composition chimique de l'algue. Nos résultats montrent que la teneur la plus élevée est trouvée chez *F. spiralis* avec une valeur de 69% et la plus faible teneur est notée pour *G. sesquipedale* avec une valeur de 50% de la matière sèche. La teneur en humidité pour les autres algues représente environ 62%, 67%, 62% chez *C. stricta*, *B. bifurcata* et *C. humilis*, respectivement.

Ces valeurs sont en accord à ceux rapportés dans la littérature, chez *Cystoseira compressa* (84%) (Oucif et al., 2020). *Cystoseira compressa* (69,70%), *Cystoseira barbata* (62,27%) et *Cystoseira corniculata* (68,39 et 70,46%) (Ozgun and Turan, 2015; Polat and Ozogul, 2008). Ainsi, des taux plus faibles sont rapportés chez l'algue rouge *Corallina officinalis* (31,50%) et *Jania rubens* (44,55%) (Polat and Ozogul, 2008)

Dans la littérature, une teneur en humidité élevée a été rapportée chez l'algue brune *Cystoseira abies-marina* avec une valeur de (83,80% MS) (Patarra et al., 2011). En outre, un taux plus faible est rapporté chez l'algue rouge *Corallina officinalis* (31,50%) (Ozgun and Turan, 2015).

Les algues se développent dans un milieu marin et sont immergées dans de l'eau durant tout leur cycle de vie, c'est ce qui explique leur contenu élevé en humidité. Par contre, les algues qui possèdent des thalles calcifiés, telles que les espèces appartenant à la famille des Corallinaceae présentent un faible taux d'humidité.

1.2. Teneur en matière minérale

Concernant la teneur en composition minéral, le Tableau 3 montre que la valeur plus élevée est trouvée chez *C. stricta* (12%), chez les autres espèces la teneur ne dépasse pas 6%.

la teneur en composition minéral chez les algues est généralement élevée (8 à 40% de la matière sèche), en raison de leur composition en polysaccharides sur leur surface cellulaire ce qui leur permettent de retenir les substances marines inorganiques (**Mabeau and Fleurence; 1993 Bocanegra et al., 2009**).

La teneur en matière minéral chez les algues est très variable selon le site géographique de la récolte, l'exposition aux balancement de marée, la saison, les espèces d'un même phylum, et les facteurs environnementales et physiologiques (**Hou and Yan, 1998 ; Mabeau and Fleurence, 1993**). **Ruperez, 2002** a rapporté que la teneur en minéraux chez les algues brunes est plus élevée (39 à 30 % de MS) que celle des algues rouges (20 à 21 % MS).

Dans la littérature, la teneur en cendre (minérales) chez *Fucus spp* peut varier de 19% à 36% par matière sèche, ce qui est nettement plus élevé que les valeurs trouvées dans les plantes terrestres (**Muraguri et al., 2016a**).

En effet, la teneur moyenne en matière minérale de la plupart des légumes est bien inférieure à celle de *Fucus spp*. (par exemple, 10,4% MS dans les pommes de terre, 7,1% MS dans les carottes et les tomates et de (2,6% MS) dans le maïs sucré)(**Cardoso et al., 2014**).

D'autre part, **Mwalugha et al., (2015)** ont montré que les deux espèces d'algues *Eucheuma denticulatum* et *Laurencia intermedia* présentent une teneur plus élevée en cendres de (36,21%) et (30,32%), respectivement. Contrairement, la teneur en cendres trouvée par **Muraguri et al., (2016)** différait avec (27.13 %) pour *Eucheuma denticulatum* et 25.62 % pour *Laurencia intermedia*.

Dans notre étude, la teneur en cendres (19% à 36%) est plus faible que celle rapportée par (**Muraguri et al., 2016a**) et considérablement inférieure à 27% à celle rapportée par (**Muraguri et al., 2016b**). La variation de la teneur en cendres pourrait être liée à l'habitat, la

température et le pH du milieu marin, qui pourrait avoir une influence sur la minéralisation **(Ozgun and Turan, 2015)**.

Cependant, Les algues sont très riches en minéraux essentiels et en oligo-éléments tels que le calcium, le sodium, le potassium et le magnésium **(Hamed et al., 2015)**. L'analyse de la composition minérale a montré que la plupart des algues présentent une teneur plus élevée en Na que la valeur déclarée pour les légumes terrestres **(USDA, 2001)**.

1.3. Teneur en lipides

La teneur en lipides varie de 1 à 3% de la composition chimique des algues. *C. humilis* présente la teneur la plus élevée en lipide avec une valeur égale à 3%. Par contre, *G. sesquipedale* présente la plus faible teneur en lipide avec un pourcentage de 1,09% (Tableau 3).

Nos résultats sont en accord avec ceux de en accord avec **Gosch et al., (2012)**, ils ont rapporté que les algues brunes contiennent des teneurs en lipides totaux plus élevés que les algues vertes et les algues rouges.

Généralement, la teneur en lipides des algues est faible (1 à 5% de matière sèche), avec une forte différence entre les espèces **(Burtin 2003)**. Il a été rapporté que la teneur en lipides des algues rouges varie de 1,10% à 2,46% poids sec. **Wong and Cheung, 2000**, Ils ont constaté que les teneurs en lipides chez les algues rouges (*Hypnea charoides* et *Hypnea japonica*) et d'une algue verte (*Ulva lactuca*) sont très faibles (comprises entre 1,42 et 1,64% en poids sec).

Chez les algues brunes, la teneur totale en lipides de *Fucus spp.* varie de 0,4 à 5% poids sec **(Muraguri et al., 2016a)**. Il a été rapporté que *F. spiralis* présente la teneur en lipide la plus élevée (5% poids sec), tandis que la valeur la plus faible a été observée chez *F. serratus* (0,4% par poids sec. **(Kim et al., 1996 ; Paiva et al., 2014)**

Cependant, Il a été rapporté que la composition biochimique, la teneur totale en lipides de *Fucus spp.* varie selon les saisons, les conditions environnementales, les différences génétiques et plusieurs autres facteurs **(Muraguri et al., 2016a)**. En fait, il a été rapporté que la teneur totale en lipides des algues est plus élevée pendant l'hiver et au printemps, et plus faible pendant l'été **(Nelson et al., 2002)**.

Chez les algues, les lipides sont caractérisés principalement par des acides gras saturés et monoinsaturés, mais de nombreuses algues présentent le potentiel d'accumuler des acides gras polyinsaturés (AGPI) à longue chaîne **(Khozin-Goldberg and Boussiba, 2011)**

1.4. Teneur en protéines

A propos de la teneur en protéine, les cinq algues présentent environ 5 à 23% de la composition chimique en protéines, avec une teneur plus élevée chez l'algue rouge *G. sesquipedale* qui est égale 23,59 % (Tableau 3). *C.humilis* présente la teneur la plus faible (5,45%) comme chez *Cystoseira elongata* (5,85%) et *Cystoseira officinalis* (5,91%) (Ismail, 2017; Oucif et al., 2020)

Dans la littérature, **Burtin, (2003)** a rapporté que la concentration en protéines chez les algues brunes varie de 5 à 11% de la matière sèche, par contre les algues vertes et rouges possèdent un teneur qui varie de 10 à 30% de la matière sèche.

D'après le Tableau, l'algue brune *F.spiralis* montre une teneur qui égale 6.67 %. Néanmoins, elle est considérablement plus faible que celles rapportées par d'autres auteurs chez les *Fucus spp.* *Fucus serratus* qui ont montrés une teneur plus élevée en protéines de 17% de matière sèche, tandis que *Fucus vesiculosus* et *Fucus spiralis* accumulent jusqu'à 11% de protéines (**Muraguri et al., 2016a**).

En outre, la teneur en protéines chez l'algue *Stypopodium schimperi* présente une différence selon les études, **Polat and Ozogul, (2013)** ont trouvé une teneur faible qui égale ($2,68 \pm 0,06\%$ poids sec), que la teneur $65.19 \pm 4.32 \text{ mg g}^{-1}$ trouvée par (**Ozgun and Turan, 2015**). Ces niveaux variaient probablement selon la saison et les conditions environnementales. La teneur en protéines des algues varie non seulement entre les espèces mais aussi entre les habitats, la maturité et la période de l'année (**Stirk et al., 2007 ;Zucchi and Necchi, 2001**)

La teneur en protéines chez les algues brunes ont généralement faible et très sensible à la saisonnalité, les teneurs les plus élevées sont observées à la fin de l'hiver et au printemps (**Galland-Irmouli et al., 1999**). Ainsi, d'après **Fleurence, (1999)**, les algues brunes contiennent généralement une teneur faible en protéines (3–15% MS) que les algues vertes et rouges.

Les variations de la teneur en protéines peuvent être liées aux valeurs de températures, les saisons. Ils peuvent être aussi proportionnelle à la différence entre les espèces, la localisation géographique et les conditions environnementales (**Fleurence, 1999; Ismail, 2017**)

1.5. Teneur en sucres totaux

Les résultats de de la teneur en sucres des cinq algues sont représentés dans le Tableau 3. Les résultats obtenus montrent une variation quantitative de sucre entre 23,23% chez *C. humilis* et % 15,81 chez *F. spiralis*. Le contenu en sucre chez l'algue rouge *G. sesquipedale* est la plus élevé (23,23%), suivie des algues *G. sesquipedal*, *B. bifurcata*, *C. stricta* avec des teneurs de (19,58%), (16,36%) et (17,30%), respectivement (Tableau 3).

Généralement les sucres sont la fraction la plus abondante dans toutes les algues étudiées. Cet résultat est en accord avec ceux rapporté par **Muraguri et al., (2016a)**, Il ont montré que la fraction en carbohydate est le plus abondante dans les *Fucus spp.*

Selon, **Ozgun and Turan, (2015)**, Les concentrations de glucides des macroalgues varient de $12,25 \pm 1,60$ à $47,92 \pm 5,66$ mg g⁻¹, avec une différence significatives entre les algues brunes.

Chez les algues, les sucres sont considérés comme les composés biochimiques les plus importants, puisqu'ils représentent la principale source d'énergie pour les voies métaboliques.

Il a été rapporté que la concentration en carbohydates est plus élevée chez les algues vertes, suivie des algues brunes et rouges (**Kasimala et al., (2017)**). Cette différences est probablement dû au fait que les espèces de chlorophycées poussent en eau peu profonde, sous une forte exposition au soleil, ceci leur permet de synthétiser plus de carbohydates par photosynthèse.

2. Analyses phytochimiques des métabolites secondaires

2.1. Analyse qualitative

La mise en évidence de différentes classes des métabolites secondaires constituants des algues nous a permet d'orienter leur screening pharmacologique. Des tests phytochimiques des extraits d'algues ont été réalisés en relation avec l'intensité du précipité et la coloration, proportionnels à la quantité de composés recherchés.

D'après le Tableau 4, différentes familles de métabolites secondaires sont présentés dans les algues testées. Chez *G. sesquipedale*, les tanins et les stéroïdes ne sont pas mis en évidence par le screening phytochimique. Chez *F. spiralis*, les extraits renferment les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins en quantité élevés, par contre les stéroïdes et les saponines sont détectées en faible quantité (Tableau 4).

Les deux algues brunes *C. stricta* et *C. humilis* renferment toutes les métabolites secondaires avec une quantité élevée des stéroïdes et les tanins chez *C. stricta*.

Les stéroïdes sont détectés en quantité élevée par rapport aux autres métabolites chez *B. bifurcata*. La richesse de *F. spiralis* en polyphénols (flavonoïdes et tanins) justifie leur grande efficacité dans l'usage thérapeutique.

Tableau 4 : Résultats des tests phytochimiques des cinq algues étudiées.

| Les espèces d'algues | polyphénols totaux | flavonoïdes | tanins | stéroïdes | saponines |
|------------------------|-----------------------|-------------|--------|-----------|-----------|
| <i>F. spiralis</i> | +++ | +++ | +++ | + | + |
| <i>G. sesquipedale</i> | + | + | - | - | +++ |
| <i>B. bifurcata</i> | + | + | ++ | +++ | + |
| <i>C. stricta</i> | ++ | ++ | +++ | +++ | ++ |
| <i>C. humilis</i> | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |

2.2. Analyse quantitative

Le Tableau ci-dessous présente les résultats de l'analyse colorimétriques de la teneur en polyphénols et flavonoïdes des cinq espèces d'algues. Les polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de folin-Ciocalteu. Le pyrocatechol a été utilisé comme standard pour les polyphénols et la quercétine comme standard pour les flavonoïdes.

Tableau 5 : la teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux des extraits des algues étudiés.

| Les extraits | Rendement (%) | Le taux en polyphénols ($\mu\text{g EP/mg}$ extrait) ^b | Le taux en flavonoïdes ($\mu\text{g EQs/mg}$ extrait) ^c |
|------------------------|------------------|---|--|
| <i>C. stricta</i> | 25,32 | 7,24 \pm 0,03 | 8,53 \pm 0,02 |
| <i>C. humilis</i> | 25,16 | 7,68 \pm 0,05 | 6,72 \pm 0,02 |
| <i>F. spiralis</i> | 40,84 | 22,9 \pm 0,06 | 26,9 \pm 0,03 |
| <i>B. bifurcata</i> | 26,24 | 4,68 \pm 0,04 | 4,26 \pm 0,02 |
| <i>G. sesquipedale</i> | 19,28 | 11,1 \pm 0,03 | 5,84 \pm 0,02 |

^aLes valeurs sont exprimées en moyennes \pm standard erreur de trois mesures parallèles ($p < 0,05$).

^b EPs: équivalents de pyrocatechol.

^c EQs: équivalents de quercétine.

2.2.1. Rendement d'extraction

Le Tableau montre les rendements en pourcentage des extraits éthanoliques des algues étudiées. Les rendements (Tableau 5) ont été déterminés par rapport à 100 g de la matière végétale sèche

de l'algue. D'après le Tableau ci-dessus, on note que l'extrait phénolique de l'algue brune *F. spiralis* enregistre un fort rendement de l'ordre de 40 % suivi par l'extrait de *B. bifurcata* avec une valeur qui égale 26,24 % (Tableau 5).

En ce qui concerne, les deux algues brunes *C. stricta*, *C. humilis* les valeurs sont proche et varient entre 5.5 % et 1.20 %. Le rendement le plus faible est observé pour l'extrait de l'algue rouge *G. sesquipedale* 19,28 %.

2.2.2. Détermination de la teneur en polyphénols

Les résultats du dosage de la teneur en polyphénols totaux des cinq espèces d'algues montrent que la teneur varie de $4,68 \pm 0,04$ à $22,9 \pm 0,06$ μg d'équivalent de pyrocatechol par mg d'extrait (PE/mg d'extrait). L'extrait éthanolique de *F. spiralis* montre une teneur en polyphénols plus élevée que celle des autres algues avec une concentration de $22,9 \pm 0,06$ μg EP/mg d'extrait suivie par *G. sesquipedale*, *C. humilis* et *C. stricta* avec des teneurs de $11,1 \pm 0,03$, $7,68 \pm 0,05$ et $7,24 \pm 0,03$ μg EP/mg d'extrait, respectivement. Par contre, *B. bifurcata* présente la teneur la plus faible avec une concentration de $4,68 \pm 0,04$ μg EP/mg d'extrait (Tableau 5).

Les composés phénoliques (les flavonoïdes, les acides phénoliques et les tanins) sont considérés comme des antioxydants puissants de rupture de chaîne qui peuvent participer directement à l'action antioxydante (**Shahidi et al., 1992**). La teneur en polyphénols peut servir comme un indicateur important pour étudier le pouvoir antioxydant, elle est utilisée comme une méthode préliminaire pour n'importe quel produit quand il est destiné comme une source naturelle des antioxydants dans les aliments fonctionnels (**Viuda-Martos et al., 2011**).

Dans une étude précédente, la teneur en polyphénols totaux chez *F. spiralis* est rapporté de 1.15 ± 0.06 mmol d'équivalents d'acide gallique / g de poids sec, ce qui correspond à $195,6$ μg d'EAG par mg d'extrait (**Peinado et al., 2014**). Dans une autre étude réalisée par **Chakraborty et al., (2013)**, l'extrait méthanolique de *Turbinaria ornata* et *Turbinaria conoides* présentent une teneur en composés phénoliques plus élevée avec des valeurs de $16,64 \pm 0,10$ et $3,42 \pm 0,35$ mg d'EAG/g d'extrait, respectivement. Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par **Sabeena Farvin and Jacobsen, (2013)**, qui ont montré que tous les extraits éthanoliques de l'espèce *Fucus* possèdent une teneur élevée en polyphénols totaux avec des valeurs de 32 à 1920 mg/100 g d'algues sèches.

2.2.3. Détermination de la teneur en flavonoïdes

Concernant la composition en flavonoïdes, les teneurs en flavonoïdes varient de $4,26 \pm 0,02$ à $26,9 \pm 0,03$ μg d'équivalents de quercétine par mg d'extrait (EQ/ mg d'extrait). L'extrait éthanolique de *Fucus spiralis* présente une teneur plus riche en flavonoïdes avec une concentration de $26,9 \pm 0,03$ EQ/ mg d'extrait, suivie par *C. stricta* et *C. humilis* et *G. sesquipedale* avec des teneurs de $8,53 \pm 0,02$, $6,72 \pm 0,02$ et $5,84 \pm 0,02$ EQ/ mg d'extrait, respectivement. En revanche, la teneur la plus faible est observée chez l'algue brune *B. bifurcata* avec une valeur de $4,26 \pm 0,02$ EQ mg d'extrait (Tableau 5).

Les flavonoïdes, ce sont des composés phénoliques naturels qui présentent une activité anti-inflammatoire, anticancéreuse, antiproliférative et antioxydante. Les flavonoïdes possèdent la chimie idéale pour une activité importante pour le piégeage des radicaux libres en raison de la présence d'une forte réactivité en tant que donneurs d'hydrogène ou d'électrons et d'une activité de chélation des métaux.

Également, les flavonoïdes sont connus par leurs activités protectives chez l'humain contre les effets des maladies coronariennes (Xiao et al., 2011). Selon Haddar et al., (2012), la teneur en flavonoïdes chez l'algue brune *Cystoseira Barbara* varie de 5 à 8 mg d'EQ/g d'extrait sec.

Cependant, les flavonoïdes sont considérés comme des inhibiteurs des enzymes impliquées dans la production des ERO. Il a été rapporté que les flavonoles quercétine, kaempferol, galangine, et le flavone apigénine sont des inhibiteurs des enzymes du cytochrome P450 impliqués dans la production des ERO (Sandhar et al., 2011).

2.3. L'activité antioxydante

Dans notre étude, nous avons testé le pouvoir antioxydant des algues par cinq tests chimiques en l'occurrence la capacité des composés à piéger des radicaux libres (DPPH, ABTS), la peroxydation des lipides (blanchissement de β -carotène), chélation des métaux de transition (Fe), CUPRAC et à tester le pouvoir réducteur de cuivre de différents extraits d'algues.

Tableau 6 : l'activité antioxydant des extraits par le test DPPH, β -carotène- acide linoléique, ABTS et chélation des métaux.

| | Test de DPPH IC ₅₀ (µg/mL) | Test d'ABTS ⁺ CI ₅₀ (µg/mL) | Test de β - carotène-acide linoléique CI ₅₀ (µg/mL) | Test de Fe ²⁺ Ferrin CI ₅₀ (µg/mL) | Test de CUPRAC (µg d'équivalents de Trolox / mg extrait) |
|-----------------------------------|--|--|---|--|---|
| <i>C. stricta</i> | 78,73 ± 1,1 | 113,4 ± 2,1 | 13,58 ± 1,2 | 198,9 ± 5,9 | 24,06 ± 0,02 |
| <i>C. humilis</i> | 121,1 ± 1,3 | 57,81 ± 1,3 | 27,58 ± 0,8 | 136,1 ± 4,4 | 12,98 ± 0,03 |
| <i>F. spiralis</i> | 47,23 ± 3,8 | 5,95 ± 0,6 | 13,25 ± 0,9 | 55,01 ± 1,9 | 55,24 ± 0,04 |
| <i>B. bifurcata</i> | 208,5 ± 1,4 | 130,6 ± 1,9 | 48,60 ± 3,2 | 45,22 ± 0,9 | 12,92 ± 0,03 |
| <i>G. sesquipedale</i> | 84,61 ± 3,9 | 44,46 ± 2,4 | 75,36 ± 3,6 | 83,73 ± 2,9 | 8,25 ± 0,01 |
| α -Tocopherol ^b | 12,26 ± 0,07 | 4,87 ± 0,56 | 2,10 ± 0,08 | NT | - |
| BHT ^b | 54,96 ± 0,99 | 4,10 ± 0,06 | 1,34 ± 0,09 | NT | - |
| Quercetine ^b | 2,07 ± 0,11 | 1,18 ± 0,03 | 1,80 ± 0,10 | 250,1 ± 0,07 | - |
| ETDA ^b | NT | NT | NT | 6,50 ± 0,07 | - |

NT= Non testé,

^a Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm standard erreur de trois mesures parallèles,

^b les standards

2.3.1. Test de DPPH

L'analyse du potentiel antioxydant par la technique de DPPH montre que les cinq extraits d'algues sont dotés d'un potentiel antioxydant avec un peu de différence entre les espèces (Tableau 6).

D'après les résultats représentés dans le Tableau, l'extrait éthanolique de *F. spiralis* possède une activité de piégeage du radical DPPH importante qui est estimé par une CI₅₀ (47.23 \pm 3.8 µg/mL) qui est un peu élevée que l'antioxydant standard BHT qui a montré une CI₅₀ (54.96 \pm 0.99 µg/mL). *F. spiralis* présente une meilleure activité qui est deux fois plus élevées que celles de *Gelidium sesquipedale* et *C. stricta*. Tandis que *C. humilis* et *B. bifurcata* présentent une activité plus faible avec une CI₅₀ égale à 121,1 \pm 1,3 et 208,5 \pm 1,4 µg/mL, respectivement, qui est inférieur à celle de *F. spiralis* (Tableau 2).

Le test de DPPH permet de tester la capacité des antioxydants solubles dans les milieux organiques. Dans notre étude, l'activité antiradicalaire la plus élevée est observée chez l'algue brune *F. spiralis* avec une activité inhibitrice meilleure que celle du contrôle positive BHT. Dans la littérature, des auteurs ont montré que les algues brunes possèdent une activité

importante de piégeage de DPPH par rapport aux autres espèces d'algues (**Paula B Andrade et al., 2013**).

Dans une autre étude, des auteurs ont trouvé que *F. spiralis* possède une meilleure activité antiradicalaire de DPPH avec une valeur de 1.15 ± 0.06 mmol trolox / g de matière sèche (**Peinado et al., 2014**). Ainsi, d'autres auteurs ont montré que les algues brunes en général possèdent une meilleure activité antiradicalaire de DPPH que les algues rouges, et les espèces du genre *Fucus* sont trouvés comme meilleures inhibiteurs du radical DPPH (**Jimenez-Escrig et al., 2001; Wang et al., 2009**).

2.3.2. Test ABTS

Concernant le test de l'ABTS, *F. spiralis* a montré également une activité importante de piégeage du radical $ABTS^{\cdot+}$. Avec une IC_{50} égale à $(5,95 \pm 0,6 \mu\text{g/mL})$, qui est comparable à ceux des antioxydants standards l'a-tocophérol ($4,87 \pm 0,56 \mu\text{g/mL}$) et le BHT ($4,10 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$). De plus, les extraits de *G. sesquipedale* et *C. humilis* montrent une meilleure activité inhibitrice d'ABTS avec IC_{50} égale à $57,81 \pm 1,3$ et $44,46 \pm 2,4 \mu\text{g/mL}$, respectivement, qui est inférieure à ceux de l'a-tocophérol, BHT et de la quercétine. Par contre, *B. bifurcata* et *C. stricta* présentent une activité antiradicalaire plus faible que celle de *Fucus spiralis* avec une IC_{50} égale à $113,4 \pm 2,1$ et $130,6 \pm 1,9 \mu\text{g/mL}$, respectivement (Tableau 6).

ABTS teste la capacité des antioxydants qui sont solubles dans les milieux lipophiles et hydrophiles. Un autre avantage par rapport au test DPPH est que l'ABTS teste également les composés qui présentent un encombrement stérique (**Demirkiran et al., 2013**). Dans la présente étude, la meilleure activité inhibitrice est observée chez *F. spiralis* avec une valeur comparable à celle des standards a-tocophérol et BHT.

Dans la littérature, l'extrait éthanolique de *Sargassum wightii* a montré une activité antiradicalaire ABTS plus élevée par rapport aux algues vertes et rouges (**Seenivasan and Indu, 2013**).

2.3.3. Test d'acide linoléique- β carotène

Concernant le test d'inhibition de l'oxydation couplée acide linoléique- β carotène, tous les extraits éthanoliques étudiés présentent une activité antioxydante remarquable avec une CI_{50} de $(75.36 \pm 3.6 \mu\text{g/mL})$, mais cette activité est faible par rapport à celle du standard l'a-tocophérol (2.10 ± 0.08), BHT ($1.34 \pm 0.09 \mu\text{g/mL}$) et de la quercétine ($1.80 \pm 0.10 \mu\text{g/mL}$).

Les deux algues *F. spiralis* et *C. stricta* présentent une activité d'inhibition de la peroxydation lipidique plus élevée avec une CI_{50} égale à $(13.25 \pm 0.9 \mu\text{g/mL})$ et $(13.58 \pm 1.2 \mu\text{g/mL})$ respectivement. Par contre, *Gelidium sesquipedale* a démontré la plus faible activité avec une CI_{50} qui est 6 fois inférieure à celle de *Fucus spiralis* (Tableau 6).

La teneur totale en caroténoïdes de *Fucus serratus* était d'environ 0,08% des cellules séchées extraites, et la fucoxanthine comprend environ 70% du caroténoïde total (**Liaaen-Jensen and Haugan, 1989**). Dans la présente étude, *F. spiralis* et *C. stricta* contient une teneur élevée en polyphénols avec une forte activité d'inhibition de la peroxydation lipidique. Ce résultat est en accord avec ceux rapportés par **Holdt and Kraan, (2011)**, ils ont rapporté que la teneur en fucoxanthine varie de 172 à 720 mg/kg de poids sec chez les algues brunes, avec une forte teneur chez l'algue brune *Fucus serratus*.

2.3.4. Test CUPRAC

Dans le test de CUPRAC, toutes les algues montrent une activité réductrice de cuivre. Pareillement que les résultats obtenus par le test DPPH et ABTS, *F. spiralis* présente une meilleure capacité antioxydante avec une valeur égale à $(55.24 \pm 0.04 \mu\text{g ETrolox} / \text{mg extrait})$. Par contre, l'algue rouge *G. sesquipedale* possède la plus faible activité avec une valeur égale à $(8.25 \pm 0.01 \mu\text{g ETrolox} / \text{mg extrait})$ qui est 6,7 fois inférieure à celle de l'algue brune *Fucus spiralis*. Tandis que, *Cystoseira humilis* et *Bifurcaria bifurcata* présente une activité antioxydante 4 fois plus faible que celle de *Fucus spiralis* avec une valeur égale à $(12.98 \pm 0.03$ et $12.92 \pm 0.03 \mu\text{g ETrolox} / \text{mg extrait})$ respectivement. Ainsi, *Cystoseira stricta* montre une activité 2 fois plus faible que celle de *Fucus spiralis* avec une valeur de $(24.06 \pm 0.02 \mu\text{g ETrolox} / \text{mg extrait})$.

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait de fucoïdane de l'algue brune *Padina distromatica* a montré une capacité importante de réduction de cuivre (**Paul, 2014**). Les capacités antioxydantes les plus élevées du test CUPRAC ont été observées pour certains acides phénoliques (**Apak et al., 2008**).

2.3.5. Test de chélation des ions ferreux

Les résultats de la capacité de chélation des ions ferreux ont montré que tous les extraits d'algues présentent une activité d'inhibition importante qui varie de $45,22 \pm 0,9$ à $198,9 \pm 5,9 \mu\text{g/mL}$, mais cette activité reste plus faible que celle du standards EDTA ($6,50 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$).

Par contre, tous les extraits testés présentent une meilleure capacité de chélation des ions ferreux que celle du contrôle positive quercétine ($250,1 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$).

L'extrait éthanolique de l'algue brune *B. bifurcata* montre une meilleure activité chélatrice des ions ferreux avec une CI_{50} ($45,22 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$). *F. spiralis* et *G. sesquipedale* présentent des activités inhibitrices une fois plus faible que celle de *B. bifurcata*. Ainsi, les algues brunes *C. humilis* et *Cystoseira stricta* montrent une activité inhibitrice qui est 3 et 4 fois respectivement plus faibles que celle de *B. bifurcata* (Tableau 6).

Dans notre étude, l'extrait éthanolique de *F. spiralis* présente une meilleure activité dans tous les tests d'activité antioxydante, sauf dans le test d'activité de chélation des métaux. Cela suggère que *F. spiralis* contient principalement des composés antioxydants lipophiles et de faible poids moléculaire en bonne quantité.

Dans la présente étude, l'algue brune *B. bifurcata* a montré une meilleure activité de chélation de métaux, bien qu'elle présente une activité relativement plus faible dans d'autres tests. La complexité chimique des extraits d'algues peut interférer de manière significative dans les activités biologiques des produits naturels (Nickavar and Esbati, 2012). Des résultats similaires ont été rapportés pour les extraits d'algues islandaises (*Palmaria palmata* et *Chondrus crispus*) qui présentent une forte activité de chélation des ions ferreux tandis que ceux qui présentent la faible teneur en polyphénols entraînent une activité de piégeage des radicaux libres DPPH plus faible (Wang et al., 2009).

Les polyphénols contribuent à l'inhibition de la formation des radicaux libres par la chélation de métaux de transition tels que le fer (Fe^{2+}) et le cuivre (Cu^+), qui sont essentiels pour de nombreuses fonctions physiologiques. Ils entrent notamment dans la composition des hémoprotéines et de cofacteurs d'enzymes du système de défense antioxydant (Fe pour la catalase et Cu pour le superoxyde dismutase).

2.4. L'activité inhibitrice des enzymes

Ces dernières années, l'inhibition des enzymes a attiré l'attention des scientifiques biomédicaux. Dans ce contexte, nous avons étudié le potentiel inhibiteur de certains enzymes (tyrosinase, uréase, l'acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase) par les extraits d'algues dans le but de trouver de nouveaux inhibiteurs de ressource marines, ce qui peut aider dans le traitement ou dans la prévention de certaines maladies.

Tableau 7 : l'activité inhibitrice d'Acétylcholinesterase, butyryl-cholinesterase, tyrosinase et uréase des algues étudiées ^a.

| Les extraits | Test d'AChE CI ₅₀ (µg/mL) | Test de BChE CI ₅₀ (µg/mL) | Test de Tyrosinase CI ₅₀ (µg/mL) | Test d'Uréase CI ₅₀ (µg/mL) |
|--------------------------|---|--|--|---|
| <i>C. stricta</i> | 83.11 ± 2.1 | 69.37 ± 1.9 | 28.11 ± 2.8 | 25.97 ± 1.9 |
| <i>C. humilis</i> | >200 | >200 | 84.08 ± 0.9 | 148.1 ± 4.8 |
| <i>F. spiralis</i> | 28.92 ± 1.8 | 11.7 ± 2.8 | 6.19 ± 0.4 | 10.96 ± 1.3 |
| <i>B. bifurcata</i> | 141.2 ± 1.3 | 177.2 ± 0.9 | >200 | 191.9 ± 5.1 |
| <i>G. sesquipedale</i> | >200 | >200 | >200 | >200 |
| Galantamine ^b | 0.005 ± 0.00 | 0.051 ± 0.00 | NT | NT |
| Acide Kojic ^b | NT | NT | 0.67 ± 0.06 | NT |
| L-Minosine ^b | NT | NT | 0.64 ± 0.04 | NT |
| Thiourea ^b | NT | NT | NT | 23.8 ± 0.2 |

Acétylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE)

^a Les valeurs sont exprimées en moyennes ± standard erreur de trois mesures parallèles).

^b les standards.

2.4.1. l'activité anticholinestérase

Dans cette étude, nous avons testé l'activité anticholinestérase des cinq algues. La galantamine a été utilisée comme contrôle positif pour comparer les résultats.

Parmi les extraits testés, l'algue brune *F. spiralis* présente l'extrait le plus actif pour les activités inhibitrices d'AChE et BChE avec CI₅₀ de l'ordre 28.92 ± 1.8 et 11.7 ± 2.8 µg/mL, respectivement. En comparaison avec le standard, tous les extraits testés montrent une activité moins importante à celle de la galantamine.

De même, l'algue brune *B. bifurcata*, qui a montré une meilleure activité de chélation, a montré également une bonne activité anticholinestérase. En revanche, *C. stricta* possède une meilleure activité inhibitrice AChE et BChE avec CI₅₀ de l'ordre 83.11 ± 2.1 et 69.37 ± 1.9, respectivement, qui est inférieur à celle de *F. spiralis*. Par contre, les autres algues étaient inactives contre les deux enzymes (Tableau 7).

L'acétylcholinestérase (AChE) est un enzyme responsable de la métabolisation de l'acétylcholine. Cependant, l'inhibition de ce neurotransmetteur va engendrer une diminution

du turn-over de l'acétylcholine et donc augmenter les effets cholinergiques. L'inhibition de l'enzyme acétylcholinestérase (AChE), qui catalyse la dégradation de l'ACh, est considérée comme une approche thérapeutique utile pour le traitement symptomatique de la maladie d'Alzheimer (**Pangestuti and Kim, 2011**).

Dans la Maladie d'Alzheimer (MA), les cellules nerveuses se détériorent progressivement, surtout celles qui produisent de l'acétylcholine. Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase sont utilisés pour diminuer les symptômes de la maladie d'Alzheimer. Leur action donc diminue l'activité de l'acétylcholinestérase et favorise l'élévation de la concentration d'acétylcholine dans le cerveau.

Il a été rapporté que les composés antioxydants ont la capacité d'inhiber les enzymes acétylcholinestérase et butyryl-cholinestérase (**Atta-ur-Rahman and Choudhary, 2001; Moodie et al., 2019**).

Dans la présente étude, les résultats montrent que *F.spiralis*, *B.bifurcata* et *C.stricta* possèdent des composés anticholinestérases importantes, qui pourraient être utilisés comme des agents thérapeutiques pour la maladie d'Alzheimer. Dans une autre étude, il a été rapporté que les algues d'Afrique du Sud ont montré une activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase, parmi lesquels les extraits de *Dictyota humifusa* qui ont montré une efficacité importante pour inhiber l'AChE (**Stirk et al., 2007**).

Selon les résultats de **Custodio et al., (2016)**, ils ont montré que les deux algues *Cystoseira tamariscifolia* et *Cystoseira nodicaulis* ont une forte activités anticholinestérases (**Custodio et al., 2016**). Le screening de l'activité inhibitrice de l'AChE et de la BChE sur différents extraits éthanoliques des algues a montré que les extraits de *Cystoseira usneoides* et *Fucus spiralis* sont de puissants inhibiteurs des cholinestérase (**Paula B. Andrade et al., 2013**).

Les algues *Ecklonia maxima*, *Ecklonia stolonifera* et *Ishige okamurae* ont été également considérés comme des sources des inhibiteurs de l'AChE (**Rengasamy R.R. Kannan et al., 2013; Yoon et al., 2008; W.-J. Yoon et al., 2009**).

2.4.2. Activité inhibitrice de la tyrosinase

D'après le Tableau 7, on constate que toutes les algues montrent une activité inhibitrice de la tyrosinase Sauf *B. bifurcata* et *G.sesquipedale*. *F. spiralis* présente l'activité inhibitrice la plus élevée avec CI_{50} de l'ordre 6.19 ± 0.4 , qui est inférieure à celles des standards l'acide cojique et L-Minosine (0.67 ± 0.06 0.64 ± 0.04 $\mu\text{g/mL}$), respectivement (Tableau 7).

De même, *C. stricta* et *C. humilis* présentent également une activité inhibitrice de la tyrosinase avec CI_{50} de 28.11 ± 2.8 et $84.08 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$, respectivement, qui est inférieur à celle de *F. spiralis* et standards.

L'enzyme tyrosinase est un polyphénol oxydase qui contient du cuivre. Il conduit à la formation de la mélanine, c'est un pigment joue un rôle primordial dans la prévention des organismes contre des propagations des radicaux libres et les effets néfastes des rayonnements. Les tyrosinases jouent un rôle important dans le traitement de l'hyperpigmentation et d'autres maladies liés à la peau.

Cependant, des produits cosmétiques qui inhibent l'enzyme tyrosinase en empêchant hyperpigmentation de la peau ont été extraits à partir des algues. Des extraits purs riche en zéaxanthine extraite à partir de *Nannochloropsis oculata* ont été breveté pour être utilisé dans les crèmes (Babitha and kim, 2011). Ainsi, il a été rapporté que la fucoxanthine isolée de *Laminaria japonica* inhibe la mélanogénèse chez la souris irradiée aux UV-B (Thomas and Kim, 2013).

Les inhibiteurs de la tyrosinase sont utilisés comme agent de blanchissement dans les produits cosmétiques et dans les traitements cliniques de la peau (Shiino et al., 2001). Il a été rapporté que les composés piègeur les radicaux libres DPPH tels que certains flavonoïdes et hydroxybenzènes inhibent l'enzyme tyrosinase (Momtaz et al., 2008).

De plus, les produits marins ont été utilisés dans les produits cosmétiques et pharmaceutiques (Kim et al., 2017). Dans cette étude, *F. spiralis* est l'algue la plus active contre l'enzyme tyrosinase. Dans une autre étude, les extraits méthanoliques des algues brunes *Cystoseira tamariscifolia* et *Cystoseira nodicaulis*, inhibent fortement la tyrosinase (Custodio et al., 2016). Le 7-phloroecol et le dieckol isolés des algues brunes *Ecklonia cava* ont montré une activité inhibitrice de la tyrosinase supérieure à celles des inhibiteurs standards comme l'arbutine et l'acide kojique (Heo et al., 2009; N. Y. Yoon et al., 2009).

2.4.3. Activité inhibitrice de l'uréase

Dans cette étude, nous avons testé l'activité inhibitrice de l'uréase. Le Tableau 7 présente l' IC_{50} des cinq extraits d'algues comparé à celle de contrôle positif Thiourea (Tableau 7).

D'après les résultats indiqués dans le Tableau 7, on peut noter que *F. spiralis* et *C. stricta* montre une bonne activité inhibitrice de l'uréase qui présente les valeurs des IC_{50} de l'ordre de 10.96 ± 1.3 et $25.97 \pm 1.9 \mu\text{g/mL}$, respectivement, *F. spiralis* présente une activité 2 fois plus élevée à

celle du standard thiourea. Cependant, une activité modérée a été observée chez *C. humilis* et *B. bifurcata* avec des IC₅₀ de l'ordre de 148.1 ± 4.8 et 191.9 ± 5.1 µg/mL, respectivement.

L'uréase bactérienne a été rapportée comme un facteur de virulence. C'est un enzyme contiens de nickel qui catalyse l'hydrolyse de l'urée en ammoniac et en carbamate, ce dernier se décompose rapidement et spontanément produisent une seconde molécule d'ammoniac, ces réactions peuvent provoquer une augmentation significative du pH qui est responsable des effets néfastes sur la santé humaine.

Les inhibiteurs de l'uréase jouent un rôle vital pour contrer l'effet négatif de l'uréase dans l'organisme vivant, ils peuvent protéger l'organisme contre plusieurs infection causé par la sécrétion de cet enzyme par *Helicobacter pylori* qui comprend des syndromes gastrique et urinaire et peut conduire à un cancer de l'estomac (**Mobley and Hausinger, 1989**). En effet, la recherché de nouveaux inhibiteurs d'uréase est devenue plus attrayante pour traiter ou prévenir les maladies induites par l'uréase. Les algues brunes contiennent des polysaccharides sulfatés (composés de fucoïdane) qui sont des substances naturelles inhibant l'uréase pendant l'infection avec *Helicobacter pylori* (**Ayala et al., 2014**).

2.5. Identification des composés phénoliques par LC-MS/MS

L'identification des composés phénoliques dans les extraits éthanoliques des cinq algues a été effectuée en comparant les temps de rétentions à ceux des standards authentiques.

Vingt-sept composés organiques ont été recherchés dans les extraits éthanoliques des cinq algues étudiés par LC-MS / MS. D'après le Tableau 8, on constate que l'acide quinique est le composé détecté dans toutes les algues étudiées. Leur concentration varie entre 8535 et 415094,45 mg / g.

De plus, l'hespéridine et l'acide malique ont également été détectés dans tous les échantillons avec des valeurs égale à 67,42 à 73,48 mg / g et 366,4 à 616,9 mg / g, respectivement. De même, l'acide fumarique, l'acide gallique, l'acide protocolatéchuique et l'acide 4- hydroxybenzoïque ont été également détectés dans certaines algues.

D'après les résultats de LC-MS / MS, l'acide quinique est le principal composant de *F. spiralis* et *G. sesquipedale* avec un rendement de 40% par rapport au extrait.

Il est a noté que *F. spiralis* est le plus actif et que *G. sesquipedale* a une activité relativement faible. Alors, l'acide quinique n'est probablement pas responsable de l'activité de l'algue.

De même, l'acide malique n'est probablement pas responsable de l'activité des algues. Le troisième composé commun pour toutes les algues est l'hespéridine, qui est connue comme un antioxydant puissant avec diverses activités biologiques. Alors, leur rendement est très faible (> 0,01 %) (Tableau 8).

Tableau 8 : l'identification et quantification des composés phénoliques des extraits éthanoliques d'algues par LC-MS/MS

| Les composés | Le temps (minut e) | Parent ion (m/z) ^a | MS2 (Collision energy) ^b | µg analyte /g d'extrait | | | | |
|-----------------------------|--------------------|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|
| | | | | <i>C. stricta</i> | <i>C. humilis</i> | <i>F. spiralis</i> | <i>B. bifurcata</i> | <i>G. sesquipedle</i> |
| L'acide quinique | 1,13 | 191,0 | 85 (22), 93 (22) | 8535 | 12762,04 | 415094,45 | 59340,49 | 412594,82 |
| L'acide malique | 1,23 | 133,1 | 115 (14), 71 (17) | 468,3 | 590,1 | 366,4 | 450,4 | 616,9 |
| L'acide fumarique | 1,48 | 115,0 | 71,4 | ND | 16,33 | ND | ND | ND |
| L'acide gallique | 3,00 | 169,1 | 125 (14), 79 (25) | ND | 20,73 | ND | ND | 10,98 |
| L'acide protocatéchuique | 4,93 | 153,0 | 109 (16), 108 (26) | 6,333 | ND | ND | ND | ND |
| L'acide 4-Hydroxy-benzoïque | 7,39 | 137,0 | 93, 65 | 25,11 | 146,3 | 56,58 | ND | ND |
| L'hespéridine | 12,67 | 611,1 | 303, 465 | 73,48 | 67,02 | 66,41 | 70,35 | 62,47 |

^a Ion parent (m / z): ions moléculaires des composés standards, rapport (masse / charge)..

^b MS2 (CE): fragments de MRM pour les ions moléculaires apparentées (CE se réfère à des énergies de collision connexes des ions fragments)

ND : Non déterminé

Pour approfondir le profil phénolique des algues marocaines, les extraits ont été analysés par LC-MS/MS. Les principaux composants des extraits éthanoliques étaient l'acide quinique, l'hespéridine et l'acide malique.

Les composés phénoliques provisoirement identifiés à partir de l'extrait éthanolique dans la présente étude sont conformes à ceux rapportés dans la littérature. Il a été rapporté que les acides phénoliques des algues brunes *Ascophyllum nodosum*, *Bifurcaria bifurcata* et *Fucus vesiculosus* d'Espagne étaient principalement des composés de dérivés d'acide quinique (Agregán et al., 2017).

Les extraits éthanoliques de *Fucus vesiculosus* et *Fucus serratus* contiennent des traces d'acide

chlorogénique. Les extraits aqueux de toutes les espèces de *Fucus* ne contiennent ni acide p-hydroxybenzoïque ni acide syringique (Sabeena Farvin and Jacobsen, 2013). Les algues marines rouges et brunes sont une source importante en métabolite secondaire bioactive, y compris les phénols et les polyphénols (Li et al., 2009). Les algues brunes contiennent des phlorotannins, des flavonoïdes et des tanins condensés tels que la fucoxanthine, le phloroglucinol, le fucoïdane (Thomas and Kim, 2013; Pádua et al., 2015). Les algues rouges contiennent des polysaccharides sulfatés comme des constituants principaux (Rodriguez-jasso et al., 2014; Fleita et al., 2015).

Dans la littérature, des auteurs ont identifié le profil antioxydant dans différentes algues rouges et vertes récoltés de la cote sud-africaines, et ils ont trouvé une série de composés polyphénoliques tels que les acides m-hydroxybenzoïque, protocatéchique et p-hydroxybenzoïque (Rengasamy et al., 2015).

De même, il est rapporté que plusieurs composés phénoliques, en particulier les acides férulique, salicylique, coumarique, syringique, vanillique, gallique, caféique, chlorogénique et p-hydroxybenzoïque ont été identifiés dans 16 algues (Fernando et al., 2016).

Dans la présente étude, l'algue rouge *G. sesquipedale* contient une grande quantité d'acide malique, qui permet leur utilisation comme une nouvelle source potentielle d'acide malique.

Alors, les composés identifiés à l'aide de l'instrument LC-MS/MS sont insuffisantes pour expliquer les activités testées dans la présente étude. Cependant, d'autres études, en particulier le fractionnement guidé par bioactivité, sont nécessaires pour comprendre l'origine de l'activité de ces algues.

II. Etude *in-vitro* sur le protozoaire *T. pyriformis*

1. Extraction par solvant de polarité croissante

L'utilisation des solvants de polarité croissante, permet de fractionner les métabolites secondaires de l'extrait brut pour déduire la fraction responsable de l'effet antioxydant.

Pour évaluer le potentiel protecteur des algues contre le stress oxydatif induit par H₂O₂, plusieurs extraits ont été préparés à partir des cinq algues. Sur ces extraits (60 extraits), différentes méthodes chimiques ont été réalisés afin de déterminer la teneur en métabolite secondaire et d'évaluer le potentiel antioxydant. Les extraits qui possèdent une teneur en polyphénols et flavonoïdes plus élevée, avec une activité antioxydante importante sont choisis pour évaluer l'effet protecteur contre le stress oxydatif induit par H₂O₂ *in vitro*.

2. Teneur en métabolites secondaires

Le Tableau ci-dessous résume les résultats obtenus des teneurs en phénols totaux et flavonoïdes. La teneur en polyphénols totaux est exprimée en μg d'équivalent d'acides gallique par mg d'extrait ou de fraction. La teneur en flavonoïdes totaux est exprimée en μg d'équivalent de quercétine par mg d'extrait ou de fraction.

Tableau 9 : Teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes des extraits bruts et ses fractions des cinq espèces d'algues étudiés ^a.

| | Extrait brute | n-Hex | CHCl ₃ | EtOAc | n-but | Aqueus |
|--|---------------|-------------|-------------------|---------------------|------------|------------|
| La teneur en polyphénols ^b | | | | | | |
| <i>B. bifurcata</i> | 6,67±0,98 | 9,35±1,10 | 41,71±1,49 | 16,71±0,75 | 10,04±2,01 | 11,91±1,94 |
| <i>C. stricta</i> | 43,33±8,23 | 25,02±2,86 | 48,23±2,31 | 381,33±10,81 | 18,01±2,16 | 5,19±0,27 |
| <i>C. humilis</i> | 5,45±0,19 | 11,17±1,67 | 35,93±2,63 | 11,13±2,46 | 5,58±0,71 | 8,23±0,52 |
| <i>F. spiralis</i> | 60,69±8,23 | 61,95±2,78 | 65,76±0,90 | 429,81±9,36,81±9,36 | 45,24±0,59 | 21,43±3,32 |
| <i>G. sesquipedale</i> | 9,44±1,00 | 12,99±7,11 | 15,02±2,49 | 61,52±6,88 | 7,79±1,42 | 13,12±1,92 |
| La teneur en flavonoïdes ^c | | | | | | |
| <i>B. bifurcata</i> | 13,47±0,63 | 46,09±3,93 | 73,98±2,67 | 28,03±0,36 | 7,87±0,47 | 12,24±0,36 |
| <i>C. stricta</i> | 22,16±0,20 | 127,32±0,45 | 74,18±2,22 | 34,7±0,24 | 12,32±0,54 | 10,49±0,72 |
| <i>C. humilis</i> | 12±0,47 | 94,02±0,58 | 35,37±0,66 | 30,21±0,41 | 14,74±1,03 | 12,08±0,59 |
| <i>F. spiralis</i> | 25,02±0,54 | 136,37±0,24 | 111,92±3,93 | 43,98±0,41 | 7,4±0,24 | 7±0,77 |
| <i>G. sesquipedale</i> | 20,61±0,59 | 81,6±0,36 | 60,53±1,15 | 5,41±0,44 | 7,79±0,59 | 7,79±0,56 |

^aLes valeurs sont exprimées en moyennes \pm standard erreur de trois mesures parallèles ($p < 0,05$).

^b GAE: équivalents d'acide gallique.

^c EQ: équivalents de quercétine.

2.1. Teneur en polyphénols

D'après le Tableau ci-dessus, on constate que les teneurs les plus élevées en composés phénoliques ont été trouvées dans les fractions EtOAc et CHCl₃ de *F. spiralis* et *C. stricta* avec des valeurs égales à ($429,81 \pm 9,36$; $65,76 \pm 0,90$ μg GAE / mg d'extrait) et ($381,33 \pm 10,81$; $48,23 \pm 2,31$ μg GAE / mg d'extrait), respectivement (Tableau 9).

Les teneurs les plus faibles en composés phénoliques ont été observées dans les fractions n-butanol et aqueux de *C. Stricta*, *G. sesquipedale*, *C. humilis* et *B. bifurcata* qui varient de $5,19 \pm 0,27$ à $18,01 \pm 2,16$ μg GAE / mg d'extrait. Par contre, *F. spiralis* a montré des quantités plus élevées en polyphénols totaux dans la fraction n-butanol ($45,24 \pm 0,59$ μg d'extrait GAE / mg) par rapport à d'autres espèces (Tableau 9).

D'après la littérature, la fraction méthanolique de *F. spiralis* a montré une teneur en polyphénols plus élevée par rapport aux fractions du méthanol et dichlorométhane de vingt-sept espèces d'algues (Pinteus et al., 2016).

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature, les algues brunes contiennent principalement des composés polyphénoliques dans les solvants organiques comme EtOAc et le dichlorométhane (Chernane et al., 2014).

Il a été rapporté que la fraction dichlorométhane de *F. spiralis* et la fraction EtOAc de *B. bifurcata* présentent des teneurs phénoliques plus élevées (29,79 et 24,44 mg d'équivalent d'acide gallique / g d'extrait sec, respectivement) par rapport aux extraits bruts et à ses fractions. Cependant, la richesse de la fraction EtOAc en composés phénoliques est probablement associée à sa polarité qui permet l'accumulation d'une variété de composés antioxydants.

Des études antérieures ont rapporté que toutes les espèces de *Fucus* testées ont montré une teneur élevée en polyphénols totaux (Sabeena Farvin and Jacobsen, 2013).

Cette richesse en composés phénolique peut être due à leur teneur élevée en phlorotannins, qui sont des polymères de phloroglucinol entièrement dérivés de l'acétate. Les phlorotannins sont limités aux algues brunes (Phaeophyceae), ils se trouvent à l'intérieur de la cellule dans des vésicules spéciales (physodes) (Ragan and Jamieson, 1982; Zilberg and Sinai, 2006).

2.2. Teneur en flavonoïdes

La concentration des flavonoïdes dans différents extraits a été exprimée en microgrammes d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait ou de fraction ($\mu\text{g QE} / \text{mg}$ d'extrait ou de fraction), comme indiqué dans le Tableau 9.

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques naturels, ils sont bien connus par leurs effets antioxydants puissants. Ces composés jouent un rôle important dans la neutralisation et stabilisation des radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle fortement réactif. De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des activités antioxydantes et des effets bénéfiques sur la nutrition et la santé humaine (Xiao et al., 2011; Maheswari et al., 2016).

D'après le Tableau 9, *F. Spiralis* présente une teneur plus élevée en flavonoïdes suivies par *C. stricta*, *G. sesquipedale*, *C. humilis* et *B. bifurcata*. Toutes les fractions de n-hexane et chloroforme possèdent des teneurs plus élevées en flavonoïdes que les autres fractions.

De plus, *F. spiralis* présente une teneur en flavonoïdes plus élevée dans les fractions de n-hexane et de chloroforme avec des valeurs égales à $136,37 \pm 0,24$ et $111,92 \pm 3,93$ $\mu\text{g QE} / \text{mg}$ d'extrait, respectivement.

Cependant, les résidus aqueux et les fractions n-butanol de toutes les espèces présentent généralement des teneurs faibles en flavonoïdes. La forte teneur en flavonoïdes dans la fraction n-hexane a été précédemment expliquée par la présence de carotènes et d'autres pigments à longues chaînes hydrocarbonés (**Gupta and Abu-Ghannam, 2011**).

Des études antérieures ont montré que le changement de la polarité des extractants modifie son efficacité à extraire un groupe spécifique de composés antioxydants et influence sur les propriétés antioxydantes des extraits (**Marinova and Yanishlieva, 1997; Zhou and Yu, 2004**).

Dans d'autres études, l'extraction des algues par acétate d'éthyle et chloroforme a donné des teneurs plus élevées en polyphénols et en flavonoïdes que l'extraction par l'eau et le méthanol, ce qui indique une affinité plus élevée pour les antioxydants lipophiles que les hydrophiles (**Murugan and Iyer, 2014**).

3. Activités antioxydantes des extraits et ses fractions

Dans cette étude, l'activité antioxydante des différents extraits obtenus à partir des cinq espèces d'algues et le standard BHT a été évaluée par quatre tests complémentaires, à savoir ABTS, DPPH et le test FRAP qui mesure le pouvoir de réduction des ions de fer.

Tableau 10 : l'activité antioxydante des extraits bruts et ses fractions des cinq espèces d'algues par le test FRAP, DPPH et ABTS.

| | Les espèces d'algues | FRAP ^a | DPPH ^b | ABTS ^c |
|-------------------------|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Méthanol | <i>B. bifurcata</i> | 11,06±0,20 | 861,82±0,77 | 1174,99±8,55 |
| | <i>C. stricta</i> | 17,66±0,28 | 666,34±0,74 | 776,07±1,30 |
| | <i>C. humilis</i> | 11,4±0,5 | 830,21±3,69 | 1062,40±13,95 |
| | <i>F. spiralis</i> | 59,03±1,05 | 355,29±0,12 | 627,89±3,25 |
| | <i>G. sesquipedale</i> | 5,06±0,58 | 1490,82±0,47 | 783,45±22,67 |
| Hexane | <i>B. bifurcata</i> | 22,73±0,51 | 442,33±5,22 | 1646,73±17,26 |
| | <i>C. stricta</i> | 68,8±0,34 | 347,52±8,44 | 1075,54±8,80 |
| | <i>C. humilis</i> | 1±0,36 | 342,67±0,20 | 1135,81±1,98 |
| | <i>F. spiralis</i> | 73,46±2,05 | 175,34±1,01 | 1125,39±34,84 |
| | <i>G. sesquipedale</i> | 6,76±0,61 | 1326,38±1,93 | 1134,66±1,98 |
| CHCl₃ | <i>B. bifurcata</i> | 12,63±0,45 | 647,75±0,63 | 1317,17±0,02 |
| | <i>C. stricta</i> | 10,36±0,20 | 165,92±2,63 | 537,94±3,60 |
| | <i>C. humilis</i> | 18,76±0,41 | 217,88±1,08 | 1101,65±27,60 |
| | <i>F. spiralis</i> | 117,66±0,40 | 55,48±0,20 | 219,82±5,47 |
| | <i>G. sesquipedale</i> | na | 1341,36±1,22 | 560,58±24,43 |
| EtOAc | <i>B. bifurcata</i> | 41,2±0,36 | 447,20±3,60 | 1025,48±1,82 |
| | <i>C. stricta</i> | 208,76±0,32 | 85,47±2,22 | 395,50±12,05 |
| | <i>C. humilis</i> | 32,16±0,51 | 145,93±2,59 | 831,44±7,27 |
| | <i>F. spiralis</i> | 261,53±5,40 | 49,51±3,29 | 50,73±2,62 |
| | <i>G. sesquipedale</i> | 4,33±0,76 | 1043,61±0,68 | 475,93±3,89 |
| N-But | <i>B. bifurcata</i> | 10,3±0,8 | 1074,07±0,64 | 1241,06±16,67 |
| | <i>C. stricta</i> | 0,43±0,20 | 1155,79±1,33 | 1181,28±7,34 |
| | <i>C. humilis</i> | 8,83±0,15 | 716,06±0,57 | 1748,00±5,08 |
| | <i>F. spiralis</i> | 34,4±0,91 | 529,32±3,68 | 977,94±1,75 |
| | <i>G. sesquipedale</i> | SA | 1752,45±7,44 | 1909,96±26,53 |
| Aqueux | <i>B. bifurcata</i> | 8,33±0,64 | 1165,78±9,32 | 3242,12±0,31 |
| | <i>C. stricta</i> | SA | 1526,87±0,54 | 2420,68±32,51 |
| | <i>C. humilis</i> | SA | 2368,11±0,22 | 2730,50±0,88 |
| | <i>F. spiralis</i> | 26,46±0,96 | 1427,59±0,34 | 1621,94±0,89 |
| | <i>G. sesquipedale</i> | SA | 2167,79±4,90 | 2015,12±0,12 |
| | BHT | NT | 54,96 ± 0,99 | 4,10 ± 0,06 |

Les valeurs IC₅₀ représentent les moyennes ± S.D. de trois mesures parallèles (p < 0,05)

^a Pouvoir réducteur de fer ferrique (µg équivalent acide ascorbique / mg d'extrait ou fraction)

^b 2,2- 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (IC₅₀ mg / mL)

^c 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique) (CI₅₀ mg / mL)

BHT: hydroxytoluène butylé

Nt: Non testé

SA: Sans activité

3.1. Réduction de fer

D'après le Tableau 10, on remarque que la capacité de réduction de fer diffère entre les extraits bruts et ses fractions. Les valeurs de FRAP des extraits bruts et ses fractions des cinq algues varient de 0,43 ± 0,002 à 261,53 ± 0,054 µg d'AscAE / mg d'extrait ou fraction. La capacité de

réduction de fer la plus élevée a été trouvée pour l'acétate d'éthyle, le chloroforme et le n-hexane de *F. spiralis* avec des valeurs de CI_{50} égale à $261,53 \pm 0,05$, $117,66 \pm 0,004$ et $73,46 \pm 0,020$ $\mu\text{g d'AscAE} / \text{g d'extrait}$, respectivement. Cependant, les résidus aqueux possèdent des valeurs FRAP les plus faibles par rapport aux autres fractions (Tableau 10).

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par (Jimenez-Escrig et al., 2001; O'Sullivan et al., 2013) qui ont montré que les espèces fucus présentent une activité de réduction de fer plus élevée par rapport aux autres espèces. Kelman et al.,(2012) ont évalué l'activité antioxydante de réduction de fer de 30 espèces d'algues hawaïennes, et ils ont trouvé que les algues brunes présentent une capacité de réduction de fer plus élevée que les algues rouges.

D'après ces résultats, on peut dire que les fractions EtOAc et CHCl_3 de *F. spiralis* ont la capacité de réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} , ce qui indique leur capacité d'inhibition de la peroxydation lipidique initiée par les ions de métaux de transition, tels que Fe^{3+} et Cu^{2+} dans les aliments et tissus humains.

Tierney et al., (2013b), ont également évalué l'activité antioxydante réductric de fer par le test FRAP dans les fractions de trois algues brunes (*Ascophyllum nodosum*, *Pelvetia canaliculata* et *Fucus spiralis*) de la côte irlandaise, et ils ont trouvé une augmentation significative de l'activité dans la fraction de *F. spiralis* avec IC_{50} égale à $559,96 \pm 26,69$ $\mu\text{g d'équivalents trolox} / \text{mg d'échantillon}$.

Les algues marines sont exposées à des périodes prolongées d'ultraviolets intenses et à des concentrations élevées en oxygène, ce qui conduit facilement à la formation des radicaux libres et d'autres espèces réactives de l'oxygène (Dykens et al., 1992; Mole Megha, N.; Sabale Anjali, 2013; Shanab et al., 2011). L'exposition des algues à long terme aux conditions environnementales difficiles permet aux algues de produire des enzymes et molécules antioxydantes puissantes qui peuvent agir comme des piègeurs de radicaux oxygénés (Munir et al., 2013; Sabeena Farvin and Jacobsen, 2013; Shanab et al., 2011).

3.2. Le piégeage du radical libre DPPH

Les résultats du pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'extrait méthanolique et ses fractions des cinq algues sont illustrés dans le Tableau 10. Il est à noter que la valeur CI_{50} de piégeage du radical DPPH diffère considérablement entre les espèces d'algues et les solvants utilisés.

D'après le Tableau 10, on constate que l'activité de piégeage du radical DPPH des cinq extraits d'algues varie de $49,51 \pm 3,29$ à $2167,79 \pm 4,90$ $\mu\text{g} / \text{mL}$ de fraction ou d'extraits. En général,

l'activité de piégeage du radical DPPH la plus élevée a été trouvée dans la fraction EtOAc et CHCl₃ de *F. spiralis* avec CI₅₀ égale à (49,51 ± 3,29 et 55,48 ± 0,20 µg / mL, respectivement, suivie par les fractions EtOAc et CHCl₃ de *C. stricta* avec CI₅₀ égale à 85,47 ± 2,22 et 165,92 ± 2,63 µg / mL, respectivement.

Par contre, l'activité de piégeage du radical DPPH la plus faible a été observée dans l'extrait méthanolique et ses fractions de *G. sesquipedale* avec des CI₅₀ allant de 1043,61 ± 0,68 à 2167,79 ± 4,90.

Comparativement à la littérature, des auteurs ont rapporté que les fractions polaires (acétate d'éthyle et dichlorométhane) des algues contiennent des pourcentages plus élevés en contenu phénoliques et présentent un fort potentiel antiradicalaire du DPPH (**Chakraborty et al., 2013; Zubia et al., 2009**).

Il a également été démontré que les solvants utilisés pour l'extraction influencent considérablement sur la composition chimique des extraits (**Yuan et al., 2005**). **Paula B Andrade et al., (2013)** ont évalué la capacité antioxydante de plusieurs algues, et ils ont constaté que les algues brunes possèdent l'activité de piégeage des radicaux la plus puissante.

Dans la présente étude, la forte activité antioxydante de piégeage du radical DPPH des deux fractions peut être due aux fortes teneurs en composés polyphénoliques, ces dernières agissent comme des donneurs d'électrons ou hydrogène pour neutraliser les radicaux libres.

Plusieurs travaux affirment qu'il existe une corrélation positive entre la teneur en polyphénols totaux et l'activités antioxydante dans différents extraits d'algues, en particulier avec l'activité de piégeage du radical DPPH (**Chakraborty et al., 2013; Ganesan et al., 2011; Pinteus et al., 2016**).

3.3. Activité antiradicalaire ABTS

Les résultats présentés dans le Tableau 10 montrent les CI₅₀ de piégeage du radical ABTS des différents extraits et fractions. Il est à noter que la valeur CI₅₀ de piégeage de radical ABTS diffèrent considérablement entre les espèces d'algues et les solvants utilisés.

L'activité de piégeage du radical ABTS des cinq algues varie de 50,73 ± 2,62 à 3242,12 ± 0,31 µg / mL d'extrait ou de fraction. Alors pour l'extrait brute méthanolique, on note que l'activité antioxydante varie de 627,89 ± 3,25 à 1174,99 ± 8,55 µg / mL, ce qui est inférieur aux fractions purifiées (Tableau 10).

D'après les résultats indiqués dans le Tableau 10, on constate que l'extrait méthanolique de *F. spiralis* présente l'activité antioxydante la plus élevée avec IC₅₀ égale à (627,89 ± 3,25 µg /mL), suivie par l'extrait métanolique de *C. stricta* avec IC₅₀ égale à C50 (776,07 ± 1,30 µg/mL) et l'extrait métanolique de *G. sesquipedal* avec IC₅₀ égale à C50 (783,45 ± 22,67 µg/mL).

Parmi toutes les espèces testées, les fractions acétate d'éthyle et chloroforme de *F. spiralis* possèdent une forte activité de piégeage du radical ABTS avec CI₅₀ égale à (50,73 ± 2,62 et 219,82 ± 5,47 µg/mL, respectivement), suivies par les fractions d'acétate d'éthyle et chloroforme de *C. stricta* avec CI₅₀ égale à (395,50 ± 12,05 et 537,94 ± 3,60 µg/mL, respectivement).

De plus, l'extrait méthanolique et ses fractions de *B. bifurcata* présentent la plus faible activité de piégeage de radical ABTS. Ainsi, Les fractions aqueuses, n-butanol et n-hexane de toutes les espèces d'algues ont montré la plus faible activité. En général, les activités antioxydantes les plus élevées ont été trouvées dans les fractions purifiées que les extraits bruts méthanoliques.

Ces résultat sont en accord avec ceux obtenus par **Audibert et al., (2010)**, qui ont mesuré de piégeage de radical ABTS des différents extraits d'*Ascophyllum nodosum*, et ils ont trouvé que les extraits brutes n'étaient pas efficaces que les fractions purifiés.

De nombreux chercheurs ont montré que les composés phénoliques extraits à partir des algues marines présentent une activité chélatrice de radicaux puissante (**Chakraborty et al., 2013; Matanjun et al., 2008**).

En raison du contenu élevé en composés phénoliques et la capacité antioxydante importante des fractions EtOAc et CHCl₃, ces fractions sont choisie pour l'évaluation de leur effet protecteur contre la cytotoxicité induite par le H₂O₂ chez le protozoaire *T. pyriformis*.

4. Evaluation de l'effet protecteur de *F. spiralis*

4.1. Caractérisation de la cytotoxicité de H₂O₂

Le protozoaire *T. pyriformis* est une cellule eucaryote qui est bien établie comme modèle approprié pour les cellules animales, en particulier les mammifères. Il est largement utilisé comme système modèle en physiologie et biochimie. Le protozoaire *T. pyriformis*, Il est largement utilisés dans les études de toxicité dans les domaines environnementaux et pharmaceutiques, la morphogenèse, la cartographie génétique et la division cellulaire (**Nanney and Simon, 1999; Wheatley et al., 1994**).

La détermination de l'IC₅₀ est un indicateur quantitatif de la toxicité d'une substance. Cet indicateur permet la mesure de la concentration en H₂O₂ causant la mort de 50% des cellules de *T. pyriformis* cultivé dans le PPYG, et ce après 24 h de traitement. Nous avons choisi de favoriser le stress oxydatif en utilisant le H₂O₂, car il est relativement stable et permet ainsi d'induire un stress oxydatif aux cellules.

La détermination de CI₅₀ est obtenue après incubation des cellules avec différentes concentrations de H₂O₂ allant de 100 à 500 µM. La cytotoxicité est évaluée chez *T. pyriformis* par l'utilisation de dénombrement cellulaire et le test MTT.

Les résultats de la (Figure 26) montrent que le traitement avec H₂O₂ entraîne une diminution significative de la viabilité cellulaire (Figure 26b) ($p < 0,05$) et le nombre de cellules vivants (Figure 26a). La concentration 300 µM de H₂O₂ est la concentration qui inhibe 50 % de la croissance de *T. pyriformis* cultivée dans le PPYG après 24 h de traitement.

Le traitement avec 300 µM de H₂O₂ a produit une diminution significative de la viabilité cellulaire avec 52 % ($p < 0,01$) et le nombre de cellules avec 48% après 24 h de traitement. Au-delà de la concentration 300 µM, le nombre de cellule du *T. pyriformis* cultivé dans le PPYG est très réduit (Figure 26b).

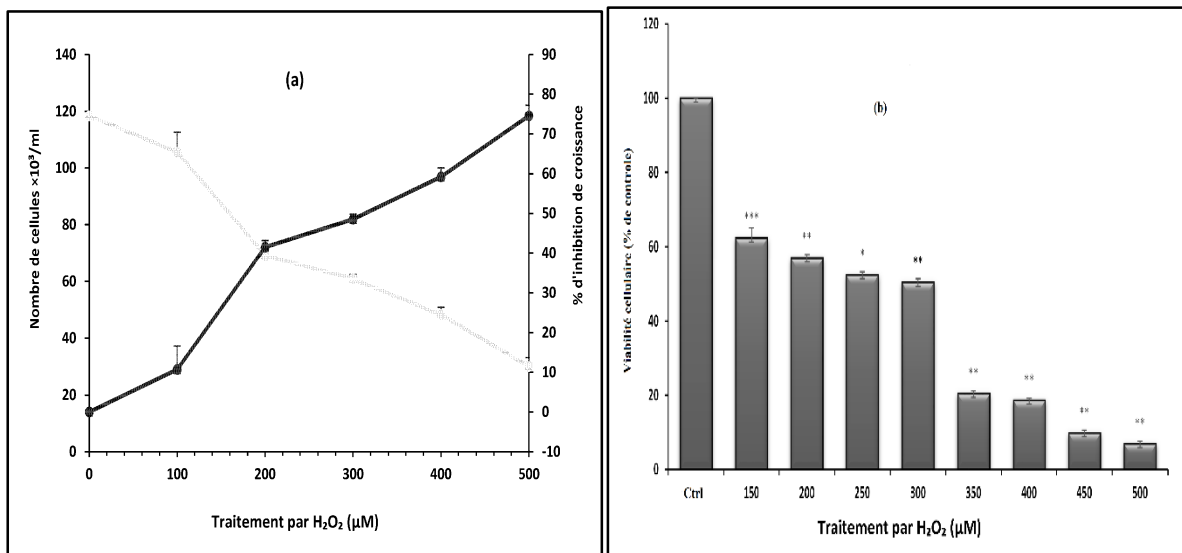


Figure 206 : Effet du H₂O₂ sur la croissance de *T. pyriformis*. *T. pyriformis* a été cultivé en milieu PPYG en présence de différentes concentrations de H₂O₂ (100-300 µM). **(a)** : Effet du H₂O₂ sur la croissance de *T. pyriformis*. **(b)** Effet du H₂O₂ sur l'activité cellulaire de *T. pyriformis*. Les résultats présentés en moyenne ± Ecartype des trois mesures indépendantes. La signification suivant le test de Student-t est indiquée par : $p < 0,05$ pour *; $p < 0,01$ pour **; $p < 0,001$ pour ***

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature, la concentration de 300 μM de H_2O_2 a été trouvée comme la concentration qui inhibe la moitié de la croissance de *T. pyriformis* (Errafiy et al., 2013; Fourrat et al., 2007; Cadi et al., 2013).

Dans une étude précédente, ils ont rapporté également que le H_2O_2 induit un stress oxydatif et la mort cellulaire dans les cellules hippocampiques HT22 murines (Kang et al., 2012). Dans une autre étude, le peroxyde d'hydrogène peut inhiber la croissance, la forme, la densité et la mobilité de *T. pyriformis* (Mar et al., 2018).

4.2. Effet de l'extrait d'algues sur la viabilité cellulaire

Les fractions de l'algue *F. spiralis* obtenus par fractionnement et qui présentent une activité antioxydante la plus active par les tests chimiques, ont été testées sur le protozoaire *T. pyriformis*. Pour déterminer la concentration non létale de chaque fraction (EtOAc et CHCl_3) de *F. spiralis* sur *T. pyriformis*, la viabilité cellulaire a été déterminée. Les résultats de la figure 29, montrent que les deux fractions ne sont pas toxiques à des concentrations de 0,09 et 0,12 $\mu\text{g} / \text{mL}$ pour la fraction EtOAc et CHCl_3 , respectivement (Figure 27).

Dans une étude similaire, la cytotoxicité des cinq fractions obtenues à partir de *F. spiralis* a été testée sur des cellules MCF-7, et il a également été démontré que les fractions de *F. spiralis* ne présentent aucune cytotoxicité à une concentration de (1 mg / mL) (Pinteus et al., 2016).

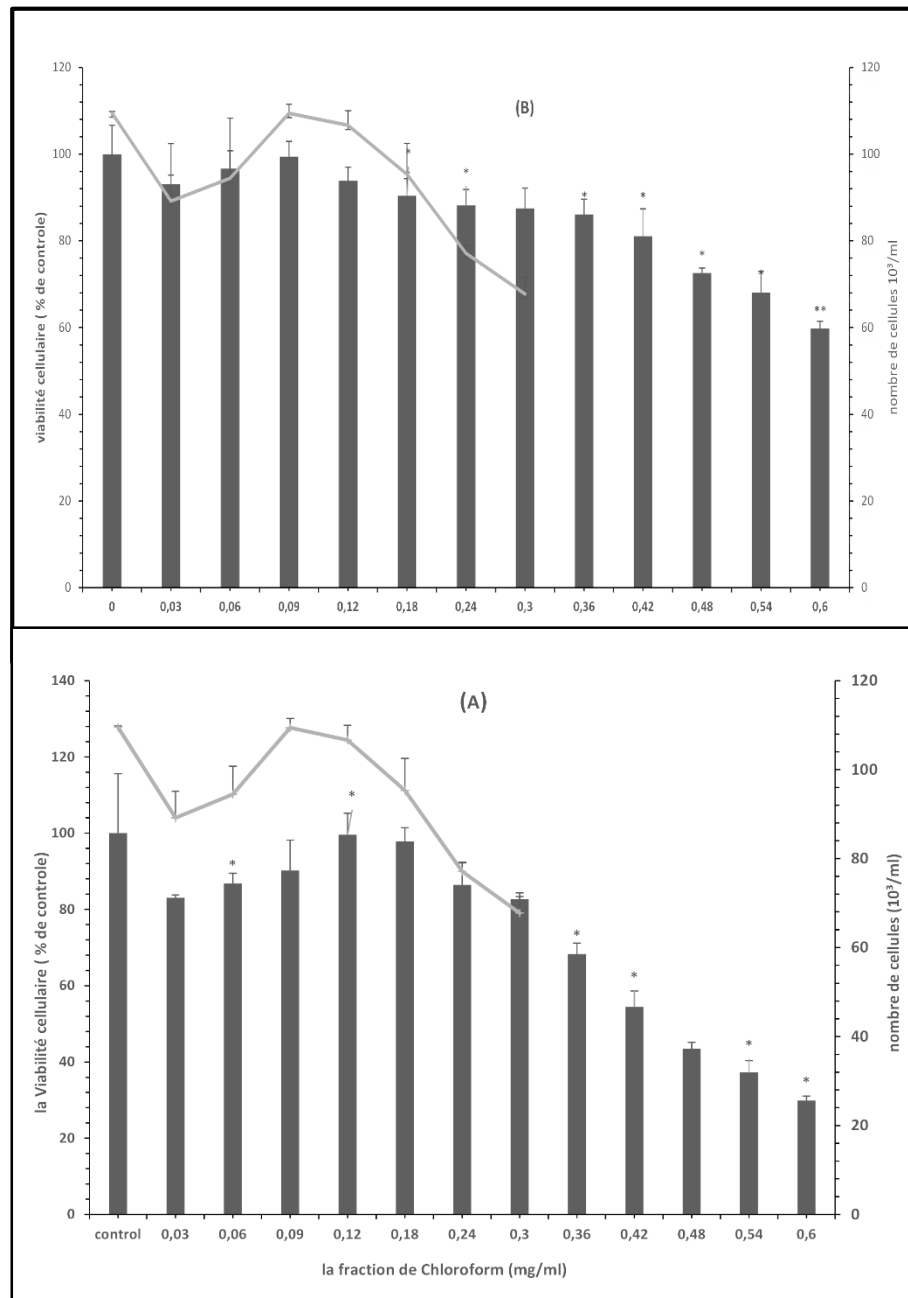


Figure 217: Effet de l'algue sur l'activité cellulaire de *T. pyriformis*. Les cellules ont été cultivées pendant 24 heures dans un milieu PPYG s en présence de différentes concentrations de la fraction chloroforme (a) ou d'acétate d'éthyle (b) (0,03 à 0,6 mg / mL). L'activité cellulaire est évaluée par le test MTT. $p < 0,001$ pour *** (comparaison entre le groupe contrôle et le groupe traité pour chaque condition).

4.3. Evaluation de l'effet protecteur

La viabilité cellulaire a été mesurée avec le test MTT, permettant de quantifier l'activité enzymatique de la déshydrogénase, qui prend en compte les dysfonctionnements mitochondriaux et/ou l'inhibition de la croissance cellulaire.

Comme le montre la figure 28, le traitement par H₂O₂ à 300 µM pendant 24 h provoque une diminution significative de la viabilité cellulaire (51,89%). Par contre, chez les cellules prétraitées avec EtOAc (0,09 µg/mL) et CHCl₃ (0,12 µg/mL) et exposés à H₂O₂ (300 µM), on note que le prétraitement a significativement restauré la viabilité cellulaire avec 82,02% et 83% pour EtOAc (0,09 µg/mL) et CHCl₃ (0,12 µg/mL), respectivement (Figure 28).

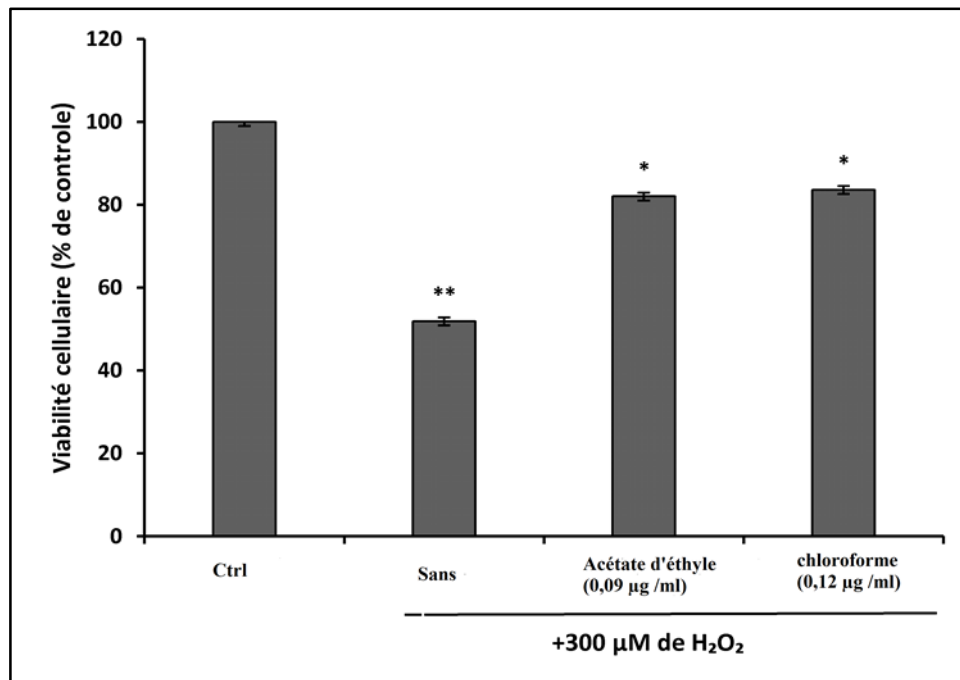


Figure 28 : Effet protecteur de la fraction d'acétate d'éthyle (0,09 µg/mL) et la fraction chloroforme (0,12 µg/ml) sur le stress oxydatif chez *T. pyriformis*, induit par H₂O₂ à 300 µM après 24 heures d'incubation. La viabilité cellulaire a été déterminée par la méthode MTT. Chaque valeur est la moyenne ± écart type de trois essais différents. *p<0,001, représentent des différences statistiquement significatives par rapport au contrôle. #p<0,001, représentent des différences statistiquement significatives par rapport à H₂O₂.

Il a été rapporté que le prétraitement avec 0,5 mg/mL de la fraction méthanolique de *Padina pavonica* ou *Fucus spiralis* contre le stress oxydatif induit par 0,2 mM de H₂O₂, sur les cellules MCF-7, améliore la viabilité cellulaire avec 81,12 ± 2,92 et 80,5 ± 2,25 % pour *Padina pavonica* et *Fucus spiralis*, respectivement (Pinteus et al., 2016).

Custódio et al., (2016) ont testé l'effet de 62,5 mg/mL de l'algue brune *C. tamariscifolia* contre le stress oxydatif induit par 100 µM H₂O₂ sur les SH-SY5Y, et ils ont montré que cet algue améliore la survie cellulaire jusqu'à 100 % par rapport au groupe traité par H₂O₂, qui avait une viabilité de 53,4%.

Dans la présente étude, le prétraitement avec EtOAc (90 µg/mL) et CHCl₃ (120 µg/mL) de *F. spiralis* empêche la réduction de la viabilité cellulaire induite par la toxicité de H₂O₂.

4.4. Effet de l'extrait sur le stress oxydant

Dans cette partie d'étude *in vitro*, les cellules de *T. pyriformis* ont été traitées par la fraction acétate d'éthyle et chloroforme préalablement solubilisée dans le DMSO. Après 24h de traitement, les cellules ont été récoltées et une mesure des marqueurs de stress a été effectuée. La figure ci-dessous présente l'activité enzymatique de la SOD, la catalase et la GPx chez les cellules de *T. pyriformis* préalablement stressées par H₂O₂ et prétraitées par la fraction EtOAc ou CHCl₃.

D'après les résultats obtenus on constate que les cellules de *T. pyriformis* traitées par 300 µM de H₂O₂ montrent une augmentation dans l'activité enzymatique des trois enzymes de stress (SOD, GPx, CAT), par rapport aux cellules contrôles. En revanche, les cellules prétraités par la fraction EtOAc ou CHCl₃ avant être exposé à 300 µM de H₂O₂, présentent une normalisation de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, GPx et CAT), comparativement aux cellules traités par H₂O₂ seule. Donc, les deux fractions d'EtOAc et CHCl₃ de *F. spiralis* préservent les niveaux normaux de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, GPx, CAT) (Figure 29).

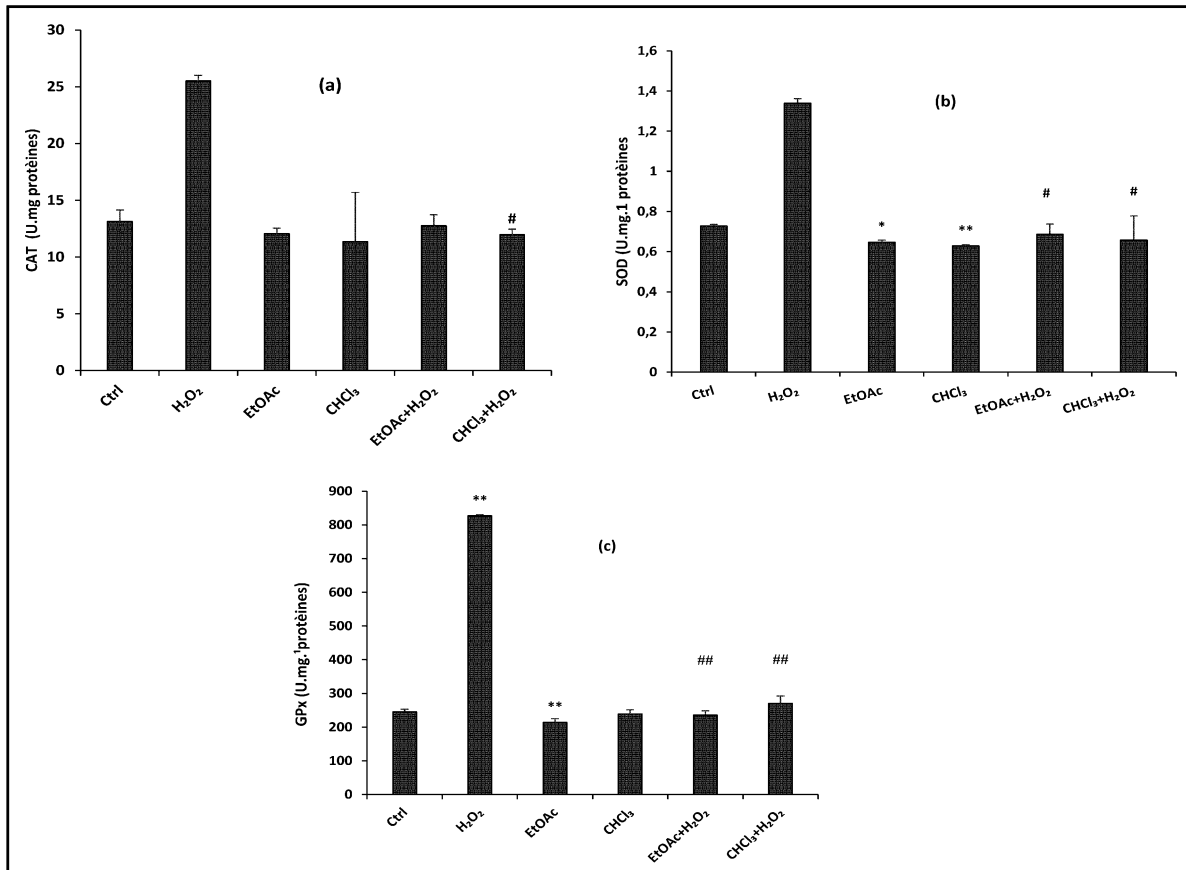


Figure 29 : l'activité enzymatique de la catalase (CAT) (a), Superoxide dismutase (SOD) (b), glutathione peroxidase (GPx) (c), chez le protozaine *Tetrahymena pyriformis* traités par le H₂O₂ et la fraction acétate d'éthyle ou la fraction de chloroforme, les fractions seules. Chaque valeur est la moyenne ± SEM de trois essais différents. * p <0,001, représentent des différences statistiquement significatives par rapport au contrôle. #p <0,001, représentent des différences statistiquement significatives par rapport à H₂O₂

Dans le même contexte que précédemment, nous avons suivi les variations de la concentration des marqueurs de stress le malondialdéhyde (MDA) et le glutathion (GSH) dans les différentes cultures de *T. pyriformis* (Figure 30).

Les résultats obtenus montrent que l'exposition des cellules de *T. pyriformis* pendant 24 heures en présence de 300 µM de H₂O₂ induit une augmentation de la concentration en malondialdéhyde (MDA) et le glutathion. Par contre, le prétraitement par les deux fractions de *F. spiralis* montre que le MDA et le GSH ont été faiblement exprimés (Figure 30).

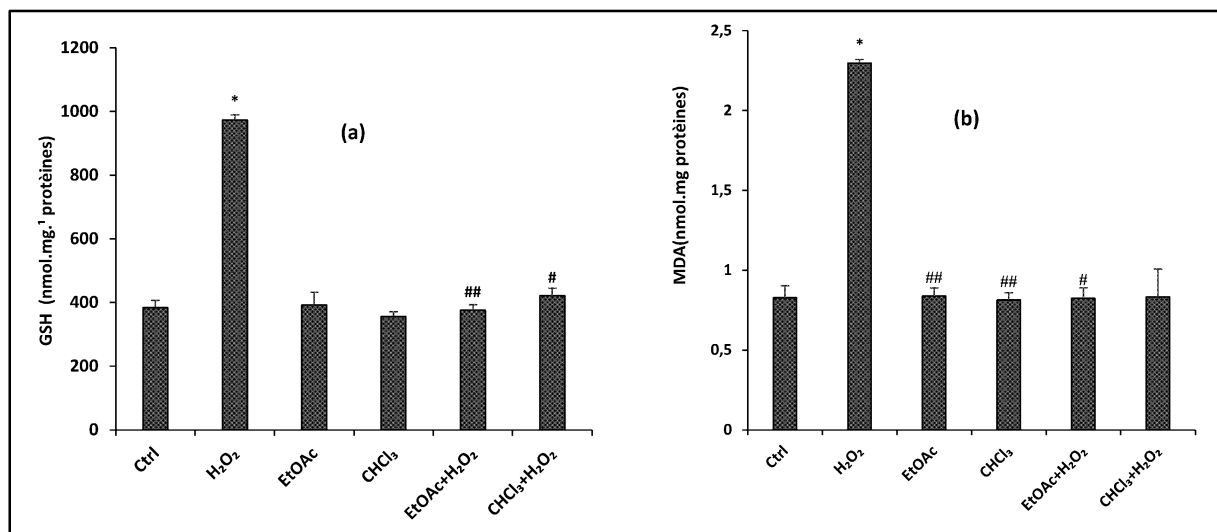


Figure 30: Les concentrations des marqueurs de stress, le glutathion (GSH) (a), le malondialdéhyde (MDA) (b) chez le protozaine *Tetrahymena pyriformis* traits par le H₂O₂ et la fraction acétate d'éthyle ou la fraction de chloroforme, les fractions seules. Chaque valeur est la moyenne ± SEM de trois essais différents. * p < 0,001, représentent des différences statistiquement significatives par rapport au contrôle. #p < 0,001, représentent des différences statistiquement significatives par rapport à H₂O₂

Ces résultats sont en accord avec les résultats de (Cadi et al., 2013) ayant montré que le prétraitement par l'huile d'argan induit une diminution du taux du MDA chez *T. pyriformis* soumis au stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène par rapport au cellules contrôles. Le malondialdéhyde est un produit de peroxydation lipidique qui résulte notamment de l'action des dérivés réactifs de l'oxygène sur les acides gras polyinsaturés.

La formation du MDA est due à l'augmentation du taux des ERO causée par le stress oxydatif induit par le H₂O₂. La concentration d'EtOAc (0,09 µg/mL) et CHCl₃ (0,12 µg/mL) ont diminué la concentration élevée en MDA et GSH des cellules exposées à H₂O₂, et ont montré un potentiel élevé de protection contre la peroxydation lipidique.

Ces effets protecteurs peuvent être dus à l'effet antioxydant des composés phénoliques présente dans les algues, et qui peuvent atténuer les dommages oxydatives en piégeant les espèces réactives et en inhibant la peroxydation lipidique (Lee et al., 2013; Thomas and Kim, 2013). Les effets protecteurs des algues sont liés à des substances biologiquement actives, notamment les polyphénols et les phlorotannins (Kang et al., 2012). Chez les algues brunes, les phlorotannins sont connus pour constituer jusqu'à 15% du poids sec des algues brunes (Wang et al., 2012).

La catalase est considérée comme un enzyme le plus important pour la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène et autres produits non toxiques (Elbaz et al., 2010;

Inal et al., 2001). La superoxyde dismutase protège la cellule en catalysant la réaction de conversion des radicaux superoxyde en peroxyde d'hydrogène, qui est décomposé par la glutathion peroxydase (**Boya et al., 1999**). Le glutathion élimine le H₂O₂ par l'oxydation du GSH, ainsi, il convertit les peroxydes lipidiques en molécules inoffensives en protégeant les cellules contre les conséquences de la peroxydation lipidique.

Dans une étude antérieure sur l'effet du H₂O₂ sur le statut redox, les résultats ont montré que cet agent oxydant provoque une augmentation de l'activité enzymatique de la catalase et superoxyde dismutase chez le protozoaire *Tetrahymena thermophile* (**Errafiy et al., 2013**).

En outre, Le stress oxydant induit par H₂O₂ a déjà démontré dans de nombreux types de cellules (**Kang et al., 2012; Pinteus et al., 2017; Vavilala et al., 2015**). Cependant, le peroxyde d'hydrogène augmente de manière significative les niveaux de concentration intracellulaire de Ca²⁺ dans les cellules murines hippocampales HT22, ce qui provoque la mort des cellules.

En effet, les phlorotannins isolés des algues brunes *Ecklonia cava* inhibent le stress oxydatif induit par H₂O₂ et la mort cellulaire en inhibant l'augmentation du Ca²⁺ (**Kang et al., 2012**).

Dans une autre étude, le H₂O₂ augmente le potentiel transmembranaire mitochondrial et l'activité de la caspase-9 dans les cellules MCF-7, tandis que le traitement avec l'extrait de l'algue *Ulva Compresa*, *Cystoseira tamariscifolia*, *Sargassum muticum*, *Fucus spiralis* et *Padina pavonica* augmente la viabilité cellulaire grâce à inhibition de l'activité de la caspase-9 et réduction de la dépolarisation de la membrane mitochondriale (**Pinteus et al., 2016**). Ainsi, il a été démontré que le H₂O₂ agit comme un oxydant biologique qui contribue à l'augmentation du Ca²⁺ cytosolique et du stress oxydatif impliqués dans les mécanismes de mort cellulaire (**Pinteus et al., 2016; Sies, 2017**). De même, il a été démontré que la mort par apoptose est liée à la diminution du potentiel de la membrane mitochondriale qui est associée à la libération du cytochrome c et à l'activation séquentielle des caspases (**Perkins et al., 2000**).

Dans le processus apoptotique, le stress oxydatif et l'augmentation du concentration de Ca²⁺ cytosolique contribuent à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTP) ce qui dépolarise les mitochondries et conduit à un gonflement mitochondrial et à la libération de cytochrome c dans le cytosol (**Goldstein et al., 2000; Krause and Durner, 2004**).

D'après c'est résultat, on explique l'effet protecteur des fractions de *F.spiralis* par sa teneur élevée en polyphénols et flavonoïdes et d'autres molécules antioxydants. La plupart des antioxydants issus des algues pourraient agir à travers le mécanisme de balayage des radicaux (**Balboa et al., 2013; Shebis et al., 2013**). Ce qui a permis à la cellule de développer un

mécanisme compensatoire pour faire face au stress oxydatif au lieu d'emprunter le mécanisme normal qui se traduit généralement par l'élévation du taux de ces enzymes.

Notre étude montre que les fractions d'acétate d'éthyle et de chloroforme de l'algue brune *F. spiralis* ont une activité protectrice contre la toxicité induite par le peroxyde d'hydrogène chez *T. pyriformis*. Des analyses chromatographiques, en vue de déterminer les profils des composés actifs pour ces deux fractions seraient intéressantes à envisager.

III. Effet protecteur de *F. spiralis in vivo*

1. Evolution pondérale

Durant les 5 semaines d'expérimentation, le poids corporel des rats est pris régulièrement.

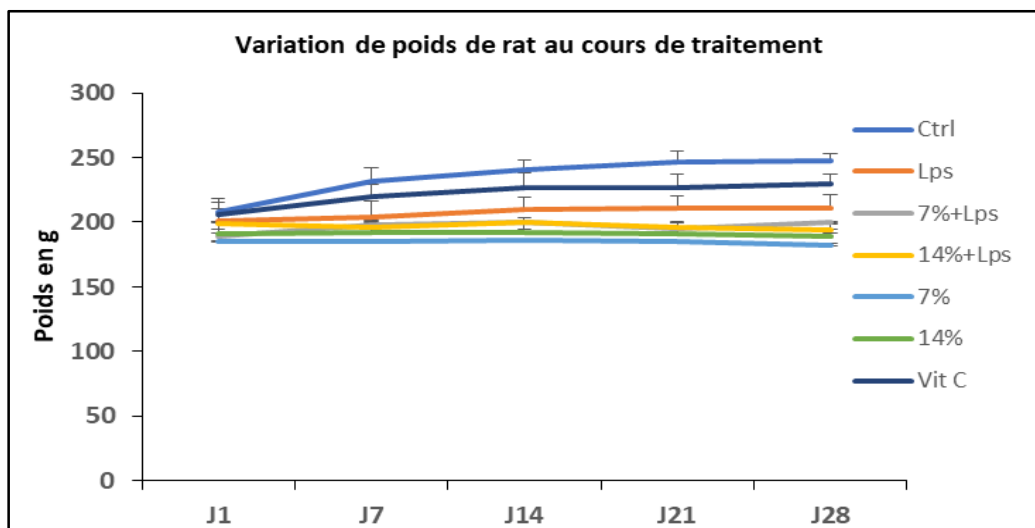


Figure 221: L'évolution du poids corporel moyen des rats contrôle, des rats traités par LPS, 7% de l'algue + LPS, 14% de l'algue+ LPS, 7% de l'algue, 14% de l'algue, et Vitamine C. Chaque courbe représente la moyenne \pm SEM de 5 rats par traitement.

Les résultats obtenus pendant le traitement indiquent, aucun rat n'est mort et aucun signe de toxicité n'a été observé chez les rats contrôles et traités. Le groupe traité par LPS a montré une légère diminution de poids corporels après injection de LPS ; le groupe de rats qui se nourrit d'un régime enrichi de 7% ou 14% la poudre de l'algue a montré également une baisse légère du poids.

2. Effets de *F. spiralis* sur le comportement

2.1. Test non moteurs

2.1.1. Tests du labyrinthe en croix surélevé (Elevated Plus Maze)

Nous avons testé les rats traités avec l'algue dans le labyrinthe en croix surélevé, en comparaison avec le groupe LPS et le groupe contrôle pour déterminer si l'algue pourrait prévenir les rats contre le stress induit par LPS.

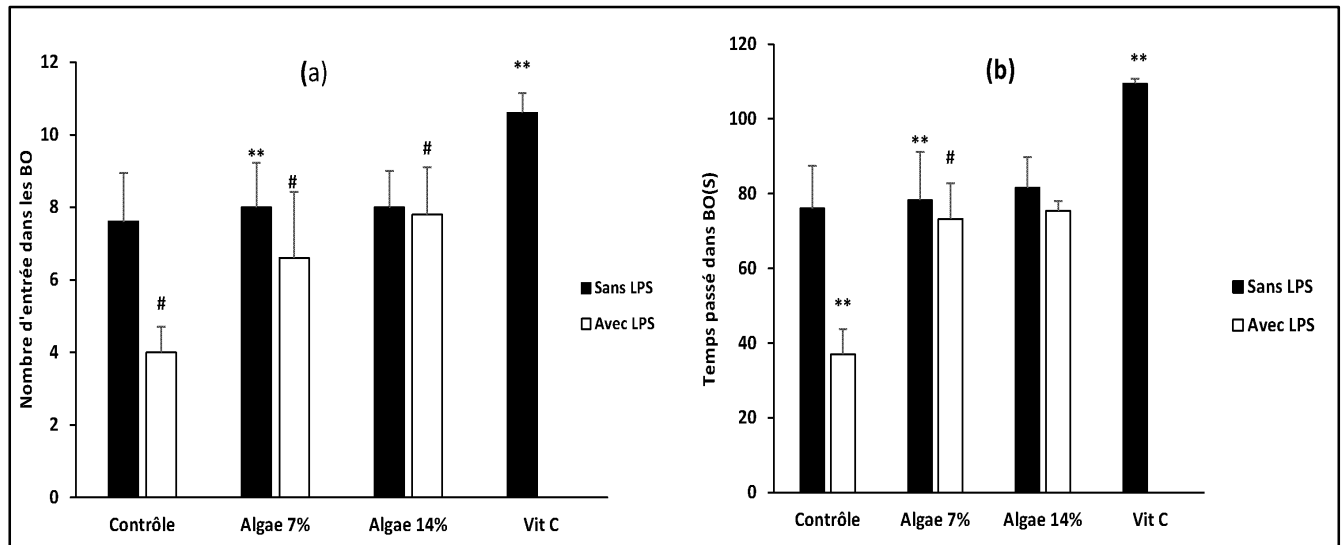


Figure 232 : Performances comportementales des rats mesurées dans l'EPM. (a) le nombre d'entrée dans les (BO) et (b) : le temps passé dans les (BO) en secondes. Les résultats sont exprimés en moyennes ± erreur standard moyenne (SEM). Avec * $p < 0,001$, par rapport au contrôle. # $p < 0,001$, par rapport LPS

Les résultats présentés dans la Figure 34, montrent que le traitement par LPS réduit significativement le nombre d'entrées dans les bras ouvert ($p < 0.01$, Figure 32a), ce qui indique une anxiété chez ce groupe. Le temps passé dans les bras ouverts a été aussi affecté par le traitement ($p < 0.01$, Figure 32b), il a été réduit par 50% par rapport au groupe contrôle.

En effet, chez le groupe de rats ayant suivi le régime 7 % d'algues+LPS et le groupe de rats ayant suivi le régime 14% + LPS, le nombre et le temps passé dans les bras ouvert connaissent une augmentation significative par rapport au groupe LPS, ce qui indique l'effet bénéfique de la supplémentation par *F. spiralis*.

2.1.2. Nage forcée

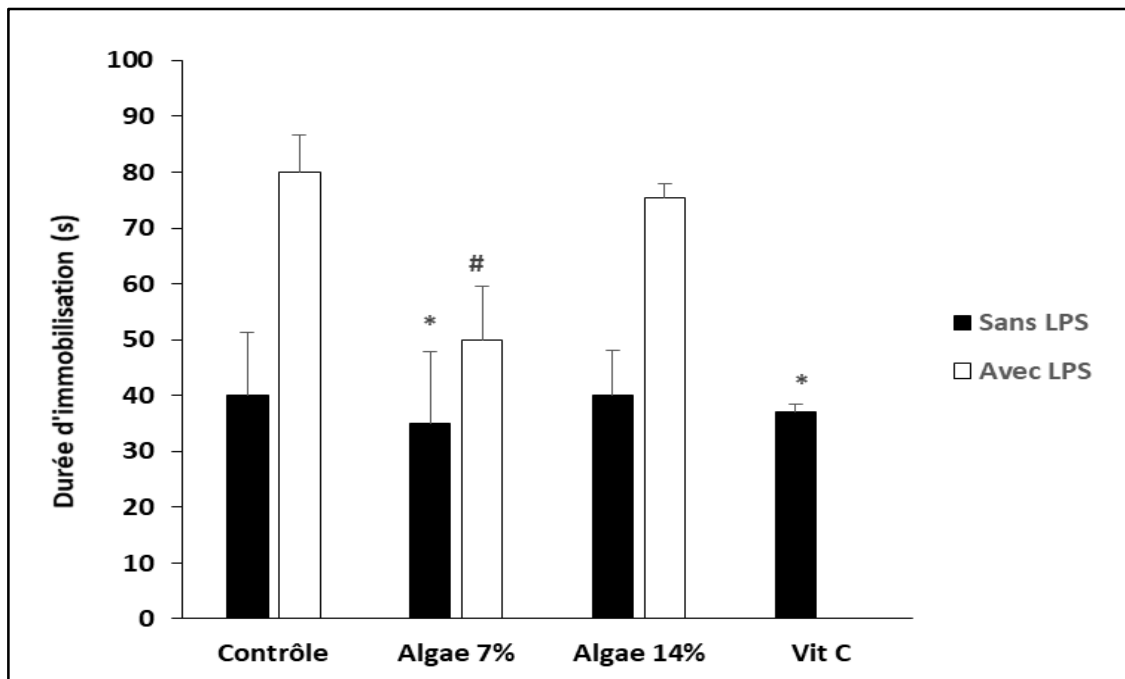


Figure 243 : Durée d'immobilisation chez les rats traités par LPS. Les histogrammes montrent la durée d'immobilité dans le test de la nage forcée. Les données rapportées en moyen ± SEM. Les comparaisons ont été réalisées en utilisant le test t: Avec * $p < 0,001$, par rapport au groupe contrôle. # $p < 0,001$, par rapport au groupe LPS.

Le comportement dépressif a été évalué chez les groupes de rats contrôles et groupes traités par LPS, en utilisant le test de la nage forcée. Les résultats montrent que le traitement par LPS induit une augmentation non significative du temps d'immobilité chez les rats $80,12 \pm 0,09$ contre $40,12 \pm 0,34$ chez les rats contrôles (Figure 33). Le traitement par LPS induit un comportement dépressif exprimé par l'augmentation du temps auquel les rats restent immobiles dans le test de la nage forcée

De plus, le temps d'immobilisation est moins élevé chez les rats traité par LPS et ayant reçu un régime enrichi par 7% et 14% de l'algue *F.spiralis*.

2.2. Test moteurs

2.2.1. Coordination motrice (Test rotarod)

Les capacités d'équilibre et de coordination motrice ont été mesurées par le rotarod. Les rats sont placés sur la barre tournante de Rotarod et le temps de maintien sur la barre pour chaque rat est enregistré.

Les résultats montrent une différence significative dans le temps de maintien du groupe LPS par rapport au groupe contrôle. Le temps de maintien a été significativement affecté par le traitement LPS et *F. spiralis* 14 % et le groupe qui reçoit Vitamine C. Comparés au groupe LPS, le prétraitement par 14% d'algue affecte significativement la performance des rats des groupes traités par LPS (Figure 34).

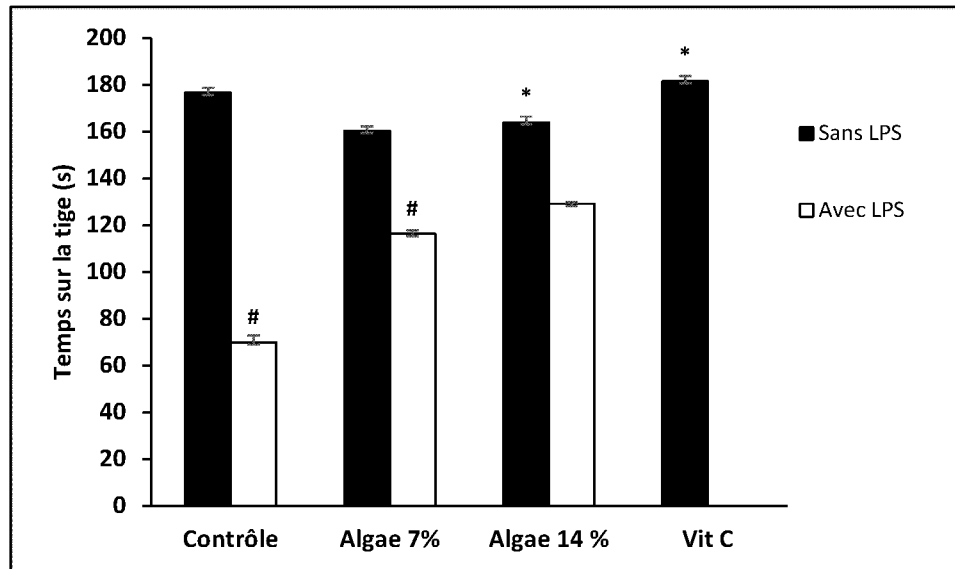


Figure 254 : L'effet du traitement sur la coordination motrice mesurée dans le Rotarod. Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM. Avec * $p < 0,001$, par rapport au contrôle. # $p < 0,001$, par rapport LPS.

2.2.2. Test du champ ouvert (open Field Test)

Tableau 11 : Effet du traitement sur les paramètres mesurés dans le test d'exploration dans un champ ouvert.

| Groupe | Nombre de carrés centraux visités | Carrés périphériques (n) | redressement (n) |
|-------------|-----------------------------------|--------------------------|-------------------|
| contrôle | 20 \pm 2,09 | 42 \pm 1,19 | 23 \pm 2,12 |
| LPS | 10 \pm 0,17 ** | 59 \pm 2,11 | 11 \pm 1,08** |
| 7% | 23,12 \pm 5,20 | 38 \pm 0,25 | 19,12 \pm 2,34 |
| 14% | 25,13 \pm 0,02 | 42 \pm 2,24 | 21,12 \pm 3,51 |
| LPS+7% | 25,12 \pm 2,13## | 45 \pm 0,07 | 14,12 \pm 4,61 |
| LPS+14% | 25,02 \pm 7,10## | 43,12 \pm 1,79 | 18,12 \pm 2,31 |
| Vit C (10%) | 22,12 \pm 5,18 | 40,12 \pm 2,39 | 25,12 \pm 1,49* |

Les valeurs représentent les moyennes \pm erreurs standard moyenne (SEM) des nombre de carrés centraux visités, nombre carrés périphériques et le redressement lors d'une session de 10 minutes réalisés après le traitement de 28 jours pour les différents groupes d'animaux : contrôles, groupe LPS, groupe (* significativité par rapport au contrôle, *** $P < 0,001$, ## $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ # significativité par rapport à LPS

Les résultats présentés dans le Tableau 12, montrent une différence significative dans la fréquence des carrés centraux visités chez le groupe LPS, le nombre des carrés centraux visités est diminué chez le groupe LPS par rapport au groupe contrôle. En revanche, chez les groupes qui reçoivent une supplémentation enrichie par 7% et 14% de l'algue *F. spiralis* et le groupe Vit C montrent une différence significative par rapport au groupe LPS.

Concernant le nombre des carrés périphériques, aucune différence n'a été observée. Le nombre de redressement a montré une différence entre le groupe LPS et le groupe contrôle, on constate que le nombre de redressement est élevé chez le groupe LPS par rapport au groupe contrôle.

Au niveau comportemental, le LPS provoque des troubles des fonctions cognitives et des composantes émotionnelles.

Le LPS est une toxine produite par la bactérie *Escherichia coli*. L'injection systémique du LPS produit un processus inflammatoire dans le cerveau, en particulier dans le cortex frontal, le striatum et l'hippocampe. Cette neuro-inflammation s'exprime histologiquement par une dégénérescence neuronale et une activation gliale (augmentation brusque du nombre et du volume des astrocytes) accompagnée par une expression nucléaire du facteur Kappa B (nF-KB), du facteur tumoral (TNF α) et des interleukines 1- β (IL 1- β).

Les maladies neurovégétatives, comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson sont caractérisées par la perte progressive de neurones due au processus inflammatoire et au stress oxydatif. Ces maladies incluent dans leurs symptômes précoces mais aussi au cours et pendant la maladie des troubles cognitifs et comportementaux accentués. Ces troubles, en plus des troubles moteurs ont fait l'objet de recherches pointues qui ont permis de mettre au point des molécules thérapeutiques.

Depuis des années, les scientifiques s'orientent vers une nouvelle approche consistant à chercher des molécules issues de ressources naturelles pour traiter certaines maladies neurodégénératives (Essa et al., 2012; Kim et al., 2020; Yeom et al., 2015). En effet, une attention croissante a été accordée aux ressources marines, en particulier sur les algues comestibles (Rengasamy R R Kannan et al., 2013).

Les études ont montrés que le LPS peut affecter la mémoire et les fonctions cognitives dans différents paradigmes comportementaux chez le rat et la souris.

Cependant, ces effets ont été principalement observés comme des conséquences du traitement de 7 jours par LPS, lorsque les symptômes comportementaux pourraient être présents et l'activité locomotrice réduite (Lee YJ et al., 2013; Zhang et al., 2015)..

Norouzi et ses collaborateurs ont indiqué que l'extrait hydro-alcoolique de *Nigella Sativa* améliore l'apprentissage et les troubles de la mémoire induits par le LPS chez le rat en améliorant les niveaux de cytokines de l'hippocampe et les lésions oxydatives des tissus cérébraux **(Norouzi et al., 2019)**

Des auteurs ont été rapporté que l'apprentissage, la mémoire et le développement de la maladie d'Alzheimer (MA) sont affectés par la neuroinflammation **(Yirmiya and Goshen, 2011 ; Yan et al., 2015)** . le LPS induit des troubles de l'apprentissage avec des dommages oxydatifs des tissus cérébraux **(Pourganji et al., 2014 ; Anaigoudari et al., 2016, 2015)**.

Le LPS est un outil important pour l'étude de la neuroinflammation associée aux maladies neurodégénératives. Cependant, le sérotype, la voie d'administration et le nombre d'injections de cette toxine induisent des réponses pathologiques différentes **(Batista et al., 2019)**. L'effet bénéfique des antioxydants sur la mémoire confirme une relation solide entre les dommages neuronaux induits par le stress oxydatif et les troubles d'apprentissage et de mémoire **(Silva et al., 2004 ; Khodabandehloo et al., 2013)**

Cependant, LPS administré aux rongeurs s'accompagne des dommages neuronaux et un défaut de neurogenèse, un échec d'apprentissage, mémoire et plasticité synaptique **(Frühauf et al., 2015)**. Il a été rapporté que les dommages oxydatifs des tissus cérébraux s'accompagne de troubles d'apprentissage et de mémoire après l'administration de LPS **(Anaigoudari et al., 2016 ; Abareshi et al., 2016)**.

Chez les rongeurs et les humains, le stress peut avoir des conséquences morphologiques, physiologiques et comportementales persistante **(Dudley et al., 2011 ; Yong et al., 2012; Neigh et al., 2013)**.

Les composés polyphénoliques issus des algues ont été étudiés pour leur efficacité à réduire le stress oxydatif et la neuroinflammation associé aux déficits de mémoire et de l'apprentissage **(Kim et al., 2020; Rafiquzzaman et al., 2015)**

Conclusion et perspectives

Aujourd'hui, les molécules d'origine naturelles connaissent depuis toujours un intérêt considérable qui ne cesse pas d'augmenter face à la méfiance grandissante du consommateur à l'égard des produits de synthèse.

Depuis longtemps, les macro-algues jouent un rôle économique et écologique très important pour les communes du littoral. Aujourd'hui, les algues sont encore peu valorisées malgré leurs compositions riches en métabolites secondaires avec des activités biologiques très variées et qui peuvent être utilisées dans le domaine de santé, pharmaceutiques et cosmétique.

Le travail que nous avons effectué dans le cadre de cette thèse s'inscrit d'une part dans la contribution de l'étude de l'activité antioxydante et l'activité inhibitrice des enzymatique, ainsi l'identification du profil antioxydant des cinq algues étudiées. D'autre part, à l'étude de l'éventuel ou hypothétique effet protecteur de l'algue la plus active *in vitro* comme agent antioxydant (*F. spiralis*) contre le peroxyde d'hydrogène induit le stress oxydatif sur *T. pyriformis*. Ainsi, à l'évaluation de l'activité biologique antioxydante *in-vivo* chez des rats exposés à un stress induit par le LPS, ce stress a été évalué par des approches comportementales.

Les résultats ont montré que l'espèce *F. spiralis* possède une teneur plus élevée en polyphénols et flavonoïdes par rapport aux autres espèces. De plus, *F. spiralis* et *C. stricta* présentent une meilleure activité inhibitrice de la peroxydation lipidique. Ainsi, *F. spiralis* a montré une bonne activité dans le test ABTS, DPPH et l'activité de la capacité antioxydante réductrice de cuivre (CUPRAC). En ce qui concerne l'activité chélatrice des métaux, *B. bifurcata* présente la meilleure activité par rapport aux autres espèces. L'activité inhibitrice des enzymes acétylcholinestérase, butyrylcholinestérase, tyrosinase, et uréase indique l'extrait éthanolique de *F. spiralis* possède la meilleure capacité inhibitrice des enzymes.

Pour l'identification du profil antioxydant par LC-MS / MS, différents antioxydants standards ont été recherchés. Les composés majoritaires que nous avons pu quantifier dans les différents extraits éthanoliques des cinq algues sont : l'acide quinique, de l'acide malique, de l'acide fumarique, de l'acide gallique, de l'acide protocatéchuique, de l'acide 4-OH-benzoïque, de l'hésperidine, ont été détectés dans des extraits à l'éthanol des cinq algues marocaines.

L'extraction par solvant de polarité croissante a montré que les solvants d'extraction ont un impact sur le contenu phénolique, flavonoïde et l'activité antioxydante. Les deux fractions EtOAc et CHCl₃ de *F. spiralis* possèdent une activité antioxydante et des teneurs en métabolites secondaires plus élevées par rapport aux autres extraits. Les fractions les plus actives EtOAc et

CHCl₃ de l'algue *F. spiralis* ont été évalué pour leur capacité à atténuer la toxicité induite par H₂O₂ sur *T. Pyriformis*.

Les résultats obtenus *in-vitro*, ont montré que le traitement de *T. Pyriformis* par le peroxyde d'hydrogène par une concentration finale de 300 µM cause un stress oxydant, remarqué par une diminution significative de la viabilité cellulaire et le nombre de cellules vivantes, ainsi, une augmentation des activités des enzymes (CAT, SOD et GPx) et les marqueurs du stress (GSH et MDA). L'effet toxique induit par le peroxyde d'hydrogène est significativement inhibé par le traitement avec les fractions EtOAc et CHCl₃.

Ces résultats indiquent que *F. spiralis* s'est avéré efficace contre la cytotoxicité et les changements redox induits par H₂O₂. *F. spiralis* pourrait être une source prometteuse de composés antioxydants et nutraceutiques à des fins pharmaceutiques. Des analyses chromatographiques, en vue de déterminer les profils des composés actifs pour ces deux fractions seraient intéressantes à envisager.

Les résultats obtenus *in vivo* sur les rats traités par *F. spiralis* ont montré que le LPS induit une toxicité accompagnée des troubles moteurs et comportement anxieux et dépressif chez les rats.

Les troubles comportementaux associés à l'effet toxique du LPS connaissent une réversibilité par le traitement avec *F. spiralis*, cet effet est probablement dû à l'activité antioxydante fournie par les polyphénols de cette algue.

Compte tenu de nos résultats obtenus, plusieurs perspectives de travail peuvent être envisagées.

L'étude physico-chimique :

- ✓ Purification et isolation des molécules dans les extraits de *F. spiralis* ayant montré un effet protecteur, pour leur utilisation thérapeutique ultérieure.
- ✓ Utiliser d'autres procédés d'extraction pour extraire des métabolites secondaires ayant des propriétés anti-oxydantes importantes.
- ✓ Extraire et caractériser d'autres composés des algues comme les huiles et les polysaccharides à partir des cinq algues étudiées.
- ✓ Identification du profil antioxydant de la fraction EtOAc et CHCl₃ par des techniques chromatographiques.

Etude *in vivo* sur des rongeurs (rats) :

- ✓ Évaluation de l'effet de *F. spiralis* sur le stress oxydatif et inflammation induite par le LPS au niveau plasmatique par le dosage des paramètres plasmatiques (Glycémie, cholestérol et urée).
- ✓ Dosage de l'activité des antioxydantes (CAT, SOD, GPx) et marqueurs de stress (MDA et GSH) au niveau des organes de foie, rein et cerveau.
- ✓ Dosage des marqueurs clés de l'inflammation dans les différentes organes (IL-6, TNF- α).
- ✓ Dosage des teneurs des protéines marqueurs des lésions hépatiques (ALT, AST).
- ✓ Étude histologique au niveau des organes foie et cerveau pour vérifier si la toxicité induite par LPS entraîne une transformation au niveau ces organes.

Références bibliographiques

- Abareshi, A., Anaeigoudari, A., Norouzi, F., Shafei, M.N., Boskabady, M.H., Khazaei, M., Hosseini, M., 2016. Lipopolysaccharide-Induced Spatial Memory and Synaptic Plasticity Impairment Is Preventable by Captopril. *Adv. Med.* 2016, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/7676512>
- Abbott, W.S., 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*
- Abbott, W.S., 1987. A method of computing the effectiveness of an insecticide. 1925. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 3, 302–3.
- Aebi, H., 1984. Catalase in Vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Agregán, R., Munekata, P.E.S., Franco, D., Dominguez, R., Carballo, J., Lorenzo, J.M., 2017. Phenolic compounds from three brown seaweed species using LC-DAD–ESI-MS/MS. *Food Res. Int.* 99, 979–985. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.043>
- Ames, B.N., Cathcart, R., Schwiers, E., Hochstein, P., 1981. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 6858–6862. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.11.6858>
- Anaeigoudari, A., Shafei, M.N., Soukhtanloo, M., Sadeghnia, H.R., Reisi, P., Beheshti, F., Mohebbati, R., Mousavi, S.M., Hosseini, M., 2015. Lipopolysaccharide-induced memory impairment in rats is preventable using 7-nitroindazole. *Arq. Neuropsiquiatr.* 73, 784–790. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20150121>
- Anaeigoudari, A., Soukhtanloo, M., Shafei, M.N., Sadeghnia, H.R., Reisi, P., Beheshti, F., Behradnia, S., Mousavi, S.M., Hosseini, M., 2016. Neuronal nitric oxide synthase has a role in the detrimental effects of lipopolysaccharide on spatial memory and synaptic plasticity in rats. *Pharmacol. Reports* 68, 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.09.004>
- Andrade, Paula B, Barbosa, M., Matos, R.P., Lopes, G., Vinholes, J., Mouga, T., Valentão, P., 2013. Valuable compounds in macroalgae extracts. *Food Chem.* 138, 1819–1828. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.081>
- Angell, A.R., Mata, L., de Nys, R., Paul, N.A., 2016. The protein content of seaweeds: a universal nitrogen-to-protein conversion factor of five. *J. Appl. Phycol.* <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0650-1>
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Çelik, S.E., 2008. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchim. Acta* 160, 413–419. <https://doi.org/10.1007/s00604-007-0777-0>
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., 2004. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *J. Agric. Food Chem.* 52. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>
- Ariede, M.B., Candido, T.M., Lucia, A., Jacome, M., Valéria, M., Velasco, R., Carlos, J., Carvalho, M. De, Rolim, A., 2017. Cosmetic attributes of algae - A review. *Algal Res.* 25, 483–487. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.019>
- Atkin, M.A., Gasper, A., Ullegaddi, R., Powers, H.J., 2005. Oxidative Susceptibility of Unfractionated Serum or Plasma: Response to Antioxidants in Vitro and to Antioxidant Supplementation. *Clin. Chem.* 51, 2138–2144. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.051078>

- Atta-ur-Rahman, Choudhary, M.I., 2001. Bioactive natural products as a potential source of new pharmacophores. A theory of memory. *Pure Appl. Chem.* 73, 555–560. <https://doi.org/10.1351/pac200173030555>
- Audibert, L., Fauchon, M., Blanc, N., Hauchard, D., Ar Gall, E., 2010. Phenolic compounds in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*: Distribution and radical-scavenging activities. *Phytochem. Anal.* 21, 399–405. <https://doi.org/10.1002/pca.1210>
- Ayala, G., Escobedo-Hinojosa, W.I., Cruz-Herrera, C.F. de la, Romero, I., 2014. Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. *World J. Gastroenterol.* 20, 1450. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i6.1450>
- Balboa, E.M., Conde, E., Moure, A., Falqué, E., Domínguez, H., 2013. In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chem.* 138, 1764–1785. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.026>
- Batista, C.R.A., Gomes, G.F., Candelario-Jalil, E., Fiebich, B.L., de Oliveira, A.C.P., 2019. Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation as a bridge to understand neurodegeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1–31. <https://doi.org/10.3390/ijms20092293>
- Beckman, K.B., Ames, B.N., 1998. The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiol. Rev.* 78, 547–581. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.2.547>
- Ben Mansour, R., Wided, M.K., Cluzet, S., Krisa, S., Richard, T., Ksouri, R., 2017. LC-MS identification and preparative HPLC isolation of *Frankenia pulverulenta* phenolics with antioxidant and neuroprotective capacities in PC12 cell line. *Pharm. Biol.* 55, 880–887. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1278452>
- Bitencourt, M.A.O., Silva, H.M.D., Abílio, G.M.F., Miranda, G.E.C., Moura, A.M.A., de Araújo-Júnior, J.X., Silveira, E.J.D., Santos, B.V.O., Souto, J.T., 2015. Anti-inflammatory effects of methanolic extract of green algae *Caulerpa mexicana* in a murine model of ulcerative colitis. *Rev. Bras. Farmacogn.* 25, 677–682. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.10.001>
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H.G., Northcote, P.T., Prinsep, M.R., 2011. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 28, 196–268. <https://doi.org/10.1039/C005001F>
- Bocanegra, A., Bastida, S., Benedí, J., Ródenas, S., Sánchez-Muniz, F.J., 2009. Characteristics and Nutritional and Cardiovascular-Health Properties of Seaweeds. *J. Med. Food* 12, 236–258. <https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0151>
- Bonnefont-Rousselot, D., Théron, P. et Delattre, J. (2003). Radicaux libres et antioxydants. In Delattre, J., Durand, G. et Jardillier, J.C. *Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires*. Paris : Médecine-sciences Flammarion. P. 59-81.
- Bonnet, J.L., Guiraud, P., Dusser, M., Kadri, M., Laffosse, J., Steiman, R., Bohatier, J., 2005. Assessment of anthracene toxicity toward environmental eukaryotic microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and selected micromycetes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 87–100. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.10.001>
- Boudouresque C.F., 1971. Recherches de bionomie analytique, structurale et expérimentale sur les peuplements benthiques sciaphiles de Méditerranée Occidentale. (Fraction algale) : la sous-strate

sciaphile des peuplements des grandes Cystoseira de mode battu. Bulletin du Musée d'Histoire Naturelle de Marseille, 31-151

Boudouresque, C.F., 1984. Groupes écologiques d'algues marines et phytocénoses benthiques en Méditerranée Nord-Occidentale: une revue. G. Bot. Ital. 118 (2), 7–42.

Bourgougnon, N., Stiger-Pouvreau, V., 2011. Chemodiversity and Bioactivity within Red and Brown Macroalgae Along the French coasts, Metropole and Overseas Departements and Territories, in: Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology. <https://doi.org/10.1002/9781119977087.ch4>

Boya, P., Pefia, D., Beloqui, O., Larrea, E., Civeira, M., Prieto, J., 1999. mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C. J. Hepatol. 31, 808–814.

Bravo, L., 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr. Rev. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>

Browne R.W., Bloom M.S., Schisterman E.F., Hovey K, Trevisan M., Wu C., Liu A., Wactawski-Wende J., 2008. Analytical and biological variation of biomarkers of oxidative stress during the menstrual cycle. Biomarkers. 13(2):160-83.

Bruneton J., 1999. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Technique & Documentation, 1119p.

Burtin, P., 2003. Issn : 1579-4377 Nutritional Value of Seaweeds. Quality.

Cadenas, E., Davies, K.J.A., 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. Free Radic. Biol. Med. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00317-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00317-8)

Cardoso, S., Carvalho, L., Silva, P., Rodrigues, M., Pereira, O., Pereira, L., 2014. Bioproducts from Seaweeds: A Review with Special Focus on the Iberian Peninsula. Curr. Org. Chem. 18, 896–917. <https://doi.org/10.2174/138527281807140515154116>

Casillo, A., Lanzetta, R., Parrilli, M., Corsaro, M.M., 2018. Exopolysaccharides from Marine and Marine Extremophilic Bacteria: Structures, Properties, Ecological Roles and Applications. <https://doi.org/10.3390/md16020069>.

Chakraborty, K., Praveen, N.K., Vijayan, K.K., Rao, G.S., 2013. Evaluation of phenolic contents and antioxidant activities of brown seaweeds belonging to Turbinaria spp. (Phaeophyta, Sargassaceae) collected from Gulf of Mannar. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 3, 8–16. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60016-7](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60016-7)

Chance, B., Sies, H., Boveris, A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol. Rev. 59, 527–605. <https://doi.org/10.1152/physrev.1979.59.3.527>

Chernane, H., Mansori, M., Latique, S., Kaoua, M. El, 2014. Evaluation of antioxidant capacity of methanol extract and its solvent fractions obtained from four Moroccan macro algae species. Eur. Sci. J. 10, 35–48.

Cochrane, C.G., 1991. Cellular injury by oxidants. Am. J. Med. 91, 23S-30S. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90280-b](https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90280-b)

Cornish, M.L., Garbary, D.J., 2010. Antioxidants from macroalgae: potential applications in human health and nutrition. Algae 25, 155–171. <https://doi.org/10.4490/algae.2010.25.4.155>

Crawley, J.N., 1981. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 15, 695–699. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(81\)90007-1](https://doi.org/10.1016/0091-3057(81)90007-1)

Crawley, J.N., 1999. Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. Published on the World Wide Web on 2 December 1998. *Brain Res.* 835, 18–26. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)01258-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)01258-X)

Custodio, L., Silvestre, L., Rocha, M.I., Rodrigues, M.J., Vizetto-Duarte, C., Pereira, H., Barreira, L., Varela, J., 2016. Methanol extracts from *Cystoseira tamariscifolia* and *Cystoseira nodicaulis* are able to inhibit cholinesterases and protect a human dopaminergic cell line from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *Pharm. Biol.* 54, 1687–1696. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1123278>

Custódio, L., Silvestre, L., Rocha, M.I., Rodrigues, M.J., Vizetto-Duarte, C., Pereira, H., Barreira, L., Varela, J., 2016. Methanol extracts from *Cystoseira tamariscifolia* and *Cystoseira nodicaulis* are able to inhibit cholinesterases and protect a human dopaminergic cell line from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *Pharm. Biol.* 54, 1687–1696. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1123278>

Davis, W., Ronai, Z., Tew, K.D., 2001. Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296, 1–6.

De Jesus Raposo, M.F., De Morais, A.M.B., De Morais, R.M.S.C., 2015. Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Mar. Drugs.* <https://doi.org/10.3390/md13052967>

Dean, R.T., Gieseg, S., Davies, M.J., 1993. Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins. *Trends Biochem. Sci.* 18, 437–441. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(93\)90145-D](https://doi.org/10.1016/0968-0004(93)90145-D)

Decker, E.A., Welch, B., 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J. Agric. Food Chem.* 38, 674–677. <https://doi.org/10.1021/jf00093a019>

Demirkiran, O., Sabudak, T., Ozturk, M., Topcu, G., 2013. Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Activities of Flavonoids from *Trifolium nigrescens* Subsp. *petrisavi*. *J. Agric. Food Chem.* 61, 12598–12603. <https://doi.org/10.1021/jf403669k>

Deschamps, V., Barberger-Gateau, P., Peuchant, E., Orgogozo, J.M., 2001. Nutritional Factors in Cerebral Aging and Dementia: Epidemiological Arguments for a Role of Oxidative Stress. *Neuroepidemiology* 20, 7–15. <https://doi.org/10.1159/000054752>

Di Monte, D.A., Chan, P., Sandy, M.S., 1992. Glutathione in Parkinson's disease: A link between oxidative stress and mitochondrial damage? *Ann. Neurol.* 32, S111–S115. <https://doi.org/10.1002/ana.410320719>

Didderan I., Destain J. et Thonart P. (2008). Le bioéthanol de seconde génération. Les presses agronomiques de Gembloux. 128 pages.

Domínguez, H., 2013. Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals, Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals. <https://doi.org/10.1533/9780857098689.2.307>

Dykens, B.Y.J.A., Shick, J.M., Benoit, C., Buettner, G.R., Winston, G.W., 1992. Oxygen radical production in the sea anemone *Anthopleura elegantissima* and its endosymbiotic algae. *J. Exp. Biol.* 168, 219–241.

- El Wahidi, M., El Amraoui, B., El Amraoui, M., Bamhaoud, T., 2015. Screening of antimicrobial activity of macroalgae extracts from the Moroccan Atlantic coast. *Ann. Pharm. Françaises* 73, 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2014.12.005>
- Elbaz, A., Wei, Y.Y., Meng, Q., Zheng, Q., Yang, Z.M., 2010. Mercury-induced oxidative stress and impact on antioxidant enzymes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecotoxicology* 19, 1285–1293. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0514-z>
- Elizalde, N., García-García, A.L., Totterdell, S., Gendive, N., Venzala, E., Ramirez, M.J., Del Rio, J., Tordera, R.M., 2010. Sustained stress-induced changes in mice as a model for chronic depression. *Psychopharmacology (Berl)*. 210, 393–406. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-1835-6>
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Elmtili, N., Essa, A., 2016. Les algues marines : nouvelle potentialité économique pour le Maroc . Quelle stratégie biotechnologique ?
- Ernster, L., Forsmark-Andrée, P., 1993. Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. *Clin. Investig.* <https://doi.org/10.1007/BF00226842>
- Errafiy, N., Ammar, E., Soukri, A., 2013. Protective effect of some essential oils against oxidative and nitrosative stress on *Tetrahymena thermophila* growth. *J. Essent. Oil Res.* 25, 339–347. <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.775681>
- Ertas, A., Boga, M., Yilmaz, M.A., Yesil, Y., Tel, G., Temel, H., Hasimi, N., Gazioglu, I., Ozturk, M., Ugurlu, P., 2015. A detailed study on the chemical and biological profiles of essential oil and methanol extract of *Thymus nummularius* (Anzer tea): Rosmarinic acid. *Ind. Crops Prod.* 67, 336–345. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.064>
- Essa, M.M., Vijayan, R.K., Braidy, N., Guillemin, G.J., Berry, B., 2012. Neuroprotective Effect of Natural Products Against Alzheimer ' s Disease. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0799-9>
- Evans, W.J., 2000. Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 647S-652S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.2.647S>
- FAO (2014). The state of world fisheries and aquaculture. Rome: Food and Agriculture Organization
- FAO, (2010). FAO annuaire. Statistiques des pêches et de l'aquaculture 2010
- FAO, (2012). FAO annuaire. Statistiques des pêches et de l'aquaculture 2012
- Faraj, a., 1987. Contribution à une étude quantitative et qualitative des protéines de l'agarophyte *Gelidium sesquipedale* (Turner) Thuret. Thèse de doctorat en Science. Fac. Sci. Agdal, Raba, Maroc. p16-17
- Favier, A., 1997. Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. 55, 9–16.
- Favier, A., 2003. Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actual. Chim.*
- Favier, A., 2006. Stress oxydant Stress oxydant et pathologies humaines 390–396.

- Fernando, I.P.S., Nah, J., Jeon, Y., 2016. Potential anti-inflammatory natural products from marine algae. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 48, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.09.023>
- Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247. <https://doi.org/10.1038/35041687>
- Fleita, D., El-Sayed, M., Rifaat, D., 2015. Evaluation of the antioxidant activity of enzymatically-hydrolyzed sulfated polysaccharides extracted from red algae; *Pterocladia capillacea*. *LWT - Food Sci. Technol.* 63, 1236–1244. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.024>
- Fleurence, J., 1999. Seaweed proteins. *Trends Food Sci. Technol.* 10, 25–28. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00015-1](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00015-1)
- Fleurence, J., Moranças, M., Dumay, J., Decottignies, P., Turpin, V., Munier, M., Garcia-Bueno, N., Jaouen, P., 2012. What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture? *Trends Food Sci. Technol.* 27, 57–61. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.03.004>
- Flohe, L., Gunzler, W.A., 1984. Assays of Glutathione Peroxidase. *Methods Enzymol.* 105, 114–120.
- Foo, S.C., Yusoff, F.M., Ismail, M., Basri, M., Yau, S.K., Khong, N.M.H., Chan, K.W., Ebrahimi, M., 2017. Antioxidant capacities of fucoxanthin-producing algae as influenced by their carotenoid and phenolic contents. *J. Biotechnol.* 241, 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.11.026>
- Forman, H.J., Zhang, H., Rinna, A., 2009. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>
- FOURRAT, L., IDDAR, A., VALVERDE, F., SERRANO, A., SOUKRI, A., 2007. Effects of Oxidative and Nitrosative Stress on *Tetrahymena pyriformis* Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. *J. Eukaryot. Microbiol.* 54, 338–346. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2007.00275.x>
- Frühauf, P., Porto Ineu, R., Tomazi, L., Duarte, T., Mello, C., Rubin, M., 2015. Spermine reverses lipopolysaccharide-induced memory deficit in mice. *J. Neuroinflammation* 12, 3. <https://doi.org/10.1186/s12974-014-0220-5>
- Galland-Irmouli, A.-V., Fleurence, J., Lamghari, R., Luçon, M., Rouxel, C., Barbaroux, O., Bronowicki, J.-P., Villaume, C., Guéant, J.-L., 1999. Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmata* (dulse). *J. Nutr. Biochem.* 10, 353–359. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(99\)00014-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(99)00014-5)
- Ganesan, K., Kumar, K.S., Rao, P.V.S., 2011. Comparative assessment of antioxidant activity in three edible species of green seaweed, *Enteromorpha* from Okha, Northwest coast of India. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 12, 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.11.005>
- Gardès-albert, M., Bonnefont-rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore, D., 2003. Espèces réactives de l'oxygène Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? 91–96.
- Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore, D., 2003. Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique? *Actual. Chim.*
- Garon-lardiere, S., 2004. Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales) Remerciements.
- Goldstein, J.C., Waterhouse, N.J., Juin, P., Evan, G.I., Green, D.R., 2000. The coordinate release of cytochrome c: during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat. Cell Biol.* 2, 156–162.

- Gómez-Ordóñez, E., Jiménez-Escrig, A., Rupérez, P., 2014. Bioactivity of sulfated polysaccharides from the edible red seaweed *Mastocarpus stellatus*. *Bioact. Carbohydrates Diet. Fibre* 3, 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.01.002>
- Gosch, B.J., Magnusson, M., Paul, N.A., de Nys, R., 2012. Total lipid and fatty acid composition of seaweeds for the selection of species for oil-based biofuel and bioproducts. *GCB Bioenergy*. <https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2012.01175.x>
- Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2011. <http://www.algaebase.org>
- Gupta, S., Abu-Ghannam, N., 2011. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends Food Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.03.011>
- Haddar, A., Sellimi, S., Ghannouchi, R., Alvarez, O.M., Nasri, M., Bougatef, A., 2012. Functional, antioxidant and film-forming properties of tuna-skin gelatin with a brown algae extract. *Int. J. Biol. Macromol.* 51, 477–483. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.06.016>
- Hagerman, A.E., 2002. Tannin Chemistry. *Nature* 134, 611–611. <https://doi.org/10.1038/134611a0>
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., Chapelle, J.P., 2007. [Oxidative stress]. *Rev. Med. Liege* 62, 628–38.
- Halliwell B and Gutteridge J M C (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford (fourth edition).
- Halliwell B, Gutteridge JM. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, third edition. Oxford University Press, Midsomer Norton, Avon, England.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University press.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* 280, 1–8. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(90\)90510-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(90)90510-6)
- Hamed, I., Özogul, F., Özogul, Y., Regenstein, J.M., 2015. Marine Bioactive Compounds and Their Health Benefits: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 14, 446–465. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12136>
- Hankamer, B., Lehr, F., Rupprecht, J., Mussgnug, J.H., Posten, C., Kruse, O., 2007. Photosynthetic biomass and H₂ production by green algae: from bioengineering to bioreactor scale-up. *Physiol. Plant.* 131, 10–21. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00924.x>
- Harper, M.K., Bugni, T.S., Copp, B.R., James, R.D., Lindsay, B.S., Richardson, A.D., Schnabel, P.C., Tasdemir, D., VanWagoner, R.M., Verbitski, S.M., Ireland, C.M., 2001. *Marine Chemical Ecology*, Marine Chemical Ecology. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420036602>
- Hearing, V.J., 1987. Mammalian Monophenol Monooxygenase (Tyrosinase): Purification, Properties, and Reactions Catalyzed. *Methods Enzymol.* 142, 154–165. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(87\)42024-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(87)42024-7)
- Heo, S.J., Ko, S.C., Cha, S.H., Kang, D.H., Park, H.S., Choi, Y.U., Kim, D., Jung, W.K., Jeon, Y.J., 2009. Effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on melanogenesis and their protective effect against photo-oxidative stress induced by UV-B radiation. *Toxicol. Vitr.* 23, 1123–1130. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.05.013>

Heo, S.-J., Yoon, W.-J., Kim, K.-N., Ahn, G.-N., Kang, S.-M., Kang, D.-H., Affan, A., Oh, C., Jung, W.-K., Jeon, Y.-J., 2010. Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food Chem. Toxicol.* 48, 2045–2051. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.003>

Hermes-Lima, M., 2005. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Wiley-Liss, Hoboken, NJ, pp. 319–368

Holdt, S.L., Kraan, S., 2011. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *J. Appl. Phycol.* 23, 543–597. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9632-5>

Hou, X., Yan, X., 1998. Study on the concentration and seasonal variation of inorganic elements in 35 species of marine algae. *Sci. Total Environ.* [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00299-X](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00299-X)

Housset, B. (1990). Aberrations du métabolisme et des acides nucléiques au cours du vieillissement. Rôle des radicaux libres. *La Revue de Médecine Interne*, 11: 62-66

<http://wwz.ifremer.fr/>. Rapports annuels sur la Qualité du Milieu Marin Littoral, Bulletin de la surveillance 2013, 2014, 2015

Huang, D.J., Chen, H.J., Lin, C. Der, Lin, Y.H., 2005. Antioxidant and antiproliferative activities of water spinach (*Ipomoea aquatica* Forsk) constituents. *Bot. Bull. Acad. Sin.* <https://doi.org/10.7016/BBAS.200504.0099>

IFREMER Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer. (-2016). URL :

İnal, M.E., Kanbak, G., Sunal, E., 2001. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin. Chim. Acta* 305, 75–80. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(00\)00422-8](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(00)00422-8)

Ismail, G.A., 2017. Biochemical composition of some Egyptian seaweeds with potent nutritive and antioxidant properties. *Food Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1590/1678-457X.20316>

Jacob, C., Knight, I., Winyard, P.G., 2006. Aspects of the biological redox chemistry of cysteine: from simple redox responses to sophisticated signalling pathways. *Biol. Chem.* 387, 1385–97. <https://doi.org/10.1515/BC.2006.174>

Jimenez-Escrig, A., Jimenez-Jimenez, I., Raquel Pulido, Saura-calixto, F., 2001. Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *J. Sci. Food Agric.* 81, 530–534.

Jung, H.A., Hyun, S.K., Kim, H.R., Choi, J.S., 2006. Angiotensin-converting enzyme I inhibitory activity of phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*. *Fish. Sci.* 72, 1292–1299. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2006.01288.x>

Kang, M.-C., Lee, S.-H., Lee, W.-W., Kang, N., Kim, E.-A., Kim, S.Y., Lee, D.H., Kim, D., Jeon, Y.-J., 2014. Protective effect of fucoxanthin isolated from *Ishige okamurae* against high-glucose induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells and zebrafish model. *J. Funct. Foods* 11, 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.09.007>

Kang, S., Kim, K., Lee, S., Ahn, G., Cha, S., Kim, A., Yang, X., Kang, M., Jeon, Y., 2011. Anti-inflammatory activity of polysaccharide purified from AMG-assistant extract of *Ecklonia cava* in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Carbohydr. Polym.* 85, 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.01.052>

Kang, S.M., Cha, S.H., Ko, J.Y., Kang, M.C., Kim, D., Heo, S.J., Kim, J.S., Heu, M.S., Kim, Y.T., Jung, W.K., Jeon, Y.J., 2012. Neuroprotective effects of phlorotannins isolated from a brown alga, *Ecklonia cava*,

against H₂O₂-induced oxidative stress in murine hippocampal HT22 cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 34, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.03.006>

Kannan, Rengasamy R R, Aderogba, M.A., Ndhlala, A.R., Stirk, W.A., Van Staden, J., 2013. Acetylcholinesterase inhibitory activity of phlorotannins isolated from the brown alga, *Ecklonia maxima* (Osbeck) Papenfuss. *Food Res. Int.* 54, 1250–1254. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.017>

Kannan, Rengasamy R.R., Aderogba, M.A., Ndhlala, A.R., Stirk, W.A., Van Staden, J., 2013. Acetylcholinesterase inhibitory activity of phlorotannins isolated from the brown alga, *Ecklonia maxima* (Osbeck) Papenfuss. *Food Res. Int.* 54, 1250–1254. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.017>

Kelman, D., Posner, E.K., McDermid, K.J., Tabandera, N.K., Wright, P.R., Wright, A.D., 2012. Antioxidant Activity of Hawaiian Marine Algae. *Mar. Drugs* 10, 403–416. <https://doi.org/10.3390/md10020403>

Khodabandehloo, F., Hosseini, M., Rajaei, Z., Soukhtanloo, M., Farrokhi, E., Rezaeipour, M., 2013. Brain tissue oxidative damage as a possible mechanism for the deleterious effect of a chronic high dose of estradiol on learning and memory in ovariectomized rats. *Arq. Neuropsiquiatr.* 71, 313–319. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20130027>

Khotimchenko, S. V., Kulikova, I. V., 1999. Lipids of two species of brown algae of the genus *Laminaria*. *Chem. Nat. Compd.* 35 : 17-20

Khozin-Goldberg, I., Boussiba, S., 2011. Concerns over the reporting of inconsistent data on fatty acid composition for microalgae of the genus *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae). *J. Appl. Phycol.* 23, 933–934. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9659-2>

Kim, A.R., Shin, T.S., Lee, M.S., Park, J.Y., Park, K.E., Yoon, N.Y., Kim, J.S., Choi, J.S., Jang, B.C., Byun, D.S., Park, N.K., Kim, H.R., 2009. Isolation and identification of phlorotannins from *Ecklonia stolonifera* with antioxidant and anti-inflammatory properties. *J. Agric. Food Chem.* 57, 3483–3489. <https://doi.org/10.1021/jf900820x>

Kim, M.-J., Hee Hyun, K., Hyun, J.-H., Im, S., Sim, J., Ho Lee, N., Hyun, C.-G., 2017. Anti-Melanogenic Activities of *Sargassum muticum* via MITF Downregulation. *Orient. J. Chem.* 33, 1589–1594. <https://doi.org/10.13005/ojc/330401>

Kim, M.-K., Dubacq, J.-P., Thomas, J.-C., Giraud, G., 1996. Seasonal variations of triacylglycerols and fatty acids in *Fucus serratus*. *Phytochemistry* 43, 49–55. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00243-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00243-9)

Kim, T., Son, H.J., Lim, D.W., Yoon, M., Lee, J., Kim, Y.T., Han, D., Lee, C., Um, M.Y., 2020. Memory-enhancing effects of *Ishige foliacea* extract: In vitro and in vivo study. *J. Food Biochem.* 44. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13162>

Ko, T.-P., Safo, M.K., Musayev, F.N., Di Salvo, M.L., Wang, C., Wu, S.-H., Abraham, D.J., 2000. Structure of human erythrocyte catalase. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 56, 241–245. <https://doi.org/10.1107/S0907444999015930>

Krause, M., Durner, D., 2004. Harpin inactivates mitochondria in *Arabidopsis* suspension cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 131–139.

Laplace-Treytore C., Pelter M.C., Lambert E., Roudriguez S., Vergon J.P., Chauvin C., (2014). Guide pratique de détermination générique des algues macroscopiques d'eau douce et de quelques organismes hétérotrophes. Ministère de l'environnement.13-14

Le Lann, K., Surget, G., Couteau, C., Coiffard, L., Cérantola, S., Gaillard, F., Larnicol, M., Zubia, M., Guérard, F., Poupart, N., Stiger-Pouvreau, V., 2016. Sunscreen, antioxidant, and bactericide capacities of phlorotannins from the brown macroalga *Halidrys siliquosa*. *J. Appl. Phycol.* 28. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0853-0>

Lee, J.-C., Hou, M.-F., Huang, H.-W., Chang, F.-R., Yeh, C.-C., Tang, J.-Y., Chang, H.-W., 2013. Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. *Cancer Cell Int.* 13, 55. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-13-55>

Lee, S., Han, J., Heo, S., Hwang, J., Jeon, Y., 2010. Toxicology in Vitro Protective effects of dieckol isolated from *Ecklonia cava* against high glucose-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. *Toxicol. Vitr.* 24, 375–381. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.11.002>

Li, Y., Qian, Z., Ryu, B., Lee, S., Kim, M.-M., Kim, S., 2009. Chemical components and its antioxidant properties in vitro: An edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 1963–1973. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.031>

Li, Yong-xin, Wijesekara, I., Li, Yong, Kim, S., 2011. Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochem.* 46, 2219–2224. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.09.015>

Liaaen-Jensen, S., Haugan, J.A., 1989. Improved isolation procedure for fucoxanthin. *Phytochemistry* 28, 2797–2798.

Lin, C.M., Chen, C.S., Chen, C.T., Liang, Y.C., Lin, J.K., 2002. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00442-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00442-4)

Lizard, G., Gueldry, S., Deckert, V., Gambert, P., Lagrost, L., 1997. Evaluation of the cytotoxic effects of some oxysterols and of cholesterol on endothelial cell growth: Methodological aspects, *Pathologie-biologie*.

Lobban, C.S., Harrison, P.J., 1994. Seaweed ecology and physiology. *Seaweed Ecol. Physiol.* 83, 554. <https://doi.org/10.2307/2261617>

López-Posadas, R., Ballester, I., Mascaraque, C., Suárez, M.D., Zarzuelo, A., Martínez-Augustin, O., Sánchez De Medina, F., 2010. Flavonoids exert distinct modulatory actions on cyclooxygenase 2 and NF- κ B in an intestinal epithelial cell line (IEC18). *Br. J. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00827.x>

Lordan, S., Ross, R.P., Stanton, C., 2011. Marine Bioactives as Functional Food Ingredients: Potential to Reduce the Incidence of Chronic Diseases. *Mar. Drugs* 9, 1056–1100. <https://doi.org/10.3390/md9061056>

Lowry, O.H., Rosbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent 193, 265–275.

Mabeau, S., Fleurence, J., 1993. Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends Food Sci. Technol.* 4, 103–107. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(93\)90091-N](https://doi.org/10.1016/0924-2244(93)90091-N)

- MacArtain, P., Gill, C.I.R., Brooks, M., Campbell, R., Rowland, I.R., 2007. Nutritional Value of Edible Seaweeds. *Nutr. Rev.* 65, 535–543. <https://doi.org/10.1301/nr.2007.dec.535-543>
- Maheswari, U., Sridevi Sangeetha, K.S., Umamaheswari, S., Uma, C., Reddy, M., Kalkura, S.N., 2016. Flavonoids: therapeutic potential of natural pharmacological agents antibiotics view project flavonoids: therapeutic potential of natural pharmacological agents. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 7, 3924. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7\(10\).3924-30](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7(10).3924-30)
- Mandelker, L., 2008. Introduction to Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 38, 1–30. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2007.10.005>
- Mansur, A.A., Brown, M.T., Billington, R.A., 2020. The cytotoxic activity of extracts of the brown alga *Cystoseira tamariscifolia* (Hudson) Papenfuss, against cancer cell lines changes seasonally. *J. Appl. Phycol.* <https://doi.org/10.1007/s10811-019-02016-z>
- Mar, P.D., Khalfi, B. El, Soukri, A., Nandi, N., Sen, A., Banerjee, R., Kumar, S., Kumar, V., Ghosh, A.N., Das, P., Lee, J.S., Kim, Y.R.E., Park, J.M., Ha, S., Kim, Y.R.E., Baek, N.I., Hong, E.K., Cells, H., Farmani, F., Sabahi, Z., Ramdani, M.M., Elasmri, O., Saidi, N., Elkhiaati, N., Taybi, F.A., Mostareh, M., Zazaali, O., Haloui, B., Ramdani, M.M., Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., Nozawa, Y., Thompson, G.U.Y.A., Niehus, L., Henniges, U., Horsky, M., Prohaska, T., Potthast, A., Brückle, I., Symons, M.C.R., Rusakiewicz, S., Rees, R.C., Ahmad, S.I., Robertson, R., Guihéneuf, F., Bahar, B., Schmid, M., Stengel, D., Fitzgerald, G., Ross, R., Stanton, C., 2018. The Anti-Inflammatory Effect of Algae-Derived Lipid Extracts on Lipopolysaccharide (LPS)-Stimulated Human THP-1 Macrophages. *Mar. Drugs* 13, 5402–5424. <https://doi.org/10.3390/md13085402>
- Marfaing, H., 2004. Les algues dans notre alimentation : Intérêt nutritionnel et utilisations. *Revue de nutrition pratique. Dietecom Bretagne.CEVA.* 1-9
- Marinova, E.M., Yanishlieva, N. V, 1997. Antioxidative activity of extracts from selected species of the family Lamiaceae in sunflower oil. *Food Chem.* 58, 245–248.
- Matanjun, P., Mohamed, S., Mustapha, N.M., Muhammad, K., 2009. Nutrient content of tropical edible seaweeds, *Euclima cottonii*, *Caulerpa lentillifera* and *Sargassum polycystum*. *J. Appl. Phycol.* 21, 75–80. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9326-4>
- Matanjun, P., Mohamed, S., Mustapha, N.M., Muhammad, K., Ming, C.H., 2008. Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo. *J. Appl. Phycol.* 20, 367–373. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9264-6>
- Mc Candless, E.L., 1978. The importance of cell wall constituents in algal taxonomy. In: Irvine, D.E.G., Price, J.H. (Eds), *Modern approaches to the taxonomy of red and brown algae*, Academic Press, London. 63-85
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049–55.
- McNeil, M., Darvill, A.G., Fry, S.C., Albersheim, P., 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu. Rev. Biochem.* <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.53.070184.003205>
- Mecocci, P., MacGarvey, U., Beal, M.F., 1994. Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 36, 747–751. <https://doi.org/10.1002/ana.410360510>

- Méndez-Sandín, M., Fernández, C., 2016. Changes in the structure and dynamics of marine assemblages dominated by *Bifurcaria bifurcata* and *Cystoseira* species over three decades (1977-2007). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2016.03.015>
- Mendis, E., Kim, S. K., 2011. Present and future prospects of seaweeds in developing functional foods. *Adv. Food. Nutr. Res.* 64 : 1-15.
- Mérigout P., 2006. Étude du métabolisme de la plante en réponse à l'apport de différents fertilisants et adjuvants culturaux. Influence des phytohormones sur le métabolisme azoté. Thèse de doctorat. Université AgroParisTech, Paris, 110 p.
- Middleton, E., Kandaswami, C., 1993. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer, in: *The Flavonoids*. Springer US, Boston, MA, pp. 619–652. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2911-2_15
- Mikami, K., Hosokawa, M., 2013. Biosynthetic pathway and health benefits of fucoxanthin, an algae-specific xanthophyll in brown seaweeds. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms140713763>
- Milane H., 2004. La quercétine et ses dérivés : molécule à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, étude et applications thérapeutique. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur, Paris, 155 p.
- Mišurcová, L., 2011. Chemical Composition of Seaweeds, in: *Handbook of Marine Macroalgae*. pp. 171–192. <https://doi.org/10.1002/9781119977087.ch7>
- Mobley, H.L., Hausinger, R.P., 1989. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiol. Rev.* 53, 85–108.
- Mole Megha, N.; Sabale Anjali, B., 2013. Antioxidant Potential of Seaweeds from Kunakeshwar along the West Coast Maharashtra. *Asian J. Biomed. Pharm. Sci.* 3, 45–50.
- Momtaz, S., Mapunya, B.M., Houghton, P.J., Edgerly, C., Hussein, A., Naidoo, S., Lall, N., 2008. Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of *Sideroxylon inerme* L. stem bark, used in South Africa for skin lightening. *J. Ethnopharmacol.* 119, 507–512. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.06.006>
- Moodie, L.W.K., Sepčić, K., Turk, T., Frangež, R., Svenson, J., 2019. Natural cholinesterase inhibitors from marine organisms. *Nat. Prod. Rep.* 36, 1053–1092. <https://doi.org/10.1039/C9NP00010K>
- Morel, L., Tian, X.-H., Croker, B.P., Wakeland, E.K., 1999. Epistatic Modifiers of Autoimmunity in a Murine Model of Lupus Nephritis. *Immunity* 11, 131–139. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80088-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80088-6)
- Mori, K., Kashiwagi, A., Yomo, T., 2011. Single-cell isolation and cloning of *Tetrahymena thermophila* cells with a fluorescence-activated cell sorter. *J. Eukaryot. Microbiol.* 58, 37–42. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2010.00517.x>
- Moubayed, N.M.S., Al Hour, H.J., Al Khulaifi, M.M., Al Farraj, D.A., 2017. Antimicrobial, antioxidant properties and chemical composition of seaweeds collected from Saudi Arabia (Red Sea and Arabian Gulf). *Saudi J. Biol. Sci.* 24, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.05.018>
- Moujahid A, Najim L 2004: The occurrence of some betaines in five macroalgal species from the Moroccan Atlantic coast. *Cryptogamie Algologie* 25: 199-205.

Moreau B., maître de conférences de pharmacognosie à la faculté de Pharmacie de Nancy. Travaux dirigés et travaux pratiques de pharmacognosie de 3ème année de doctorat de pharmacie, 2003..

Munir, N., Sharif, N., Naz, S., Manzoor, F., 2013. Algae : A potent antioxidant source 1, 22–31.

Muraguri, E.N., Wakibia, J.G., Kinyuru, J.N., 2016a. Chemical Composition and Functional Properties of Selected Seaweeds from the Kenya Coast. *J. Food Res.* 5, 114. <https://doi.org/10.5539/jfr.v5n6p114>

Muraguri, E.N., Wakibia, J.G., Kinyuru, J.N., 2016b. Chemical Composition and Functional Properties of Selected Seaweeds from the Kenya Coast. *J. Food Res.* <https://doi.org/10.5539/jfr.v5n6p114>

Murray, P.M., Moane, S., Collins, C., Beletskaya, T., Thomas, O.P., Duarte, A.W.F., Nobre, F.S., Owoyemi, I.O., Pagnocca, F.C., Sette, L.D., McHugh, E., Causse, E., Pérez-López, P., Feijoo, G., Moreira, M.T., Rubiolo, J., Leirós, M., Botana, L.M., Pinteus, S., Alves, C., Horta, A., Pedrosa, R., Jeffryes, C., Agathos, S.N., Allewaert, C., Verween, A., Vyverman, W., Laptev, I., Sineoky, S., Bisio, A., Manconi, R., Ledda, F., Marchi, M., Pronzato, R., Walsh, D.J., 2013. Sustainable production of biologically active molecules of marine based origin. *N. Biotechnol.* 30, 839–850. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.03.006>

Murugan, K., Iyer, V. V., 2014. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts of selected red and brown seaweeds from the Mandapam Coast of Tamil Nadu. *J. Food Biochem.* 38, 92–101. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12029>

Mwalugha, H.M., Wakibia, J.G., Kenji, G.M., Mwasaru, M.A., 2015. Chemical Composition of Common Seaweeds from the Kenya Coast. *J. Food Res.* 4, 28. <https://doi.org/10.5539/jfr.v4n6p28>

Nakamura, H., Kobayashi, J., Hirata, Y., 1982. Separation of mycosporine-like amino acids in marine organisms using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 250, 113–118. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)95219-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)95219-1)

Nanney, D.L., Simon, E.M., 1999. Chapter 1 Laboratory and Evolutionary History of *Tetrahymena thermophila*, in: *In Methods in Cell Biology.* pp. 3–25. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)61527-7](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)61527-7)

Nelson, M.M., Phleger, C.F., Nichols, P.D., 2002. Seasonal Lipid Composition in Macroalgae of the Northeastern Pacific Ocean. *Bot. Mar.* 45, 58–65. <https://doi.org/10.1515/BOT.2002.007>

Ngo, D.H., Kim, S.K., 2013. Sulfated polysaccharides as bioactive agents from marine algae. *Int. J. Biol. Macromol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.08.036>

Nickavar, B., Esbati, N., 2012. Evaluation of the Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Three *Thymus* Species. *JAMS J. Acupunct. Meridian Stud.* 5, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.jams.2012.03.003>

Nicolau, A., Dias, N., Mota, M., Lima, N., 2001. Trends in the use of protozoa in the assessment of wastewater treatment. *Res. Microbiol.* 152, 621–630. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01241-4](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01241-4)

Norouzi, F., Hosseini, M., Abareshi, A., Beheshti, F., Khazaei, M., Shafei, M.N., Soukhtanloo, M., Gholamnezhad, Z., Anaeigoudari, A., 2019. Memory enhancing effect of *Nigella Sativa* hydro-alcoholic extract on lipopolysaccharide-induced memory impairment in rats. *Drug Chem. Toxicol.* 42, 270–279. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1447578>

Nourhashémi, F., Gillette-Guyonnet, S., Andrieu, S., Ghisolfi, A., Ousset, P.J., Grandjean, H., Grand, A., Pous, J., Vellas, B., Albarède, J.-L., 2000. Alzheimer disease: protective factors. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 643S-649S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.2.643s>

O'Sullivan, A.M., O'Callaghan, Y.C., O'Grady, M.N., Hayes, M., Kerry, J.P., O'Brien, N.M., 2013. The effect of solvents on the antioxidant activity in Caco-2 cells of Irish brown seaweed extracts prepared using accelerated solvent extraction (ASE®). *J. Funct. Foods* 5, 940–948. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.02.007>

of the United Nations.p. 230

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)

Oucif, H., Benaissa, M., Ali Mehidi, S., Prego, R., Aubourg, S.P., Abi-Ayad, S.M.E.A., 2020. Chemical Composition and Nutritional Value of Different Seaweeds from the West Algerian Coast. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 29, 90–104. <https://doi.org/10.1080/10498850.2019.1695305>

Ouhssine K., Ouhssine M. & Mohammed El yachioui M., 2006. Caractérisation chimique et microbiologique des déchets de *Gelidium sesquipedale* avant et après fermentation. *Société de Pharmacie de Bordeaux*, 145: 31-40

Oumaskour, K., Boujaber, N., Etahiri, S., Assobhei, O., 2013. Anti-inflammatory and antimicrobial activities of twenty-three marine red algae from the coast of Sidi Bouzid (El Jadida-Morocco).

Oyaizu, M., 2011. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese J. Nutr. Diet.* 44, 307–315. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>

Ozgun, S., Turan, F., 2015. Biochemical composition of some brown algae from Iskenderun Bay, the northeastern Mediterranean coast of Turkey, *J. Black Sea/Mediterranean Environment*.

Öztürk, M., Tel, G., Öztürk, F.A., Duru, M.E., 2014. The Cooking Effect on Two Edible Mushrooms in Anatolia: Fatty Acid Composition, Total Bioactive Compounds, Antioxidant and Anticholinesterase Activities, *Records of Natural Products*.

Pádua, D., Rocha, E., Gargiulo, D., Ramos, A.A., 2015. Bioactive compounds from brown seaweeds: Phloroglucinol, fucoxanthin and fucoïdan as promising therapeutic agents against breast cancer. *Phytochem. Lett.* 14, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.09.007>

Paiva, L., Lima, E., Patarra, R.F., Neto, A.I., Baptista, J., 2014. Edible Azorean macroalgae as source of rich nutrients with impact on human health. *Food Chem.* 164, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.119>

Pal, S., Sarkar, C., 2014. Protective effect of resveratrol on fluoride induced alteration in protein and nucleic acid metabolism, DNA damage and biogenic amines in rat brain. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.07.009>

Pangestuti, R., Kim, S., 2011. Neuroprotective Effects of Marine Algae. *Mar. Drugs* 9, 803–818. <https://doi.org/10.3390/md9050803>

Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A., Caparrini, A., 1986. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Anal. Biochem.* 154, 536–541. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90026-6)

- Papp, M., Bal, A., 1987. Separation of the motivational and motor consequences of 6-hydroxydopamine lesions of the mesolimbic or nigrostriatal system in rats. *Behav. Brain Res.* 23, 221–229. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(87\)90022-2](https://doi.org/10.1016/0166-4328(87)90022-2)
- Patarra, R.F., Paiva, L., Neto, A.I., Lima, E., Baptista, J., 2011. Nutritional value of selected macroalgae. *J. Appl. Phycol.* 23, 205–208. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9556-0>
- Paul, J.P.J., 2014. Activity of fucoidan extracted from *Padina distromatica* Hauck (brown seaweed) from Hare Island, Thoothukudi, Tamil Nadu, India. *Am. J. Biol. Pharm. Res.* 1, 151–155.
- Paul, S., Kundu, R., 2013. Antiproliferative activity of methanolic extracts from two green algae, *Enteromorpha intestinalis* and *Rizoclonium riparium* on HeLa cells. *DARU, J. Pharm. Sci.* 21. <https://doi.org/10.1186/2008-2231-21-72>
- Peinado, I., Girón, J., Koutsidis, G., Ames, J.M., 2014. Chemical composition, antioxidant activity and sensory evaluation of five different species of brown edible seaweeds. *Food Res. Int.* 66, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.035>
- Perkins, C.L., Fang, G., Kim, C.N., Bhalla, K.N., 2000. The role of Apaf-1, caspase-9, and Bid proteins in etoposide- or paclitaxel-induced mitochondrial events during apoptosis. *Cancer Res.* 60, 1645–1653.
- Person, J., 2010. Algues, filières du futur, colloque algues : filières du futur, livre turquoise, Adebitech, Romainville. 200pp
- Person, J., 2011. Livre Turquoise - Algues, Filière du Future. Actes du Colloq. Adebitech 17-19 Novembre 2010, Romainville. 163p.
- Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO. (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Cœur, Poumons*, 4, (5)
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J., 2002. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Physiological action of antioxidant defences* 16, 233–239.
- Pinteus, S., Silva, J., Alves, C., Horta, A., Fino, N., Rodrigues, A.I., Mendes, S., Pedrosa, R., 2016. Cytoprotective effect of seaweeds with high antioxidant activity from the Peniche coast (Portugal). *Food Chem.* 218, 591–599. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.067>
- Pinteus, S., Silva, J., Alves, C., Horta, A., Thomas, O., Pedrosa, R., 2017. Antioxidant and Cytoprotective Activities of *Fucus spiralis* Seaweed on a Human Cell in Vitro Model. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 292. <https://doi.org/10.3390/ijms18020292>
- Polat, S., Ozogul, Y., 2008. Biochemical composition of some red and brown macro algae from the Northeastern Mediterranean Sea. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 59, 566–572. <https://doi.org/10.1080/09637480701446524>
- Polat, S., Ozogul, Y., 2013. Seasonal proximate and fatty acid variations of some seaweeds from the northeastern Mediterranean coast. *Oceanologia* 55, 375–391. <https://doi.org/10.5697/oc.55-2.375>
- PORSOLT, R.D., LE PICHON, M., JALFRE, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730–732. <https://doi.org/10.1038/266730a0>
- Porter, L.J., 1989. Tannins. pp. 389–419. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-461011-8.50017-2>
- Pourganji, M., Hosseini, M., Soukhtanloo, M., Zabihi, H., Hadjzadeh, M.A. Reza, 2014. Protective role of endogenous ovarian hormones against learning and memory impairments and brain tissues oxidative

damage induced by lipopolysaccharide. Iran. Red Crescent Med. J. 16, e13954. <https://doi.org/10.5812/ircmj.13954>

Powers SK, Smuder AJ, Kavazis AN, Hudson MB., 2010. Experimental guidelines for studies designed to investigate the impact of antioxidant supplementation on exercise performance. International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism. 20:2–14

Powers, S.K., Jackson, M.J., 2008. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. Physiol. Rev. 88, 1243–76. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2007>

Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. Eur. J. Pharmacol. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X)

Rachida, C., Khadija, M., Fadila, A., Abdelaziz, S., 2013. Protective and antioxidant potential of the argan oil on induced oxidative stress in *Tetrahymena pyriformis*. J. Med. Plants Res. 7, 1961–1968. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.139>

Rafiquzzaman, S.M., Kim, E.Y., Lee, J.M., Mohibullah, M., Alam, M.B., Soo Moon, I., Kim, J.-M., Kong, I.-S., 2015. Anti-Alzheimers and anti-inflammatory activities of a glycoprotein purified from the edible brown alga *Undaria pinnatifida*. Food Res. Int. 77, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.021>

Ragan, M.A., Jamieson, W.D., 1982. Oligomeric polyphloroglucinols from *Fucus vesiculosus*: Photoplate mass spectrometric investigation. Phytochemistry 21, 2709–2711. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(82\)83103-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(82)83103-8)

Raman, R., Parthiban, S., Karthikeyan, S., Muthuraman, M.S., Sivasubramanian, A., 2014. Antimicrobial and anti-inflammatory studies on *Sargassum wightii* extracts. Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 6, 611–614.

Rapport national., 2012. Etude nationale sur la biodiversité : rapport de synthèse. Ministère de l'agriculture et de la pêche maritime. p37-40, 124pp.

Rauf, A., Uddin, G., Siddiqui, B.S., Khan, H., Uzair, S., Shah, A., Hadda, T. Ben, Mabkhot, Y.N., Farooq, U., Khan, A., 2016. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of Flavonoids isolated from *Pistacia integerrima* galls. Complement. Ther. Med. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2016.02.002>

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic. Biol. Med. 26, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

Rengasamy, K.R.R., Amoo, S.O., Aremu, A.O., Stirk, W.A., Gruz, J., Šubrtová, M., Doležal, K., Van Staden, J., 2015. Phenolic profiles, antioxidant capacity, and acetylcholinesterase inhibitory activity of eight South African seaweeds. J. Appl. Phycol. 27, 1599–1605. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0438-8>

Rengasamy, K.R.R., Kulkarni, M.G., Stirk, W.A., Van Staden, J., 2014. Eckol - a new plant growth stimulant from the brown seaweed *Ecklonia maxima*. J. Appl. Phycol. 27, 581–587. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0337-z>

Reviere, B., 2002. Biologie et phylogénie des algues. Belin. 1, 351p

Rezzag M. O., 2010. Extraction de certains composés du miel naturel ayant effet antimicrobien. Thèse d'études supérieures. Université Kasdi Merbah, Ouargla, 51 p

- Riadi, H., Kazzaz, M., 1998. Inventaire bibliographique des algues benthiques du littoral Marocain. I. chlorophyceae et phaeophyceae. *Acta Bot. Malacit.* 23, 23–41.
- Riadi, H., Kazzaz, M., 2000. Inventaire bibliographique des Algues benthiques du littoral Marocain. I. chlorophyceae et phaeophyceae. *Acta Bot. Barcinonensia* 46, 53–88.
- Riadi, Hassane, Kazzaz, M., 1998. Inventaire bibliographique des algues benthiques du littoral Marocain. I. Chlorophyceae et phaeophyceae. *Acta Bot. Malacit.* 23, 23–41.
- Rice-evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B., 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic. Res.* <https://doi.org/10.3109/10715769509145649>
- Robic A. (2008). Etude de la variabilité chimique, physico- chimique et rhéologique des ulvanes, polysaccharides des parois cellulaires d'algues marines vertes de la famille des Ulvales, Chlorophytes). Doctorat Biotechnologies végétales, Université de Nantes. 175 p.
- Rodriguez-jasso, R.M., Mussatto, S.I., Pastrana, L., 2014. Chemical composition and antioxidant activity of sulphated 68, 203–209. <https://doi.org/10.2478/s11696-013-0430-9>
- Rozas, G., Guerra, M., Labandeira-García, J., 1997. An automated rotarod method for quantitative drug-free evaluation of overall motor deficits in rat models of parkinsonism. *Brain Res. Protoc.* 2, 75–84. [https://doi.org/10.1016/S1385-299X\(97\)00034-2](https://doi.org/10.1016/S1385-299X(97)00034-2)
- Ruiz G., 2005. Extraction, Détermination Structurale et valorisation chimique de phycocolloides d'Algue rouge, thèse de doctorat en Chimie appliquée-Chimie des Substances Naturelles, université de Limoges, Ecole Doctorale Sciences- Technologie-Santé
- Ruperez, P., 2002. Mineral content of edible marine seaweeds. *Food Chem.* 79, 23–26. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00171-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00171-1)
- S. Babitha, E.K., 2011. Prospects and trends of marine-derived cosmeceutical ingredients, in: *Marine Cosmeceuticals : Trends and Prospects.* pp. 63–65.
- Sabeena Farvin, K.H., Jacobsen, C., 2013. Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chem.* 138, 1670–1681. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.078>
- Sabudak, T., Demirkiran, O., Ozturk, M., Topcu, G., 2013. Phenolic compounds from *Trifolium echinatum* Bieb. and investigation of their tyrosinase inhibitory and antioxidant activities. *Phytochemistry* 96, 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.08.014>
- Sabudak, T., Ozturk, M., Alpay, E., 2017. New bioflavonoids from *solanum nigrum* L. by anticholinesterase and anti-tyrosinase activities-guided fractionation. *Rec. Nat. Prod.* 11, 130–140.
- Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Seca, A.M.L., Pinto, D.C.G.A., Michalak, I., Trincone, A., Mishra, A.P., Nigam, M., Zam, W., Martins, N., 2019. Current trends on seaweeds: Looking at chemical composition, phytopharmacology, and cosmetic applications. *Molecules.* <https://doi.org/10.3390/molecules24224182>
- Salum, C., Roque-Da-Silva, A.C., Morato, S., 2003. Conflict as a determinant of rat behavior in three types of elevated plus-maze. *Behav. Processes.* [https://doi.org/10.1016/S0376-6357\(03\)00034-2](https://doi.org/10.1016/S0376-6357(03)00034-2)
- Samarakoon, K., Jeon, Y.J., 2012. Bio-functionalities of proteins derived from marine algae - A review. *Food Res. Int.* <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.03.013>

- Sanchez-Moreno, C., 2002. Review : Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Sci. Technol. Int.* 8, 121–137. <https://doi.org/10.1106/108201302026770>
- Sánchez-Muniz, F.J., Bocanegra de Juana, A., Bastida, S., Benedí, J., 2013. Algae and cardiovascular health, in: *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*. Elsevier, pp. 369–415. <https://doi.org/10.1533/9780857098689.2.369>
- Sanjeewa, K.K.A., Kim, E.A., Son, K.T., Jeon, Y.J., 2016. Bioactive properties and potentials cosmeceutical applications of phlorotannins isolated from brown seaweeds: A review. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.06.027>
- Sathya, R., Kanaga, N., Sankar, P., Jeeva, S., 2017. Antioxidant properties of phlorotannins from brown seaweed *Cystoseira trinodis* (Forsskål) C. Agardh. *Arab. J. Chem.* 10, S2608–S2614. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.09.039>
- Sauvageau C., 1912. A propos de *Cystoseira* de Banyuls et de Guétary. *Bulletin de la Station Biologique d'Arcachon*, 14: 133-566
- Schapira, A. H., Cooper, J. M., Dexter, D., Jenner, P., Clark, J. B., and Marsden, C. D., 1989. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1, 1269.
- Schisler, N.J., Singh, S.M., 1989. Effect of ethanol in vivo on enzymes which detoxify oxygen free radicals. *Free Radic. Biol. Med.* 7, 117–123. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(89\)90002-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(89)90002-6)
- Seenivasan, R., Indu, H., 2013. In vitro antioxidant activity of selected seaweeds from southeast coast of of india. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 5, 0975–1491.
- Shahidi, F., Janitha, P.K., Wanasundara, P.D., 1992. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32, 67–103. <https://doi.org/10.1080/10408399209527581>
- Shanab, S.M.M., Shalaby, E.A., El-Fayoumy, E.A., 2011. *Enteromorpha compressa* Exhibits Potent Antioxidant Activity. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2011/726405>
- Shebis, Y., Iluz, D., Kinel-tahan, Y., Dubinsky, Z., Yehoshua, Y., 2013. Natural Antioxidants : Function and Sources 2013, 643–649.
- Shibata, T., Ishimaru, K., Kawaguchi, S., Yoshikawa, H., Hama, Y., 2009. Antioxidant activities of phlorotannins isolated from Japanese Laminariaceae, in: *Nineteenth International Seaweed Symposium*. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9619-8_32
- Shiino, M., Watanabe, Y., Umezawa, K., 2001. Synthesis of N-substituted N-nitrosohydroxylamines as inhibitors of mushroom tyrosinase. *Bioorganic Med. Chem.* 9, 1233–1240. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(01\)00003-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00003-7)
- Shu, M.-H., Appleton, D., Zandi, K., AbuBakar, S., 2013. Anti-inflammatory, gastroprotective and anti-ulcerogenic effects of red algae *Gracilaria changii* (Gracilariales, Rhodophyta) extract. *BMC Complement. Altern. Med.* 13, 61. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-61>
- Sies, H., 2017. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* 11, 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>
- Silva, G.C., Albuquerque Costa, R., Oliveira Peixoto, J.R., Pessoa Nascimento, F.E., Macedo Carneiro, P.B. de, Fernandes Vieira, R.H.S. dos, 2013. Tropical Atlantic marine macroalgae with bioactivity against

virulent and antibiotic resistant *Vibrio*. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 41, 183–188. <https://doi.org/10.3856/vol41-issue1-fulltext-17>

Silva, R., Abílio, V., Takatsu, A., Kameda, S., Grassl, C., Chehin, A., Medrano, W., Calzavara, M., Registro, S., Andersen, M., Machado, R., Carvalho, R., Ribeiro, R. d. A., Tufik, S., Frussa-Filho, R., 2004. Role of hippocampal oxidative stress in memory deficits induced by sleep deprivation in mice. *Neuropharmacology* 46, 895–903. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2003.11.032>

Singh, S.P., Kumari, S., Rastogi, R.P., Singh, K.L., Sinha, R.P., 2008. Mycosporine-like amino acids (MAAs): chemical structure, biosynthesis and significance as UV-absorbing/screening compounds. *Indian J. Exp. Biol.* 46, 7–17.

Sithranga Boopathy, N., Kathiresan, K., 2013. Anticancer agents derived from marine algae, in: *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*. Elsevier, pp. 307–337. <https://doi.org/10.1533/9780857098689.2.307>

Skulachev, V.P., 1996. Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Lett.* 397, 7–10. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00989-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00989-1)

Slinkard, K., Singleton, V.L., 1977. Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Vitic.* 28, 49–55.

Sohal, R.S., Mockett, R.J., Orr, W.C., 2002. Mechanisms of aging: An appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic. Biol. Med.* [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00886-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00886-9)

Squier, T.C., 2001. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp. Gerontol.* 36, 1539–1550. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(01\)00139-5](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(01)00139-5)

Stadtman, E.R., 1993. Oxidation of Free Amino Acids and Amino Acid Residues in Proteins by Radiolysis and by Metal-Catalyzed Reactions. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 797–821. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.62.070193.004053>

Stirk, W.A., Reinecke, D.L., van Staden, J., 2007. Seasonal variation in antifungal, antibacterial and acetylcholinesterase activity in seven South African seaweeds. *J. Appl. Phycol.* 19, 271–276. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9134-7>

Stirk, W.A., Van Staden, J., 2014. Plant Growth Regulators in Seaweeds, in: *Advances in Botanical Research*. Elsevier, pp. 125–159. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408062-1.00005-6>

Sun, yi, Oberley, L., Li, V., 1988. A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase. *Clin. Chem.* 34, 497–500.

Tang, S.Y., Halliwell, B., 2010. Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.137>

Tazi, A., Farh, M., Moumni, M., Hakkou, F., 1992. Potentiation of behavioural effects of a calcium channel antagonist, nifedipine, by ipsapirone. *Behav. Pharmacol.* 3, 269–274. <https://doi.org/10.1097/00008877-199206000-00012>

Tel, G., Apaydın, M., Duru, M.E., ozturk, M., 2012. Antioxidant and Cholinesterase Inhibition Activities of Three *Tricholoma* Species with Total Phenolic and Flavonoid Contents: The Edible Mushrooms from Anatolia. *Food Anal. Methods* 5, 495–504. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9275-4>

Tel, G., Öztürk, M., Duru, M.E., Doğan, B., Harmandar, M., 2013. Fatty acid composition, antioxidant, anticholinesterase and tyrosinase inhibitory activities of four *Serratula* species from anatolia. *Rec. Nat. Prod.* 7, 86–95.

Tessier, F., Marconnet, P., 1995. Radicaux libres , systkmes antioxydants.

Thénard L.J, (1818). Académie des Sciences, Traite de Chimie 1, Paris ,6th Edition.

Thomas, N., Kim, S., 2013. Beneficial Effects of Marine Algal Compounds in Cosmeceuticals. *Mar. Drugs* 11, 146–164. <https://doi.org/10.3390/md11010146>

Tierney, M.S., Croft, A.K., Hayes, M., 2010. A review of antihypertensive and antioxidant activities in macroalgae. *Bot. Mar.* 53, 387–408. <https://doi.org/10.1515/bot.2010.044>

Tierney, M.S., Smyth, T.J., Rai, D.K., Soler-vila, A., Croft, A.K., Brunton, N., 2013a. Enrichment of polyphenol contents and antioxidant activities of Irish brown macroalgae using food-friendly techniques based on polarity and molecular size. *Food Chem.* 139, 753–761. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.019>

Tierney, M.S., Soler-vila, A., Croft, A.K., Hayes, M., 2013b. Antioxidant activity of the brown macroalgae *Fucus spiralis* Linnaeus harvested from the West Coast of Ireland. *Curr. Res. J. Biol. Sci.* 5, 81–90.

Tsao, R., 2010. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>.

USDA (2001). Agricultural research service. Nutrient Database for Standard Reference, Release 14.

V. Brito, T., Barros, F.C.N., Silva, R.O., Dias Júnior, G.J., José, J.S., Franco, Á.X., Soares, P.M.G., Chaves, L.S., Abreu, C.M.W.S., de Paula, R.C.M., Souza, M.H.L.P., Freitas, A.L.P., André, A.L., 2016. Sulfated polysaccharide from the marine algae *Hypnea musciformis* inhibits TNBS-induced intestinal damage in rats. *Carbohydr. Polym.* 151, 957–964. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.047>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>.

Vavilala, S.L., Gawde, K.K., Sinha, M., Souza, J.S.D., Vavilala, S.L., Gawde, K.K., Sinha, M., Souza, J.S.D., 2015. Programmed cell death is induced by hydrogen peroxide but not by excessive ionic stress of sodium chloride in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* Programmed cell death is induced by hydrogen peroxide but not by excessive ionic stress of s 0262. <https://doi.org/10.1080/09670262.2015.1070437>.

Vermerris, W., Nicholson, R., 2006. Phenolic compound biochemistry, Phenolic Compound Biochemistry. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5164-7>

Villière, A. et Genot, C. (2006). Physico-chemical and olfatometric analysis of lipid oxidation in oil-in-water emulsions. *Oleagineux Corps Gras*, 13(2-3) : 152-159.

Viuda-Martos, M., Mohamady, M.A., Fernández-López, J., Abd ElRazik, K.A., Omer, E.A., Pérez-Alvarez, J.A., Sendra, E., 2011. In vitro antioxidant and antibacterial activities of essentials oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control* 22, 1715–1722. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.04.003>.

Wang, H.M.D., Chen, C.C., Huynh, P., Chang, J.S., 2015. Exploring the potential of using algae in cosmetics. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.001>.

- Wang, T., Jónsdóttir, R., Ólafsdóttir, G., 2009. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chem.* 116, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.041>.
- Watanabe, F., Takenaka, S., Katsura, H., Masumder, S.A.M.Z.H., Abe, K., Tamura, Y., Nakano, Y., 1999. Dried Green and Purple Lavers (Nori) Contain Substantial Amounts of Biologically Active Vitamin B 12 but Less of Dietary Iodine Relative to Other Edible Seaweeds. *J. Agric. Food Chem.* 47, 2341–2343. <https://doi.org/10.1021/jf981065c>.
- Wheatley, D.N., Rasmussen, L., Tiedtke, A., 1994. Tetrahymena: a model for growth, cell cycle and nutritional studies, with biotechnological potential. *Bio Essays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 16, 367–372.
- Wijesekara, I., Pangestuti, R., Kim, S., 2011. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydr. Polym.* 84, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.062>.
- Woelkerling, W.J., 2004. Biologie et phylogénie des algues. *Phycologia*. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-43-1-114.1>.
- Wong, K.H., Cheung, P.C.K., 2000. Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds. *Food Chem.* 71, 475–482. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00175-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00175-8).
- Xiao, Z.-P., Peng, Z.-Y., Peng, M.-J., Yan, W.-B., Ouyang, Y.-Z., Zhu, H.-L., 2011. Flavonoids Health Benefits and Their Molecular Mechanism. *Mini-Reviews Med. Chem.* 11, 169–177. <https://doi.org/10.2174/138955711794519546>.
- Yan, W.-W., Chen, G.-H., Wang, F., Tong, J.-J., Tao, F., 2015. Long-term acarbose administration alleviating the impairment of spatial learning and memory in the SAMP8 mice was associated with alleviated reduction of insulin system and acetylated H4K8. *Brain Res.* 1603, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.01.042>.
- Yeom, M., Park, J., Lee, B., 2015. Acupuncture suppresses stress-induced neuroinflammation in the rat hypothalamus. *Integr. Med. Res.* 4, 66. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2015.04.073>.
- Yirmiya, R., Goshen, I., 2011. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain. Behav. Immun.* 25, 181–213. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.10.015>.
- Yoon, N.Y., Chung, H.Y., Kim, H.R., Choi, J.S., 2008. Acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory activities of sterols and phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*. *Fish. Sci.* 74, 200–207. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2007.01511.x>.
- Yoon, N.Y., Eom, T.-K., Kim, M.-M., Kim, S.-K., 2009. Inhibitory Effect of Phlorotannins Isolated from *Ecklonia cava* on Mushroom Tyrosinase Activity and Melanin Formation in Mouse B16F10 Melanoma Cells. *J. Agric. Food Chem.* 57, 4124–4129. <https://doi.org/10.1021/jf900006f>.
- Yoon, W.-J., Ham, Y.M., Kim, S.-S., Yoo, B.-S., Moon, J.-Y., Baik, J.S., Lee, N.H., Hyun, C.-G., 2009. Suppression of pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression by brown algae *Sargassum micracanthum* in RAW 264.7 macrophages. *EurAsian J. Biosci.* 143, 130–143. <https://doi.org/10.5053/ejobios.2009.3.0.17>.
- Yuan, Y. V., Carrington, M.F., Walsh, N.A., 2005. Extracts from dulse (*Palmaria palmata*) are effective antioxidants and inhibitors of cell proliferation in vitro. *Food Chem. Toxicol.* 43, 1073–1081. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.02.012>.

- Zahid, H., Rizwani, G., Kamil, A., Shareef, H., Tasleem, S., Khan, A., 2015. Anti-urease Activity of *Mimusops elengi* Linn (Sapotaceae). *European J. Med. Plants* 6, 223–230. <https://doi.org/10.9734/EJMP/2015/12240>.
- Zhang, Z., Wang, F., Wang, X., Liu, X., Hou, Y., Zhang, Q., 2010. Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity in vitro. *Carbohydr. Polym.* 82, 118–121. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.031>.
- Zhou, K., Yu, L., 2004. Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *LWT - Food Sci. Technol.* 37, 717–721. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.02.008>.
- Zilberg, D., Sinai, T., 2006. Optimization and validation of a colorimetric assay for *Tetrahymena* sp. survival. *Res. Microbiol.* 157, 355–359. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.09.012>.
- Zubia, M., Fabre, M.S., Kerjean, V., Lann, K.L., Stiger-Pouvreau, V., Fauchon, M., Deslandes, E., 2009. Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food Chem.* 116, 693–701. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.025>.
- Zucchi, M.R., Necchi, O., 2001. Effects of temperature, irradiance and photoperiod on growth and pigment content in some freshwater red algae in culture. *Phycol. Res.* 49, 103–114. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1835.2001.00230.x>.

Publications de recherches



In vitro enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phytochemical fingerprints of five Moroccan seaweeds



Fatiha Grina^a, Zain Ullah^c, Erhan Kaplaner^c, Abderrahman Moujahid^a, Rabiaa Eddoha^a, Boubker Nasser^a, Pınar Terzioğlu^b, Mustafa Abdullah Yılmaz^c, Abdulselem Ertaş^d, Mehmet Öztürk^{e,*}, Abdelkhalid Essamadi^{a,*}

^a Faculty of Sciences and Technology, Laboratory of Biochemistry & Neuroscience, Applied Biochemistry and Toxicology Team, Hassan 1st University, P.O. Box 577, Settat 26000, Morocco

^b Faculty of Engineering and Natural Sciences, Department of Fiber and Polymer Engineering, Bursa Technical University, Bursa, Turkey

^c Faculty of Science, Department of Chemistry, Muğla Sıtkı Koçman University, 48121 Kötekli, Turkey

^d Science and Technology Research and Application Center, Dicle University, 21280 Diyarbakir, Turkey

^e Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, Dicle University, 21280 Diyarbakir, Turkey

ARTICLE INFO

Article History:

Received 8 May 2019

Revised 9 October 2019

Accepted 27 October 2019

Available online xxx

Edited by WA Stirk

Keywords:

Macroalgae

Phenolics compounds

Seaweed extracts

Antioxidant activity

Enzymatic activity

LC-MS/MS method

ABSTRACT

The coastlines of Morocco have an abundant resource of diverse seaweeds but the bioactivity of many of these seaweeds is still unexplored. The aim of this study was to contribute to the evaluation of the antioxidant potential, using different in vitro systems and searching some fingerprints of phenolic constituents based on LC-MS/MS method of five seaweeds species obtained from Moroccan Atlantic Ocean: *Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira humilis*, *Cystoseira stricta*, *Fucus spiralis* and *Gelidium sesquipedale*. The total phenolic compounds, the antioxidant activity, anticholinesterase, tyrosinase inhibitory, urease inhibitory activities and the organic compounds were determined. The results showed that *Fucus spiralis* possessed the highest phenolic and flavonoid contents compared to the others. In addition, *Fucus spiralis* (IC_{50} : $13.25 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$) and *Cystoseira stricta* (IC_{50} : $13.58 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$) exhibited higher lipid peroxidation inhibitory activity. The highest 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (IC_{50} : $47.23 \pm 3.8 \mu\text{g/mL}$), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) dia-mmonium salt (ABTS) (IC_{50} : $5.95 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$), and Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) ($55.24 \pm 0.04 \mu\text{g}$ trolox equivalents/mg) activity was measured in *Fucus spiralis*. Regarding metal chelating activity, *Bifurcaria bifurcata* was the best (IC_{50} : $45.22 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$) compared to the others. The highest acetylcholinesterase (IC_{50} : $28.92 \pm 1.8 \mu\text{g/mL}$), butyrylcholinesterase (IC_{50} : $11.72 \pm 2.8 \mu\text{g/mL}$), tyrosinase (IC_{50} : $6.19 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$) and urease (IC_{50} : $10.96 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$) inhibitory activities was found in *Fucus spiralis*. According to LC-MS/MS results, quinic acid, malic acid, fumaric acid, gallic acid, protocatechuic acid, 4-OH-benzoic acid, hesperidin, were detected in ethanol extracts of the five Moroccan seaweeds. This study demonstrated that seaweeds, particularly *Fucus spiralis* and *Cystoseira stricta* could be a promising source of antioxidants and phytochemicals which can be used in cosmetics, pharmaceutical and as nutritional food supplement in food industries to deleterious free radical induced stress, disorder and diseases.

© 2019 SAAB. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Morocco, whose Atlantic and Mediterranean coasts exceed 3500 km, constitutes an abundant richness of algal biomass to value and exploit in the pharmaceutical and agri-food sectors. The Moroccan algae are diverse and include more than 93 species of Chlorophyceae, 110 species of Phaeophyceae and 304 species of Rhodophyceae (Riadi and Kazzaz, 1998, 2000). However, the available scientific reports and knowledge on

Moroccan algae species are very limited. The difference on chemical composition of the seaweeds nutrients depends on habitat, maturity state, species and environmental conditions (Cofrades et al., 2010). Seaweeds are therefore, a good source of different vitamins, essential amino acids, dietary fiber, essential fatty acids, hormones, minerals, and phenolic compounds (Senthilkumar et al., 2013; Stirk et al., 2014a, 2014b; Ambrozova et al., 2014). Furthermore, they are considered as a unique nutrient source especially in the low-calorie diets and healthier foods (Heiba et al., 1993; Cofrades et al., 2010; Mohamed et al., 2012). They are also used extensively in agriculture crops as plant biostimulants due to the presence of endogenous plant growth regulators (Stirk et al., 2014a, 2014b;

*Corresponding authors.

E-mail addresses: mehmetozturk@mu.edu.tr (M. Öztürk), essamadi@uhp.ac.ma (A. Essamadi).

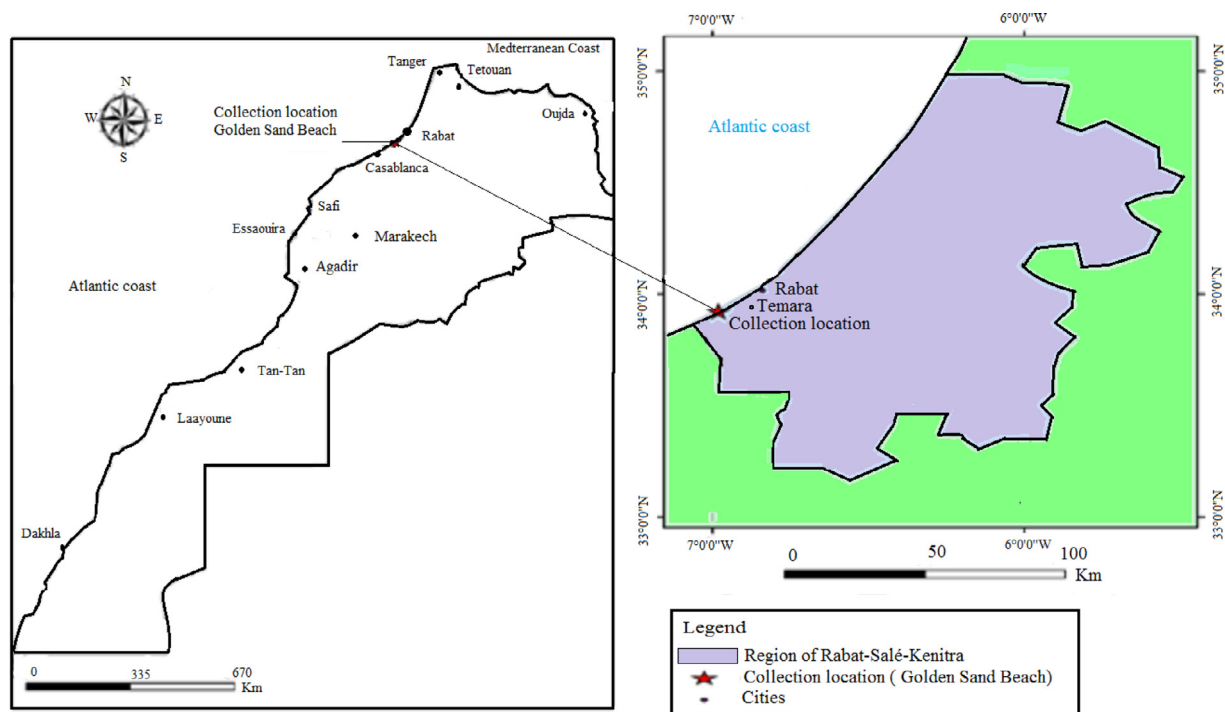


Fig. 1. Localization of collection point seaweeds at Golden Sand Beach.

Rengasamy et al., 2014). Recently, seaweeds have received special attention as a source of natural antioxidants (Senthilkumar et al., 2013).

Seaweeds have been used in pharmacological and food systems (Chan et al., 2011) due to their bioactive compounds such as phenolic compounds (Sabeena Farvin and Jacobsen, 2013; Machu et al., 2015; Agregán et al., 2017), phlorotannins (Wijesekara et al., 2011; Sathya et al., 2017; Shin et al., 2014), fucoxanthin (Yan et al., 1999; Kang et al., 2014) and polysaccharides (Zhang et al., 2010). Seaweeds present various therapeutic properties such as anti-inflammatory (Subash et al., 2016; Bitencourt et al., 2015), antimicrobial (Stirk et al., 2007; Rhimou et al., 2010; El Wahidi et al., 2015), antiviral (Bouhlal et al., 2010; Takebe et al., 2013), antitumoral (Shao et al., 2013; Zhai et al., 2014), radioprotective (Zhang et al., 2008; Shin et al., 2014) and neuroprotective (Rafiqzaman et al., 2015; Custodio et al., 2016; Moodie et al., 2019).

Some of the synthetic antioxidants used in the food industry are suspected to cause cancer in rats (Grice, 1988). This suspicion led to a search for safe antioxidants from natural products. Similarly, some of the drugs being used against Alzheimer's Disease have side effects to the liver (Öztürk, 2012). Therefore, it is necessary to develop and utilize more effective and safe bioactive compounds from natural origins in the food and pharmaceutical industries.

To the best of our knowledge, this study is the first to characterize bioactivity in ethanol extracts from five Moroccan seaweeds. The seaweed studied are the most dominant species in the Moroccan Atlantic coast. Previous studies mainly focused on antibacterial and antifungal effects of these seaweeds. The objective of the present study was to undertake and investigate total phenolic and organic compounds by the establishment of the chemical fingerprint of five Moroccan seaweeds. In addition, the antioxidant potential and inhibitory activities on some enzymes, as therapeutic tools were evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Collection and extraction of seaweeds

Seaweeds were collected in spring 2016 from Atlantic Coast 10 km south of Rabat-Morocco in front of Golden Sand Beach coast (33°92'N; 6°96'E) (Fig. 1) at low tide. The seaweeds were identified

Professor Moujahid A., Hassan First University, Department of Biology and Food Sciences according to the nomenclature adopted in the preliminary inventory of benthic algae of the Moroccan Coast (Boudouresque, 1984) and updated by Riadi and Kazzaz (2000).

Algal samples were identified as *Bifurcaria bifurcata* (Ross, 1958), *Cystoseira humilis* (Schousboe ex Kützing, 1860), *Cystoseira stricta* (Sauvageau, 1911), *Fucus spiralis* (Linnaeus, 1753) and *Gelidium sequepedale* (Clemente) (Thuret, 1876). Voucher specimens of all species were deposited in the National Herbarium (RAB) of the Moroccan Scientific Institute (Rabat, Morocco).

The seaweeds were transported to the laboratory in a cooler box, cleaned and washed with sea and fresh water to remove epiphytes, salts and sands. The samples were dried at 50 °C for 48 to 72 h. The dried samples were ground in an electrical grinder to obtain fine powder. Each powdered seaweed (25 g) was extracted using 70% ethanol (200 ml) at 60 °C for 2 h. The extraction procedure was repeated twice and the combined extracts were filtered through Buchner funnel under vacuum. The solvent was evaporated under reduced pressure and eventually lyophilized. The lyophilized extracts were stored at –20 °C until further used.

2.2. Determination of total phenolic content

The concentrations of phenolic content in all extracts were expressed as mg pyrocatechol equivalents (PEs), determined with Folin–Ciocalteu's reagent (FCR) according to the method of Slinkard and Singleton (1977). Briefly, 1 mL algal extract (1 mg extract/mL MeOH) was added to 46 mL distilled water and 1 mL FCR, and mixed thoroughly. After 3 min, 3 mL sodium carbonate (2%) was added to the mixture and shaken intermittently for 2 h at room temperature. The absorbance was read at 760 nm by a spectrophotometer (Shimadzu 1601, Japan). Pyrocatechol was used as standard and the results were expressed as mg pyrocatechol equivalents (PEs).

2.3. Determination of total flavonoid content

Measurement of flavonoid concentration of the extract was based on the method described by Tel et al. (2012), with a slight

modification (Öztürk et al., 2014). An aliquot of 1 mL algal extract (1 mg extract/mL MeOH) was added to test tubes containing 0.1 mL 10% aluminum nitrate, 0.1 mL 1 M potassium acetate and 3.8 mL methanol. After 40 min at room temperature, the absorbance was determined at 415 nm. The total flavonoid content was calculated from the standard quercetin calibration curve, and the result was expressed as μg quercetin equivalents (QEs).

2.4. Antioxidant activity

2.4.1. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay

The DPPH free radical scavenging activity was determined by the DPPH method described by (Blois, 1958) with slight modifications (Öztürk et al., 2014). In its radical form, DPPH absorbs at 517 nm, but upon reduction by an antioxidant or a radical species, its absorption decreases. Ethanol was used as a control while butylated hydroxytoluene (BH) and α -tocopherol were used as antioxidant standards for comparison of the activity. The results were recorded as 50% inhibition concentration (IC_{50}). The sample concentration providing 50% DPPH scavenging effect (IC_{50}) was calculated from the graph of DPPH scavenging effect percentage against sample concentration.

2.4.2. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) radical scavenging assay

The spectrophotometric analysis of ABTS⁺ scavenging activity was determined according to the method of (Re et al., 1999) with slight modifications (Tel et al., 2013). The ABTS⁺ was produced by the reaction between 7 mM ABTS in water and 2.45 mM potassium persulfate, stored in the dark at room temperature for 12 h. Before usage, the ABTS⁺ solution was diluted to get an absorbance of 0.703 ± 0.025 at 734 nm with ethanol. Ethanol was used as a control, while BHT and α -tocopherol were used as antioxidant standards for comparison of the activity. The results were given as 50% inhibition concentration (IC_{50}). The sample concentration providing 50% ABTS⁺ scavenging effect (IC_{50}) was calculated from the graph of ABTS⁺ scavenging effect percentage against sample concentration.

2.4.3. β -Carotene/linoleic acid bleaching assay

The total antioxidant activity was evaluated using a β -carotene/linoleic acid test system (Sabudak et al., 2013), with slight modifications. β -Carotene (0.5 mg) in 1 mL chloroform was added to 25 μL linoleic acid and 200 mg Tween 40 emulsifier mixture. After evaporation of chloroform under vacuum, 100 mL distilled water saturated with oxygen was added by vigorous shaking. One hundred sixty microliters of this mixture were transferred into 40 mL samples at different concentrations. Ethanol was used as a control. BHA and α -tocopherol were used as antioxidant standards for comparison of the activity. As soon as the emulsion was added into each tube, the zero-time absorbance was measured at 470 nm using a 96-well microplate reader (Spectra Max 340PC³⁸⁴, Molecular Devices, USA) and continued to be read every 30 min until the color of control disappeared. The last absorbance of the emulsion was read after incubation of the plate for 2 h at 50 °C. The bleaching rate (R) of β -carotene was calculated according to the following equation.

$$R = \frac{\ln \frac{a}{b}}{t}$$

Where, \ln = natural log, a = absorbance at time zero, b = absorbance at time t (120 min). The antioxidant activity (AA) was calculated in terms of percent inhibition relative to the control, using the following equation:

$$AA = \frac{R_{\text{Control}} - R_{\text{Sample}}}{R_{\text{Control}}} \times 100$$

2.4.4. Cupric-reducing antioxidant capacity

The cupric-reducing antioxidant capacity was determined according to the method of (Apak et al., 2004) with slight modifications. To each well, in a 96-well plate, 50 μL 10 Mm Cu(II), 50 μL 7.5 Mm neocuproine and 60 μL NH₄Ac buffer (1 M, pH 7.0) solutions were added. Forty microliters of the extract at different concentrations was added to the initial mixture to make the final volume 200 μL . After 1 h, the absorbance at 450 nm was recorded against a reagent blank using a 96-well microplate reader (Spectra Max 340PC³⁸⁴, Molecular Devices, USA). Results were given as absorbance and compared with those of BHA and α -tocopherol used as antioxidant standards.

2.4.5. Ferrous ion chelating activity

The chelating activity of the extracts on Fe²⁺ was measured as reported by Decker and Welch (1990), with slight modifications. The extract solution (80 μL dissolved in ethanol in different concentrations) was added to 40 μL 0.2 mM FeCl₂. The reaction was initiated by the addition of 80 μL 0.5 Mm ferene. The mixture was shaken vigorously and left standing at room temperature for 10 min. After the mixture reached equilibrium, the absorbance was measured at 593 nm. EDTA was used as a positive control for comparison of the activity.

2.6. Enzyme inhibitory activity

2.6.1. Anticholinesterase activity

Acetylcholinesterase (AChE, Type-VI-S, EC 3.1.1.7, 425.84 U/mg) and butyrylcholinesterase (BChE, EC 3.1.1.8, 11.4 U/mg) inhibitory activities of ethanol extracts were determined according to previously described Ellman's colorimetric method (Ellman et al., 1961). For this purpose, 130 μL sodium phosphate buffer (100 mM, pH 8.0), 10 μL ethanolic extract at different concentrations, and 20 μL AChE or BChE enzymes in buffer were mixed and incubated for 15 min at 25 °C. Subsequently, 20 μL 0.5 mM DTNB (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) and 20 μL acetylthiocholine iodide (0.71 mM) or butyrylthiocholine chloride (0.2 mM) was added for AChE, or BChE assay, respectively. Then the absorbance was measured at 412 nm using a 96-well microplate reader (SpectraMax 340PC³⁸⁴, Molecular Devices, USA). Galantamine was used as standard compound (positive control) on two enzymes inhibitory effects evaluation (Sabudak et al., 2017).

2.6.2. Tyrosinase inhibition activity

Tyrosinase inhibitory activity of the extracts was measured using the method described by (Hearing, 1987) with slight modification. L-DOPA was used as a substrate. For this purpose, to the 96 well plate 150 μL potassium phosphate buffer (50 mM, pH 6.5), 10 μL tested extracts dissolved in absolute ethanol at different concentrations and 20 μL tyrosinase (13.3 U/well) were mixed. After 10 min incubation at room temperature, 8.4 mM L-DOPA was added then the absorbance was measured at 475 nm for 10 min using a 96-well microplate reader (Spectra Max 340PC³⁸⁴, Molecular Devices, USA) (Sabudak et al., 2017). The well-known tyrosinase inhibitors kojic acid and L-mimosine were used as positive controls.

2.6.3. Urease inhibitory activity

Canavalia ensiformis (Jack bean) urease was used to determine inhibitory activity where urea was used as substrate (Zahid et al., 2015). The enzyme solution and substrate (0.1 M) were prepared in phosphate buffer (0.01 M, pH 8.2). To the well, 10 μL sample in ethanol, and 25 μL (8.3×10^{-3} U) urease, and 50 μL urea were added. After 15 min at 30 °C, the 45 μL phenol reagent containing 0.005% w/v sodium nitroprusside and 1% w/v phenol, and 70 μL alkali reagent containing 0.1% NaOCl and 0.5% w/v NaOH were added. The absorbance was measured kinetically at 630 nm using a 96-well microplate reader (Spectra Max 340PC³⁸⁴, Molecular Devices, USA). The absorbance was measured kinetically at 630 nm. The thiourea was used as standard to compare the activity.

2.7. Identification and quantitation of phenolic compounds

The phenolic compounds and the organic acids of seaweeds were determined using LC-MS/MS instrument. The ethanolic extract was dissolved with methanol and diluted to 250 mg/L and then all samples were filtrated using 0.22- μ m microfiber filter. LC-MS/MS (Nexera, Shimadzu, Kyoto, Japan) was equipped with DGU-20A3R degasser, LC-30AD binary pumps, SIL-30AC autosampler and CTO-10ASvp column oven. The chromatographic separation was performed on a C18 reversed-phase Inertsil ODS-4 (150 mm \times 4.6 mm, 3 μ m) analytical column ODS C18 column. The elution gradient consisted of mobile phase A (Water, 5 mM ammonium formate and 0.1% formic acid) and mobile phase B (methanol, 5 mM ammonium formate and 0.1% formic acid). The elution was started with mobile phase A, and the gradients of mobile phase B. The optimizations of LC-MS/MS and the method validation parameters were the same as given previously (Ertas et al., 2015). The flow rate was 0.5 mL/min while the injection volume was 4 μ L. Twenty-seven phenolic compounds including flavonoids, flavonoid glycosides, phenolic acids, phenolic aldehyde, coumarin and three non-phenolic organic acids were screened in the extracts.

2.8. Statistical analyses

All data on activity assays were the average of triplicate analyses, which were recorded as mean \pm standard error of the mean (SEM). The significance between means were analyzed by ANOVA procedures by using SPSS software program ($p < 0.05$).

3. Results

3.1. Total phenolic and flavonoid content

The total phenolic content of the seaweed species ranged from 4.68 to 22.91 μ g pyrocatechol equivalents per mg extract (PEs/mg extract). Among the five seaweeds studied, the phenolic content of *Fucus spiralis* was 3-fold higher than those of *Cystoseira humilis* and *Cystoseira stricta* and 2- and 5-fold higher *Gelidium sesquipedale*, and *Bifurcaria bifurcata* (Table 1). The flavonoid content of seaweeds ranged from 4.26 to 26.86 μ g quercetin equivalents per mg extract (QEs/mg extract). The most flavonoid rich extract was the ethanol extract of *Fucus spiralis* which was about 3- and 4-fold higher than those of *Cystoseira stricta* and *Cystoseira humilis*, while *Gelidium sesquipedale* was nearly 5-fold lower than *Fucus spiralis* (Table 1). However, the lowest amount was observed in *Bifurcaria bifurcata*, which was 6.3-fold lower than that of *Fucus spiralis*.

3.2. Antioxidant activity

DPPH scavenging activity was consistently higher in ethanolic extracts of *Fucus spiralis*. These algae present a better activity being

Table 1

Total phenolic and total flavonoid contents of the extracts of the selected seaweeds.^a

| Extracts | Phenolic content μ g PEs/mg extract ^b | Flavonoid content μ g QEs/mg extract ^c |
|------------------------------|--|---|
| <i>Cystoseira stricta</i> | 7.24 \pm 0.03 | 8.53 \pm 0.02 |
| <i>Cystoseira humilis</i> | 7.68 \pm 0.05 | 6.72 \pm 0.02 |
| <i>Fucus spiralis</i> | 22.9 \pm 0.06 | 26.9 \pm 0.03 |
| <i>Bifurcaria bifurcata</i> | 4.68 \pm 0.04 | 4.26 \pm 0.02 |
| <i>Gelidium sesquipedale</i> | 11.1 \pm 0.03 | 5.84 \pm 0.02 |

^a Values expressed are means \pm standard error of three parallel measurements ($p < 0.05$).

^b PEs, pyrocatechol equivalents.

^c QEs, quercetin equivalents.

nearly 2-fold higher than those of *Gelidium sesquipedale* and *Cystoseira stricta*. In contrast, *Cystoseira stricta* and *Bifurcaria bifurcata* present a lower activity being 2.5 and 4.5-fold lower than that of *Fucus spiralis* (Table 2).

Fucus spiralis showed the highest ABTS scavenging activity, which was very close to those of α -tocopherol and BHT. The other seaweeds; namely, *Gelidium sesquipedale* and *Cystoseira humilis* also exhibited good results but lower than those of α -tocopherol, BHT and quercetin. However, the activity in *Bifurcaria bifurcata* was lower than that of ethanolic extracts of all seaweeds, with 22-fold lower than that of *Fucus spiralis* (Table 2).

In β -carotene-linoleic acid assay, all seaweeds ethanol extracts exhibited the antioxidant activity with values lower than 75 μ g/mL and none of them exhibited better activity than that of the antioxidant standards. The activity of *Fucus spiralis* and *Cystoseira stricta* were similar and exhibited the higher lipid peroxidation inhibition activity among all the tested extracts. *Gelidium sesquipedale* demonstrated the least activity which was about 6-fold lower than that of *Fucus spiralis* (Table 2).

All the seaweeds species had cupric reducing antioxidant capacity. In accordance with DPPH and ABTS results, *Fucus spiralis* had also the best antioxidant capacity. Decreasing the seaweeds antioxidants activity was nearly 2-fold in *Cystoseira stricta* and 4-fold in *Cystoseira humilis* and *Bifurcaria bifurcata*. However, the red algae showed an antioxidant activity with 6.7-fold which is lower than that of the brown algae *Fucus spiralis* (Table 2).

The ferrous ion chelating ability of seaweeds extracts exhibited variable activity. The ethanol extract of all seaweeds exhibited better metal chelating ability of ferrous ions than that of quercetin standards. The ethanol extract of the brown algae *Bifurcaria bifurcata* indicated the best metal chelating activity compared to that of the other species. *Fucus spiralis* and *Gelidium sesquipedale* exhibited relatively higher activities and showed nearly 1-fold lower than that of *Bifurcaria bifurcata*. The brown seaweeds *Cystoseira humilis* and *Cystoseira stricta* showed the lowest inhibitory activity, 3- and 4-fold, respectively, when compared to that of *Bifurcaria bifurcata* (Table 2).

3.3. Enzyme inhibitory activity

3.3.1. Anticholinesterase activity

Galantamine was used as a positive control to compare the activity as it is used to treat mild Alzheimer's patients. As expected, the antioxidant brown seaweed *Fucus spiralis* also demonstrated the highest AChE and BChE inhibitory activities. The brown seaweed *Bifurcaria bifurcata* which had the best chelating ability, also had good anticholinesterase activity. In contrast, *Cystoseira stricta* possessed a better inhibitory activity with 5-fold in BChE and about 3-fold in AChE lower when compared to than that of *Fucus spiralis*. The other seaweeds were inactive against both enzymes (Table 3).

3.3.2. Tyrosinase inhibitory activity

Except for *Bifurcaria bifurcata* and *Gelidium sesquipedale*, seaweed extracts possessed tyrosinase inhibitory activity. *Fucus spiralis* exhibited the highest inhibitory activity, 4- and 13-fold higher than *Cystoseira stricta* and *Cystoseira humilis* respectively. *Cystoseira stricta* and *Cystoseira humilis* also indicated good tyrosinase inhibitory activities compared to those of *Gelidium sesquipedale* and *Bifurcaria bifurcata* (Table 3).

3.3.3. Urease inhibitory activity

The brown algae *Fucus spiralis* was the most active extract among the other seaweeds. *Fucus spiralis* present a better urease inhibitory activity, being two times than the Thiourea standards. Thus, *Cystoseira stricta* was also exhibited good inhibitory activity. However, moderate activity was found in *Cystoseira humilis* and *Bifurcaria bifurcata*, 13-fold and 17-fold lower when compared to that of *Fucus spiralis* (Table 3).

Table 2
Antioxidant activity of extracts of seaweeds by the DPPH, β -carotene-linoleic acid, ABTS⁺, and metal chelating assays.^a

| Samples | DPPH assay IC ₅₀ (μ g/mL) | β -carotene-linoleic acid assay IC ₅₀ (μ g/mL) | ABTS assay IC ₅₀ (μ g/mL) | Fe ²⁺ - Ferrin assay IC ₅₀ (μ g/mL) | CUPRAC (μ g Trolox equivalents / mg extract) |
|-----------------------------------|---|--|---|--|---|
| <i>Cystoseira stricta</i> | 78.73 \pm 1.1 | 13.58 \pm 1.2 | 113.4 \pm 2.1 | 198.9 \pm 5.9 | 24.06 \pm 0.02 |
| <i>Cystoseira humilis</i> | 121.1 \pm 1.3 | 27.58 \pm 0.8 | 57.81 \pm 1.3 | 136.1 \pm 4.4 | 12.98 \pm 0.03 |
| <i>Fucus spiralis</i> | 47.23 \pm 3.8 | 13.25 \pm 0.9 | 5.95 \pm 0.6 | 55.01 \pm 1.9 | 55.24 \pm 0.04 |
| <i>Bifurcariabifurcata</i> | 208.5 \pm 1.4 | 48.60 \pm 3.2 | 130.6 \pm 1.9 | 45.22 \pm 0.9 | 12.92 \pm 0.03 |
| <i>Gelidium sesquipedale</i> | 84.61 \pm 3.9 | 75.36 \pm 3.6 | 44.46 \pm 2.4 | 83.73 \pm 2.9 | 8.25 \pm 0.01 |
| α -Tocopherol ^b | 12.26 \pm 0.07 | 2.10 \pm 0.08 | 4.87 \pm 0.56 | NT | – |
| BHT ^b | 54.96 \pm 0.99 | 1.34 \pm 0.09 | 4.10 \pm 0.06 | NT | – |
| Quercetin ^b | 2.07 \pm 0.11 | 1.80 \pm 0.10 | 1.18 \pm 0.03 | 250.1 \pm 0.07 | – |
| EDTA ^b | NT | NT | NT | 6.50 \pm 0.07 | – |

NT= not tested.

^a IC₅₀ values represent the means \pm standard error meaning of three parallel measurements ($p < 0.05$).

^b Reference compounds.

3.4. Identification and quantification of phenolic compounds

Twenty-seven organic compounds were screened for the ethanol extracts of five Moroccan seaweeds by LC-MS/MS. Quinic acid was the most abundant compound of seaweed extracts which was detected in all studied seaweeds. The quinic acid ranged between 8535 and 415094.45 μ g/g. Hesperidin and malic acid were also detected in all samples within the range of 67.42–73.48 μ g/g and 366.4–616.9 μ g/g, respectively. Fumaric acid, gallic acid, protocatechuic acid and 4-hydroxy-benzoic acid were also detected in some samples. According to LC-MS/MS results, quinic acid was the main component of *Fucus spiralis* and *Gelidium sesquipedale* and yielded nearly to 40% (w) of the extract. Since *Fucus spiralis* was the most active and *Gelidium sesquipedale* had relatively low activity, the quinic acid is probably not responsible for the activity. Similarly, malic acid is probably not responsible for the activities. The third common compound for all seaweeds was hesperidin, which is known as a strong antioxidant, and gives various activities. However, the yield was very low (>0.01%) (Table 4).

4. Discussion

Phenolic compounds (e.g. flavonoids, phenolic acids, and tannins) are considered as effective chain breaking antioxidants which may directly participate in antioxidative action (Shahidi et al., 1992). Hence, the total flavonoid and phenolic contents of the *Bifurcariabifurcata*, *Cystoseira humilis*, *Cystoseira stricta*, *Gelidium sesquipedale* and *Fucus spiralis* extracts were determined as quercetin and pyrocatechol equivalents, respectively. Antioxidant compounds have an ability to inhibit the acetylcholinesterase and butyryl-cholinesterase enzymes (Atta-ur-Rahman and Choudhary, 2001; Moodie et al., 2019). Therefore, the acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity was screened beside the antioxidant activity assays. In addition, the urease inhibitory activity and tyrosinase inhibitory activity were also evaluated for the seaweeds extracts.

In a previous study, the phenolic content of *Fucus spiralis* was reported to be 1.15 \pm 0.06 mmol equivalents of gallic acid/g dry weight, corresponding to 195.6 μ g gallic acid equivalents per mg extract (Peinado et al., 2014). Furthermore, the methanolic extract of *Turbinaria ornata* and *Turbinaria conoides* exhibited a higher phenolic compound content with values of 16.64 \pm 0.10 and 3.42 \pm 0.35 mg of GAE/g, respectively (Chakraborty et al., 2013). The present results are in agreement with the previous study of Sabeena Farvin and Jacobsen, 2013, which showed that all the ethanolic extracts of the *Fucus* species had high total phenolic content with values ranging from 32 to 1920 mg/100 g dried seaweed. Flavonoids are a group of natural phenolic compounds exhibiting anti-inflammatory, anticancer, antiproliferative, antihypertensive, and antioxidant activity (Maheswari et al., 2016). Flavonoids also protect humans from coronary heart disease effects (Xiao et al., 2011). The content of flavonoids in *Cystoseira Barbara* varied from 5 to 8 mg QEs/g dried extract (Haddar et al., 2012).

DPPH is a stable free radical. In this assay, DPPH tests the scavenging ability of the antioxidants which are soluble in organic media. Herein, the higher radical scavenging activity was observed in the brown seaweed *Fucus spiralis* with inhibitory activity better than those of the BHT standards. In previous studies, brown seaweeds possessed the most potent radical scavenging activity against DPPH compared to other seaweeds (Andrade et al., 2013). The DPPH free radical scavenging of *Fucus spiralis* was 54.5 \pm 0.4 mmol trolox/g DW (Peinado et al., 2014). Brown seaweed in general have better DPPH radical scavenging than red seaweed and *Fucus* species are good DPPH scavengers (Jimenez-Escrig et al., 2001; Wang et al., 2009).

ABTS tests the electron donating capacity of an antioxidant, which are soluble, both in lipophilic and hydrophilic media. Another advantage over the DPPH assay is that ABTS also tests compounds having steric hindrance (Demirkiran et al., 2013). In the present study, the best inhibitory activity was observed in *Fucus spiralis* with a value close to those of the α -tocopherol and BHT standards. In previous finding, ethanol extracts of brown

Table 3
Acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE), tyrosinase and urease inhibitory activities of extracts of seaweeds.^a

| Samples | AChE assay IC ₅₀ (μ g/mL) | BChE assay IC ₅₀ (μ g/mL) | Tyrosinase assay IC ₅₀ (μ g/mL) | Urease assay IC ₅₀ (μ g/mL) |
|------------------------------|---|---|---|---|
| <i>Cystoseira stricta</i> | 83.1 \pm 2.1 | 69.4 \pm 1.9 | 28.1 \pm 2.8 | 25.9 \pm 1.9 |
| <i>Cystoseira humilis</i> | >200 | >200 | 84.1 \pm 0.9 | 148 \pm 4.8 |
| <i>Fucus spiralis</i> | 28.9 \pm 1.8 | 11.7 \pm 2.8 | 6.19 \pm 0.4 | 10.9 \pm 1.3 |
| <i>Bifurcariabifurcata</i> | 141 \pm 1.3 | 177 \pm 0.9 | >200 | 191 \pm 5.1 |
| <i>Gelidium sesquipedale</i> | >200 | >200 | >200 | >200 |
| Galantamine ^b | 0.005 \pm 0.00 | 0.051 \pm 0.00 | NT | NT |
| Kojic acid ^b | NT | NT | 0.67 \pm 0.06 | NT |
| L-Mimosine ^b | NT | NT | 0.64 \pm 0.04 | NT |
| Thiourea | NT | NT | NT | 23.8 \pm 0.2 |

NT = not tested.

^a IC₅₀ values represent the means \pm standard error meaning of three parallel measurements ($p < 0.05$).

^b Positive standards.

Table 4
Identification and quantification of compounds of ethanol extract of seaweeds by LC–MS/MS.

| Sample name | Retention time (min) | Parent ion (m/z) ^a | MS2 (Collision energy) ^b | µg analyte /g extract | | | | |
|------------------------|----------------------|-------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | | | | <i>Cystoseira stricta</i> | <i>Cystoseira humilis</i> | <i>Fucus spiralis</i> | <i>Bifurcaria bifurcata</i> | <i>Gelidium sesquipedale</i> |
| Quinic acid | 1.13 | 191.0 | 85 (22), 93 (22) | 8535 | 12762.04 | 415094.45 | 59340.49 | 412594.82 |
| Malic acid | 1.23 | 133.1 | 115 (14), 71 (17) | 468.3 | 590.1 | 366.4 | 450.4 | 616.9 |
| Fumaric acid | 1.48 | 115.0 | 71.4 | – | 16.33 | – | – | – |
| Gallic acid | 3.00 | 169.1 | 125 (14), 79 (25) | – | 20.73 | – | – | 10.98 |
| Protocatechuic acid | 4.93 | 153.0 | 109 (16), 108 (26) | 6.333 | – | – | – | – |
| 4-Hydroxy-benzoic acid | 7.39 | 137.0 | 93, 65 | 25.11 | 146.3 | 56.58 | – | – |
| Hesperidin | 12.67 | 611.1 | 303, 465 | 73.48 | 67.02 | 66.41 | 70.35 | 62.47 |

^a Parent ion (m/z): molecular ions of the standard compounds (mass to charge ratio).

^b MS2 (CE): MRM fragments for the related molecular ions (CE refers to related collision energies of the fragment ions).

seaweed *Sargassum wightii* showed the highest activity in ABTS radical scavenging assay compared to green and red seaweed (Seenivasan and Indu, 2013).

Linoleic acid contains two double bonds at –9 and –12 positions which are easily oxidized by the singlet oxygen in the media and the antioxidant gives H[•] to the media to inhibit the radicalic reaction (Oztürk et al., 2009). Therefore, β-carotene is used to monitor the reaction. The total carotenoid contents of *Fucus serratus* was approximately 0.08% of the dried extracted cells, and fucoxanthin comprises about 70% of the total carotenoid (Liaaen-Jensen and Haugan, 1989). In this present work, *Fucus spiralis* and *Cystoseira stricta* containing higher amount of fucoxanthin had higher lipid peroxidation inhibition. This result is in accordance with the result of Holdt and Kraan (2011) where the fucoxanthin content ranges from 172 to 720 mg kg⁻¹ DW in the brown seaweeds species, with a maximal concentration in *Fucus serratus*.

The CUPRAC assay tests the reducing capacity of the antioxidants, which have the ability to give electrons to the media. The method relies on the reduction of cupric to the cuprous form by an antioxidant (Özyürek et al., 2011). Based on this method, all studied algae exhibited the ability of reducing copper ions from Cu(II) to Cu(I). The Moroccan brown seaweed *Fucus spiralis* showed the highest reducing activity when compared to the other seaweeds. The assessment of the antioxidant activity of fucoïdan extract from the brown seaweed *Padina distromatica* exhibited the ability of reducing copper in a concentration dependent manner (Paul, 2014). The highest antioxidant capacities in the CUPRAC assay were observed for some phenolic acids (Apak et al., 2008).

The complexation of excess amount of ferrous ions in the biological fluids is necessary; thus, the antioxidant capacity of seaweeds was evaluated according to the ferrous ions chelating assay. In this work, the ethanol extract of *Fucus spiralis* exhibited the best activity in all antioxidant activity assays except in the metal chelating activity assay. This suggests that *Fucus spiralis* mostly contains lipophilic and low molecular weight antioxidant compounds in good amounts. In the present study, the brown seaweed *Bifurcaria bifurcata* demonstrated the best metal chelating activity, although exhibiting relatively lower activity in other assays. The chemical complexity of the seaweed extracts can significantly interfere in the biological activities of natural products (Nickavar and Esbati, 2012). A similar result was reported for the Icelandic seaweed (*Palmaria palmata* and *Chondrus crispus*) extracts which showed the highest ferrous ion-chelating activity while the lower polyphenol content resulted in weaker DPPH free radical scavenging activity (Wang et al., 2009).

Previous studies highlighted high antioxidant activities and high phenolic contents in *Fucus* species such as *Fucus spiralis* and *Fucus vesiculosus*, and attributed these high activities to the presence of phlorotannins (Tierney et al., 2013; Wang et al., 2012). Since, the correlation was reported between antioxidant and anticholinesterase compounds, the anticholinesterase activity of seaweeds extracts was carried out against acetylcholinesterase (AChE) and butyryl

cholinesterase (BChE) which are the chief enzymes of Alzheimer disease. The inhibition of acetylcholinesterase (AChE) enzyme, which catalyzes the breakdown of ACh, is considered to be a useful therapeutic approach for the symptomatic treatment of Alzheimer's disease (Pangestuti and Kim, 2011). In the present study, the findings suggest that among the tested Moroccan seaweeds, *Fucus spiralis*, *Bifurcaria bifurcata* and *Cystoseira stricta* had potential anticholinesterase compounds, which could be used in future as therapeutic agents for Alzheimer's disease. In another study on South African seaweeds, all seaweeds extracts tested had acetylcholinesterase inhibitory activity, among them *Dictyota humifusa* extracts were the most effective at inhibiting AChE (Stirk et al., 2007). In a recent study, two *Cystoseira* species; namely, *Cystoseira tamariscifolia* and *Cystoseira nodicaulis* were reported as potential anticholinesterase compounds (Custodio et al., 2016). Screening of AChE and BChE inhibitory activity on ethanol extracts of different seaweeds showed that extracts from *Cystoseira usneoides* and *Fucus spiralis* were potent inhibitors (Andrade et al., 2013). In another study, brown algae, such as *Ecklonia maxima*, *Ecklonia stolonifera* and *Ishige okamurae* were also able to inhibit AChE (Yoon et al., 2008; Yoon et al., 2009; Kannan et al., 2013).

The tyrosinase enzyme contains copper and is a polyphenol oxidase. It is linked to melanin hyperpigmentation of skin and the inhibition of tyrosinase plays an important role for vitiligo disease as well as other skin related diseases. Tyrosinase inhibitors are used as a whitening agent in cosmetics in clinical skin treatments (Shiino et al., 2001). Therefore, the compounds scavenging DPPH free radical such as some flavonoids and hydroxy benzenes inhibit tyrosinase enzyme (Momtaz et al., 2008). In the same way, marine products have been used in cosmetics and/or pharmaceuticals (Kim et al., 2017). In this study, *Fucus spiralis* was the most active algae against tyrosinase enzyme. In another study, methanol extracts of other brown algal species, such as *Cystoseira tamariscifolia* and *Cystoseira nodicaulis* strongly inhibit tyrosinase (Custodio et al., 2016). 7-Phloroecol and dieckol isolated from the brown algae *Ecklonia cava* had higher inhibitory activity than those of commercial inhibitors such as arbutin and kojic acid against tyrosinase (Yoon et al., 2009; Heo et al., 2009). In vivo studies in mice suggested that fucoxanthin isolated from *Laminaria japonica* suppressed tyrosinase activity in ultraviolet B (UV-B)-irradiated guinea pig and melanogenesis in UV-B-irradiated mice (Thomas and Kim, 2013).

Urease enzyme has an important role in the development of gastric and peptic ulcer causing cancer (Mobley and Hausinger, 1989). Therefore, obtaining new urease inhibitors has become more attractive to treat or prevent urease mediated diseases. Brown seaweed contain sulfated polysaccharides (fucoïdan compounds) which are natural substances inhibiting urease during *Helicobacter pylori* infection (Ayala et al., 2014). Herein, the urease enzyme inhibitory activity of five algae was studied. Among them, the brown algae *Fucus spiralis* was the most potent.

To further explore the phenolic profile of the Moroccan seaweeds, the extracts were analyzed by LC-MS/MS. The main components in ethanolic extracts were quinic acid, hesperidin and malic acid. The phenolic compounds tentatively identified from the ethanolic extract in the present study are in accordance with previous studies. Phenolic acids of the brown seaweeds *Ascophyllum nodosum*, *Bifurcaria bifurcata* and *Fucus vesiculosus* from Spain were predominantly composed of quinic acid derivatives (Agregán et al., 2017). Ethanolic extracts of *Fucus vesiculosus* and *Fucus serratus* contained trace levels of chlorogenic acids. Water extracts of all the *Fucus* species contained no *p*-hydroxybenzoic acid and syringic acid (Sabeena Farvin and Jacobsen, 2013).

Marine red and brown seaweed are an important source of bioactive secondary metabolite including phenols and polyphenols (Li et al., 2009). The brown seaweeds contain phlorotannins, flavonoids and condensed tannins such fucoxanthin, phloroglucinol, fucoidan (Thomas and Kim, 2013; Pádua et al., 2015). Red seaweed contains sulfated polysaccharides as major constituents (Fleita et al., 2015; Rodrigues et al., 2012). In a previous study regarding red and green seaweeds, a series of polyphenolic compounds such as *m*-hydroxybenzoic, protocatechuic and *p*-hydroxybenzoic acids were quantified in South African seaweeds (Rengasamy et al., 2015). Previous reports indicated the presence of several phenolic compounds, especially, ferulic, salicylic, coumaric, syringic, vanillic, gallic, caffeic, chlorogenic and *p*-hydroxybenzoic acids in 16 seaweeds (Fernando et al., 2016). However, in this study, the red algae *Gelidium sesquipedale* contained high amount of malic acid may be considered as a potential new source for malic acid. In the present study, the compounds elucidated using the LC-MS/MS instrument are insufficient to explain the activities tested herein. Therefore, further studies, particularly bioactivity guided fractionation is necessary to understand the origin of the activity.

5. Conclusion

The results presented herein are the first data on the antioxidant activity of *Cystoseira stricta*, and *Gelidium sesquipedale*, and the first information on the anticholinesterase activity of *Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira stricta* and *Gelidium sesquipedale*. The tyrosinase and urease inhibitory activities of all seaweeds were studied for the first time. In antioxidant activity methods, the best activity was observed in lipid peroxidation inhibition by the β -carotene–linoleic acid assay. Among the seaweeds, *Cystoseira stricta* and *Fucus spiralis* exhibited the best activity in all antioxidant tests, except for ferrous chelating activity. In four enzymes inhibitory activity. *Fucus spiralis* was the most active. *Cystoseira stricta* also exhibited similar inhibitory activity to that of *Fucus spiralis* against acetylcholinesterase, butyryl-cholinesterase, tyrosinase, and urease enzymes.

Development of tyrosinase inhibitors is becoming increasingly necessary in the cosmetic and pharmaceutical industry due to their usability in the treatment of hyperpigmentation related dermatological disorders, skin-whitening property and depigmentation after sunburn. In this study, it can be concluded that *Fucus spiralis*, and *Cystoseira stricta* are potential candidates as a natural source of tyrosinase inhibitors. The results indicated that the seaweeds commonly used as foods and as therapeutics since ancient times in maritime countries might be used in food and pharmaceutical industries as preservatives and/or therapeutic agents. However, further bioactivity studies and isolated constituents are needed.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

Authors also thankful to the Hassan 1st University Settat for financial support by mobility grant and Mugla Sitki Koçman University for providing laboratory facilities. Authors are thankful to TUBITAK for

financial supporting of Graduate Scholarship Program for International Students (TUBITAK-BIDEB-2215).

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.sajb.2019.10.021.











References

- Agregán, R., Muneke, P.E.S., Franco, D., Dominguez, R., Carballo, J., Lorenzo, J.M., 2017. Phenolic compounds from three brown seaweed species using LC-DAD–ESI–MS/MS. Food Research International 99, 979–985. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.043>.
- Ambrozova, J.V., Misurcova, L., Vicha, R., Machu, L., Samek, D., Baron, M., Mlcek, J., Sochor, J., Jurikova, T., 2014. Influence of extractive solvents on lipid and fatty acids content of edible freshwater algal and seaweed products, the green microalga *Chlorella kessleri* and the cyanobacterium *Spirulina platensis*. Molecules 19, 2344–2360. <https://doi.org/10.3390/molecules19022344>.
- Andrade, P.B., Barbosa, M., Matos, R.P., Lopes, G., Vinholes, J., Mougá, T., Valentão, P., 2013. Valuable compounds in macroalgae extracts. Food Chemistry 138, 1819–1828. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.081>.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Çelik, S.E., 2008. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. Microchimica Acta 160, 413–419. <https://doi.org/10.1007/s00604-007-0777-0>.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., 2004. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 7970–7981. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>.
- Atta-ur-Rahman, Choudhary, M.I., 2001. Bioactive natural products as a potential source of new pharmacophores. A theory of memory. Pure and Applied Chemistry 73, 555–560. <https://doi.org/10.1351/pac200173030555>.
- Ayala, G., Escobedo-Hinojosa, W.I., Cruz-Herrera, C.F., de la Romero, I., 2014. Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. World Journal of Gastroenterology 20, 1450. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i6.1450>.
- Bitencourt, M.A.O., Silva, H.M.D., Abílio, G.M.F., Miranda, G.E.C., Moura, A.M.A., de Araújo-Júnior, J.X., Silveira, E.J.D., Santos, B.V.O., Souto, J.T., 2015. Anti-inflammatory effects of methanolic extract of green algae *Caulerpa mexicana* in a murine model of ulcerative colitis. World Journal of Gastroenterology 25, 677–682. <https://doi.org/10.1016/j.wjg.2015.10.001>.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181, 1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>.
- Boudouresque, C.F., 1984. Groupes écologiques d'algues marines et phytocénoses benthiques en Méditerranée Nord-Occidentale: une revue. Giornale Botanico Italiano 118 (2), 7–42.
- Bouhlal, R., Riadi, H., Bourgougnon, N., 2010. Antiviral activity of the extracts of Rhodophyceae from Morocco. African Journal of Biotechnology 9, 7968–7975. <https://doi.org/10.5897/AJB09.2023>.
- Chakraborty, K., Praveen, N.K., Vijayan, K.K., Rao, G.S., 2013. Evaluation of phenolic contents and antioxidant activities of brown seaweeds belonging to Turbinaria spp. (Phaeophyta, Sargassaceae) collected from Gulf of Mannar. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 3, 8–16. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60016-7](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60016-7).
- Chan, Y.Y., Kim, K.H., Cheah, S.H., 2011. Inhibitory effects of *Sargassum polycystum* on tyrosinase activity and melanin formation in B16F10 murine melanoma cells. Journal of Ethnopharmacology 137, 1183–1188. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.07.050>.
- Cofrades, S., López-Lopez, I., Bravo, L., Ruiz-Capillas, C., Bastida, S., Larrea, M.T., Jiménez-Colmenero, F., 2010. Nutritional and antioxidant properties of different brown and red Spanish edible seaweeds. Food Science and Technology International 16, 361–370. <https://doi.org/10.1177/1082013210367049>.
- Custodio, L., Silvestre, L., Rocha, M.I., Rodrigues, M.J., Vizetto-Duarte, C., Pereira, H., Barreira, L., Varela, J., 2016. Methanol extracts from *Cystoseira tamariscifolia* and *Cystoseira nodicaulis* are able to inhibit cholinesterases and protect a human dopaminergic cell line from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. Pharmaceutical Biology 54, 1687–1696. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1123278>.
- Decker, E.A., Welch, B., 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. Journal of Agricultural and Food Chemistry 38, 674–677. <https://doi.org/10.1021/jf00093a019>.
- Demirkiran, O., Sabudak, T., Ozturk, M., Topcu, G., 2013. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of flavonoids from *Trifolium nigrescens* Subsp. *petrisavi*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61, 12598–12603. <https://doi.org/10.1021/jf403669k>.
- El Wahidi, M., El Amraoui, B., El Amraoui, M., Bamhaoud, T., 2015. Screening of antimicrobial activity of macroalgae extracts from the Moroccan Atlantic coast. Annales Pharmaceutiques Françaises 73, 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2014.12.005>.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).
- Ertas, A., Boga, M., Yilmaz, M.A., Yesil, Y., Tel, G., Temel, H., Hasimi, N., Gazioglu, I., Ozturk, M., Ugurlu, P., 2015. A detailed study on the chemical and biological profiles of essential oil and methanol extract of *Thymus nummularius* (Anzer tea): Rosmarinic acid. Industrial Crops and Products 67, 336–345. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.064>.

- Fernando, I.P.S., Kim, M., Son, K.-T., Jeong, Y., Jeon, Y.-J., 2016. Antioxidant activity of marine algal polyphenolic compounds: a mechanistic approach. *Journal of Medicinal Food* 19, 615–628. <https://doi.org/10.1089/jmf.2016.3706>.
- Fleita, D., El-Sayed, M., Rifaat, D., 2015. Evaluation of the antioxidant activity of enzymatically-hydrolyzed sulfated polysaccharides extracted from red algae; *Pterocladia capillacea*. *LWT – Food Science and Technology* 63, 1236–1244. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.024>.
- Grice, H.C., 1988. Safety evaluation of butylated hydroxyanisole from the perspective of effects on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food and Chemical Toxicology* 26, 717–723.
- Haddar, A., Sellimi, S., Ghannouchi, R., Alvarez, O.M., Nasri, M., Bougatef, 2012. Functional, antioxidant and film-forming properties of tuna-skin gelatin with a brown algae extract. *International Journal of Biological Macromolecules* 51, 477–483. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.06.016>.
- Hearing, V.J., 1987. Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): purification, properties, and reactions catalyzed. *Methods in Enzymology*, 142. In D. Kaufman (Ed.), New York, NY: Academic Press, pp. 154–165. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(87\)42024-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(87)42024-7).
- Heiba, H.I., Al-Nagdy, S.A., Rizk, A.M., Durgham, M.M., 1993. The amino acid composition of some common marine algae of Qatar Arabian Gulf. *Qatar University Science Journal* 13, 219–225.
- Heo, S.J., Ko, S.C., Cha, S.H., Kang, D.H., Park, H.S., Choi, Y.U., Kim, D., Jung, W.K., Jeon, Y.J., 2009. Effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on melanogenesis and their protective effect against photo-oxidation by UV-B radiation. *Toxicology in Vitro* 23, 1123–1130. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.05.013>.
- Holdt, S.L., Kraan, S., 2011. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology* 23, 543–597. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9632-5>.
- Jimenez-Escrig, A., Jimenez-Jimenez, I., Pulido, Raquel, Saura-calixto, F., 2001. Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 534, 530–534.
- Kang, M.-C., Lee, S.-H., Lee, W.-W., Kang, N., Kim, E.-A., Kim, S.Y., Lee, D.H., Kim, D., Jeon, Y.-J., 2014. Protective effect of fucoxanthin isolated from *Ishige okamurae* against high-glucose induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells and zebrafish model. *Journal of Functional Foods* 11, 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.09.007>.
- Kannan, R.R.R., Aderogba, M.A., Ndhkala, A.R., Stirk, W.A., Van Staden, J., 2013. Acetylcholinesterase inhibitory activity of phlorotannins isolated from the brown alga, *Ecklonia maxima* (Osbeck) Papenfuss. *Food Research International* 54, 1250–1254. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.017>.
- Kim, M.-J., Hyun, H., Hyun, J.-H., Im, S., Sim, J., Lee, N.H., Hyun, C.G., 2017. Anti-melanogenic activities of *Sargassum muticum* via MITF downregulation. *Oriental Journal of Chemistry* 33, 1589–1594. <https://doi.org/10.13005/ojoc/330401>.
- Li, Y., Qian, Z., Ryu, B., Lee, S., Kim, M.-M., Kim, S., 2009. Chemical components and its antioxidant properties in vitro: an edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17, 1963–1973. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.031>.
- Liaen-Jensen, S., Haugan, J.A., 1989. Improved isolation procedure for fucoxanthin. *Phytochemistry* 28, 2797–2798.
- Machui, L., Misurcova, L., Vavra Ambrozova, J., Orsavova, J., Mlcek, J., Jurikova, S.J., 2015. Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. *Molecules* 20, 1118–1133. <https://doi.org/10.3390/molecules20011118>.
- Maheswari, U., Sridevi Sangeetha, K.S., Umamaheswari, S., Uma, C., Reddy, M., Kalkura, S.N., 2016. Flavonoids: therapeutic potential of natural pharmacological agents antibiotics view project flavonoids: therapeutic potential of natural pharmacological agents. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 7, 3924–3930. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7\(10\)](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7(10)).
- Mobley, H.L., Hausinger, R.P., 1989. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiology Reviews* 53, 85–108.
- Mohamed, S., Hashim, S.N., Rahman, H.A., 2012. Seaweeds: a sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends in Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.09.001>.
- Montaz, S., Mapunya, B.M., Houghton, P.J., Edgerly, C., Hussein, A., Naidoo, S., Lall, N., 2008. Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of *Sideroxylon inerme* L. stem bark, used in South Africa for skin lightening. *Journal of Ethnopharmacology* 119, 507–512. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.06.006>.
- Moodie, L.W.K., Sepčić, K., Turk, T., Frangež, R., Svenson, J., 2019. Natural cholinesterase inhibitors from marine organisms. *Natural Product Reports*. <https://doi.org/10.1039/C9NP00010K>.
- Nickavar, B., Eshabi, N., 2012. Evaluation of the antioxidant capacity and phenolic content of three thymus species. *JAMS, Journal of Acupuncture and Meridian Studies* 5, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.jams.2012.03.003>.
- Öztürk, M., 2012. Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil. *Food Chemistry* 134, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.054>.
- Öztürk, M., Kolak, U., Duru, M.E., Harmandar, M., 2009. GC–MS analysis of the antioxidant active fractions of *Micromeria juliana* with anticholinesterase activity. *Natural Product Communications* 4, 1271–1276.
- Öztürk, M., Tel, G., Öztürk, F.A., Duru, M.E., 2014. The cooking effect on two edible mushrooms in anatolia: fatty acid composition, total bioactive compounds, antioxidant and anticholinesterase activities. *Journal of Natural Products* 8 (2), 189–194.
- Özyürek, M., Güçlü, K., Tütem, E., Bakan, K.S., Erçağ, E., Esin Çelik, S., Baki, S., Yıldız, L., Karaman, S., Apak, R., 2011. A comprehensive review of Cuprac methodology. *Analytical Methods* 3, 2439–2453. <https://doi.org/10.1039/c1ay05320e>.
- Pádua, D., Rocha, E., Gargiulo, D., Ramos, A.A., 2015. Bioactive compounds from brown seaweeds: Phloroglucinol, fucoxanthin and fucoidan as promising therapeutic agents against breast cancer. *Phytochemistry Letters* 14, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.09.007>.
- Pangestuti, R., Kim, S., 2011. Neuroprotective effects of marine algae. *Marine Drugs* 9, 803–818. <https://doi.org/10.3390/md9050803>.
- Paul, J.P., 2014. Activity of fucoidan extracted from *Padina distromatica* Hauck (brown seaweed) from Hare island, Thoothukudi, Tamil Nadu, India. *American Journal of Biological and Pharmaceutical Research* 1, 151–155.
- Peinado, I., Girón, J., Koutsidis, G., Ames, J.M., 2014. Chemical composition, antioxidant activity and sensory evaluation of five different species of brown edible seaweeds. *Food Research International* 66, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.035>.
- Rafiqzaman, S.M., Kim, E.Y., Lee, J.M., Mohibullah, M., Alam, M.B., Soo Moon, Kim, J.-M., Kong, I.-S., 2015. Anti-Alzheimers and anti-inflammatory activities of a glycoprotein purified from the edible brown alga *Undaria pinnatifida*. *Food Research International* 77, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.021>.
- Re, R., Pellegrini, N., Protaggè, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- Rengasamy, K.R.R., Amoo, S.O., Aremu, A.O., Stirk, W.A., Gruz, J., Šubrtová, M., Doležal, K., Van Staden, J., 2015. Phenolic profiles, antioxidant capacity, and acetylcholinesterase inhibitory activity of eight South African seaweeds. *Journal of Applied Phycology* 27, 1599–1605. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0438-8>.
- Rengasamy, K.R.R., Kulkarni, M.G., Stirk, W.A., Van Staden, J., 2014. Eckol - a new plant growth stimulant from the brown seaweed *Ecklonia maxima*. *Journal of Applied Phycology* 27, 581–587. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0337-z>.
- Rhimou, B., Hassane, R., José, M., Nathalie, B., 2010. The antibacterial potential of the seaweeds (Rhodophyceae) of the Strait of Gibraltar and the Mediterranean Coast of Morocco. *African Journal of Biotechnology* 9, 6365–6372. <https://doi.org/10.5897/AJB09.1911>.
- Riadi, H., Kazzaz, M., 2000. Inventaire bibliographique des Algues benthiques du littoral Marocain. I. Chlorophyceae et phaeophyceae. *Acta Botanica Barcinonensia* 46, 53–88.
- Riadi, H., Kazzaz, M., 1998. Inventaire bibliographique des algues benthiques du littoral Marocain. I. Chlorophyceae et phaeophyceae. *Acta Botanica Malacitana* 23, 23–41.
- Rodrigues, J.A.G., Vanderlei, E. de S.O., Silva, L.M.C.M., de Araújo, I.W.F., de Queiroz, I.N.L., de Paula, G.A., Abreu, T.M., Ribeiro, N.A., Bezerra, M.M., Chaves, H.V., Lima, V., Lima, V., Jorge, R.J.B., Monteiro, H.S.A., Leite, E.L., Benevides, N.M.B., 2012. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Caulerpa cupressoides*. *Pharmacology Reports* 64, 282–292. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70766-1](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70766-1).
- Sabeena Farvin, K.H., Jacobsen, C., 2013. Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chemistry* 138, 1670–1681. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.078>.
- Sabudak, T., Demirkiran, O., Ozturk, M., Topcu, G., 2013. Phenolic compounds from *Trifolium echinatum* Bieb. and investigation of their tyrosinase inhibitory and antioxidant activities. *Phytochemistry* 96, 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.08.014>.
- Sabudak, T., Ozturk, M., Alpay, E., 2017. New bioflavonoids from *Solanum nigrum* L. by anticholinesterase and anti-tyrosinase activities-guided fractionation. *Records of Natural Products* 11, 130–140.
- Sathya, R., Kanaga, N., Sankar, P., Jeeva, S., 2017. Antioxidant properties of phlorotannins from brown seaweed *Cystoseira trinodis* (Forsskål) C. Agardh. *Arabian Journal of Chemistry* 10, S2608–S2614. <https://doi.org/10.1016/j.arabjoc.2013.09.039>.
- Seenivasan, R., Indu, H., 2013. In vitro antioxidant activity of selected seaweeds from southeast coast of India. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5, 0975–1491.
- Senthilkumar, K., Manivasagan, P., Venkatesan, J., Kim, S.K., 2013. Brown seaweed fucoidan: biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.06.030>.
- Shahidi, F., Janitha, P.K., Wanasundara, P.D., 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 32, 67–103. <https://doi.org/10.1080/10408399209527581>.
- Shao, P., Chen, X., Sun, P., 2013. In vitro antioxidant and antitumor activities of different sulfated polysaccharides isolated from three algae. *International Journal of Biological Macromolecules* 62, 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.08.023>.
- Shiino, M., Watanabe, Y., Umezawa, K., 2001. Synthesis of N-substituted N-nitrosohydroxylamines as inhibitors of mushroom tyrosinase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 9, 1233–1240. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(01\)00003-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00003-7).
- Shin, T., Ahn, M., Hyun, J.W., Kim, S.H., Moon, C., 2014. Antioxidant marine algae phlorotannins and radioprotection: a review of experimental evidence. *Acta Histochemica* 116, 669–674. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2014.03.008>.
- Slinkard, K., Singleton, V.L., 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 28, 49–55.
- Stirk, W.A., Reinecke, D.L., Van Staden, J., 2007. Seasonal variation in antifungal, antibacterial and acetylcholinesterase activity in seven South African seaweeds. *Journal of Applied Phycology* 19, 271–276. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9134-7>.
- Stirk, W.A., Tarkowská, D., Turečová, V., Strnad, M., Van Staden, J., 2014. Isolation and identification of cytokinins in a new commercial seaweed product made from *Fucus serratus* L. *Journal of Applied Phycology* 26, 561–567. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0062-z>.
- Stirk, W.A., Tarkowská, D., Turečová, V., Strnad, M., Van Staden, J., 2014. Abscisic acid, gibberellins and brassinosteroids in *Kelpak*®, a commercial seaweed extract made from *Ecklonia maxima*. *Journal of Applied Phycology* 26, 561–567. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0062-z>.

- Subash, A., Veeraraghavan, G., Sali, V.K., Bhardwaj, M., Vasanthi, H.R., 2016. Attenuation of inflammation by marine algae *Turbinaria ornata* in cotton pellet induced granuloma mediated by fucoidan like sulphated polysaccharide. *Carbohydrate Polymers* 151, 1261–1268. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.077>.
- Takebe, Y., Saucedo, C.J., Lund, G., Uenishi, R., Hase, S., Tsuchiura, T., Kneteman, N., Ramessar, K., Tyrrell, D.L.J., Shirakura, M., Wakita, T., McMahon, J.B., O'Keefe, B.R., 2013. Antiviral lectins from red and blue-green algae show potent in vitro and in vivo activity against hepatitis C virus. *PLoS one* 8, e64449. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064449>.
- Tel, G., Apaydin, M., Duru, M.E., ozturk, M., 2012. Antioxidant and cholinesterase inhibition activities of three tricholoma species with total phenolic and flavonoid contents: the edible mushrooms from anatolia. *Food Analytical Methods* 5, 495–504. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9275-4>.
- Tel, G., Öztürk, M., Duru, M.E., Dogan, B., Harmandar, M., 2013. Fatty acid composition, antioxidant, anticholinesterase and tyrosinase inhibitory activities of four *Serratula* species from anatolia. *Records of Natural Products* 7, 86–95.
- Thomas, N., Kim, S., 2013. Beneficial effects of marine algal compounds in cosmeceuticals. *Marine Drugs* 11, 146–164. <https://doi.org/10.3390/md11010146>.
- Tierney, M.S., Soler-vila, A., Croft, A.K., Hayes, M., 2013. Antioxidant activity of the brown macroalgae *Fucus spiralis* Linnaeus harvested from the West Coast of Ireland. *Current Research Journal of Biological Sciences* 5, 81–90. <https://doi.org/10.19026/crjbs.5.5446>.
- Wang, T., Jonsdottir, R., Liu, H., Gu, L., Kristinsson, H.G., Raghavan, S., Olafsdottir, G., 2012. Antioxidant capacities of phlorotannins extracted from the brown algae *Fucus vesiculosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 5874–5883. <https://doi.org/10.1021/jf3003653>.
- Wang, T., Jónsdóttir, R., Ólafsdóttir, G., 2009. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry* 116, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.041>.
- Wijesekara, I., Kim, S.K., Li, Y., Li, Y.X., 2011. Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.09.015>.
- Xiao, Z.-P., Peng, Z.-Y., Peng, M.-J., Yan, W.-B., Ouyang, Y.-Z., Zhu, H.-L., 2011. Flavonoids health benefits and their molecular mechanism. *Mini-Reviews Medicinal Chemistry* 11, 169–177. <https://doi.org/10.2174/138955711794519546>.
- Yan, X., Chuda, Y., Suzuki, M., Nagata, T., 1999. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 63, 605–607. <https://doi.org/10.1271/bbb.63.605>.
- Yoon, N.Y., Chung, H.Y., Kim, H.R., Choi, J.S., 2008. Acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory activities of sterols and phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*. *Fisheries Science* 74, 200–207. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2007.01511.x>.
- Yoon, N.Y., Eom, T.-K., Kim, M.-M., Kim, S.-K., 2009. Inhibitory effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on mushroom tyrosinase activity and melanin formation in mouse B16F10 melanoma cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 4124–4129. <https://doi.org/10.1021/jf900006f>.
- Zahid, H., Rizwani, G., Kamil, A., Shareef, H., Tasleem, S., Khan, A., 2015. Anti-urease activity of *Mimusops elengi* Linn (Sapotaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 6, 223–230. <https://doi.org/10.9734/EJMP/2015/12240>.
- Zhai, Q., Li, X., Yang, Y., Yu, L., Yao, Y., 2014. Antitumor activity of a polysaccharide fraction from *Laminaria japonica* on U14 cervical carcinoma-bearing mice. *Tumor Biology* 35. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1014-6>.
- Zhang, R., Kang, K.A., Piao, M.J., Ko, D.O., Wang, Z.H., Lee, I.K., Kim, B.J., Jeong, I.Y., Shin, T., Park, J.W., Lee, N.H., Hyun, J.W., 2008. Eckol protects V79-4 lung fibroblast cells against γ -ray radiation-induced apoptosis via the scavenging of reactive oxygen species and inhibiting of the c-Jun NH2-terminal kinase pathway. *European Journal of Pharmacology* 591, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.06.086>.
- Zhang, Z., Wang, F., Wang, X., Liu, X., Hou, Y., Zhang, Q., 2010. Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity in vitro. *Carbohydrate Polymers* 82, 118–121. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.031>.

Could the *Fucus Spiralis* Algal Extract Prevent the Oxidative Stress in *Tetrahymena Pyriformis* Model?

Fatiha Grina ^{1,*} , Abdellatif Rahim ¹ , Talal Sabraoui ¹ , Boubker Nasser ¹ , Abderrahman Moujahid ¹ , Rabiaa Eddoha ¹ , Evan Alexander Netherton Marks ² , Maryam Benbachir ¹ , Mehmet Öztürk ³ , Abdel Khalid Essamadi ¹ 

¹ Laboratory of Biochemistry and Neuroscience, Applied Biochemistry and Toxicology Team, Faculty of Sciences and Technology, Hassan 1st University, P.O. Box 577, 26000 Settat, Morocco

² CT BETA, Universitat de Vic – Universitat Central de Catalunya, Carrer de la Laura 13, 08500 Vic, Spain

³ Faculty of Science, Department of Chemistry, Muğla Sıtkı Koçman University, 48121 Kötekli, Muğla Türkiye

* Correspondence: f.grina@uhp.ac.ma; fatihagrina@yahoo.fr;

Scopus Author ID 57211752270

Received: 20.07.2020; Revised: 23.08.2020; Accepted: 25.08.2020; Published: 30.08.2020

Abstract: Algae are well-known to be exceptionally rich sources for biologically active metabolites and have recently gained recognition for their therapeutic applications. This study is designed to assess the phenolic composition of five algae and evaluate their antioxidant and protective effects against hydrogen peroxide (H₂O₂) induced cytotoxicity in the protozoa *Tetrahymena pyriformis*. Successive fractionations of five algae using five solvents were performed. Spectrophotometric methods were used to determine the total phenolic and flavonoid contents. The antioxidant capacities of fractions of these five algae were assessed through three *in vitro* tests (DPPH, ABTS, and FRAP). The active fractions were further evaluated for their ability to attenuate H₂O₂ induced toxicity in *T. pyriformis*. *Fucus spiralis* has rich phenolic contents from chloroform (CHCl₃) and ethyl acetate (EtOAc) fractions, averaging 65±0.90 µg GAE/mg fraction and 429.81±9.36 µg GAE /mg fraction, respectively. This algae also showed significant FRAP (261.53±5.40 and 117.66±0.40 µg /mL), DPPH (IC₅₀: 49.51±3.29 and 55.48±0.20 µg) and ABTS (IC₅₀: 50.73±2.62 and 219.82±5.47 µg /mL) results. The treatment with 300 µM H₂O₂-induced oxidative stress as shown by the significant decrease in the cell viability and the number of cells increases in CAT, SOD, GPx activities, and the levels of GSH and MDA. However, the treatment with EtOAc and CHCl₃ fractions from *F. spiralis* appeared to be effective against cytotoxicity and the redox changes induced by H₂O₂. The results indicate that *F. spiralis* is a promising source of antioxidant and nutraceutical compounds for pharmaceutical purposes.

Keywords: Antioxidant activity; brown algae; *Fucus spiralis*; oxidative stress; *Tetrahymena pyriformis*; hydrogen peroxide.

© 2020 by the authors. This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Oxidative stress may produce excess amounts of free radical species following the exposure of aerobic cells to endogenous and exogenous factors. Reactive oxygen species (ROS) have important roles in the regulation of intracellular signal transduction and physiological adaptation phenomena in normal cells and tissues [1]. However, excessive concentration of ROS may trigger the development of various chronic diseases by impairing the structure of cellular membrane lipids, proteins, and DNA [2-3].

Hydrogen peroxide (H₂O₂), a relatively weak oxidant reactive oxygen species form ROS, is generated by a variety of intracellular reactions [2]. Physiologically, the low levels of

endogenous H₂O₂ modulate physiological cellular functions [4]. However, high levels of H₂O₂, such as observed in inflammatory states, generally cause cellular dysfunction and/or cytotoxicity.

The accumulation of excessive ROS is expected to worsen the oxidative stress and might be implicated in a set of disorder/disease processes, including heart disease, diabetes, liver injury, cancer, neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, and other age-related degenerative disorders [5-6]. However, the sensitivity of cells to oxidants is controlled by producing enzymatic antioxidant defense systems, such as glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), non-enzymatic glutathione (GSH), histidine-peptide, or iron-binding proteins [7]. In addition to such defenses, the supplementation of antioxidants can be considered as the alternative method for chelation therapy of free radicals.

Over the past few decades, researchers have pursued efforts to isolate natural bioactive compounds with versatile health benefits, and substantial attention has been focused on a wide array of antioxidants [8]. Marine macroalgae have been widely used in traditional foods since ancient times and are traditionally renowned for their versatile health benefits [9-10]. Several compounds with antioxidative action have been isolated from brown algae, most of them belonging to the phenolic fraction [11-12]. The total phenolic contents and activities of brown algal extracts have been reported [13-14].

Marine macroalgae have long been reported to be rich in unique bioactive compounds that are not found in terrestrial plants, including different proteins such as lectins, phycobiliproteins, peptides, and amino acids [12-15], hormones [16], polyphenols [17-18], polysaccharides [19 -20], and other novel bioactive compounds which might represent a potential to be used in the development of new human health applications [21]. Algae extracts have been described to have many phytochemicals with a range of different activities such as anti-inflammatory effects [22-23], neuroprotective effects [24-25], anti-aging effects [26-27], anti-cancer effects [22], antibacterial activity [28-29], antioxidant effects [30-31] and cardioprotective effects [32].

Our recent studies on the five algae showed that *Fucus spiralis* has a higher antioxidant activity among the other species [31]. Therefore, the aim of this study is to evaluate the antioxidant activity of five algae from Moroccan coastlines by quantifying of total phenolic and flavonoid contents, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) and by the ferric reducing antioxidant power (FRAP). In this study, *Tetrahymena pyriformis*, eukaryotic cell, was used as a model that imitates the animal cell, especially mammalian and used widely in toxicology and ecotoxicology [33]. The selected algal fractions were then evaluated for their protective effect against H₂O₂-induced stress on *Tetrahymena pyriformis* cellular antioxidants, metabolic systems, and in particular, their effects on CAT, GPx, SOD, GSH, and malondialdehyde (MDA) levels. The fractions of chloroform (CHCl₃) and ethyl acetate (EtOAc) of *F. spiralis* were used for the treatment of forced stress induced by H₂O₂.

2. Materials and Methods

2.1. Algal materials.

Alive and fresh samples of algae were collected during the low tide in the middle/lower intertidal areas of a beach from the Atlantic coast, namely Golden Sand Beach (sable d'Or, 33°919677'N; 6° 969531'E), 10 km south of Rabat-Morocco. The investigated algae were

identified as *Bifurcaria bifurcata* (Ross 1958), *Cystoseira humilis* (Schousboe ex Kutzing, 1860), *Cystoseira stricta* (Sauvageau 1911), *Fucus spiralis* (Linnaeus 1753) and *Gelidium sequipedale* (Clemente) (Thuret 1876). Voucher specimens of all species were deposited in the National Herbarium (RAB) of the Moroccan Scientific Institute (Rabat, Morocco).

2.2. Extract preparation.

The collected algae samples were immediately brought to the laboratory in plastic bags containing natural seawater to prevent evaporation. Algae were thoroughly washed with fresh water to remove extraneous materials and air-dried at 60°C. The dried algae were then ground in an electric mixer and stored at 4°C until use. The milled algae materials (25 g of each) were extracted twice with 80% methanol at room temperature overnight after being at 60°C for 2h. The crude extract was obtained by concentrating the supernatant using a rotary evaporator (Buchner) and a vacuum oven set at 30°C. The crude extract was dissolved in water and then partitioned sequentially in four different solvents, n-Hexane (Hex), CHCl₃, EtOAc, and n-butanol (BuOH) to fractionate the polar and non-polar compounds in the crude methanolic extract. The resulting solvent fractions were concentrated by a rotary evaporator and dried by a vacuum oven set at 30°C. The crude extract and its solvent fractions were stored in the dark at -20°C before analysis.

2.3. Bioactive constituent.

2.3.1. Determination of total phenol content.

Total polyphenol content (TCP) was determined according to the method of Slinkard and Singleton [34]. The calibration curve generated using the gallic acid standards was used to obtain the values for algae samples, which are expressed as micrograms of gallic acid equivalents (GAE) per milligram of crude extract or fraction ($\mu\text{g GAE mg}^{-1}$).

2.3.2. Determination of total flavonoid content.

The method reported in Tel *et al.* [35] was adopted for the determination of flavonoids. Flavonoid contents were calculated using a standard calibration curve prepared from quercetin. The concentrations of flavonoids in the test samples were calculated from the calibration plot and expressed as $\mu\text{g quercetin equivalent (QEs)}$ per milligram of crude extract or fraction ($\mu\text{g QEs mg}^{-1}$).

2.4. Antioxidant activity.

2.4.1. Ferric reducing power assay (FRAP).

The reducing power of different extracts was determined using the method reported by Oyaizu [36] with slight modification. One milliliter of different concentrations of test samples (0.2-1 mg/mL) were mixed with 2.5 mL sodium phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 2.5 mL of 1% potassium ferricyanide (K₃Fe(CN)₆) solution. The mixture was incubated at 50°C for 20 min. Then, trichloroacetic acid (10%, 2.5 mL) was added to the mixture. Next, 2.5 mL of this solution was mixed with 2.5 mL distilled water and 0.5 mL of 0.1% FeCl₃, and the absorbance was measured at 700 nm. Blanc was prepared with all the reaction agents without extracts.

Higher absorbance of the reaction mixture indicated that the reducing power was increased. Ascorbic acid was used as a positive control. The experiment was performed in triplicate.

2.4.2. DPPH free radical scavenging assay.

The free radical scavenging activity of extracts was determined by the DPPH assay described by Blois [37], with a slight modification. In its radical form, DPPH absorbs at 517 nm, but its absorption decreases upon reduction by an antioxidant or radical species. Briefly, a 0.1 mM solution of DPPH in methanol was prepared, and 160 μ L of this solution was added to 40 μ L of the sample solution in methanol at different concentrations (0.2-1 mg/mL). Thirty minutes later, the absorbance was measured at 517 nm using a 96-well microplate reader. Methanol was used as a control. Lower absorbance of the reaction mixture indicates higher free radical scavenging activity. The capability to scavenge the DPPH radical of an antioxidant was calculated using the following equation (1):

$$(1) \quad \text{DPPH scavenging effect (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

where A_{control} is the initial concentration of the DPPH, and A_{sample} is the absorbance of the remaining concentration of DPPH in the presence of the sample. BHA and α -tocopherol were used as antioxidant standards for comparison of the activity. IC_{50} values (μ g/mL) were also determined for fractions or extracts that scavenged DPPH radicals at a rate superior to 50%.

2.4.3. ABTS cation radical decolorization assay.

The spectrophotometric analysis of $ABTS^{\cdot+}$ scavenging activity was determined according to the method of [38] with slight modifications. The $ABTS^{\cdot+}$ was produced by the reaction between 7 mM ABTS in H_2O and 2.45 mM potassium persulfate, stored in the dark at room temperature for 12 h. The radical cation was stable in this form for more than 2 days when stored in the dark at room temperature. Before usage, the $ABTS^{\cdot+}$ solution was diluted to achieve an absorbance of 0.708 ± 0.025 at 734 nm with ethanol. Then, 160 μ L of $ABTS^{\cdot+}$ solution was added to 40 μ L of the sample solution in ethanol at different concentrations. After 10 min, using a 96-well microplate reader, the percentage inhibition at 734 nm was calculated for each concentration relative to a blank absorbance. The scavenging capability of $ABTS^{\cdot+}$ was calculated using the following equation (2):

$$(2) \quad \text{ABTS}^{\cdot+} \text{ scavenging effect (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

where A_{control} is the initial concentration of the $ABTS^{\cdot+}$ and A_{sample} is the absorbance of the remaining concentration of $ABTS^{\cdot+}$ in the presence of the sample. BHA and α -tocopherol were used as antioxidant standards for comparison of the activity. IC_{50} values (μ g/mL) were also determined for fractions or extracts that scavenged $ABTS^{\cdot+}$ radical over 50%.

2.5. Protective effect of selected extracts on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity.

2.5.1. Cell culture of *Tetrahymena pyriformis*.

A wild strain of *Tetrahymena pyriformis* was grown aerobically without shaking in a broth medium containing 1.5% protease-peptone, 0.25% yeast extract, and 0.2% glucose at 28°C during 72h [39]. For all experiments, the protozoa were always in the exponential growth phase, at a density of 1×10^4 /mL.

To determine the effect of the selected algae extracts and hydrogen peroxide on the viability of *T. pyriformis*, the protozoa cells were grown in PPYG medium added with various concentrations of H₂O₂ (200-500 µg/mL) to determine the sub-lethal concentration of H₂O₂. For selecting the extract which has the best activity, the cells were maintained in a PPYG medium supplemented with various concentrations of either ethyl acetate or chloroform fractions of *F. spiralis* (0.03-0.60 mg/mL) to determine the non-toxic concentration extracts. To evaluate the protective effect of selected extracts on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity, the culture of *T. Pyriformis* cells was treated with a non-toxic concentration of either the chloroform or ethyl acetate fraction from *F. spiralis* algae.

2.5.2. Cell proliferation and viability assays.

The effects of treatments with H₂O₂ with or without ethyl acetate or chloroform fraction aliquots on the proliferation of *T. pyriformis* were evaluated optically using a microscope. *T. pyriformis* cell viability and/or mitochondrial activity was determined using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay method [40]. The MTT assay was performed in 96-well microplates. The formazan production due to dehydrogenase activity at 550 nm was measured at 540 nm with a microplate reader. The results were expressed as percentage viability and cell numbers compared to the control.

2.6. Determination of antioxidant enzyme activities in *T. pyriformis*.

2.6.1. Preparation of crude extracts.

Protozoan cells were harvested during the logarithmic growth phase by centrifugation at 12000 g for 15 min. The pellet obtained was suspended in 1 mL of 50 mM phosphate buffer at pH 7.4. The cells were then crushed in the cold (-4°C) with ultraturax for 20 min, followed by sonication of the sample (80W, 60 s). The obtained supernatant (soluble protein fraction) was considered as the crude cell-free extract used in all enzyme assays.

2.6.2. CAT activity.

CAT activity in the crude cell-free extract was measured according to the method as previously described [41]. Briefly, 1 mL reaction reagent contained 50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ buffer, 30 mM H₂O₂, and was prepared at a pH of 7. CAT activity was calculated from the time of consumption of H₂O₂, resulting in an absorbance decrease at 240 nm. The enzyme activity was expressed as mmol of H₂O₂ consumed/min/mg protein.

2.6.3. SOD activity.

The activity of SOD was determined according to the procedure of Paoletti *et al.* [42]. The total (Cu-Zn and Mn) SOD activity was determined by measuring its ability to inhibit the photoreduction of nitroblue tetrazolium (NBT) [43]. One unit of SOD represents the amount inhibiting the photoreduction of NBT by 50%. The activity was expressed as units/mg protein at 25°C.

2.6.4. GPx activity.

GPx activity was measured following the method as previously described [44]. The reaction reagent consisted of 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.4), 2 mM GSH, 10 mM

sodium azide, 0.5 mM EDTA, 1mM H₂O₂ and 0.3 mL of the extract. After incubation at 37°C for 15 min, the reaction was terminated by the addition of trichloroacetic acid (TCA, 5%, 0.5 mL). Tubes were centrifuged at 1200 g for 5 min, and the supernatant was collected. A quantity of 0.2 mL of phosphate buffer (0.1 M pH 7.4) and 0.7 mL of DTNB (0.4 mg/mL) were added to 0.1 mL of reaction supernatant. After mixing, absorbance was recorded at 420 nm. The activity was expressed as μmol of GSH/min/mg of soluble cell proteins at 25°C.

2.6.5. Determination of reduced glutathione (GSH).

GSH levels were determined in the algal extracts using Ellman's method [45], with slight modifications. Briefly, the trichloroacetic acid solution was mixed with the extract. After centrifugation for 10 min at 12000 g, the supernatant was collected and mixed with a phosphate buffer (50 Mm, pH 8) and 6 mM 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid (DTNB)). The absorbance was read at 412 nm. Reduced thiol contents were expressed in nmol of GSH/mg of protein.

2.6.6. MDA content.

MDA levels in the cell culture supernatant were determined spectrophotometrically, according to the method described by Ohkawa *et al.* [46]. 0.5 mL of supernatant was homogenized with trichloroacetic acid (TCA 20%) and 1 mL thiobarbituric acid (TBA, 0.67%). The mixture was heated at 100°C for 15 min. After cooling, 4 mL of butanol was added to each sample and centrifuged at 3000 g for 15 min. The intensity of the pink/red color of the supernatant was determined at 532 nm. MDA levels were defined as nmol per mg of proteins.

2.6.7. Protein assay.

Protein content was measured by using bovine serum albumin (BSA) as the analytical standard, according to Lowry's methods [47].

2.7. Calculation and analysis of data.

Statistical analysis was performed using the SPSS 23. All data for both antioxidant and antioxidant enzyme activity tests were the average of triplicate analyses. Data were recorded as the mean \pm Standard Deviation (SD). Differences between means were determined using the Student's test. p values < 0.05 were taken as significant.

3. Results and Discussion

3.1. Total bioactive compounds.

In this study, the total phenolic content was expressed as μg GAE per gram of the extract and fraction. It can be seen from Table 1 that the brown algae *F. spiralis* and *C. humulilis* contained higher amounts of polyphenols than the other algae, *B. bifurcata*, *G. sesquipedale*, and *C. humilis*. This result is in accordance with the results reported previously [13-17]. The highest phenolic contents for EtOAc and CHCl₃ fractions were found in *F. spiralis* with values of (429.81 \pm 9.36; 65.76 \pm 0.90 μg GAE/mg extract) and *C. stricta* (381.33 \pm 10.81; 48.23 \pm 2.31 μg GAE/mg extract), respectively. The lowest total phenolic contents were observed in n-butanol and an aqueous fraction of *C. Stricta*, *G. sesquipedale*, *C. humilis* and *B. bifurcata* ranging from 5.19 \pm 0.27 to 18.01 \pm 2.16 μg GAE/mg extract, while *F. spiralis* showed higher

amounts of phenolic contents in n-butanol ($45.24 \pm 0.59 \mu\text{g GAE}/\text{mg extract}$) compared to other species.

Table 1. Total bioactive contents of the methanol extracts and their fractions for the five algae species included in the study.

| | Crude extract | n-Hexan | Chloroform | Ethyl acetate | n-butanol | Aqueous |
|---|---------------|-------------|-------------|---------------|------------|------------|
| Total phenolic contents^a | | | | | | |
| <i>B. bifurcata</i> | 6.67±0.98 | 9.35±1.10 | 41.71±1.49 | 16.71±0.75 | 10.04±2.01 | 11.91±1.94 |
| <i>C. stricta</i> | 43.33±8.23 | 25.02±2.86 | 48.23±2.31 | 381.33±10.81 | 18.01±2.16 | 5.19±0.27 |
| <i>C. humilis</i> | 5.45±0.19 | 11.17±1.67 | 35.93±2.63 | 11.13±2.46 | 5.58±0.71 | 8.23±0.52 |
| <i>F. spiralis</i> | 60.69±8.23 | 61.95±2.78 | 65.76±0.90 | 429.81±9.36 | 45.24±0.59 | 21.43±3.32 |
| <i>G. sesquipedale</i> | 9.44±1.00 | 12.99±7.11 | 15.02±2.49 | 61.52±6.88 | 7.79±1.42 | 13.12±1.92 |
| Total flavonoid contents^b | | | | | | |
| <i>B. bifurcata</i> | 13.47±0.63 | 46.09±3.93 | 73.98±2.67 | 28.03±0.36 | 7.87±0.47 | 12.24±0.36 |
| <i>C. stricta</i> | 22.16±0.20 | 127.32±0.45 | 74.18±2.22 | 34.7±0.24 | 12.32±0.54 | 10.49±0.72 |
| <i>C. humilis</i> | 12±0.47 | 94.02±0.58 | 35.37±0.66 | 30.21±0.41 | 14.74±1.03 | 12.08±0.59 |
| <i>F. spiralis</i> | 25.02±0.54 | 136.37±0.24 | 111.92±3.93 | 43.98±0.41 | 7.4±0.24 | 7±0.77 |
| <i>G. sesquipedale</i> | 20.61±0.59 | 81.6±0.36 | 60.53±1.15 | 5.41±0.44 | 7.79±0.59 | 7.79±0.56 |

Values expressed are means ± SD of three parallel measurements ($p < 0.05$).

^aTotal phenolic contents are expressed as $\mu\text{g GAE}$ per mg of extract or fraction.

^bTotal flavonoid contents are expressed as $\mu\text{g QE}$ per mg extract or fraction

The red algae, *G. sesquipedale* showed a decrease of polyphenol contents in the EtOAc fraction (61.52 ± 3.97) when compared to its other solvent fractions. In other studies, the methanolic fraction from *F. spiralis* showed the highest total phenolic content compared to methanol and dichloromethane fractions from twenty-seven other macroalgae species [48]. Our findings are in agreement with those of previous studies, whereas brown algae species were found to contain predominantly polyphenolic compounds in the organic solvents such as EtOAc and dichloromethane [49]. Previous studies have reported that the dichloromethane fraction of *F. spiralis* and EtOAc fraction of *B. bifurcata* showed higher phenolic contents (29.79 and $24.44 \text{ mg GAE/g dry weight extract}$, respectively) when compared to other solvent fractions and crude methanol extract. However, the relatively high phenolic contents of the EtOAc fraction are probably associated with its polarity which allows the accumulation of a variety of antioxidant compounds. Previous studies have reported that all the *Fucus* species tested had high total phenolic contents [17]. This might be due to their high content of phlorotannins, which are polymers of phloroglucinol derived entirely from acetate. Phlorotannins are restricted to brown algae (Phaeophyta), where they are found in special vesicles (physodes) within the cells [50].

Flavonoids are natural polyphenolic compounds and well-known antioxidants, playing significant roles in detoxification of free radicals. It has been recognized that flavonoids show antioxidant activity, and their effects on human nutrition and health are considerable. Their concentration in the extracts was expressed as micrograms of quercetin equivalents per milligram of extract and fraction ($\mu\text{g QEs}/\text{mg extract or fraction}$), as shown in Table 1. Among the algae extracts, *F. Spiralis* showed the highest flavonoid contents followed by *C. stricta*, *G. sesquipedale*, *C. humilis*, and *B. bifurcata*. All n-hexane and chloroform fractions of the studied algae species were found to be more effective than the other fractions. *F. spiralis* exhibited the highest flavonoid amount that was observed in n-hexane and chloroform fractions with values of (136.37 ± 0.24 and $111.92 \pm 3.93 \mu\text{g QEs}/\text{mg extract}$, respectively).

As expected, aqueous residue and n-butanol fractions of all species were found to be generally poor in flavonoids, with the exception of the EtOAc fraction of *G. sesquipedale* ($5.41 \pm 0.44 \mu\text{g QEs}/\text{mg extract}$) which, on the study level, was the poorest in flavonoid contents. The high flavonoid content in the n-hexane fraction has been previously explained by the

presence of carotenes or other pigments with long hydrocarbon chains [51]. Earlier studies have shown that a change in extractant polarity alters its efficiency to extract a specific group of antioxidant compounds and that influences the antioxidant properties of the extracts [52-53]. In other studies, extraction of algae using ethyl acetate and chloroform gave higher contents of phenols and flavonoids than water and methanol, suggesting a higher affinity to lipophilic rather than hydrophilic antioxidants [54].

3.2. Antioxidant activities of algae extracts and fractions.

In this study, the antioxidant activity of the various extracts obtained from the five algae species, compared to those of butylated hydroxytoluene (BHT) and α -tocopherol, were assessed by four complementary tests, namely, ABTS, DPPH and the FRAP assay for free radical scavenging activity. As observed in Table 2, the algae species showed significant differences in the ferric reducing power of crude methanol extract and its solvent fraction.

Table 2. Antioxidant activities of the extracts and fractions of five algae species by FRAP, DPPH and ABTS⁺ assays.

| | Algae species | FRAP ^a | DPPH ^b | ABTS ^c |
|-------------------------|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Methanol | <i>B. bifurcata</i> | 11.06±0.20 | 861.82±0.77 | 1174.99±8.55 |
| | <i>C. stricta</i> | 17.66±0.28 | 666.34±0.74 | 776.07±1.30 |
| | <i>C. humulis</i> | 11.4±0.5 | 830.21±3.69 | 1062.40±13.95 |
| | <i>F. spiralis</i> | 59.03±1.05 | 355.29±0.12 | 627.89±3.25 |
| | <i>G. sesquipedale</i> | 5.06±0.58 | 1490.82±0.47 | 783.45±22.67 |
| Hexan | <i>B. bifurcata</i> | 22.73±0.51 | 442.33±5.22 | 1646.73±17.26 |
| | <i>C. stricta</i> | 68.8±0.34 | 347.52±8.44 | 1075.54±8.80 |
| | <i>C. humulis</i> | 1±0.36 | 342.67±0.20 | 1135.81±1.98 |
| | <i>F. spiralis</i> | 73.46±2.05 | 175.34±1.01 | 1125.39±34.84 |
| | <i>G. sesquipedale</i> | 6.76±0.61 | 1326.38±1.93 | 1134.66±1.98 |
| CHCl₃ | <i>B. bifurcata</i> | 12.63±0.45 | 647.75±0.63 | 1317.17±0.02 |
| | <i>C. stricta</i> | 10.36±0.20 | 165.92±2.63 | 537.94±3.60 |
| | <i>C. humulis</i> | 18.76±0.41 | 217.88±1.08 | 1101.65±27.60 |
| | <i>F. spiralis</i> | 117.66±0.40 | 55.48±0.20 | 219.82±5.47 |
| | <i>G. sesquipedale</i> | na | 1341.36±1.22 | 560.58±24.43 |
| AcET | <i>B. bifurcata</i> | 41.2±0.36 | 447.20±3.60 | 1025.48±1.82 |
| | <i>C. stricta</i> | 208.76±0.32 | 85.47±2.22 | 395.50±12.05 |
| | <i>C. humulis</i> | 32.16±0.51 | 145.93±2.59 | 831.44±7.27 |
| | <i>F. spiralis</i> | 261.53±5.40 | 49.51±3.29 | 50.73±2.62 |
| | <i>G. sesquipedale</i> | 4.33±0.76 | 1043.61±0.68 | 475.93±3.89 |
| N-But | <i>B. bifurcata</i> | 10.3±0.8 | 1074.07±0.64 | 1241.06±16.67 |
| | <i>C. stricta</i> | 0.43±0.20 | 1155.79±1.33 | 1181.28±7.34 |
| | <i>C. humulis</i> | 8.83±0.15 | 716.06±0.57 | 1748.00±5.08 |
| | <i>F. spiralis</i> | 34.4±0.91 | 529.32±3.68 | 977.94±1.75 |
| | <i>G. sesquipedale</i> | na | 1752.45±7.44 | 1909.96±26.53 |
| Aqueous | <i>B. bifurcata</i> | 8.33±0.64 | 1165.78±9.32 | 3242.12±0.31 |
| | <i>C. stricta</i> | na | 1526.87±0.54 | 2420.68±32.51 |
| | <i>C. humulis</i> | na | 2368.11±0.22 | 2730.50±0.88 |
| | <i>F. spiralis</i> | 26.46±0.96 | 1427.59±0.34 | 1621.94±0.89 |
| | <i>G. sesquipedale</i> | na | 2167.79±4.90 | 2015.12±0.12 |
| | BHT | nt | 54.96 ± 0.99 | 4.10 ± 0.06 |

IC₅₀ values represent the means ± SD of three parallel measurements ($p < 0.05$).

^aFRAP (µg ascorbic acid Equivalent/mg extract or fraction).

^bDPPH radical scavenging activity (IC₅₀ mg/mL).

^cABTS (IC₅₀ mg/mL).

nt: not tested, na: no activity.

The FRAP values of the algae extracts and fractions ranged between (0.43±0.002 and 261.53±0.054 µg AscAE/mg extract). The highest FRAP values were for Ethyl acetate, chloroform, and n-Hexan of *F. spiralis* with values of 261.53±0.05, 117.66±0.004 and 73.46 ±0.020 µg AscAE/g extract, respectively. However, the aqueous residue fractions possessed the lowest FRAP values relative to other fractions. The FRAP value of crude extracts and fractions from five algae species revealed decreasing FRAP values in the order of *F. spiralis*, *C. stricta*, *B. bifurcata*, *C. Humilis*, and *G. sesquipedale*. In agreement with our results,

previous studies revealed that fucus species exhibited higher FRAP activities than other species [55-56]. In a study, the ferric reducing antioxidant activity of 30 species of Hawaiian algae, and the brown algae presented the highest mean antioxidant values among Hawaiian algae [14]. However, the red algae had the lowest FRAP value. From these results, the EtOAc and CHCl₃ fractions of *F. spiralis* had the ability to reduce the Fe³⁺ to Fe²⁺, which indicates the possible role in human tissues and foods samples to inhibit lipoperoxidation initiated by transition metal ions such as Fe³⁺ and Cu²⁺. The Ferric reducing antioxidant activity was also evaluated by the FRAP system in the fraction of three brown macroalgae (*Ascophyllum nodosum*, *Pelvetia canaliculata* and *Fucus spiralis*) from Irish coast and they obtained a significant increase in activity in the fraction of *F. spiralis* with values of 559.96±26.69 µg Trolox equivalents (TE) mg/mg sample [57]. Marine algae are exposed to prolonged intense ultraviolet and high oxygen concentration that readily lead to the formation of free radicals and other reactive oxygen species [58-59]. The long-term exposure to the harsh environment conditions implies that algae have protective enzymes and potent antioxidant molecules that can behave as reactive oxygen scavengers [17-58].

The DPPH free radical-scavenging model is widely accepted as a tool for investigating the free radical scavenging activities of antioxidants. In this study, the free radical scavenging ability of methanolic and solvent fractions of five algae was evaluated through the change of absorbance caused by the reduction of DPPH radical. As can be seen in Table 2, the antioxidant activity assessed with DPPH depends on the solvent extraction and the algae species. As shown in Table 2, the DPPH radical scavenging activities of the five algae crude extracts and their solvent fractions varied considerably from 49.51±3.29 to 2167.79±4.90 µg/mL of fraction or extracts ($p < 0.05$). In general, the highest DPPH radical-scavenging activities were reordered in the EtOAc and CHCl₃ fraction of the brown algae *F. spiralis* (49.51±3.29 and 55.48±0.20 µg/mL, respectively) followed by the EtOAc and CHCl₃ fractions of *C. stricta* (85.47±2.22 and 165.92±2.63 µg/mL, respectively). The lowest values of DPPH radical scavenging activity were observed in methanolic crude extract and its solvent fractions of *G. sesquipedale* with values ranging from 1043.61±0.68 to 2167.79±4.90 µg/mL. Earlier reports indicate that the polar solvent fractions (ethyl acetate and dichloromethane) of algae contain the highest percentages of total phenolic contents and exhibit a higher antioxidant potential based on the DPPH radical assay [18]. It has also been shown that the solvents used for extraction dramatically influence the chemical composition of the extracts [60]. Andrade *et al.* evaluated the antioxidant capacity of several algae, and they found that brown algae possess the most potent radical scavenging activity [61].

The higher DPPH radical scavenging is thought to be due to an increase of total phenolic content in these fractions. Thus they act as electron donors because of their hydrogen-donating ability and neutralization of free radicals. Previous studies have demonstrated a positive correlation between total phenolic contents and antioxidant activities in deferment algae extracts, particularly in terms of DPPH radical scavenging activity [18-48].

As shown in Table 2, the ABTS radical scavenging activity of crude methanolic extracts from the five species can be ranked in the following order of decreasing radical scavenging activity: *F. spiralis*, *C. stricta*, *G. sesquipedale*, *C. Humilis*, *B. bifurcata*. The IC₅₀ value for ABTS radical-scavenging activity differed among the algae species and solvents used. The ABTS radical scavenging activities of Moroccan algae varied considerably from 50.73±2.62 to 3242.12±0.31 µg/mL of crude extract or fraction. For the methanolic crude extract, antioxidant activity ranged from 627.89±3.25 to 1174.99±8.55 µg/mL, which is lower than the

purified fraction. *F. spiralis* was found to have the highest antioxidant activity (627.89 ± 3.25 $\mu\text{g/mL}$), followed by *C. stricta* (776.07 ± 1.30 $\mu\text{g/mL}$) and *G. sesquipedale* (783.45 ± 22.67 $\mu\text{g/mL}$). Among all species tested, ethyl acetate and chloroform fractions of *F. spiralis* showed the most scavenging activity on ABTS radicals (50.73 ± 2.62 and 219.82 ± 5.47 $\mu\text{g/mL}$, respectively), followed by the ethyl acetate and chloroform fractions of *C. stricta* (395.50 ± 12.05 and 537.94 ± 3.60 $\mu\text{g/mL}$, respectively). However, methanolic crude extract and its fraction from *B. bifurcata* showed less scavenging activity than from other species. The aqueous, n-butanol, and n-hexane fractions of all algae species showed the lowest IC_{50} value of ABTS radical scavenging activity than other algal fractions. In general, the highest antioxidant activities were found in the purified fraction than in methanolic crude extract. In another study, the ABTS radical scavenging activity of different extracts from *Ascophyllum nodosum* was measured, and the crude extracts were less effective antioxidants than purified ones [62]. Many researchers have shown that polyphenolic compounds extracted from marine algae exhibited high potent antioxidants activity against free radical cation activity [18]. In accordance with total phenolic content and DPPH radical scavenging activity, the ABTS results were again found in the methanolic and fraction of brown algae *F. spiralis*.

Due to the high total phenolic contents and the high antioxidant capacities of the EtOAc and CHCl_3 fractions of the brown algae *F. spiralis*, the protective effect of these fractions against peroxide hydrogen induced-cytotoxicity in the *T. pyriformis* protozoan was investigated further.

3.3. Cytotoxicity of H_2O_2 on *T. pyriformis*.

The protozoan *T. pyriformis*, a eukaryotic cell, is well-established as a suitable model for higher animal cells, especially mammalian. The unicellular ciliate *T. pyriformis*, is an appropriate system for a number of studies, including cell morphogenesis, gene mapping, cell division, and in toxicant screening studies in environmental and pharmaceutical fields [63].

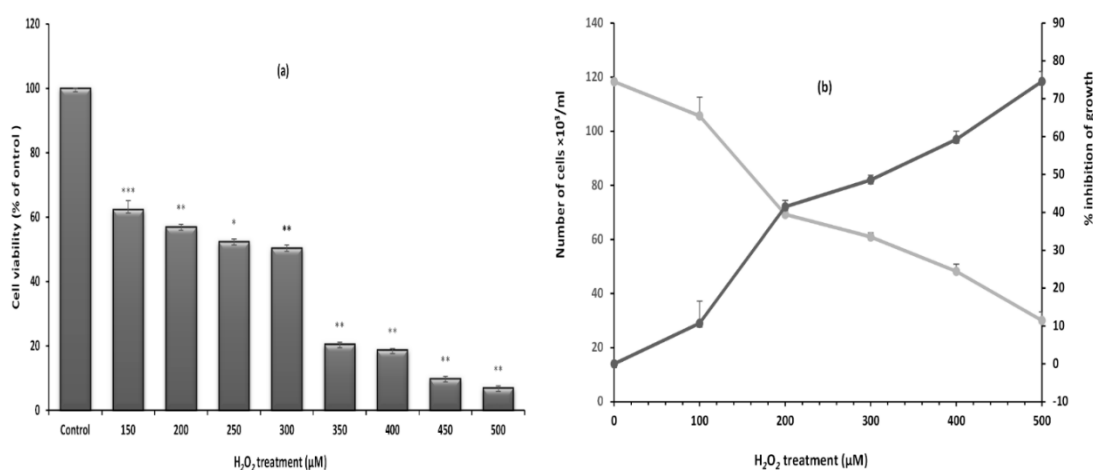


Figure 1. *T. pyriformis* was cultivated in PPYG medium in the presence of different concentrations of H_2O_2 (100-300 μM). (a) Results were obtained by the MTT method. (b) Effect of H_2O_2 on *T. pyriformis* growth. The results shown are the mean \pm SD of the three independent experiments. Values were normalized to the control and are given as percent of the control. The significance following the Student t-test are shown as: $p < 0.05$ for *; $p < 0.01$ for **; $p < 0.001$ for ***.

The protozoan *T. pyriformis* was grown with different concentrations of H₂O₂, as mentioned in materials and methods. We chose to promote stress using H₂O₂ because it is relatively stable and thus enables us to impose reproducible oxidative stress upon the cells. The cytotoxicity induced using different concentrations over the range of 100 to 500 μM was assessed in *T. pyriformis* using the enumeration cells and MTT assays. The results show that the treatment with H₂O₂ resulted in a significant decrease in cell viability (Figure 1a) ($p < 0.05$), and the number of cells was remarkably reduced (Figure 1b). Moreover, the treatment with 300 μM of H₂O₂ produced a significant decrease in the cell viability with 52% ($p < 0.01$) and the number of cells with 48% after 24 hours of treatment. The concentrations under 300 μM are toxic and lethal (Figure 1a). These results were in agreement with the finding of previous studies that reported that 300 μM of H₂O₂ inhibited the growth of *T. pyriformis* by half [64-65]. Results from other studies have shown that hydrogen peroxide induces oxidative stress and cell death in murine hippocampal HT22 cells [24] and that hydrogen peroxide can inhibit the growth, shape, density, and mobility of *T. pyriformis* [66].

3.4. Effect of the algae extracts on the growth of *T. pyriformis*.

To determine the non-lethal concentration of each fraction extract (EtOAc and CHCl₃) of *F. spiralis* on *T. pyriformis*, cell viability and cell numbers were determined. As shown in Figure 2, CHCl₃ (a) and EtOAc (b) fractions were not cytotoxic up to the concentration of 0.09 and 0.12 μg/mL of EtOAc and CHCl₃, respectively. In a similar study, the cytotoxicity of five fractions obtained from *F. spiralis* was tested on MCF-7 cells, and it was also shown that none of the fractions (1 mg/mL) presented cytotoxicity [30].

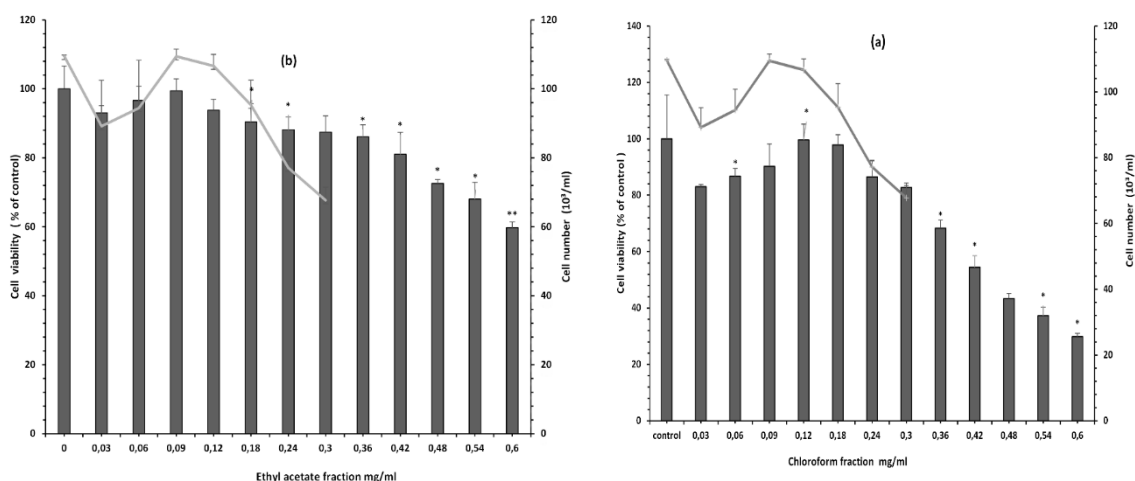


Figure 2. Effect of algae on the growth of *Tetrahymena pyriformis*. The cells were maintained in PPYG medium supplemented with different concentrations of (a) chloroform or (b) ethyl acetate (0.03-0.6 mg/ml). Values of MTT were normalized to the control and are given as percent of the control. The significance following the Student t-test are shown as: $p < 0.05$ for *; $p < 0.01$ for **; $p < 0.001$ for ***.

3.5. Protective effect against H₂O₂-induced cytotoxicity on *T. pyriformis*.

Cell viability was measured with the MTT test, allowing quantifying the enzymatic activity of dehydrogenase, which takes into account mitochondrial dysfunctions and/or cell growth inhibition. As shown in Figure 3, When H₂O₂ was applied at 300 μM for 24 h, a significant decrease of the cell viability (51.89 %) was observed as compared to the control.

On the other hand, in the cells treated with of EtOAc (0.09 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and CHCl_3 (0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and exposed to H_2O_2 (300 μM), we noted that the pre-treatment significantly restored the cell viability to 82.02 % and 83 % of control for EtOAc (0.09 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and CHCl_3 (0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectively. These results indicate that both fractions had a strong scavenging effect on hydrogen peroxide. They inhibited H_2O_2 -induced cytotoxicity of *T. pyriformis* and showed a significant protective effect against oxidative stress by H_2O_2 . In previous studies, the methanolic fraction of *Padina pavonica* and *Fucus spiralis* presented the highest activities (81.12 \pm 2.92 and 80.5 \pm 2.25% of viable cells, respectively), at 0.5 mg/mL concentration when MCF-7 cells were exposed to 0.2 mM of H_2O_2 [48]. In other studies, the pre-treatment with the extract up to the concentration of 62.5 mg/mL from *C. tamariscifolia* against oxidative stress imposed by 100 μM H_2O_2 treatment on SH-SY5Y, enhanced cell survival up to almost 100% compared with the H_2O_2 -treated group, which had a viability of 53.4% [25]. Herein, when adding EtOAc and CHCl_3 (90 and 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$), *F. spiralis* fraction prevented the reduction of cell viability induced by H_2O_2 .

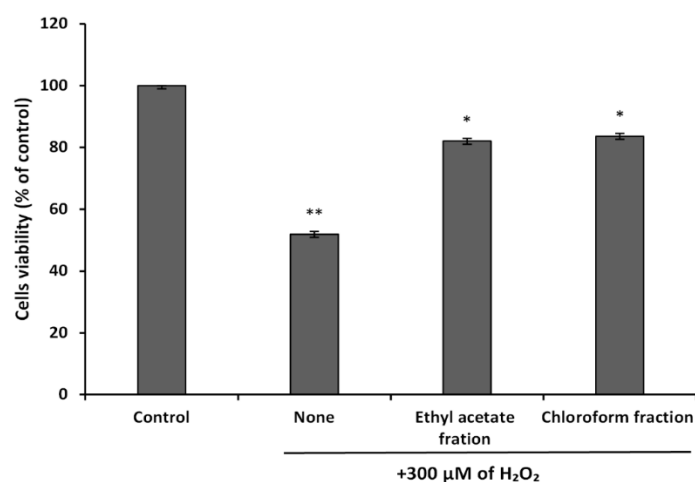


Figure 3. The protective effect of ethyl acetate (0.09 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and chloroform fraction (0.12 $\mu\text{g}/\text{ml}$) on hydrogen peroxide promoted oxidative stress conditions in *T. pyriformis* promoted by H_2O_2 at 300 μM after 24 hours of incubation. Cell viability was determined via the MTT method. The values in each column represent the mean \pm SD. * $p < 0.001$, represent statistically significant differences compared with the control. # $p < 0.001$ represents statistically significant differences compared to the H_2O_2 condition.

3.6. Effect of extract on antioxidant enzyme activities.

The results of the protective effect of algae as having possible antioxidant effects are shown in (Figure 4). According to our results, in *T. pyriformis* cells treated by 300 μM H_2O_2 , the enzymatic activities of SOD, GPx, CAT (Figure 4a, 4b, 4c), MDA and GSH levels (Figure 4d, 4e) were increased when compared to controls. However, when *T. pyriformis* was grown in the medium supplemented with EtOAc or CHCl_3 fraction and exposed to H_2O_2 , it significantly decreased the antioxidant enzymes (SOD, GPx, and CAT) and levels of (MDA and GSH) to near normal values, when compared to H_2O_2 treated *T. pyriformis*. The treatment with EtOAc and CHCl_3 preserves the normal levels of antioxidant enzymes, MDA, and GSH levels. This effect may be due to the antioxidant effect of phenolic compounds, which may blunt oxidative injuries through scavenging reactive species and inhibiting lipid peroxidation [22]. The antioxidant protective effects of algae are related to biologically active substances, including polyphenols and phlorotannins [24]. In the brown algae, phlorotannins are known to constitute up to 15% of the dry weight of brown algae [67].

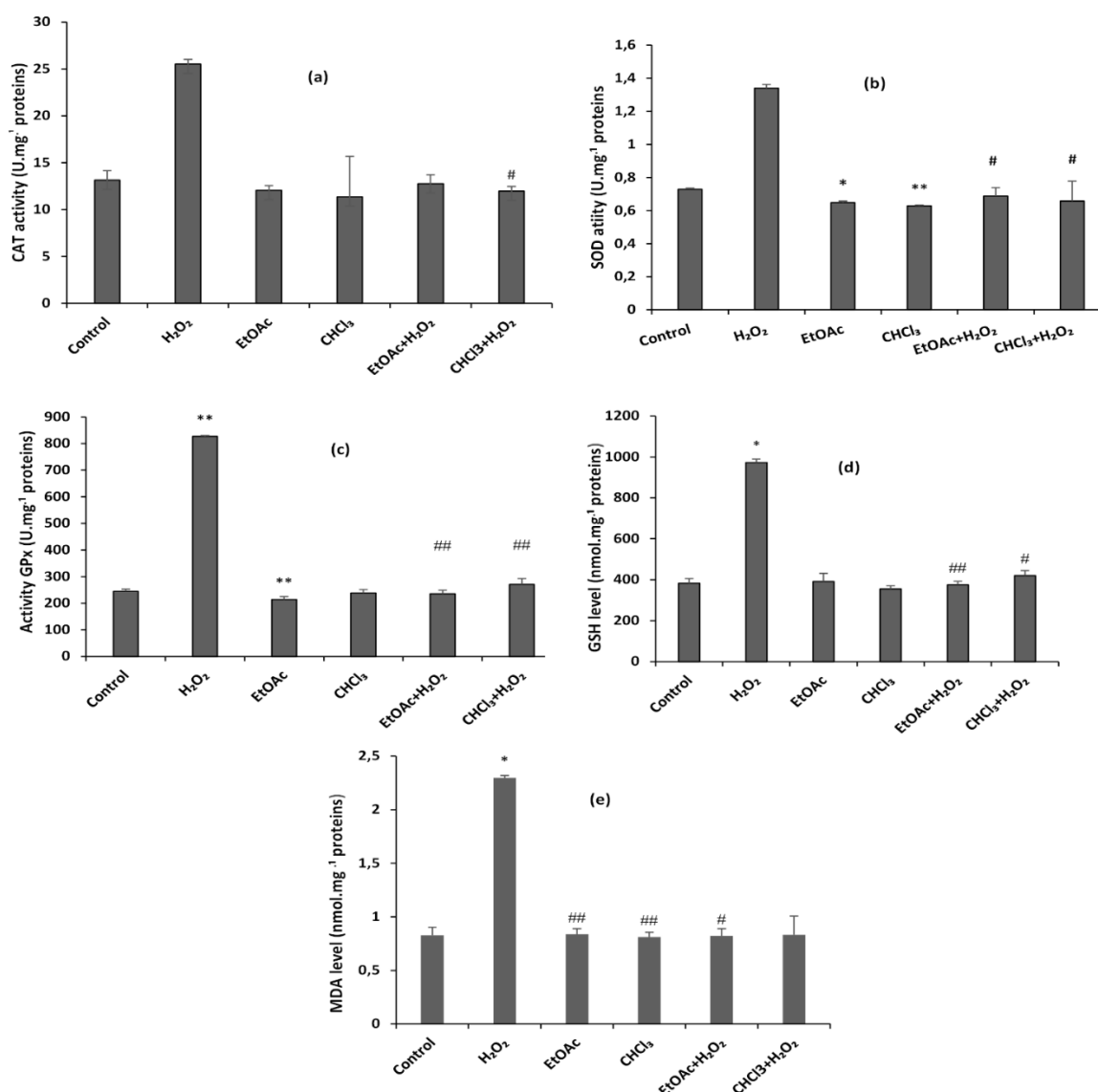


Figure 4. (a) CAT, (b) SOD, (c) GPx, (d) GSH and (e) MDA. The values in each column represent the mean \pm SD. * $p < 0.001$, represent statistically significant differences compared with the control. # $p < 0.001$, represent statistically significant differences compared with H₂O₂ condition.

CAT is considered the most important enzyme for the break-down of H₂O₂ to water, oxygen, and other non-toxic products [68]. SOD protects a cell by catalyzing the conversion of superoxide radicals to H₂O₂, which is decomposed by GPx [69]. GPx removes H₂O₂ by the oxidation of GSH, but it converts lipid peroxides to harmless molecules protecting the cells from the consequences of lipid peroxidation. Previous reports related to the effect of H₂O₂ on redox status revealed that this oxidant displayed an increase in CAT and SOD in the protozoan *Tetrahymna thermophile* [64]. H₂O₂ induced oxidative stress was previously demonstrated in many cell types [24,70]. In the murine hippocampal HT22 cells, peroxide hydrogen significantly increased levels of intracellular Ca²⁺ concentration, which induced cell death. Therefore, phlorotannins isolated from the brown algae *Ecklonia cava* inhibit H₂O₂ induced oxidative stress and cell death by inhibiting Ca²⁺ increase [24]. Similarly, another study has reported that H₂O₂ enhances mitochondrial transmembrane potential and caspase-9 activity in the MCF- 7 cells, whereas the treatment with algae extracts of *Ulva Compresa*, *Cystoseira tamariscifolia*, *Sargassum muticum*, *Fucus spiralis*, and *Padina pavonica* increases the cell viability through inhibition of the caspase-9 activity and reduced mitochondrial membrane depolarization [48]. It has been shown that H₂O₂ acts as a biological oxidant, and contributes

to the increase of cytosolic Ca²⁺ and oxidative stress, which is involved in cell death mechanisms [70-71]. It has been reported that apoptosis death is related to the decrease in the mitochondrial membrane potential, which is associated with the release of cytochrome c and sequential activation of caspases [72]. In the apoptotic process, an increase of cytosolic Ca²⁺ and oxidative stress contribute to the opening of the mitochondrial permeability transition pore (PTP), which depolarizes the mitochondria and leads to mitochondrial swelling and subsequent release of cytochrome c into the cytosol [73-74].

Our data show that the ethyl acetate and chloroform fractions from *F. spiralis* extract are able to counteract H₂O₂-induced cell growth inhibition. Algae is a possible source of useful antioxidative compounds, and different compounds can be obtained as a result of the selection of the extraction solvent.

4. Conclusions

In summary, this study showed that extraction solvents had a significant impact on the phenolic, flavonoid contents and are against various oxidative systems under *in vitro* condition. Overall, EtOAc and CHCl₃ of *F. spiralis* contained the highest antioxidant activities. The present study demonstrated that the EtOAc and CHCl₃ fraction from *F. spiralis* algae could significantly reduce oxidative stress in *T. Pyriformis* against H₂O₂ induced cytotoxicity. These results indicate that *F. spiralis* has therapeutic effects for some health problems associated with oxidative stress, and this was established by its protective effect on redox status and cell viability. Significant efforts should be made to identify and isolate the bioactive compounds that are involved in the antioxidant activities of these algae species.

Funding

This research received no external funding.

Acknowledgments

We thank Dr. Abedlouahid Chriyaa for his contribution to the manuscript reading.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Circu, M.L.; Aw, T.Y. Reactive Oxygen Species, Cellular Redox Systems, and Apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *48*, 749–762, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022>.
2. Yoshikawa, T.; Naito, Y. What Is Oxidative Stress? *J. Japan Med. Assoc.* **2002**, *45*, 271–276.
3. Carocho, M.; Ferreira, I.C.F.R. A Review on Antioxidants, Prooxidants and Related Controversy: Natural and Synthetic Compounds, Screening and Analysis Methodologies and Future Perspectives. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *51*, 15–25, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>.
4. Rhee, S.G.; Chang, T.; Jeong, W.; Kang, D. Methods for Detection and Measurement of Hydrogen Peroxide inside and Outside of Cells. *Mol. Cells* **2010**, *29*, 539–549, <https://doi.org/10.1007/s10059-010-0082-3>.
5. Barbosa, M.P.R.; Mendes, L.D.S.; Vilela, D.d.A.; Veras, M.; Rocha, J.C.T. Can Oxidative Stress Markers Help Define Stroke Prognosis? *Biointerface Res. Appl. Chem.* **2019**, *10*, 4864–4868, <https://doi.org/10.33263/BRIAC101.864868>.
6. Murray, P.M.; Moane, S.; Collins, C.; Beletskaya, T.; Thomas, O.P.; Duarte, A.W.F.; Nobre, F.S.; Owoyemi, I.O.; Pagnocca, F.C.; Sette, L.D.; McHugh, E.; Causse, E.; Pérez-López, P.; Feijoo, G.; Moreira, M.T.; Rubiolo, J.; Leirós, M.; Botana, L.M.; Pinteus, S.; Alves, C.; Horta, A.; Pedrosa, R.;

- Jeffryes, C.; Agathos, S.N.; Allewaert, C.; Verween, A.; Vyverman, W.; Laptev, I.; Sineoky, S.; Bisio, A.; Manconi, R.; Ledda, F.; Marchi, M.; Pronzato, R.; Walsh, D.J. Sustainable Production of Biologically Active Molecules of Marine Based Origin. *N. Biotechnol.* **2013**, *30*, 839–850, <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.03.006>.
7. Kazakov, Y.; Tarasov, A.; Alyoshina, L.; Brainina, K. Interplay between Antioxidant Activity, Health and Disease. *Biointerface Res. Appl. Chem.* **2019**, *10*, 4893–4901, <https://doi.org/10.33263/BRIAC101.893901>.
 8. Qin, Y. Applications of Bioactive Seaweed Substances in Functional Food Products. *J. Food Sci. Technol.* **2019**.
 9. Gomez-Zavaglia, A.; Prieto Lage, M.A.; Jimenez-Lopez, C.; Mejuto, J.C.; Simal-Gandara, J. The Potential of Seaweeds as a Source of Functional Ingredients of Prebiotic and Antioxidant Value. *Antioxidants*. **2019**, *8*, <https://doi.org/10.3390/antiox8090406>.
 10. Hannan, M.A.; Sohag, A.A.M.; Dash, R.; Haque, M.N.; Mohibullah, M.; Oktaviani, D.F.; Hossain, M.T.; Choi, H.J.; Moon, I.S. Phytosterols of Marine Algae: Insights into the Potential Health Benefits and Molecular Pharmacology. *Phytomedicine* **2020**, *69*, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153201>.
 11. Balboa, E.M.; Conde, E.; Moure, A.; Falqué, E.; Domínguez, H. In Vitro Antioxidant Properties of Crude Extracts and Compounds from Brown Algae. *Food Chem.* **2013**, *138*, 1764–1785, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.026>.
 12. Michalak, I.; Chojnacka, K. Algae as Production Systems of Bioactive Compounds. *Eng. Life Sci.* **2015**, *15*, 160–176, <https://doi.org/10.1002/elsc.201400191>.
 13. Cérantola, S.; Breton, F.; Ar Gall, E.; Deslandes, E. Co-Occurrence and Antioxidant Activities of Fucol and Fucophlorethol Classes of Polymeric Phenols in *Fucus Spiralis*. *Bot. Mar.* **2006**, *49*, 347–351.
 14. Kelman, D.; Posner, E.K.; McDermid, K.J.; Tabandera, N.K.; Wright, P.R.; Wright, A.D. Antioxidant Activity of Hawaiian Marine Algae. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 403–416, <https://doi.org/10.3390/md10020403>.
 15. Harnedy, P.A.; FitzGerald, R.J. Bioactive Proteins, Peptides, and Amino Acids From Macroalgae. *J. Phycol.* **2011**, *47*, 218–232, <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.00969.x>.
 16. Ashour, M.; El-Shafei, A.A.; Khairy, H.M.; Abd-Elkader, D.Y.; Mattar, M.A.; Alataway, A.; Hassan, S.M. Effect of *Pterocladia Capillacea* Seaweed Extracts on Growth Parameters and Biochemical Constituents of Jew's Mallow. *Agronomy* **2020**, *10*, <https://doi.org/10.3390/agronomy10030420>.
 17. Sabeena Farvin, K.H.; Jacobsen, C. Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Selected Species of Seaweeds from Danish Coast. *Food Chem.* **2013**, *138*, 1670–1681, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.078>.
 18. Chakraborty, K.; Praveen, N.K.; Vijayan, K.K.; Rao, G.S. Evaluation of Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Brown Seaweeds Belonging to *Turbinaria* Spp. (Phaeophyta, Sargassaceae) Collected from Gulf of Mannar. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2013**, *3*, 8–16, [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60016-7](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60016-7).
 19. Lajili, S.; Ammar, H.H.; Mzoughi, Z.; Amor, H.B.H.; Muller, C.D.; Majdoub, H.; Bouraoui, A. Characterization of Sulfated Polysaccharide from *Laurencia Obtusa* and Its Apoptotic, Gastroprotective and Antioxidant Activities. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *126*, 326–336, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.089>.
 20. Dobrinčić, A.; Balbino, S.; Zorić, Z.; Pedisić, S.; Bursać Kovačević, D.; Elez Garofulić, I.; Dragović-Uzelac, V. Advanced Technologies for the Extraction of Marine Brown Algal Polysaccharides. *Mar. Drugs* **2020**, *18*, <https://doi.org/10.3390/md18030168>.
 21. Ouahid, E. A.; Mohamed, R.; Meryam, O.; Ali Yahya, H.S.; Latrach, L.; Soufiane, F.; Abdelhafid, C. Evaluation of the Energetic Valorization of the Lagoon and Mediterranean Algae (*Caulerpa Prolifera* & *Corallina Elongata*) by Anaerobic Digestion. *Sci. African* **2019**, *5*, <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00111>.
 22. Lee, J.-C.; Hou, M.-F.; Huang, H.-W.; Chang, F.-R.; Yeh, C.-C.; Tang, J.-Y.; Chang, H.-W. Marine Algal Natural Products with Anti-Oxidative, Anti-Inflammatory, and Anti-Cancer Properties. *Cancer Cell Int.* **2013**, *13*, <https://doi.org/10.1186/1475-2867-13-55>.
 23. Sarangi, M.K.; Rao, M.E.B.; Parcha, V.; Yi, D.K.; Nanda, S.S. Marine Polysaccharides for Drug Delivery in Tissue Engineering. In: *Natural Polysaccharides in Drug Delivery and Biomedical Applications*. Elsevier, **2019**; pp. 513–530, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817055-7.00022-4>.
 24. Kang, S.M.; Cha, S.H.; Ko, J.Y.; Kang, M.C.; Kim, D.; Heo, S.J.; Kim, J.S.; Heu, M.S.; Kim, Y.T.; Jung, W.K.; Jeon, Y.J. Neuroprotective Effects of Phlorotannins Isolated from a Brown Alga, *Ecklonia Cava*, against H₂O₂-Induced Oxidative Stress in Murine Hippocampal HT22 Cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2012**, *34*, 96–105, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.03.006>.
 25. Custodio, L.; Silvestre, L.; Rocha, M.I.; Rodrigues, M.J.; Vizetto-Duarte, C.; Pereira, H.; Barreira, L.; Varela, J. Methanol Extracts from *Cystoseira Tamariscifolia* and *Cystoseira Nodicaulis* Are Able to Inhibit Cholinesterases and Protect a Human Dopaminergic Cell Line from Hydrogen Peroxide-Induced Cytotoxicity. *Pharm. Biol.* **2016**, *54*, 1687–1696, <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1123278>.
 26. Eren, B.; Tuncay Tanrıverdi, S.; Aydın Köse, F.; Özer, Ö. Antioxidant Properties Evaluation of Topical

- Astaxanthin Formulations as Anti-Aging Products. *J. Cosmet. Dermatol.* **2019**, <https://doi.org/10.1111/jocd.12665>.
27. Pereira, L. Seaweeds as Source of Bioactive Substances and Skin Care Therapy—Cosmeceuticals, Algototherapy, and Thalassotherapy. *Cosmetics* **2018**, *5*, <https://doi.org/10.3390/cosmetics5040068>.
 28. Moujahid, A.; Bencharki, B.; Hilali, L.; Bagri, A.; Najim, L. Activités Antibactérienne et Antifongique Des Extraits d' Algues Marines d' Origine Marocaine. *Biol. Santé* **2004**, *4*, 288–305.
 29. Karpiński, T.M.; Adamczak, A. Fucoxanthin—An Antibacterial Carotenoid. *Antioxidants* **2019**, *8*, <https://doi.org/10.3390/antiox8080239>.
 30. Pinteus, S.; Silva, J.; Alves, C.; Horta, A.; Thomas, O.; Pedrosa, R. Antioxidant and Cytoprotective Activities of Fucus Spiralis Seaweed on a Human Cell in Vitro Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, <https://doi.org/10.3390/ijms18020292>.
 31. Grina, F.; Ullah, Z.; Kaplaner, E.; Moujahid, A.; Eddoha, R.; Nasser, B.; Terzioğlu, P.; Yilmaz, M.A.; Ertaş, A.; Öztürk, M.; Essamadi, A. In Vitro Enzyme Inhibitory Properties, Antioxidant Activities, and Phytochemical Fingerprints of Five Moroccan Seaweeds. *South African J. Bot.* **2020**, *128*, 152–160, <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.10.021>.
 32. Thomes, P.; Rajendran, M.; Pasanban, B.; Rengasamy, R. Cardioprotective Activity of Cladosiphon Okamuraanus Fucoidan against Isoproterenol Induced Myocardial Infarction in Rats. *Eur. J. Integr. Med.* **2010**, *18*, 52–57, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.06.006>.
 33. Sauvant, M.; Pepin, D.; Piccini, E. Tetrahymena Pyriformis: A Tool for Toxicological Studies. *Science* **1999**, *38*, 1631–1669, [https://doi.org/10.1016/s0045-6535\(98\)00381-6](https://doi.org/10.1016/s0045-6535(98)00381-6).
 34. Slinkard, K.; Singleton, V.L. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *Am. J. Enol. Vitic.* **1977**, *28*, 49–55.
 35. Tel, G.; Apaydın, M.; Duru, M.E.; Ozturk, M. Antioxidant and Cholinesterase Inhibition Activities of Three Tricholoma Species with Total Phenolic and Flavonoid Contents: The Edible Mushrooms from Anatolia. *Food Anal. Methods* **2012**, *5*, 495–504, <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9275-4>.
 36. Oyaizu, M. Studies on Products of Browning Reaction. Antioxidative Activities of Products of Browning Reaction Prepared from Glucosamine. *Japanese J. Nutr. Diet.* **2011**, *44*, 307–315, <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>.
 37. Blois, M.S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* **1958**, *181*, 1199–1200, <https://doi.org/10.1038/1811199a0>.
 38. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237, [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
 39. Nicolau, A.; Dias, N.; Mota, M.; Lima, N. Trends in the Use of Protozoa in the Assessment of Wastewater Treatment. *Res. Microbiol.* **2001**, *152*, 621–630, [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01241-4](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01241-4).
 40. Lizard, G.; Gueldry, S.; Deckert, V.; Gambert, P.; Lagrost, L. Evaluation of the Cytotoxic Effects of Some Oxysterols and of Cholesterol on Endothelial Cell Growth: Methodological Aspects. Volume 45, **1997**.
 41. Aebi, H. Catalase in Vitro. *Methods Enzymol.* **1984**, *105*, 121–126, [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3).
 42. Paoletti, F.; Aldinucci, D.; Mocali, A.; Caparrini, A. A Sensitive Spectrophotometric Method for the Determination of Superoxide Dismutase Activity in Tissue Extracts. *Anal. Biochem.* **1986**, *154*, 536–541, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90026-6).
 43. Sun, Y.; Oberley, L.; Li, V. A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase. *Clin. Chem.* **1988**, *34*, 497–500.
 44. Flohe, L.; Gunzler, W.A. Assays of Glutathione Peroxidase. *Methods Enzymol.* **1984**, *105*, 114–120, [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05015-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05015-1).
 45. Ellman, G.L. Tissue Sulfhydryl Groups. *Am. J. Anal. Chem.* **1959**, *82*, 70–77, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).
 46. Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal. Biochem.* **1979**, *95*, 351–358, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).
 47. Lowry, O.H.; Rosbrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275.
 48. Pinteus, S.; Silva, J.; Alves, C.; Horta, A.; Fino, N.; Rodrigues, A.I.; Mendes, S.; Pedrosa, R. Cytoprotective Effect of Seaweeds with High Antioxidant Activity from the Peniche Coast (Portugal). *Food Chem.* **2017**, *218*, 591–599, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.067>.
 49. Chernane, H.; Mansori, M.; Latique, S.; Kaoua, M.E. Evaluation of Antioxidant Capacity of Methanol Extract and Its Solvent Fractions Obtained from Four Moroccan Macro Algae Species. *Eur. Sci. J.* **2014**, *10*, 35–48.
 50. Zilberg, D.; Sinai, T. Optimization and Validation of a Colorimetric Assay for Tetrahymena Sp. Survival. *Res. Microbiol.* **2006**, *157*, 355–359, <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.09.012>.
 51. Gupta, K.K.; Mishra, A.; Tiwari, A. Production of Reactive Oxygen Species, Its Effect, Drugs and Plant Extract Used as an Antioxidant, Chelator on Thalassemic Patient: A Review. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2011**, *2*, 2278–2285, [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2\(9\).2278-85](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2(9).2278-85).

52. Marinova, E.M.; Yanishlieva, N.V. Antioxidative Activity of Extracts from Selected Species of the Family Lamiaceae in Sunflower Oil. *Food Chem.* **1997**, *58*, 245–248, [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00223-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00223-3).
53. Zhou, K.; Yu, L. Effects of Extraction Solvent on Wheat Bran Antioxidant Activity Estimation. *LWT - Food Sci. Technol.* **2004**, *37*, 717–721, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.02.008>.
54. Murugan, K.; Iyer, V.V. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Extracts of Selected Red and Brown Seaweeds from the Mandapam Coast of Tamil Nadu. *J. Food Biochem.* **2014**, *38*, 92–101, <https://doi.org/10.1111/jfbc.12029>.
55. Jimenez-Escrig, A.; Jimenez-Jimenez, I.; Raquel, P.; Saura-calixto, F. Antioxidant Activity of Fresh and Processed Edible Seaweeds. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, *81*, 530–534, <https://doi.org/10.1002/jsfa.842>.
56. O’Sullivan, A.M.; O’Callaghan, Y.C.; O’Grady, M.N.; Queguineur, B.; Hanniffy, D.; Troy, D.J.; Kerry, J.P.; O’Brien, N.M. In Vitro and Cellular Antioxidant Activities of Seaweed Extracts Prepared from Five Brown Seaweeds Harvested in Spring from the West Coast of Ireland. *Food Chem.* **2011**, *126*, 1064–1070, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.127>.
57. Hayes, M.; Tierney, M.S.; Soler-Vila, A.; Croft, A.K. Activity of the Brown Macroalgae *Fucus Spiralis* Linnaeus Harvested from the West Coast of Ireland Antioxidant. *Curr. Res. J. Biol. Sci.* **2013**.
58. Shanab, S.M.M.; Shalaby, E.A.; El-Fayoumy, E.A. *Enteromorpha Compressa* Exhibits Potent Antioxidant Activity. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, *2011*, 1–11, <https://doi.org/10.1155/2011/726405>.
59. Mole Megha, N.; Sabale Anjali, B. Antioxidant Potential of Seaweeds from Kunakeshwar along the West Coast Maharashtra. *Asian J. Biomed. Pharm. Sci.* **2013**, *3*, 45–50.
60. Yuan, Y.V.; Carrington, M.F.; Walsh, N.A. Extracts from Dulse (*Palmaria Palmata*) Are Effective Antioxidants and Inhibitors of Cell Proliferation in Vitro. *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43*, 1073–1081, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.02.012>.
61. Andrade, P.B.; Barbosa, M.; Matos, R.P.; Lopes, G.; Vinholes, J.; Mouga, T.; Valentão, P. Valuable Compounds in Macroalgae Extracts. *Food Chem.* **2013**, *138*, 1819–1828, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.081>.
62. Audibert, L.; Fauchon, M.; Blanc, N.; Hauchard, D.; Ar Gall, E. Phenolic Compounds in the Brown Seaweed *Ascophyllum Nodosum*: Distribution and Radical-Scavenging Activities. *Phytochem. Anal.* **2010**, *21*, 399–405, <https://doi.org/10.1002/pca.1210>.
63. Nanney, D.L.; Simon, E.M. Chapter-1 Laboratory and Evolutionary History of *Tetrahymena Thermophila*. In: *Methods in Cell Biology*. Volume 62, **1999**; pp 3–25, [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)61527-7](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)61527-7).
64. Rachida, C.; Khadija, M.; Fadila, A.; Abdelaziz, S. Protective and Antioxidant Potential of the Argan Oil on Induced Oxidative Stress in *Tetrahymena Pyriformis*. *J. Med. Plants Res.* **2013**, *7*, 1961–1968, <https://doi.org/10.5897/JMPR12.139>.
65. Errafiy, N.; Ammar, E.; Soukri, A. Protective Effect of Some Essential Oils against Oxidative and Nitrosative Stress on *Tetrahymena Thermophila* Growth. *J. Essent. Oil Res.* **2013**, *25*, 339–347, <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.775681>.
66. Mar, P.D.; Khalfi, B.El; Soukri, A.; Nandi, N.; Sen, A.; Banerjee, R.; Kumar, S.; Kumar, V.; Ghosh, A.N.; Das, P.; Lee, J.S.; Kim, Y.R.E.; Park, J.M.; Ha, S.; Kim, Y.R.E.; Baek, N.I.; Hong, E.K.; Cells, H.; Farmani, F.; Sabahi, Z.; Ramdani, M.M.; Elasri, O.; Saidi, N.; Elkhiaati, N.; Taybi, F.A.; Mostareh, M.; Zazaali, O.; Haloui, B.; Ramdani, M.M.; Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K.; Nozawa, Y.; Thompson, G.U.Y.A.; Niehus, L.; Henniges, U.; Horsky, M.; Prohaska, T.; Potthast, A.; Brückle, I.; Symons, M.C.R.; Rusakiewicz, S.; Rees, R.C.; Ahmad, S.I.; Robertson, R.; Guihéneuf, F.; Bahar, B.; Schmid, M.; Stengel, D.; Fitzgerald, G.; Ross, R.; Stanton, C. The Anti-Inflammatory Effect of Algae-Derived Lipid Extracts on Lipopolysaccharide (LPS)-Stimulated Human THP-1 Macrophages. *Mar. Drugs* **2018**, *13*, 5402–5424, <https://doi.org/10.3390/md13085402>.
67. Thomas, N.; Kim, S. Beneficial Effects of Marine Algal Compounds in Cosmeceuticals. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 146–164, <https://doi.org/10.3390/md11010146>.
68. Wang, T.; Jónsdóttir, R.; Liu, H.; Gu, L.; Kristinsson, H. G.; Raghavan, S.; Olafsdóttir, G. Antioxidant Capacities of Phlorotannins Extracted from the Brown Algae *Fucus Vesiculosus*. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 5874–5883, <https://doi.org/10.1021/jf3003653>.
69. Elbaz, A.; Wei, Y. Y.; Meng, Q.; Zheng, Q.; Yang, Z.M. Mercury-Induced Oxidative Stress and Impact on Antioxidant Enzymes in *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Ecotoxicology* **2010**, *19*, 1285–1293, <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0514-z>.
70. Boya, P.; Pefia, D.; Beloqui, O.; Larrea, E.; Civeira, M.; Prieto, J. Mononuclear Cells from Patients with Chronic Hepatitis C. *J. Hepatol.* **1999**, *31*, 808–814.
71. Pinteus, S.; Silva, J.; Alves, C.; Horta, A.; Thomas, O.; Pedrosa, R. Antioxidant and Cytoprotective Activities of *Fucus Spiralis* Seaweed on a Human Cell in Vitro Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, <https://doi.org/10.3390/ijms18020292>.
72. Sies, H. Hydrogen Peroxide as a Central Redox Signaling Molecule in Physiological Oxidative Stress: Oxidative Eustress. *Redox Biol.* **2017**, *11*, 613–619, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>.
73. Perkins, C.L.; Fang, G.; Kim, C.N.; Bhalla, K.N. The Role of Apaf-1, Caspase-9, and Bid Proteins in

- Etoposide- or Paclitaxel-Induced Mitochondrial Events during Apoptosis. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 1645–1653.
74. Goldstein, J.C.; Waterhouse, N.J.; Juin, P.; Evan, G.I.; Green, D.R. The Coordinate Release of Cytochrome : C: During Apoptosis Is Rapid, Complete and Kinetically Invariant. *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 156–162, <https://doi.org/10.1038/35004029>.
75. Krause, M.; Durner, D. Harpin Inactivates Mitochondria in Arabidopsis Suspension Cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2004**, *17*, 131–139, <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.2.131>.