

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

Université des Frères Mentouri Constantine1  
Faculté des Science de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Animale

N° d'ordre : 70/D3C/2018

N° de série : 06/BA/2018



Thèse de Doctorat  
Présenté pour obtenir le diplôme de Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle  
Domaine : Biotechnologie et Biologie de l'Environnement  
Option : Physio-Toxicologie Cellulaire

*Présentée et soutenue par :*

***MEZDOUR HICHEM***

**Intitulé :**

# **POTENTIEL ANTIOXYDANT DES ALGUES DES CÔTES DE L'EST ALGERIEN**

**Membres du jury :**

<b>Président :</b>	Pr. AMMEDAH. Souad.	Université des Frères Mentouri Constantine1
<b>Directeur :</b>	Pr. MENAD Ahmed.	Université des Frères Mentouri Constantine1
<b>Examineurs :</b>	Pr. DAHAMNA. Saliha	Université Abbas Ferhat Sétif 1.
	Pr. LALAOUI Korichi	Université Frères Mentouri Constantine1.
	Dr. ZOUAGHI Youcef	Université des Frères Mentouri Constantine1

**Année universitaire 2017/2018**

# Dédicaces

## *À Mes Très Chers Parents*

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

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

*J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondé en moi.*

*Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour.*

*Vous résumez si bien le mot parents qu'il serait superflu d'y ajouter quelque chose.*

*Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie pour que vous demeuriez le flambeau illuminant le chemin de vos enfants.*

## *À mes Grand Parents Paternels*

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

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

## *À la mémoire de mes Grands-Parents maternels*

*Le destin ne nous a pas laissé le temps pour jouir ce bonheur ensemble et de vous exprimer tout mon amour.*

*Puisse Dieu tout puissant vous accorder sa clémence, sa miséricorde et vous accueillir dans son saint paradis.*

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

*Je ne peux exprimer à travers ses lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous.*

*Puisse l'amour et la fraternité nous unissent à jamais.*

*Je vous souhaite la réussite dans votre vie, avec tout le bonheur qu'il faut pour vous combler.*

*Merci pour votre précieuse aide à la réalisation de ce travail.*

*A toute ma famille, mes enseignants et mes amis*

*A tonton Abdelkrim pour tous ses conseils et ses encouragements.*

*A Rayene Houamel pour son soutien, sa disponibilité et ses encouragements.*

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

*A Tous Mes enseignants tout au long de mes études.*

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

*Mezdour Hichem.*

## Remerciements

Premièrement, je remercie Allah, le bon Dieu, qui m'a donné l'ambitieux, le défi, la santé et le courage pour terminer cette thèse.

Deuxièmement, je tiens à présenter ma profonde gratitude et mes sincères remerciements au Professeur Menad Ahmed qui a accepté de m'encadrer et qui m'a fait bénéficier de son savoir et de ses conseils éclairés afin de perfectionner ce travail. Je le remercie pour sa disponibilité et son encouragement durant toute la période de la réalisation de cette thèse. Je remercie également Mme le Professeur Amedah Souad pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour ses conseils, son aide précieuse et pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse. Mes chers professeurs, vous avez fait de moi un chercheur accompli. Je vous suis reconnaissant, je ne saurais jamais vous remercier assez.

Je tiens à remercier Madame le Professeur Diaba Faiza pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire au département de pharmacie à l'université Barcelone. Je la remercie pour son intérêt à mon travail, pour ses conseils et l'encadrement de haut niveau qu'elle m'a offert. Qu'elle trouve ici mes sincères gratitude et remerciements. Sans oublier tous les membres de son équipe, spécialement mes collègues doctorants, Sergi, Miriam, Aina, Ferran, Arianna, Mar, Lorenzo, Caroline, Guilhem et Juan, merci pour tous les bons moments que nous avons passé ensemble, pour votre disponibilité et pour avoir contribué à la réussite de mon stage.

Je tiens à remercier également les membres du Jury Mme le Professeur Dahamna, Mr le professeur Lalaoui et Mr le Dr Zouaghi, qui m'ont honoré d'avoir accepté de juger ma thèse.

Mes remerciements sont aussi dirigés à tous mes enseignants, depuis le primaire, qui ont contribué et influencé dans l'élaboration de ma formation. Je remercie aussi les membres des équipes scientifiques du laboratoire de Biologie et environnement et du laboratoire de microbiologie. Je tiens spécialement à remercier mes collègues de

laboratoire et amis dans la vie, Wissem, Zenouba, Mounia, Meriem G, Meriem K, Fateh, Sara, Yamouna, Zayneb, Karima B. Merci Pour votre soutien et votre contribution. Je remercie aussi tous les gens qui font partie du personnel du laboratoire pour leur disponibilité.

Je remercie également toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

## Résumé

Le nombre d'études des extraits des algues marines issues de l'espèce algérienne *Ulva lactuca* reste très petit. Cette étude vise à examiner le potentiel biologique des fractions polysaccharides, polyphénols et lectines extraite de l'espèce *U. lactuca* collectée de l'Est algérien (Jijel). Ces fractions sont évaluées en testant l'activité antioxydante *in vitro*, l'activité anti-inflammatoire induite par la carragénine ainsi que l'effet immuno-modulateur *in vivo* via l'évaluation de l'index de la phagocytose. Les métabolites d'*U. lactuca* sont aussi étudiés pour leur pouvoir à inhiber la synthèse de TNF- $\alpha$  et la libération du NO chez les macrophages RAW 264.7 stimulés par LPS. L'effet gastro-protecteur de la phase polysaccharides vis-à-vis les lésions inflammatoires et ulcéraires de la muqueuse gastrique a été estimées par le modèle animale des altérations gastriques induite par une administration intra-gastrique de l'éthanol absolu. Toutes ces études sont supporté par une examinations microscopiques et macroscopiques minutieuses. Les résultats montrent que les phases poly phénoliques (MeOH et EtOAc ) d'*U. lactuca* ont prouvé un potentiel antioxydant *in vitro*. Les phases polysaccharides et lectines ont manifesté un effet anti-œdème si significatif. La diminution de l'activité MPO et des taux du MDA au niveau des tissus inflammatoire des pattes des rats était significative dans les cas de la phase polysaccharides en comparaison à celle des lectines. Les deux phases ont augmenté l'activité phagocytaire des macrophages *in vivo*, seulement cette augmentation était plus prononcée chez les groupes traités par la phase lectines. les deux phases ont exercé un effet protecteur contre l'inflammation provoquée par les LPS chez les cellules RAW264 et ont régulé la production du NO par les macrophages, la libération TNF- $\alpha$ ; ces effets sont plus évidentes dans les cas de la phase polysaccharides. Le prétraitement des souris par l'extrait des polysaccharides préserve les biomarqueurs de la muqueuse gastrique altérée et compense le déficit des mécanismes de défense antioxydant, GSH, CAT, SOD et GST et élimine la peroxydation lipidique. L'étude histologique a également confirmé une restauration importante de l'architecture de la muqueuse gastrique. Ainsi, l'*U. lactuca* algérienne est comme dotée d'un potentiel antioxydant, anti- inflammatoire et gastro-protecteur ; ces propriétés pourraient être due aux effets synergique de ses constituant comprenant en particulier les lectines et les polysaccharides.

**Mots clé :** *U. lactuca*, polysaccharides, lectines, anti-inflammatoire, immune-modulateur antioxydant,

## ABSTRACT

The number of studies of marine algae extracts from the Algerian species *Ulva lactuca* is so little. This study aims to examine the biological potential of polyphenoles, polysaccharide and lectins fractions of the species *U. lactuca* collected from eastern Algeria (Jijel). The polyphenoles fractions was evaluated by testing the antioxidant activity *in vitro*, the carrageenin-induced anti-inflammatory activity in the *Albino wistar* rat, and the immunomodulatory effect *in vivo* by assessing the index of phagocytosis. *U. lactuca* metabolites (polysaccharide and lectins) are also investigated for their ability to inhibit TNF- $\alpha$  synthesis and NO release in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. The gastro-protective effect of the polysaccharide phase on inflammatory and ulcerative lesions of the gastric mucosa was estimated by the animal model of gastric alterations induced by intra-gastric administration of the gastric mucosa of absolute ethanol. All of these studies was supported by minute microscopic and macroscopic examinations. The results show that the polyphenol phase has proved an antioxidant potential *in vitro*. The polysaccharide and lectin phases showed a significant antiedema effect. Decreases in MPO activity and MDA levels in inflammatory rat foot tissues were significant in the case polysaccharide phase compared to lectins. Both phases increased the phagocytic activity of macrophages *in vivo*, although this increase was more pronounced in groups treated with the lectin phase. Both phases exerted a protective effect against LPS-induced inflammation in RAW264 cells and revealed a significant dependent dose down regulating the production of NO by macrophages, TNF- $\alpha$  release; these effects were more obvious in the case of the polysaccharide phase. The results of this study showed that Algerian *U. lactuca* has an important immunomodulatory activity due specifically to the lectin fraction and an anti-inflammatory effect due specifically to the polysaccharide fraction. The pre-treatment of mice with polysaccharide extract preserves biomarkers of altered gastric mucosa and compensate the deficiency of antioxidant defense mechanisms, GSH, CAT, SOD and GST, and eliminates lipid peroxidation. The histological study similarly confirmed an important restoration of the architecture of the gastric mucosa. Thus, the Algerian *U. lactuca* is endowed with an antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotective potential, these properties could be due to the synergistic effects of its constituents including specifically lectins and polysaccharides

**Key words :** *U. lactuca*, polysaccharides, lectins, anti-inflammatory, immuno-modulatory antioxidant.

## المخلص

إن عدد الدراسات الخاصة بمستخلصات الطحالب البحرية من الأنواع الجزائرية *Ulva lactuca* قليل جدا. تهدف هذه الدراسة إلى دراسة الإمكانيات الحيوية لمتعدد البوليفينول، متعدد السكريات، واللكتينات من أنواع *U. lactuca* التي تم جمعها من شرق الجزائر (جيجل). يتم تقييم هذه المستخلصات من خلال اختبار النشاط المضاد للأكسدة في المختبر، والنشاط المضاد للالتهابات الناجم عن الكاراجينين وكذلك التأثير المناعي في الجسم الحي من خلال تقييم مؤشر البلعمة. كما تم أيضا استقصاء قدرتها على تثبيط تخليق TNF- $\alpha$  وعدم إطلاق NO في خلايا RAW 7.264 المحفزة بـ LPS. تم تقدير التأثير الوقائي لمستخلص عديد السكاريد على الجروح الالتهابية والتقرحية في الغشاء المخاطي للمعدة من خلال النموذج الحيواني للتغيرات المعوية الناجمة عن استخدام داخل المعدة. للإيثانول المطلق. وتم دعم جميع هذه الدراسات من خلال الفحوص الدقيقة المجهرية والماهرية. وأظهرت النتائج أن مستخلص البوليفينول من *U. lacuta* يمتلك قدرة مضادة للأكسدة *in vitro*. وأظهرت مستخلصات عديد السكاريد واللكتين تأثير كبير ضد التورمات القديمة. كما بينت الدراسة ان نسبة انخفاض مستويات MPO و MDA بالانسجة الملتهبة كانت اكبر عند استعمال مستخلص عديد السكاريد بالمقارنة مع مستخلص اللكتينات. عكس الدراسة الخاصة بالمؤشر البلعومي، حيث كانت نتائج مستخلص اللكتينات أحسن من مستخلص عديد السكريات. أيضا، كلا المستخلصين مارسا تأثيرا وقائيا ضد الالتهاب الناجم عن LPS في خلايا RAW264 وتمكنا من تنظيم إنتاج الخلايا البالعة للـ NO، وإطلاق TNF- $\alpha$ ؛ هذه الآثار كانت أكثر وضوحا عند استعمال مستخلص عديد السكريات. إن المعالجة المسبقة للفئران بمستخلص عديد السكاريد حافظت على العلامات الحيوية للغشاء المخاطي المعدي وعوضت نقص آليات الدفاع المضادة للأكسدة GSH، CAT، SOD، و GST وتمكنت من إزالة بيروكسيد الدهون. وأكدت الدراسة النسيجية أيضا عن استعادة الغشاء المخاطي للمعدة لقدراته. وبالتالي، فإن الطحلب الجزائري *U. lactuca* له قدرة مضادة للأكسدة، مضادة للالتهابات وقدرة على حماية الغشاء الداخلي للمعدة، قد تكون هذه الخصائص بسبب الآثار التآزرية لمكوناته وعلى وجه التحديد اللكتينات وعديد السكريات.

**الكلمات الدالة :** أولفا لاكتوكا، عديد السكاريد، اللكتينات، عديد الفينول، مضاد الأكسدة، مضاد الالتهاب

# TABLE DES MATIERES

Dédicace et remerciements

Résumés

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

**Premier chapitre** : introduction

Introduction.....1

**Deuxième chapitre** : Revue bibliographique

1. Les Algues.....	4
1.1. Généralités sur les algues .....	4
1.2. Classification des algues.....	4
1.2.1. Les algues vertes (Chlorophycées).....	6
1.2.2. Les algues brunes (Phéophycées).....	6
1.2.3. Les algues rouges (Rhodophycées).....	6
1.3. Reproduction des algues.....	6
1.4. Champs d'application des algues.....	7
1.4.1. Alimentation humaine.....	7
1.4.2. Santé.....	8
1.4.3. Energie.....	9
1.4.4. Environnement.....	9
2. Les phytoconstituents des algues .....	9
2.1. Les composés phénoliques.....	9
2.1.1 Généralités, structures et classification.....	10
2.1.1.1 Les acides phénoliques.....	12
2.1.1.2 Les stilbénes.....	12
2.1.1.3 Les flavonoids.....	12
2.1.1.4 Les liganes.....	13
2.1.2 Applications industrielles des polyphénols .....	13
2.2 Les polysaccharides.....	13
2.2.1 généralités sur les polysaccharides.....	14
2.2.2. les différents types de polysaccharides chez les algues.....	15

2.3	Les lectines.....	16
2.3.1	Spécificité des lectines.....	16
2.3.2	Classification des lectines.....	19
2.3.2.1	Lectines de plantes .....	19
2.3.2.2	Lectines des microorganismes.....	19
2.3.2.3	Lectines bactériennes.....	21
2.3.2.4	Lectines des champignons.....	21
2.3.2.5	Lectines des algues marines.....	22
2.3.3	Propriétés biologiques des lectines.....	21
3	Radicaux libres et stress oxydatif.....	22
3.1	Les espèces réactives de l'oxygène(ERO) .....	23
3.2	Les espèces réactives azotées (ERN).....	27
3.3	La production de radicaux libres.....	28
3.3.1	la production intracellulaire.....	28
3.3.2	la production extracellulaire.....	30
3.4	Mécanismes d'action des ROS et le stress oxydant ou oxydatif.....	30
3.5	Le pouvoir antioxydant.....	31
3.5.1	protections cellulaires.....	31
3.5.1.1	Systèmes antioxydants enzymatiques endogènes.....	32
3.5.1.2	Systèmes antioxydants non-enzymatiques.....	33
4	Ulcère péptique et stress oxydatif.....	37
4.1	Epidemiologie et etiologie.....	37
4.2	Physiologie des ulcères.....	38
4.3	Modèles d'études des ulcères gastriques.....	39
4.3.1	Modèle de l'ulcère gastrique induit par l'éthanol .....	40
4.4	Thérapie et phytothérapie.....	42

### Troisième chapitre : Matériels et méthodes

1.	Etude phytochimique de l'algue <i>Ulva lactuca</i> .....	44
1.1.	l'algue <i>Ulva lactuca</i> .....	44
1.2.	récolte de l'algue <i>Ulva lactuca</i> .....	45
1.3.	préparation des extraits algologiques.....	45
1.3.1	criblage phytochimique préliminaire.....	45
1.3.2	Dosage des phénols totaux.....	45
1.3.3	Dosage des flavonoïdes totaux.....	46
1.4	Extraction des polysaccharides.....	46

1.4.1	dosage des oses totaux.....	48
1.4.2	dosage des protéines.....	48
1.5	Extraction des lectines de l'algue <i>Ulva lactuca</i> .....	49
1.5.1	Test d'hémagglutination.....	51
2.	Evaluation de l'activité antioxydante de l'algue <i>Ulva lactuca</i> .....	51
2.1	Evaluation de l'activité antioxydante in vitro.....	51
2.1.1	Effet anti-radicalaire par le test au DPPH°.....	51
2.1.2	Le test du pouvoir réducteur.....	53
2.1.3	Inhibition de la peroxydation lipidique (LPO induite par le système Fe <sup>2+</sup> /acide ascorbique).....	54
2.1.4	Effet scavenger NO <sup>·</sup> .....	54
2.2	Etude de l'activité antioxydante in vivo.....	55
2.2.1	Etude de l'activité anti-ulcéreuse in vivo.....	55
2.2.1.1	Evaluation des marqueurs du stress oxydant.....	57
3	Etude de l'activité anti-inflammatoire in vivo .....	61
3.1	Etude in vivo .....	61
3.1.1	Dosages biochimiques.....	62
3.1.1.1	Dosage du malondialdéhyde (MDA) .....	63
3.1.1.2	Mesure de l'activité de myéloperoxydase (MPO).....	63
3.1.2	Étude histologique.....	64
3.2	Etude de l'activité anti-inflammatoire in vitro.....	64
3.2.1	Test de Viabilité cellulaire.....	64
3.2.2	Détermination des médiateurs de l'inflammation.....	64
3.2.2.1	Détermination des niveaux de TNF- $\alpha$ .....	65
3.2.2.2	Détermination des niveaux d'oxyde nitrique (NO).....	65
4	Test d'activité immunomodulatrice in vivo .....	65
3.3	Animaux.....	66
3.4	Indice phagocytaire.....	66

#### **Quatrième chapitre : Résultats et discussion**

1.	Etude phytochimique .....	68
1.1	Criblage phytochimique préliminaire.....	68
1.2	Dosage des polyphénols et des flavonoïdes.....	68
1.3	Rendement des extraits bruts de polysaccharides.....	69
1.4	Extraction des lectines.....	69

2.	Propriétés antioxydantes des extraits MeOH et EtOAc d'U. lacuta.....	72
2.1	L'effet scavenger du DPPH°.....	72
2.2	Le pouvoir réducteur.....	73
2.3	L'effet antiperoxydative.....	74
2.4	Activité scavenger du NO°.....	75
2.5	Discussion.....	75
3.	Propriétés antioxydantes in vivo.....	78
3.2	Activité gastroprotectrice (Modèle éthanol).....	78
3.1.1	Indices d'ulcère.....	78
3.1.2	Effets de l'extrait ULPF sur les paramètres du stress oxydatifs gastriques.....	78
3.1.2.1	Effets de l'extrait ULPF sur l'MDA le taux du GSH.....	78
3.1.2.2	Effet sur le taux de CAT, GST ET SOD.....	79
3.1.3	Etude macroscopique et microscopique.....	80
3.1.3.1	Etude macroscopique.....	80
3.1.3.2	Etude microscopique .....	82
3.1.4	Discussion.....	83
4.	Etude de l'activité anti-inflammatoire in vivo.....	87
4.1	Modèle d'inflammation aiguë : œdème induit par la carragénine.....	87
4.1.1	Taux du MDA et du MPO dans l'œdème des pattes.....	87
4.1.2	Etude histopathologique.....	88
4.2	Activité Immunomodulatrice.....	90
4.2.1	Test de la clairance du carbone.....	90
5.	Activité anti-inflammatoire invitro (modèle LPS-RAW 264.7).....	90
5.1	La viabilité cellulaire.....	90
5.2	L'effet ULPF et ULLF sur les taux deTNF-α et NO des cellules LPS-RAW 264.7.....	91
5.3	Discussion.....	93

## **Cinquième chapitre : Conclusion**

Conclusion générale.....	98
--------------------------	----

<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>100</b>
--	------------

## Liste des abréviations :

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AG</b>	Acides gras
<b>AIF</b>	Apoptosis inducing factor
<b>AINS</b>	Anti-inflammatoire non-steroidien
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CDNB</b>	1-chloro-2,4 dinitrobenzene
<b>COX</b>	Cyclo-oxygénase
<b>CYP450</b>	Cytochrome P 450
<b>Cyt</b>	Cytochrome
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>DPPH</b>	2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle
<b>DTNB</b>	Acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque
<b>EDTA</b>	Ethylenediamine tetra acetic acid
<b>ERO</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>GR</b>	Glutathion réductase
<b>GSH</b>	Glutathion réduit
<b>GPx</b>	Glutathion peroxydase
<b>GSSG</b>	Glutathion disulfure oxydé
<b>H2O2</b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>I %</b>	Pourcentage d'inhibition
<b>IC50 %</b>	Concentration inhibitrice de 50 %
<b>ICE</b>	Interleukine converting enzyme
<b>IL</b>	Interleukine
<b>LC-MS</b>	Liquid chromatography-Mass spectrum
<b>LPS</b>	Lipo-polysaccharide
<b>MDA</b>	Malonyldialdéhyde

<b>MeOH</b>	Méthanol
<b>Mn-SOD</b>	Superoxyde dismutase mitochondrial
<b>MPO</b>	Myéloperoxydase
<b>MS</b>	Spectrométrie de mass
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé
<b>NADH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
<b>NO<sup>-</sup></b>	Oxyde nitrique (monoxyde d'azote)
<b>NOS</b>	NO synthase
<b>O<sup>-</sup> 2</b>	Radical anion superoxyde
<b>OH<sup>°</sup></b>	Radical anion hydroxyde
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxynitrite
<b>PGE2</b>	Prostaglandines E2
<b>PMNs</b>	polynucléaires neutrophiles
<b>ULPF</b>	extrait de polysaccharides <i>Ulva lactuca</i>
<b>ULLF</b>	extrait de lectines <i>Ulva lactuca</i>
<b>PUFA</b>	Acides gras polyinsaturés
<b>RE</b>	Réticulum endoplasmique
<b>SD</b>	Standard deviation
<b>SEM</b>	Standard error of the mean
<b>SOD</b>	Superoxyde dismutase
<b>TBA</b>	Thiobarbituric acid
<b>TBARS</b>	Thiobarbituric acid-reactive substances
<b>TCA</b>	Acide trichloroacétique
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor
<b>Vit E</b>	Vitamine E

## Liste des figures

Numéro	Désignation	Page
Figure. 1	Schema d'un thalle (Guimard F., 2004).	5
Figure. 2	Cyanobactérie <i>Chroococcus</i> au Microscope optique x 1000 (Didier P., 2008).	6
Figure. 3	Mode reproductif chez les algues (Herron.D., 2013).	7
Figure. 4	Différents types de liaisons rencontrées chez les polysaccharides	15
Figure. 5	Schéma de la paroi cellulaire d'une algue (brune) (Deniaud-Bouët <i>et al.</i> , 2014).	17
Figure. 6	Illustration de la liaison lectin-sucre à la surface membranaire des cellules (Rocca et Shah., 2008).	19
Figure. 7	Rôle de glycoconjugués situés sur la surface cellulaire. Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides (Lis et Sharon., 1986).	24
Figure. 8	Schématisation de la molécule biradical libre d'oxygène	25
Figure. 9	Réactions de base intervenant lors de la synthèse des EOR et des EAR (Favier A., 2003).	26
Figure. 10	Production mitochondriale de radicaux libres (Laura B <i>et al.</i> 2000).	28
Figure. 11	La cytochrome oxydase de la chaine respiratoire.	29
Figure. 12	Schématisation des molécules intervenant dans les protections cellulaires (Ananya M.,2012).	33
Figure. 13	Differentes structures chimiques de l'acid ascorbique lors de sa réaction avec les radicaux libres (Nimse and Pal., 2015)	34
Figure. 14	Structure chimique des tocophérol et des tocotriénol (Qureshi <i>et al.</i> , 2011).	35
Figure. 15	Exemple du $\beta$ carotène	35
Figure. 16	Structure chimique de la 2- phénylbenzopyrane	36
Figure. 17	Balance entre les facteurs protecteurs et agressifs. (Copyright Johns Hopkins Hospital ;2014).	38
Figure. 18	Mécanismes de défense gastrique (McGraw, 2009).	39
Figure. 19	Voies générales de l'ulcère gastrique induit par l'éthanol	41
Figure. 20	<i>Ulva lactuca</i>	41
Figure. 21	Protocole d'extraction des polysaccharides.	47
Figure. 22	Colonne d'extraction Sephadex G-200.	50
Figure. 23	Principe de la technique du radicale DPPH	52

Figure. 24	Réaction illustrant le pouvoir réducteur	53
Figure. 25	Réaction de Conjugaison CDMB-GSH par la GST	60
Figure. 26	Test d'hémagglutination de l'extrait brut de <i>Ulva lactuca</i>	69
Figure. 27	Chromatogramme de la purification des lectines sur colonne gel filtration.	70
Figure. 28	Chromatogramme de la purification des lectines sur colonne gel filtration.	70
Figure. 29	Test d'hémagglutination des différentes fractions avec le sang de rat	71
Figure. 30	Activités scavenger du radical DPPH des fraction MeOH et At OAc d'U. <i>Lacuta</i> ;	72
Figure. 31	Le pouvoir réducteur des fraction MeOH et At OAc d'U. <i>Lacuta</i> ;	73
Figure. 32	le pouvoir antiperoxydative des fraction MeOH et At OAc d'U. <i>Lacuta</i>	74
Figure. 33	Activités scavenger du NO° des fraction MeOH et At OAc d'U. <i>Lacuta</i> ;	75
Figure. 34	Effet gastroprotecteur de ULPF contre le stress oxydatif (MDA.GSH)	79
Figure. 35	Effet gastroprotecteur de ULPF contre le stress oxydatif (GST, SOD, CAT).	79
Figure. 36	L'aspect macroscopique de l'estomac témoins chez les souris traités témoins et traités.	81
Figure. 37	Photomicrographie histopathologique de l'estomac.	83
Figure. 38	Réduction de l'œdème plantaire induit par la carragénine en présence des extraits ULPF et ULLF	87
Figure. 39	Taux du MDA et du MPO dans l'œdème des pattes en présence des extraits ULPF et ULLF	88
Figure. 40	monographes de l'œdème de la patte des rats induit par le carragénine après l'induction de l'inflammation.	89
Figure. 41	Activité immunomodulatrice (test de clairance carbone) des extraits de lectines et de polysaccharides U. <i>Lucuca</i> (ULPF et ULLF)	90
Figure. 42	Effet protecteur des extraits ULPF et ULLF sur la viabilité des macrophages RAW 264.7 mesurés par le test MTT	91
Figure. 43	Effet des extraits ULPF et ULLF sur la libération de NO dans le milieu par des macrophages RAW 264.7 activés par LPS	92
Figure. 44	Effet des extraits de lectines et de polysaccharides de <i>U. lactuca</i> (ULPF et ULLF) sur la libération de TNF-a dans le milieu par des macrophages RAW 264.7 activés par LPS.	92

## Liste des tableaux

<b>Numéro</b>	<b>Désignation</b>	<b>Page</b>
Tableau .1	formule générale des polyphénols (Macheix et al., 2005).	11
Tableau. 2	Résultats des tests préliminaires des compositions chimiques des extraits MeOH et EtOAc d'U. lacuta	68
Tableau 3	Teneur en polyphénols et flavonoïdes dans les extraits MeOH et EtOAc issus d'U. lacuta	68
Tableau 4	Rendement d'extraction et teneur en oses totaux et protéines totales.	69
Tableau 5	Résultats de la purification de l'extrait brut sur colonne séphadex G-200	71
Tableau 6	Effet de l'extrait ULPF sur l'ulcère gastrique induit par l'éthanol.	78

---

---

# Chapitre I :

# Introduction

---

---

## Introduction

L'investigation de principes naturels possédant des propriétés pharmacologiques contribue continuellement à la découverte des substances ayant des intérêts dans le domaine de l'application. Les algues marines, thallophytes se développant dans les eaux peu profondes, surtout dans les zones où les substrats appropriés sont disponibles, constituent d'importantes ressources renouvelables probatoires de divers composés structuraux bioactifs tels les polyphénols, les caroténoïdes les lectines et les polysaccharides. Au cours des siècles les métabolites secondaires d'origine algologique ont été employés dans les médecines traditionnelles vu leurs potentiels thérapeutiques. D'après la littérature, les algues comestibles contiennent des quantités significatives de protéines, de vitamines nécessaires à la nutrition humaine. Les algues disposent de certains composés soignants tels les antibiotiques, les laxatifs, les anticoagulants et les produits anti-ulcère. Plusieurs composés chimiques d'origine marine dotés d'activités biologiques ont été isolés et dont de nombreux font l'objet des études visant à la découverte de nouvelles substance d'intérêt pharmaceutiques (Chouikhi.,2013). Les algues marines sont éternellement exposées aux pressions biotiques et abiotiques qui influençant la physiologie de l'organisme, ce qui mène par la suite à l'élaboration de métabolites secondaires bénéfiques dont plusieurs sont d'ordre constitutif ou existent sous formes biologiquement actives chez les individus sains. Seulement, malgré le nombres des composés bioactifs existants, il y a toujours une exigence perpétuelle à découvrir des composés thérapeutiques originaux vu la survenue de plusieurs nouvelles maladies d'ordre physiopathologique. Des recherches récentes ont mis en évidences des preuves indiquant que les polysaccharides issues des algues marines pourraient jouer un rôle important dans la prévention contre les dommages induits par le stress oxydant (Cynthia 2011). Selon des ressources bibliographiques, les fractions des polysaccharides sulfatés dérivées des espèces appartenant aux algues rouges (les Rhodophycées) ont montré un effet antiinflammatoire induit par l'éthanol chez les souris via le processus NO/KATP (Samara *et al.*,2013). Les polysaccharides présents chez certaines espèces appartenant aux algues brunes (les Phéophycées) ont fait l'objet de plusieurs prospections vu la variabilité de leurs intérêts bioactifs. Certains polysaccharides sulfatés isolés de ces espèces ont prouvé des activités anticoagulantes, antiinflammatoires et anticancéreuses Gross *et al.*, 2006). D'une manière générale, la bio-activité des polysaccharides sulfatés relève de leur variabilité structurale

notamment le degré de sulfatation de leurs molécules.

Les informations biochimiques et structurales sur les lectines d'algues sont rares et ne sont que de quelques espèces et, par conséquent, la classification fonctionnelle et phylogénétique de ces lectines reste incertaine.. Les lectines expriment diverses activités biologiques telles que l'activation de la voie alterne du complément et l'agrégation des immunoglobulines (Nachbar *et al.* 1980), les effets pro et antiinflammatoires (Assreury 1997) et l'induction de l'apoptose.

Les polyphénols représentent un groupe de composés qui s'élaborent naturellement en tant que métabolites secondaires chez le règne végétal. De nombreuses algues marines renferment des polyphénols algaux, connus sous le nom phlorotanins. Ce groupe comprend une hétérogénéité structurale lui fournissant une variabilité immense d'activités biologiques. Ces polyphénols manifestent diverses actions bénéfiques à la santé humaine : antiinflammatoires, antiprolifératives, inhibition du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> médiée par des dommages d'ADN. Parmi ce groupe, plusieurs principes actifs protègent contre les dommages oxydatifs et la mort cellulaire via divers mécanismes tels l'effet scavenger des radicaux oxygénés, l'inhibition de la peroxydation lipidique et l'effet chélateur des ions métalliques (Suzuki *et al.*, 1987).

L'*Ulva lactuca* a fait l'objet de plusieurs recherches, seulement en Algérie l'étude de cette espèce reste très restreinte. L'originalité de cette investigation consiste dans l'étude *in vivo* de cette espèce localisée dans les côtes de Algérie. Dans ce sens, la présente investigation s'engage à explorer le potentiel biologique des polyphénols, des lectines et des polysaccharides issues d'une espèce appartenant au groupe des algues vertes (les Chlorophycées), à savoir *Ulva lactuca* collectée de la région de Jijel (l'Est de l'Algérie).

La méthodologie adoptée durant ce travail a compris les étapes suivantes :

- ✓ Collection et authentification taxonomique de l'espèce algologique *U. lactuca* de la à la zone sélectionnée.
- ✓ Extraction et des polyphénols, des lectines et des polysaccharides via des protocoles préconisés donnant un rendement adéquat.
- ✓ Screening phytochimique pour les polyphénols, criblage phytochimique préliminaire et analyse qualitative et quantitative . études de l'effet antioxydant *in vitro*
- ✓ Réalisation des études de l'effet antioxydant *in vivo* des polysaccharides.(model

---

gastrite)

- ✓ Etude de l'effet antiinflammatoire des polysaccharides et des lectines *in vivo* (carragenin), *in vitro* (RAW 264.7,LPS).

---

---

Chapitre II :

Revue bibliographique

---

---

# 1. LES ALGUES

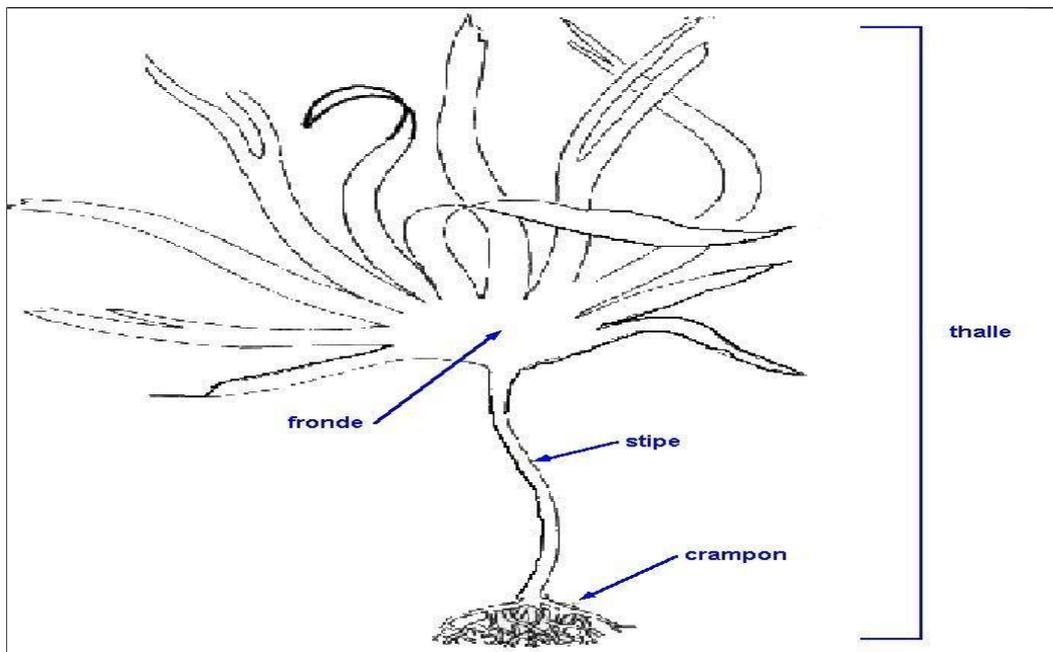
## 1.1. Généralités sur les algues

On définit en tant qu'«algue» un végétal autotrophe chlorophyllien dont l'appareil végétatif, appelé thalle, ne possède aucun organe spécifique (racine, tige, feuille), contrairement aux végétaux supérieurs (Barsanti et Gualtieri 2010). Les algues forment un groupe polyphylétique, c'est-à-dire que les espèces qui le composent n'ont pas d'ancêtre commun (Palmer *et al.*, 2004). Ce groupe peut être divisé en trois classes principales : les chlorophycées (algues vertes), les rhodophycées (algues rouges) et les phaeophyceae (algues brunes), auxquelles s'ajoute une classe d'organismes procaryotes unicellulaires à laquelle appartiennent les cyanobactéries (Kitayama *et al.*, 2000). Les algues se développent dans l'eau ou dans des milieux très humides. Bien que surtout abondantes dans les eaux des mers, des lacs, des mares, des eaux courantes et des eaux thermales, on en trouve également sur les rochers humides et sur la terre. Exceptionnellement, elles peuvent être endophytes de tissus animaux ou végétaux. L'air, la lumière et des sels dissous sont, en plus de l'eau, nécessaires à leur développement (Reviere B., 2002).

## 1.2. Classification des algues

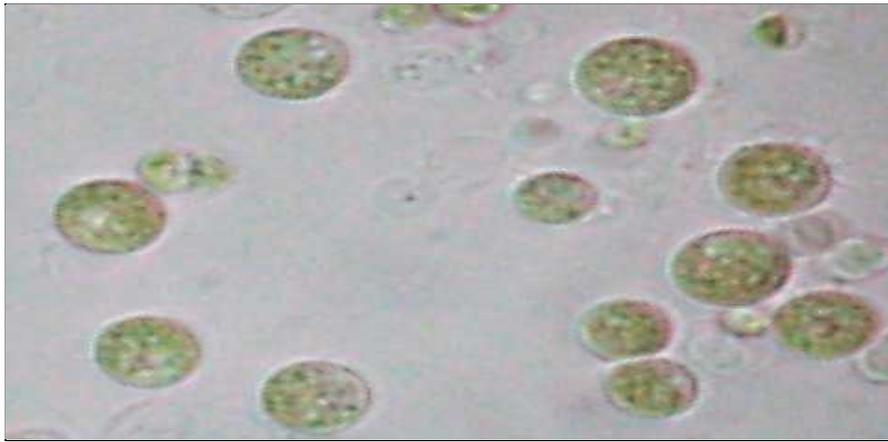
Leur appareil végétatif ou thalle est extrêmement variable, aussi bien en forme qu'en dimension. Il peut ainsi être formé d'une seule cellule allant de quelques dizaines de microns à une dizaine de centimètres ; il peut au contraire comporter de très nombreuses cellules et atteindre plusieurs dizaines de mètres de longueur. Les algues se distinguent donc des autres végétaux par leur thalle, appareil végétatif uni- ou pluricellulaire, dépourvu de racines, de tiges et de feuilles (Garon-Lardiere, 2010). Les cellules des algues possèdent les mêmes éléments de structure que celles des plantes supérieures. Elles ont une paroi cellulaire partiellement cellulosique, des petits noyaux et des plastes pigmentés ou chromatophores (comportant de la chlorophylle souvent masquée par des pigments surnuméraires qui donnent aux thalles des couleurs rouge, brune, verte ou bleue) (Ruiz., 2005).

Il faut préciser que ceci n'est qu'un aperçu destiné à clarifier les choses. Il faut ajouter encore que tous les auteurs ne sont pas d'accord entre eux et que des différences plus ou moins importantes apparaissent entre les ouvrages. Ce désordre n'est pas sans faire de tort à la botanique mais les choses changent incontestablement. Pour le moment c'est le code international de nomenclature botanique (2000) qui fait loi.



**Figure1:** Schéma d'un thalle (Guimard., 2004).

C'est ainsi qu'un des critères de classification des algues est leur pigmentation, qui permet de définir plusieurs grands groupes : les algues rouges (6 000 espèces), les algues brunes (2 000 espèces), les algues vertes (1 200 espèces) et les algues bleues (2 000 espèces). Ces dernières sont des organismes unicellulaires dépourvus de noyau différencié : il s'agit de procaryotes, également nommées cyanobactéries (Glicksman., 1987). Toutes les autres algues, uni- ou pluricellulaires, ont des cellules dont le noyau est différencié (noyau individualisé entouré d'une membrane), ce sont des eucaryotes.



**Figure 2 :** Cyanobactérie *Chroococcus* au Microscope optique x 1000 (Didier., 2008).

Sur la base de ces pigments et d'autres caractéristiques physiologiques et morphologiques, l'ensemble des algues a été classé (Garon-Lardiere., 2004) en :

### **1.2.1. Les algues vertes (Chlorophycées)**

Elles sont de formes très variées, uni- ou pluricellulaires. Leurs plastes sont colorés en vert par les chlorophylles a et b, auxquelles sont associés des carotènes et des xanthophylles. La photosynthèse permet la formation d'amidon, comme pour les plantes supérieures. La plupart des algues vertes vivent en eau douce ou en milieux marins, mais certaines espèces peuvent également se développer sur terre.

Elles jouent un rôle important dans l'oxygénation des eaux, favorisant ainsi la vie animale.

### **1.2.2 .Les algues brunes (Phéophycées)**

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). Toutes possèdent une structure pluricellulaire, mais leurs dimensions varient depuis les éléments microscopiques jusqu'aux très grands spécimens. La grande majorité des algues brunes sont marines.

### **1.2.3 .Les algues rouges (Rhodophycées)**

Les rhodophytes ou algues rouges forment un groupe très diversifié. Ces algues doivent leur couleur à la présence de plastes roses dans lesquels un pigment rouge, la

phycoérythrine, est associée à plusieurs autres pigments dont les chlorophylles. La plupart de ces algues rouges sont pluricellulaires et marines, mais il existe quelques formes unicellulaires et quelques-unes vivent également en eau douce. Les algues rouges sont divisées en deux groupes : celui des Bangiophycées (qualifiées de primitives) et celui des Floridéophycées (plus complexes). Elles se distinguent généralement par leur cycle de reproduction particulièrement complexe.

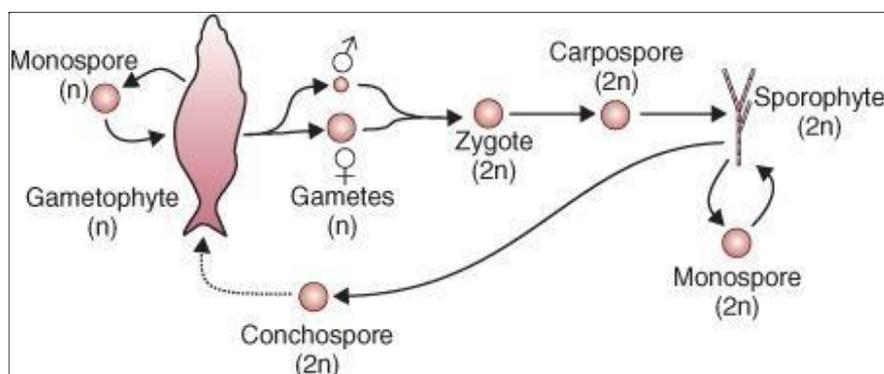
### 1.3 .Reproduction des algues

Dans de très nombreux cas, la reproduction des algues s'effectue par multiplication végétative. Il s'agit d'une multiplication asexuée qui consiste soit en la division d'une cellule isolée (cas des algues bleues), soit en une fragmentation de thalle aboutissant à la formation de plusieurs organismes identiques. Elle est souvent réalisée par la formation de cellules spécialisées : les spores.

Les algues eucaryotes réalisent en plus une reproduction sexuée au cours de laquelle l'union de deux cellules reproductrices, ou gamètes, produit un oeuf, ou zygote (Raven., 2005).

La reproduction des algues se déroule ainsi selon une alternance de phases de reproduction asexuée assurée par les thalles (sporophytes), et de phases de reproduction sexuée, assurée par des thalles producteurs de gamètes (gamétophytes).

Aux cycles d'alternance de génération plus ou moins variés caractérisant leur reproduction, se superpose également une alternance de phases (de  $n$  à  $2n$  chromosomes).



**Figure 3 :** Mode reproductif chez les algues (Herron., 2013).

## 1.4 .Les champs d'application des algues

Les algues marines ouvrent de nombreuses perspectives pour la recherche et pour de nombreux secteurs économiques, au nombre de cinq : l'alimentation, la santé, les biocarburants de seconde et surtout de troisième génération, l'environnement et l'industrie. A cela, il faut rajouter d'autres activités comme la cosmétique.

### 1.4.1 .Alimentation humaine

Beaucoup d'algues sont utilisées dans l'alimentation humaine telles quelles comme le cas des algues microscopiques : Spiruline, Diatomée et Chlorelle. Pour le cas de la Spiruline, citée à titre indicatif, en raison de sa valeur nutritionnelle très élevée, cette algue bleue est considérée comme l'une des seules sources de protéines non animales, avec le soja, à contenir tous les acides aminés essentiels, (Simpore *et al.*, 2006). D'autres types de macroalgues peuvent être intégrés dans certains ingrédients alimentaires, comme les pates.

Parmi les algues marines les plus valorisées, on trouve les algues rouges comme *Gelidium*, *Gracilaria* et *Gracilariopsis*, dites algues agarophytes sources de trois phycocolloïdes: l'agar, l'alginate et les carraghénanes qui sont des polysaccharides aux propriétés épaississantes et gélifiantes. Ces phycocolloïdes sont utilisés aussi bien dans le domaine agroalimentaire que dans le domaine médical et industriel. L'agar est considéré comme étant l'agent gélifiant naturel le plus puissant que l'on trouve actuellement. On estime que les algues rouges représentent un potentiel important de ressource pour la production d'agar (Mc Lachlan, 1985).

### 1.4.2 Santé

L'implication des algues dans la santé est énorme. 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, ainsi que des antioxydants puissants et des antiradicalaires (Marfaing et Lerat, 2007) ou encore des agents antinociceptifs (Viana *et al.*, 2002).

### 1.4.3. Energie

Par rapport à d'autres sources d'énergie, les végétaux possèdent la capacité de produire des carburants aux propriétés analogues à celui 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 (Ben Hankamer et al., 2007; Chisti, 2007). Actuellement, se développe une industrie de production de biocarburants, à partir de la lignocellulose, dis de seconde et surtout de troisième génération (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 : ainsi le rendement d'*Ulva lactuca* est de l'ordre de 12 tonnes de matière sèche/ha/an (Pérez *et al.*, 1992) contre un rendement de 0,9 t/ha/an pour le maïs (Bisault., 2008). De même, à noter que cette espèce d'algue possède l'avantage de ne consommer ni eau douce, ni engrais.

### 1.4.3. Environnement

Outre l'intérêt écologique considérable que jouent les microalgues 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).

## 2. Les constituants phytochimiques des algues

### 2.1. Les composés phénoliques

Les algues ont des fonctions biologiques et écologiques semblables à celles des plantes et, bien qu'elles appartiennent à des lignées évolutives distinctes, leurs réponses chimiques de défense ont également des similitudes, (Potin 2008). Les composés phénoliques ou polyphénoliques sont également des produits du métabolisme secondaire des algues et comprennent un groupe important et divers de composés chimiques, constitué d'un groupe hydroxyle (-OH) directement lié à un groupe hydrocarboné aromatique (Waterman & Mole 1994). "Phénol" est le terme pour une sous-structure avec un groupe hydroxyle phénolique, les types catéchol et résorcinol (benzènediols) en ont deux, et les types de pyrogallol et de chloroglucinol (benzènetriols).

#### 2.1.1. Généralités, structures et classification

Les composés phénoliques, ou polyphénols, constituent une famille de molécules organiques largement présentes dans le règne végétal. On les retrouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits, et ils font donc partie intégrante de notre alimentation. Ce sont des métabolites secondaires produits par les plantes pour interagir avec les autres végétaux et les animaux. Ils n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance ou la reproduction.

Le terme phénolique est utilisé pour définir des substances qui possèdent au moins un groupement hydroxyle (OH) substitué sur un cycle aromatique. Ce nom provient du composé parent le plus simple : le phénol.

Les polyphénols naturels peuvent donc être des molécules simples comme les acides phénoliques, mais aussi des composés hautement polymérisés comme les tanins. Plusieurs milliers de composés phénoliques ont été caractérisés jusqu'à ce jour dans le règne végétal. On compte, à l'heure actuelle, pas loin de 8000 composés. Ils ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (Tableau 8) (Bravo, 1998).

La large variété de polyphénols peut être divisée en une dizaine de classes dont la

structure chimique peut être répartie en deux grands groupes, les flavonoïdes et les autres. Les flavonoïdes, qui représentent la classe la plus abondante et la plus étudiée de cette classification, comptent plus de 4000 composés découverts à ce jour. Les composés de chaque sous-classe des flavonoïdes se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles ou autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et en position 3 sur l'hétérocycle central. C'est d'abord la structure de ce dernier et son degré d'oxydation qui permettent de distinguer les différentes classes de flavonoïdes.

Les autres possèdent une structure chimique plus simple comme les acides phénoliques et les stilbènes dont les dérivés sont parfois complexes, comme les oligomères de stilbènes, les gallotanins, et les ellagitanins (El Gharras, 2009).

Les acides phénoliques, les stilbènes, les flavonoïdes, les tanins et les lignanes sont majoritairement présents dans les feuilles, les fleurs et l'écorce de bois. Ces molécules jouent un rôle majeur au niveau de la croissance des végétaux et dans la lutte contre des agents pathogènes et des infections. La couleur des fruits, des fleurs et des feuilles est une des caractéristiques d'une sous-classe des flavonoïdes (El Gharras, 2009).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemple)
C <sub>6</sub>	Phénols simples	Catéchol	
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Acide hydroxybenzoïques	<i>p</i> -Hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Acide hydroxycinnamiques	Acides caféique, férulique	Pomme de terre, pomme
	Coumarines	Scopolétine, esculétine	Citrus
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoïdes		
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Flavonols</li> <li>• Anthocyanes</li> <li>• Flavanols</li> <li>• Flavanones</li> </ul>	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélargonidine Catéchine, épicatechine Naringénine	Fruits, légumes, fleurs Fleurs, fruits rouges Pomme, raisin Citrus
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Isoflavonoïdes	Daidzéine	Soja, pois
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C <sub>15</sub> ) <sub>n</sub>	Lignines		Bois, noyau des fruits
	Tannins		Raisin rouge, kaki

**Table 1** : formule générale des polyphénols (Macheix *et al.*, 2005).

### 2.1.1.1. Les acides phénoliques

On distingue deux classes appartenant à cette sous-famille. Les dérivés d'acide benzoïque et les dérivés d'acide cinnamique. Les acides hydroxybenzoïques sont à la base de structures complexes comme les tanins hydrolysables présents dans les mangues, et les fruits rouges comme les fraises, les framboises ou encore les mûres (Manach *et al.*, 2004). Les acides hydroxycinnamiques sont plus abondants que les acides hydroxybenzoïques. Ils sont principalement composés d'acide p-coumarique, caféique, férulique et sinapique (Annexe 6). L'acide caféique se combine avec l'acide quinine pour former l'acide chlorogénique, que l'on retrouve dans de très nombreux fruits et à forte concentration dans le café (El Gharras, 2009).

### 2.1.1.2. Les stilbènes

Ces composés sont en très petite quantité dans notre alimentation. Le plus connu d'entre eux est le resvératrol qui a été largement étudié pour ses propriétés anticancéreuses mises en évidence lors de l'étude des activités biologiques de plantes médicinales. (El Gharras, 2009).

### 2.1.1.3. Les flavonoïdes

- Les flavonols

Les flavonols sont les flavonoïdes les plus abondants dans l'alimentation. Les composés les plus représentatifs de cette famille sont le kaempferol et la quercétine (Annexe 6). Cette dernière est connue pour posséder un très fort pouvoir antioxydant en raison de sa structure chimique favorable au piégeage des radicaux libres. A des concentrations de l'ordre de 15 à 30 mg/kg de matière fraîche, on les rencontre dans l'oignon, les brocolis, les poireaux et les myrtilles. La glycosylation avec un glucose ou un rhamnose est très fréquente (Manach *et al.*, 2004).

- Les flavones

De tous les flavonoïdes, cette sous-classe est la moins abondante dans les fruits et légumes. Ils sont essentiellement constitués de lutéoline et apigénine glycosylés (Annexe 6). Les seules denrées comestibles connues à ce jour qui en possèdent sont le persil et le céleri (Manach *et al.*, 2004).

- Les flavonones

Dans l'alimentation, les flavanones se retrouvent dans les tomates, certaines plantes comme la menthe, et sont présents des quantités importantes dans le citron. Les principaux aglycones sont la naringénine dans le pamplemousse, l'hespéridine dans l'orange et l'ériodictyol dans le citron. La position 7 est le siège de la glycosylation (El Gharras, 2009).

- Les isoflavones

Les produits dérivés du soja sont la principale source d'isoflavones dans l'alimentation, qui peuvent être glycosylées ou non. On les rencontre aussi dans les légumineuses.

- Les flavanols

Les flavanols existent sous forme de monomères, dont l'unité la plus simple est la catéchine, et sous forme polymérique appelés les proanthocyanidines. La catéchine est présente dans de nombreux fruits comme la pomme, mais le chocolat et le thé sont les principales sources de ce composé (El Gharras, 2009).

- Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments naturels colorés que l'on retrouve dans les plantes vasculaires. Leur aptitude à se solubiliser facilement dans les milieux aqueux offre des possibilités très larges dans le domaine industriel. Ils sont responsables de la coloration (orange, rose, rouge, violet et bleue) de certaines fleurs (tulipe, rose, orchidée) et fruits (pomme, baies, raisin). Une caractéristique importante de ces composés réside dans leur aptitude antioxydante, et de nombreuses études sur leurs activités biologiques peuvent en témoigner (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009).

#### **2.1.1.4. Les lignanes**

Ils sont constitués de deux unités de phénylpropane. Bien qu'ils entrent dans la composition de certaines graines, céréales, fruits et autres légumes, ils sont environ 1000 fois plus concentrés dans les graines de lins (El Gharras, 2009).

### **2.1.3. Applications des polyphénols**

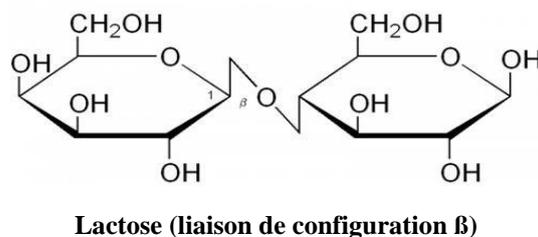
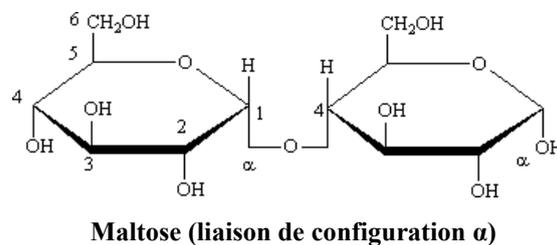
De telles propriétés ont donc été exploitées, et trouvent des applications dans de nombreux domaines industriels : en agroalimentaire, en cosmétique et dans l'industrie pharmaceutique. Grâce aux propriétés antimicrobiennes de certains polyphénols comme les flavan-3-ols, les flavanols et les tanins, il est désormais possible de développer des conservateurs alimentaires et de nouvelles thérapies dans de nombreuses maladies infectieuses en considérant la résistance microbienne face à certains traitements antibiotiques (Daglia, 2012). La capacité antioxydante de composés comme les polyphénols est utilisée dans l'alimentation pour lutter contre la peroxydation lipidique et ainsi permettre une meilleure stabilisation des denrées alimentaires. Ils sont également préconisés pour améliorer la stabilité de pigments de jus colorés (comme le jus de betterave), d'arômes alimentaires, et rentrent dans la composition de produits pharmaceutiques pour des utilisations par voie orale et des cosmétiques pour des applications locales (Moure et al., 2001). Enfin, l'effet de certains flavonoïdes en médecine humaine est de plus en plus étudié dans le traitement de certaines maladies, et particulièrement pour le contrôle du virus de l'immunodéficience, principal responsable du SIDA (Sartori-Thiel, 2003).

## 2.2 Les polysaccharides

### 2.2.1 .Généralités sur les polysaccharides

Polysaccharide, c'est le nom donné à une macromolécule se composant d'un grand nombre de résidus de monosaccharide, joints entre eux par des liaisons glycosidiques. Les polysaccharides composés uniquement d'un seul type de monosaccharide sont appelés homopolysaccharides (homoglycanes). De même, s'ils sont composés de deux monosaccharides différents ou plus, ils sont appelés hétéropolysaccharides (hétéroglycanes) (Robyt., 1998).

Ces polysaccharides peuvent être d'origine végétale, c'est le cas de l'amidon, de la cellulose, des pectines ou des gommes. Ils peuvent également être issus des algues comme les alginates, les carraghénanes, l'agar ou les fucanes, ou encore être d'origine animale (héparine, chondroïtine), ou microbienne (dextranes, xanthanes).



**Figure 4 :** Différents types de liaisons rencontrées chez les polysaccharides.

### 2.2.2 .Les différents types de polysaccharides chez algues

Les polysaccharides algaux forment une vaste famille au sein de laquelle on distingue :

- *Les polysaccharides de réserve (stockés à l'intérieur de la cellule)*

Chez les algues brunes, il s'agit de la laminarine (polymère du 1,3- $\beta$ -glucopyranose), chez les algues rouges, de l'amidon floridéen (polymère du 1,4- $\alpha$ -glucose), et chez les algues vertes, du glucane (polymère du 1,4- $\beta$ -glucose) (Percival.,1979)

- *Les polysaccharides de faible poids moléculaire*

Solubles dans le milieu, ils passent au travers de la membrane pour réguler la pression osmotique.

Chez les algues rouges, on distingue plusieurs espèces dont deux isomères : le floridoside et l'isofloridoside participant à la régulation osmotique.

Chez les algues brunes, plusieurs espèces sont également présentes. Est également présent un type particulier de saccharide sous forme de polyols, le D-mannitol, qui représente jusqu'à 25% du poids sec de l'algue.

Enfin, les algues vertes comportent des traces de monosaccharides tels que le fructose ou le saccharose. (Percival.,1979).

- *Les polysaccharides de structure*

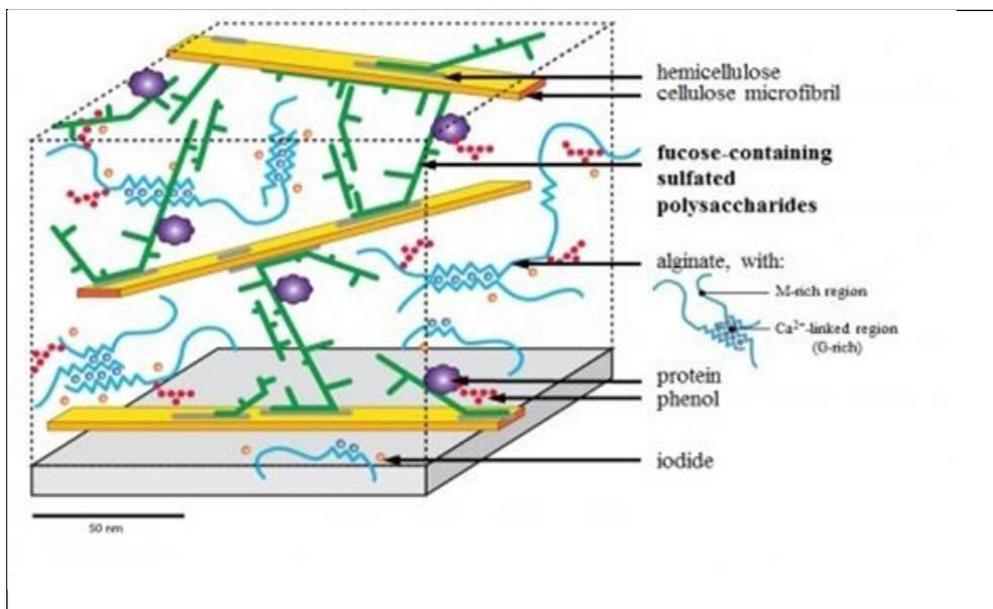
Ceux de la paroi sont appelés polysaccharides pariétaux, ils comprennent :

- une phase **squelettique**, uniquement de structure et constituée de polysaccharides insolubles (cellulose, mannanes, xylanes). (Percival.,1979).
- une phase **matricielle** contenant des polysaccharides de structure plus hydrosolubles noyés dans la matrice (ou zone amorphe), dans laquelle ont lieu les échanges cationiques.

Globalement, en dehors de la cellulose, les structures chimiques détaillées des polysaccharides insolubles demeurent un véritable défi à relever pour les chercheurs de par leurs complexités. Plus remarquable, la fraction des polysaccharides solubles représente de (51% à 56%) des polysaccharides totaux du côté des algues vertes et rouges et de (67 à 87%)

du côté des algues brunes, le type de ces polysaccharides solubles est disparate en fonction du groupe en question.

- Les polysaccharides solubles caractéristiques des algues vertes sont les ulvanes.
- Les polysaccharides solubles caractéristiques des algues brunes sont les alginates, les laminaranes et les fucanes.
- Les polysaccharides solubles caractéristiques des algues rouges sont les xylanes, les agars et les carraghénanes.



**Figure 5** : Schéma de la paroi cellulaire d'une algue (brune) (Deniaud-Bouët et al., 2014).

## 2.3. Les Lectines

- **Définition**

Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines d'origine virale, bactérienne, végétale ou animale, dépourvues d'activité enzymatique et non synthétisées par un système immunitaire. Elles sont capables de reconnaître spécifiquement des sucres simples ou des oligosaccharides plus complexes sans les modifier (Goldstein *et al.*, 1980). Appelées aussi agglutinines, de par leur capacité à agglutiner les cellules (comme les hémacies) et les glycoconjugués. Cette caractéristique importante des lectines est due au fait que ces protéines possèdent généralement au moins deux sites de reconnaissance par molécule, elles sont multivalentes, ce qui explique pourquoi elles arrivent à précipiter des polysaccharides, des glycoprotéines ou des glycolipides et induire l'agglutination de cellules diverses (Liener *et al.*, 1986).

Pour le moment, seules les lectines végétales sont utilisées pour caractériser ou fractionner des glycoconjugués d'origines diverses (Goldstein et Hayes, 1978 ; Sharon et Lis, 1989). Très souvent, ces lectines sont classées en fonction du monosaccharide capable d'inhiber la réaction d'agglutination induite par la lectine.

Les méthodes anciennement utilisées pour leur identification consistent à mélanger l'extrait à examiner avec des érythrocytes en solution. L'agglutination ou la précipitation des cellules indique que la solution analysée contient une ou parfois plusieurs molécules agglutinantes. L'abondance de ces molécules et leur relative facilité de purification leur ont permis d'être largement caractérisées et d'être utilisées dans différents domaines de la biologie.

### 2.3.1. Spécificité des lectines

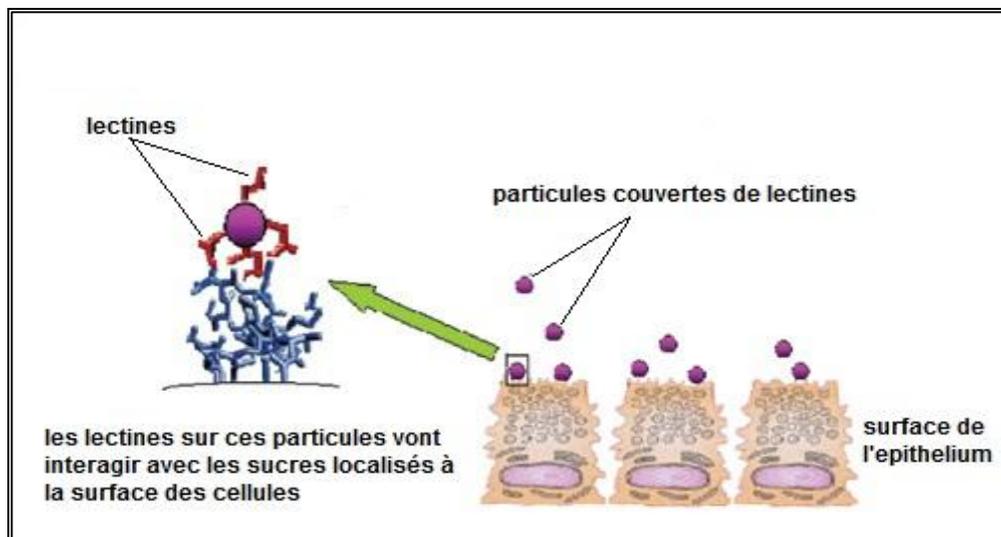
La plupart des lectines sont spécifiques pour un petit nombre de sucres et que, dans la majorité des cas, ces sucres sont présents dans et sur la surface des cellules, surtout sous la forme de glycoconjugués. On peut identifier deux classes de lectines par rapport à leur spécificité : celles qui reconnaissent un monosaccharide spécifique et celles qui reconnaissent exclusivement des oligosaccharides (Sharon., 2003).

Les protéines spécifiques pour des monosaccharides sont classifiées en cinq groupes, selon le sucre pour lequel la lectine présente la plus forte affinité : le Mannose (Man), le Galactose(Gal)/N-acetylgalactosamine (GalNAc), le N-acetylglucosamine (GlcNAc), le Fucose (Fuc), l'Acide sialique (acide N-acetylneuraminique, NeuAc) (Lis and Sharon 1998). Cette reconnaissance est souvent désignée comme « la spécificité primaire » des lectines. Ces monosaccharides et leurs dérivés sont

ceux qui sont le plus souvent présents sur les épitopes glycaniques des surfaces cellulaires. La plupart des lectines peuvent se lier à des monosaccharides, mais leur affinité sera en général plus forte pour certains oligosaccharides. (Dam and Brewer 2002).

Les similarités structurales entre monosaccharides sont déterminantes pour la spécificité des lectines. Par exemple, la plupart des lectines qui reconnaissent le Gal se lient aussi au GalNAc. Ce phénomène est dû à la présence dans ces monosaccharides des trois fonctions hydroxyles qui ont une topologie très similaire. Certaines lectines présentent une spécificité anomérique et peuvent distinguer la configuration en carbone (C 1) de monosaccharides tels que l' $\alpha$ - méthyle-galactoside et le  $\beta$  méthylegalactoside. La combinaison de plusieurs techniques expérimentales permet d'élucider la spécificité des lectines (Park, et coll. 2008). Par exemple, en utilisant les techniques de test ELLA (Enzyme Linked Lectin Assay) et de test « Glycans array » la spécificité d'une lectine peut être déterminée. Ces techniques sont simples, rapides et requièrent des quantités réduites de matériel.

La plupart des lectines sont des protéines multivalentes. Elles sont capables de se lier à plusieurs molécules de glucides. La multivalence peut provenir de la répétition de type « tandem » de domaine lectines dans un polypeptide, de l'association de plusieurs monomères ou de la présentation de plusieurs lectines sur une surface cellulaire. Les interactions multiples entre d'une part les lectines multivalentes et d'autre part les glycoconjugués, sont impliquées dans les processus de reconnaissance (Lee and Lee 1995).



**Figure 6 :** Illustration de la liaison lectin-sucre à la surface membranaire des cellules (Rocca et Shah., 2008).

### 2.3.2. Classification des lectines

Les lectines sont des protéines ubiquitaires, présentes dans tous les organismes vivants. Il existe une grande variété de lectines qui présentent une très grande diversité structurale. Le nombre de structures cristallographiques de lectines est toujours en croissance, et on connaît aujourd'hui la structure tridimensionnelle de plus de 0111 lectines. La banque de données concernant les lectines comprend ainsi plusieurs familles structurales différentes.

#### 2.3.2.1 . Les lectines des plantes

Selon la classification de Peumans et Van Damme (1995), quatre types majeurs de lectines sont présentes chez les plantes :

- **Les Mérolectines**

Les mérolectines sont de petits peptides, formés d'une seule chaîne polypeptidique et ne possédant qu'un seul domaine de liaison aux glucides (exemple : héveine, protéines d'Orchidées). Les mérolectines sont incapables de précipiter les glycoconjugués ou d'agglutiner les cellules.

- **Les Hololectines**

Les hololectines contiennent deux domaines (ou plus) de liaison aux glucides quasi identiques, ou du moins très homologues. Les hololectines peuvent précipiter les glycoconjugués ou agglutiner les cellules. La majorité des lectines de plantes connues sont des hololectines.

- **Les Chimérolectines**

Les chimérolectines possèdent un ou plusieurs domaines de liaison aux glucides ainsi qu'un domaine ayant une activité catalytique bien définie et agissant indépendamment du site de liaison. Selon le nombre de liaison aux glucides, les chimérolectines se conduisent comme des mérolectines (exemple : chitinase classe I) ou comme des hololectines (exemple : type 2-Rip Ribosom Inactivating Proteine : Protéine Inactivant les Ribosomes comme la ricine).

- **Les Superlectines**

Les superlectines sont un type particulier de chimérolectines, elles sont des protéines de fusion constituées de deux domaines de liaison à base de glucides en mosaïque qui sont structurellement différents et reconnaissent des sucres structurellement non reliés, actuellement, une seule superlectine a été décrite, provenant des graines de tulipes.

### **2.3.2.2. Les lectines des microorganismes**

Les microorganismes pathogènes, virus, bactéries, champignons ou parasites eucaryotes, utilisent fréquemment des lectines pour reconnaître les sucres présents sur la surface des cellules hôte. Ces interactions lectines-sucres jouent également un rôle dans l'adhésion sur les tissus richement glycosylés présents dans les voies respiratoires, digestives ou dans l'appareil urogénital (Nizet *et al.*, 2017).

### **2.3.2.3. Les lectines bactériennes**

Les lectines bactériennes sont généralement situées sur la surface de la bactérie ou localisées dans le cytosol et jouent des rôles importants dans la reconnaissance des glycoconjugués présents à la surface des cellules de l'hôte pendant la première étape du processus d'infection, ce qui a attiré bien évidemment beaucoup d'attention dans ces dernières années (Nizet *et al.*, 2017).

### **2.3.2.4. Les lectines de champignons**

Les champignons, y compris les moisissures et les champignons proprement dits, font partie d'une importante classe d'organismes. N'étant pas capable d'utiliser la photosynthèse comme les plantes ils doivent extraire du milieu toutes les substances nutritives dont ils se nourrissent et ont donc adopté des modes de vie saprophytes, parasites ou symbiotiques. Ces organismes, ont développé au cours des centaines de millions d'années d'évolution une impressionnante série de gènes et sont donc très riches en métabolites et en protéines qui leur confèrent à la fois des propriétés bénéfiques ou très toxiques. Parmi les protéines qui ont été purifiées à partir de champignons on peut trouver des protéines immunomodulatrices, antivirales, antiprolifératives et antimitotiques (Abol Hassan *et al.*, 2015).

### **2.3.2.5. Les lectines des algues marines**

À ce jour, il y a moins de 100 publications décrivant la présence de lectines dans les macroalgues rouges, vertes et marron. De plus, comparées aux plantes terrestres supérieures, les lectines d'algues marines ont été isolées et caractérisées à un rythme beaucoup plus faible depuis le premier rapport d'activité hémagglutinante dans ces organismes apparu il y a plus de 50 ans (Boyd *et al.*, 1966). Par la suite, d'autres études décrivant la présence et / ou la purification des lectines d'algues ont été signalées par des groupes d'Angleterre (Blunden *et al.*, 1975), du Japon (Kamiya *et al.*, 1982), de l'Espagne (Fabregas *et al.*, 1984), des États-Unis (Chiles *et al.*, 1989) et du Brésil (Ainouz *et al.*, 1991, Oliveira *et al.*, 2017).

Jusqu'à présent, la présence de lectines a été analysée dans environ 800 espèces d'algues. Cependant, ce nombre est encore petit, étant donné qu'il existe des milliers d'espèces d'algues marines. La recherche montre qu'environ 60% des espèces analysées présentent une activité hémagglutinante. Le nombre d'espèces positives pourrait être plus élevé puisque dans les premières projections, les auteurs utilisaient un nombre limité de globules rouges et sans érythrocytes traités par des enzymes (Teixeira *et al.*, 2012).

L'amélioration des méthodologies des tests à la fois, l'extraction et l'hémagglutination pourrait augmenter le nombre d'espèces positives. En fait, il semble y avoir une coïncidence que les érythrocytes de lapin traités avec de la papaïne soient les plus adaptés à la détection de l'activité hémagglutinante dans les macroalgues marines (Ainouz *et al.*, 1995)

Bien que les lectines d'algues marines présentent un contenu protéinique similaire aux lectines provenant de plantes terrestres, elles diffèrent dans certains aspects. Les premières publications sur ce sujet ont révélé qu'en général, les lectines d'algues possèdent des masses moléculaires faibles, pas d'affinité pour les monosaccharides, une forte spécificité pour les oligosaccharides complexes et / ou les glycoprotéines. En outre, ils semblent n'avoir aucune exigence pour les ions métalliques, montrant une teneur élevée en résidus acides et même à de fortes concentrations tendent à rester sous forme monomère (Rogers *et al.*, 1993, Hori *et al.* 1990). Cependant, il existe quelques rapports montrant que certaines de ces molécules peuvent être inhibées par des sucres simples et sont dépendantes des cations comme cela a été montré pour les lectines du genre algue marin vert, *Codium* (Rogers *et al.*, 1994) et le genre algue marin rouge, *Ptilota* (Sampaio *et al.*, 2002).

Même avec l'augmentation des publications liées aux lectines d'algues marines, les informations biochimiques et structurelles sur les lectines d'algues sont rares et ne sont que de quelques espèces et, par conséquent, la classification fonctionnelle et phylogénétique de ces lectines reste incertaine. L'information structurelle disponible indique l'existence de différentes protéines liant les glucides dans les algues marines étudiées. De plus, les séquences d'acides aminés complètes de seulement 14 lectines d'algues ont été déterminées. Dans les algues marines rouges, la lectine de *Bryothamnion Triquetrum* (BTL) a été la première lectine à déterminer sa structure primaire (Calvette *et al.*, 2000).

### 2.3.3. Propriétés Biologiques des lectines

Les propriétés biologiques des lectines sont multiples et variées.

- **Liaison avec les sucres**

Elle est spécifique et propre à chaque lectine de sorte que la connaissance du sucre spécifique conditionne la mise en évidence de l'activité de la lectine (Miyoshi *et al.*, 1982).

- **Agglutination des cellules**

C'est la manifestation la plus visible de l'interaction des lectines avec les cellules. Pour qu'elle se produise, les lectines doivent posséder au moins deux sites de reconnaissance et de liaison avec des saccharides de surface des cellules animales ou autres (bactéries, virus, mycoplasme, champignon). Les lectines monovalentes à un seul site de reconnaissance ne provoquent pas d'agglutination (Peumans *et al.*, 1995 ; Wang *et al.*, 1998).

En outre, on s'est aperçu que les lectines agglutinent plus facilement les cellules malignes par rapport à leurs homologues normales. Des attitudes préférentielles ont été observées également entre cellules embryonnaires et cellules adultes, entre cellules en mitose et cellules en interphase (Wang *et al.*, 1998).

- **Activité mitogène**

Une des propriétés les plus étonnantes des lectines réside dans leur pouvoir de transformer les petits lymphocytes du sang en cellules blastiques. Cette transformation lymphoblastiques résulte du pouvoir mitogène des lectines mais en général elle ne s'exerce que sur les lymphocytes T (Barbosa, 2001 ; Falasca 1989)

- **Effets mimétiques des hormones**

Les lectines des graines de haricot rouge (*Phaseolus vulgaris*), qui ont une haute réactivité avec les membranes cellulaires et leurs récepteurs peuvent mimer les effets des hormones. En effet, les lectines pures des graines de haricot rouge sont connues pour avoir une activité insuline-like sur les grosses cellules isolées (Greer *et al.*, 1985). De même les lectines des graines de *Momordica charantia* comme diverses autres lectines possèdent des activités antilipolytiques et lipogénique (activités insuline-like) à cause de son interaction avec les récepteurs d'insuline des adipocytes (Wang *et coll.*, 1998).

- **Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses**

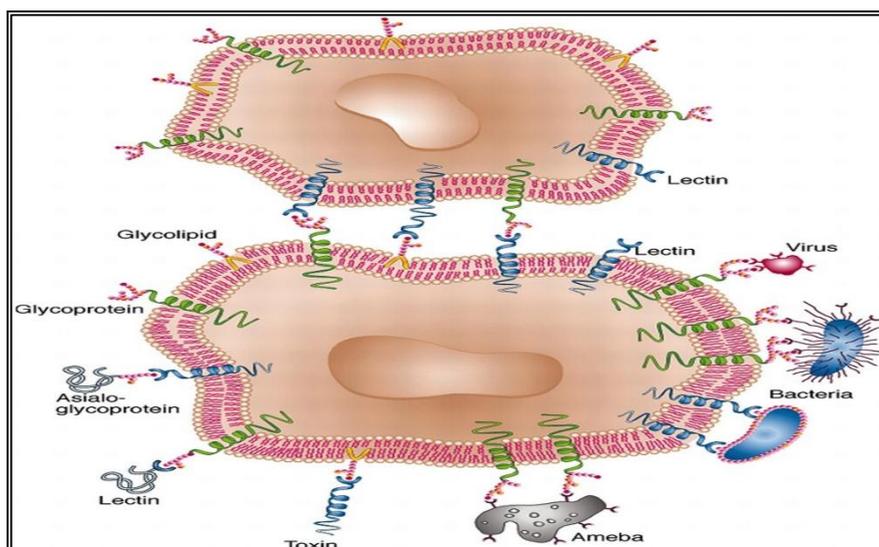
Les travaux de Valentiner *et al.* (2003) suggèrent que les lectines alimentaires pourraient inhiber la croissance cellulaire des cellules du cancer du sein de l'homme *in vitro*. Quant à Banwell *et al.* (1983), ils montrent que les lectines des graines de haricot rouge provoquent l'inhibition de la migration des cellules cancéreuses.

- **Actions antivirales**

Les lectines peuvent avoir des actions antivirales comme celles observées par les RIPs (Ribosomes inactivant les protéines) (Wang et coll, 1998). Les lectines mannose-spécifiques isolées de bulbes de 15 espèces sauvages du genre *Narcissus* cultivées en Espagne ont une activité inhibitrice anti-VIH1. L'activité anti-VIH-1 la plus efficace est obtenue avec les extraits de l'espèce *Narcissus tortifolius* (Lopez., 2003).

- **Autres propriétés**

Les lectines expriment diverses activités biologiques telles que la précipitation des glycoprotéines, l'activation de la voie alterne du complément et l'aggrégation des immunoglobulines (Nachbar *et al.* 1980), l'induction de la libération de l'histamine à partir des cellules basophiles et des mastocytes (Gomes 1994), les effets pro et antiinflammatoires (Assreury 1997), l'induction de l'apoptose (Kulkarni 1988).

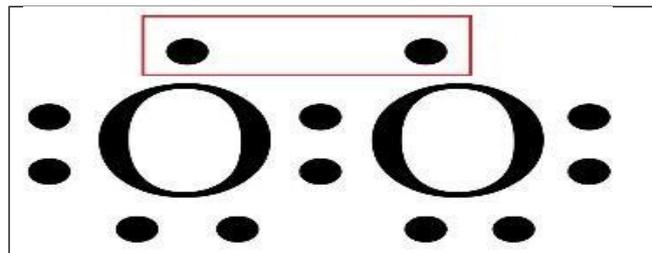


**Figure 7 :** Rôle de glycoconjugués situés sur la surface cellulaire. Représentation schématique d'exemples d'interaction lectines-glucides (Lis et Sharon., 1986).

## 2 .Radicaux libres et stress oxydatif

Au cours des dernières décennies, la recherche concernant les activités antioxydantes a représenté un véritable enjeu scientifique. Le stress oxydatif est inévitable, c'est une conséquence d'être vivant. On possède de plus en plus de données selon lesquelles le stress oxydatif entraînerait de nombreuses maladies, au travers du chapitre suivant, nous allons parler de l'oxydation et des moyens d'y lutter.

Un radical libre est une espèce chimique doté d'un ou de plusieurs électrons non-appariés sur sa couche externe. La molécule d'oxygène présente la particularité d'avoir la structure d'un biradical libre, en raison de la présence de deux électrons célibataires situés sur les deux orbitales périphériques. oxydatif entraînerait de nombreuses maladies, au travers du chapitre suivant, nous allons parler de l'oxydation et des moyens d'y lutter.



**Figure 8 :** Schématisation de la molécule biradical libre d'oxygène.

L'oxyde d'azote est un radical peu réactif la, la cause de cette faible réactivité est la présence d'un seul est unique électron célibataire, il est le résultat de l'association d'une molécule d'azote et une autre d'oxygène.

Lors des processus biologique faisant intervenir le stress oxydant, les espèces chimiques qui prennent part à ce phénomène ont la particularité d'avoir un électron non apparié sur un atome d'oxygène ou d'azote, d'où leur appellation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou de l'azote (RNS).

### 2.1 . Les espèces réactives de l'oxygène(ERO)

On distingue deux grandes familles de molécules réactives impliquées dans les processus du stress oxydant : les espèces radicalaires et les espèces non-radicalaires. La réactivité d'un radical libre varie d'un radical à un autre et dépend de l'environnement où ils se trouvent.

Leurs constantes de vitesse réactionnelle sont très élevées (105 à 1010 mol<sup>-1</sup>.L.s<sup>-1</sup>) (Delattre *et al.*, 2005).

- **Les espèces oxygénées réactives radicalaire**

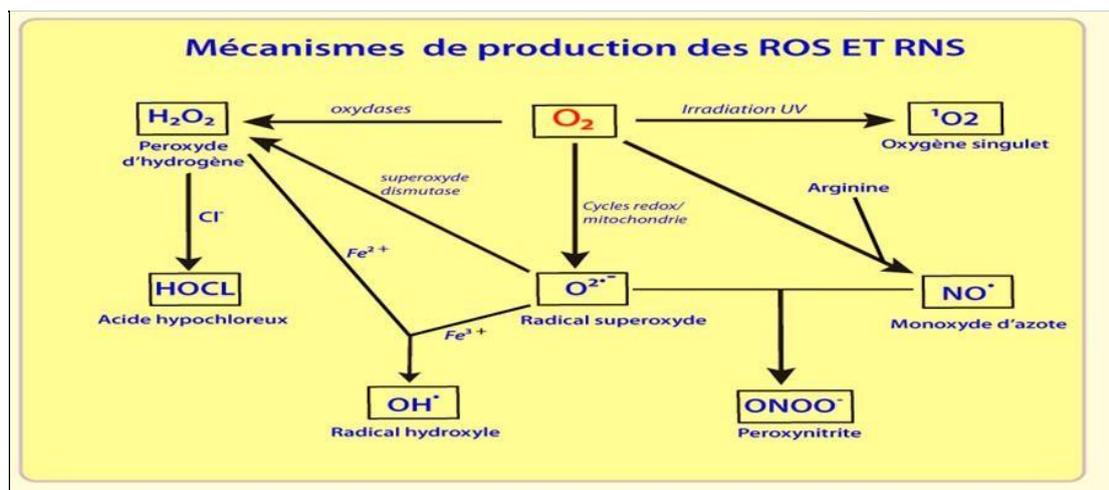
L'anion radical superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) est le résultat de l'apport d'un électron supplémentaire à la structure initiale de l'oxygène. Malgré une réactivité moyenne, ce radical a quelques cibles privilégiées telles que le cytochrome c (Fe<sup>3+</sup>), l'ascorbate et surtout le superoxyde dismutase.

Plus réactif que le précédent, le radical perhydroxyle HO<sub>2</sub><sup>•</sup> est obtenu après protonation de ce dernier à pH inférieur à 4,8 (pK<sub>a</sub> (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>/ O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) = 4,8).

La réduction monoélectronique du peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit le radical hydroxyle HO<sup>•</sup> et l'anion basique non radicalaire OH<sup>-</sup> en présence d'un catalyseur (réaction de Fenton : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Fe<sup>2+</sup> → HO<sup>•</sup> + Fe<sup>3+</sup> OH<sup>-</sup>). Cette espèce chimique particulièrement réactive joue un rôle majeur dans la peroxydation lipidique et la destruction du matériel génétique (Hennebelle, 2006).

Le radical peroxyde RO<sub>2</sub><sup>•</sup> est un radical secondaire, il est le résultat de l'addition de l'oxygène sur les radicaux centrés sur le radical R<sup>•</sup>. Sa réactivité se situe entre l'anion radical superoxyde et le radical hydroxyle.

Le radical secondaire alkoxydes RO<sup>•</sup> est le résultat de la décomposition de l'hydroperoxyde RO<sub>2</sub>H, lui-même produit de l'oxydation de substrat RH, par des cations métalliques.



**Figure 9** : Réactions de base intervenant lors de la synthèse des EOR et des EAR (Favier., 2003).

- **Les espèces oxygénées non radicalaires**

Bien qu'il ne soit pas un radical, l'oxygène singulet  $O_2$ , qui est la forme diamagnétique de l'oxygène, joue un rôle important dans le vieillissement cutané et certaines maladies liées à l'âge, il est produit en présence de rayonnement UV ou par les leucocytes (Choe et Min, 2005; Hennebelle, 2006).

Sous sa forme moléculaire, le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  est également toxique, en particulier à cause de sa transformation en radical hydroxyle en présence de cations métalliques  $Fe^{2+}$  et  $Cu^+$ , lors de réactions de type « Fenton » (Wardman et Candeias, 1996).

La myéloperoxydase<sup>20</sup> convertit le peroxyde d'hydrogène en acide hypochlorique (HOCl) à des concentrations physiologiques. Ce dernier peut réagir avec les fonctions aminées des protéines pour former des chloramines (Sumaya Martinez, 2004).

## 2.2 . Les espèces réactives azotées (ERN)

- **Espèces radicalaires azotées**

Le monoxyde d'azote, un radical indispensable qui participe activement aux fonctions physiologiques du corps, particulièrement au niveau du sang. Malgré son implication dans les processus anti-inflammatoires et son rôle protecteur vis-à-vis la lipopéroxidation il est paradoxalement impliqué dans de nombreuses pathologies telles que l'athérosclérose, les lésions neuronales dégénératives, le diabète et le cancer.

- **Espèces non radicalaires azotées**

Caractérisé par sa grande capacité de diffusion dans les membranes cellulaires et sa réactivité relativement moyenne (de l'ordre de quelques secondes in vivo), le monoxyde d'azote radicalaire peut facilement réagir avec la plupart des espèces oxygénées et se transformer en dioxyde d'azote ( $NO_2$ ) ( $2 \cdot NO + O_2 \rightarrow 2 NO_2$ ), lequel peut donner du trioxyde d'azote ( $N_2O_3$ ) ( $\cdot NO + NO_2 \rightarrow N_2O_3$ ) pour enfin aboutir à un ion nitrate stable ( $NO_2^-$ ) ( $N_2O_3 + H_2O \rightarrow 2 NO_2^- + 2H^+$ ). De plus, le monoxyde d'azote forme avec l'ion superoxyde le peroxyde d'azote ( $ONOO^-$ ) ( $\cdot NO + O_2 \cdot^- \rightarrow ONOO^-$ ), moins réactif que son précurseur azoté, mais responsable de l'oxydation de nombreuses biomolécules (protéines, lipides et acides nucléiques) (Boczkowski J *et al.*, 1999).

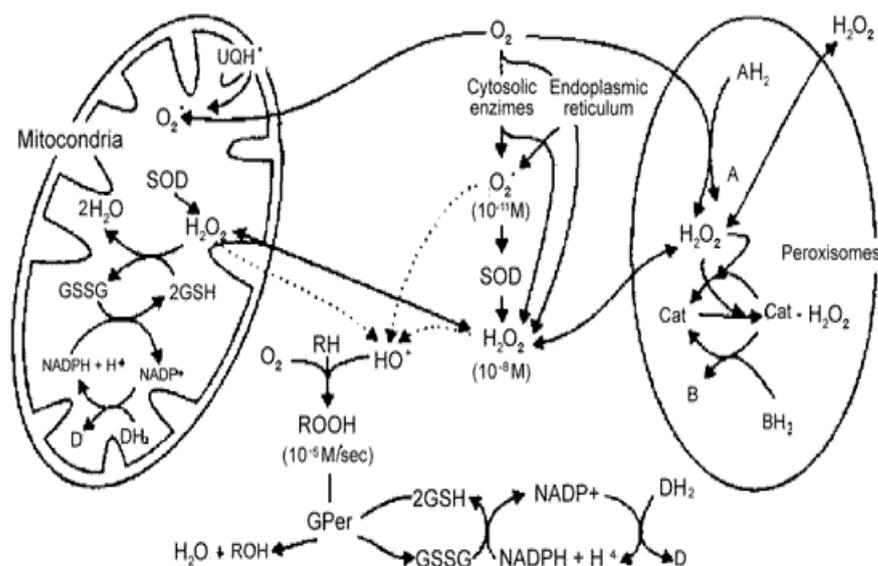
### 3.3. La production de radicaux libres

#### 3.3.1. La production intracellulaire

La production des radicaux libres chez les eucaryotes est essentiellement enzymatique, mais il existe plusieurs autres sources possibles.

Il s'agit principalement de la NAD(P)H oxydase membranaire et du complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire.

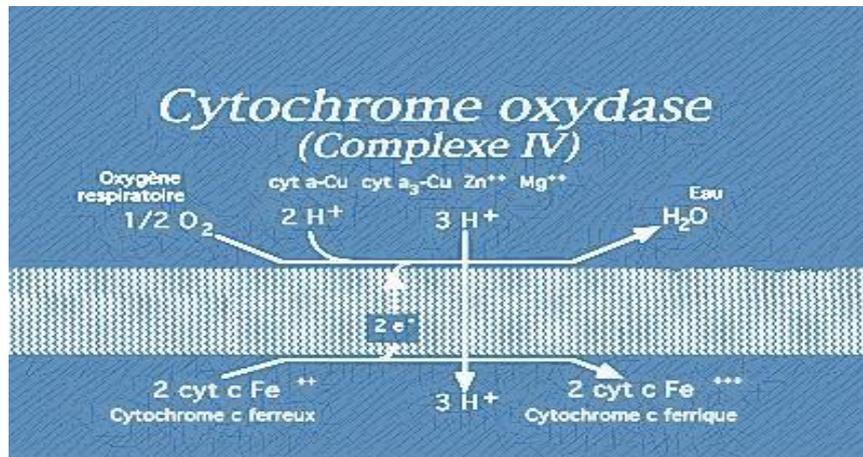
La NAD(P)H oxydase est une enzyme membranaire qui catalyse la réduction de l'oxygène selon :



**Figure 10 :** Production mitochondriale de radicaux libres (Laura *et al.* 2000).

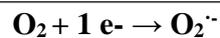
Les cytochromes P450, accepteurs terminaux d'électrons du complexe (IV) de la chaîne de transport des électrons, situés dans la membrane mitochondriale, catalysent la réaction :





**Figure 11** : La cytochrome oxydase de la chaîne respiratoire.

Cette chaîne de transport laisse fuir une certaine proportion d'électrons, environ 2 %, qui vont réduire partiellement l'oxygène pour aboutir à la formation du radical superoxyde :



Compte tenu de l'intense activité de la chaîne respiratoire dans les organismes aérobies, cet excès d'électrons semble surpasser les activités de la NAD(P)H. De plus, dans les mitochondries, l'oxydation de coenzymes, s'accompagne d'une perte de protons et d'électrons qui sont transférés à l' $O_2$  par l'intermédiaire de la chaîne de transport. La chaîne de transport des électrons est composée de nombreuses espèces moléculaires et ioniques ( les cythochromes, les flavoprotéines etc...) (Delattre *et al.*, 2005).

D'autres sources peuvent également jouer un rôle dans la production de radicaux comme la xanthine oxydase qui réduit l'oxygène moléculaire en ion superoxyde, les peroxysomes qui possèdent plusieurs enzymes sources de peroxyde d'hydrogène et les lipooxygénases, enzymes de la voie de l'acide arachidonique qui permettent notamment la synthèse des prostaglandines, oxydent les acides gras pour donner des hydroperoxydes d'acide gras insaturés (Delattre *et al.*, 2005).

Par ailleurs, au cours de la défense antibactérienne, les cellules phagocytaires activées par une réaction inflammatoire vont produire un grand nombre d'ERO. De plus, il y a production massive d'anion superoxyde par le mécanisme leucocytaire. C'est la flambée respiratoire. Les NO synthases, à l'origine du radical  $NO^{\cdot}$ , peuvent, sous certaines conditions,

produire également des anions superoxydes (Delattre *et al.*, 2005; Valko *et al.*, 2006).

### 3.3.2. La production extracellulaire

Les radicaux libres sont également produits par des phénomènes extérieurs à notre organisme, l'environnement et le mode de vie sont responsables de la création et de l'accumulation de ces espèces chimiques dans l'organisme.

Ces facteurs environnementaux incluant des agents cancérigènes non-génotoxiques peuvent directement, ou indirectement, être impliqués dans la génération de radicaux libres (xénobiotiques, activation des leucocytes...). Les rayonnements UV induisent la synthèse de  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$ ,  $^1O_2$  et d' $H_2O_2$  l'intermédiaire d'agents photosensibilisants (Sumaya Martinez, 2004).

L'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote ( $NO_2$ ) présents dans notre mode de vie (tabagisme, radiations ionisantes, champs électriques, polluants industriels...), ainsi qu'une alimentation « chimiquée » (raffinée, riche en graisses saturées et en sucre, consommation d'alcool...), sont autant d'éléments favorisant la genèse de radicaux libres (Mena *et al.*, 2009).

### 3.4. Mécanismes d'action des espèces réactives oxygénées et le stress oxydant ou oxydatif

Les EOR et ERN sont connues pour jouer un double rôle dans les systèmes biologiques, puisqu'ils peuvent être à la fois nocifs mais aussi bénéfiques, voire indispensables pour les organismes vivants (Valko *et al.*, 2004)

Bénéfiques, lorsqu'ils sont impliqués dans des rôles physiologiques au niveau des réponses cellulaires telles que la lutte contre des agents infectieux et leur fonction dans les systèmes de signalisation cellulaire.

Nocifs, lorsqu'il y a un déséquilibre entre la balance des ERO et ERN et les systèmes de défense, avec comme conséquence l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule (ADN, protéines, lipides) en lien avec l'apparition de nombreuses maladies graves (cancer, artériosclérose, arthrite, maladies neurodégénératives) : c'est le stress oxydatif (Evans et Halliwell, 1999).

Quelles que soient leurs fonctions, ces molécules jouent donc un rôle indispensable chez tous les êtres vivants. Les notions les plus essentielles vont être développées ci-après.

- **Rôle des radicaux libres chez l'homme**

De nombreux ligands extracellulaires sont capables d'induire la production cellulaire d'ERO, après interaction avec leur récepteur spécifique. Ces ERO contribuent donc à la transduction du signal, mais assurent également l'amplification de ce signal. Par exemple, cela va se traduire par l'activation de la NADPH oxydase qui formera l'anion superoxyde, et contribuera à l'activation de phosphorylases, dont les cibles sont des protéines.

En résumé, les mécanismes d'action principaux des ERO sont alors de déclencher ou d'amplifier un signal intracellulaire par deux mécanismes principaux (par modification de l'équilibre rédox intracellulaire et par modification oxydative des protéines). Les ERO sont également à l'origine de l'action bactéricide par les leucocytes (Delattre et *al.*, 2005).

- **Rôle des radicaux libres chez les plantes**

Les ERO sont continuellement produites chez les plantes selon le métabolisme aérobie. En fonction de leur nature, certaines, très toxiques, sont rapidement détoxifiées par divers mécanismes enzymatiques et non-enzymatiques.

Alors que les végétaux génèrent pléthore de processus pour combattre la croissance des ERO produites dans les conditions de stress abiotique (chocs thermiques, irradiation excessive, couche d'ozone, sécheresse, salinité...), dans d'autres circonstances, ils peuvent tout aussi engendrer délibérément des ERO au titre de molécules signal afin de contrôler de nombreux phénomènes comme la défense contre des pathogènes (stress biotique), la mort cellulaire programmée (apoptose) et le comportement stomatique (Apel et Hirt, 2004; Smirnoff, 2005).

### **3.5. Le pouvoir antioxydant**

Comme nous avons pu le voir précédemment, l'organisme est capable, dans une certaine mesure, de limiter les dégâts dus aux radicaux libres, grâce à des mécanismes de défense enzymatiques et chimiques développés au cours de l'Évolution (Hennebelle, 2006).

#### **3.5.1. Protections cellulaires**

Les molécules ou microconstituants capables d'interférer avec les radicaux libres sont appelés antioxydants. Un bon antioxydant se devra de respecter quelques critères (Valko et

*al.*, 2006) :

- ✓ Être capable de piéger directement et spécifiquement les radicaux libres.
- ✓ Chélaterdes ions de métaux de transition ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ) d'importance biologique capables de promouvoir la production de radicaux libres par la réaction de Fenton.
- ✓ Interagir avec d'autres antioxydants, et, dans la mesure du possible, les régénérer.
- ✓ Avoir un effet positif sur l'expression génique.
- ✓ Être rapidement absorbé.
- ✓ Avoir une concentration qualifiée de « physiologique » dans les tissus et les fluides biologiques.
- ✓ Être efficace en milieu aqueux et/ou dans le milieu membranaire.

#### **3.5.1.1. Systèmes antioxydants enzymatiques endogènes**

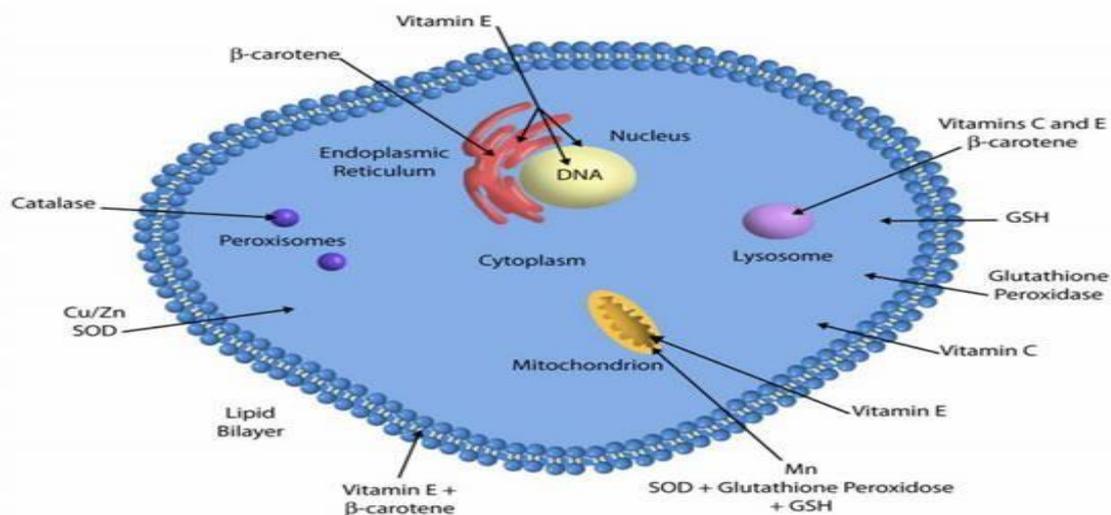
Les principaux systèmes enzymatiques antioxydants les plus efficaces chez les mammifères ainsi que chez les plantes sont la superoxyde dismutase, la catalase et le glutathion peroxydase (Mates *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 2012).

Le rôle majeur du superoxyde dismutase ou SOD est de catalyser la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire.

La catalase, essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes, est capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.

L'activité du glutathion peroxydase, ou GPx, est de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur (Delattre *et al.*, 2005d).

D'autres enzymes jouent un rôle non négligeable dans la lutte antioxydante, l'ensemble formant un système complexe : glutathion réductase, thioredoxine reductase, glutathion.



**Figure 12** : Schématisation des molécules intervenant dans les protections cellulaires (Ananya., 2012).

### 3.5.1.2. Systèmes antioxydants non-enzymatiques

- **Systèmes antioxydants endogènes**

Les systèmes antioxydants non-enzymatiques endogènes incluent de nombreux thiols dont le majoritaire est le glutathion, largement présent sous forme réduite, qui est capable de réagir, *in vitro*, avec les radicaux  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{RO}_2^\bullet$ ,  $\text{RO}^\bullet$ ,  $\text{1O}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$ , des radicaux centrés sur le carbone, mais aussi l'acide hypochloreux  $\text{HOCl}$ .

Le glutathion est aussi capable de participer à l'activité enzymatique qui, elle, détoxifie le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes (McCall et Frei, 1999; Masella *et al.*, 2005; Delattre *et al.*, 2005).

Les deux formes, oxydée et réduite, de l'acide lipoïque (non présentée sur le schéma), autre composé appartenant aux thiols, présentent des propriétés antioxydantes *in vitro* en piégeant les  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{RO}_2^\bullet$ , l' $\text{HOCl}$  et l' $\text{1O}_2$ . En se liant à des métaux comme le fer et le cuivre, il permet de les désactiver d'un point de vue catalytique, et a la capacité de régénérer certains antioxydants endogènes et exogènes (Packer *et al.*, 2001; Panfili *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004).

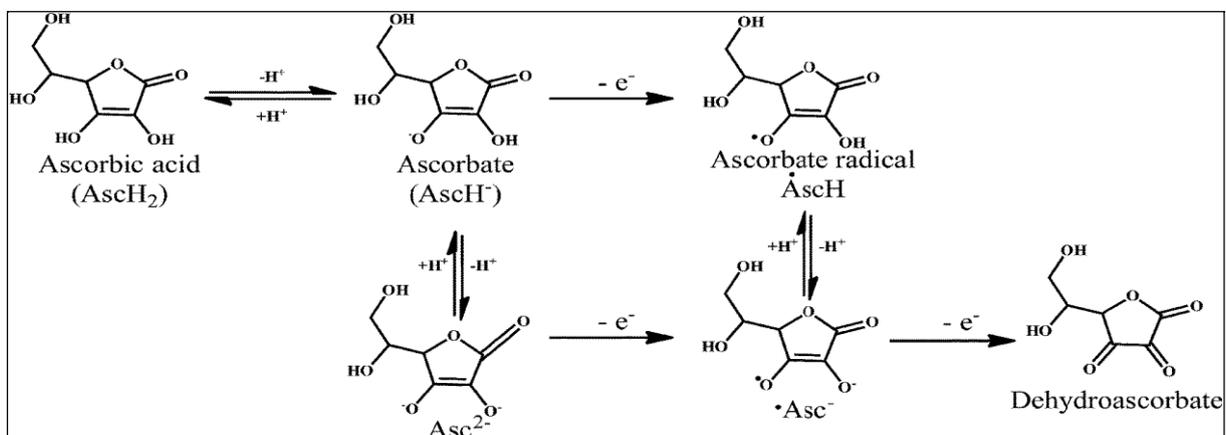
L'acide urique, présent sous forme urate à pH physiologique, possède des propriétés antioxydantes *in vitro* contre les  $\text{HO}^\bullet$  et  $\text{RO}_2^\bullet$ , tout comme la bilirubine, les mélanines et la mélatonine (Delattre *et al.*, 2005).

- **Systèmes antioxydants exogènes**

Les antioxydants chimiques exogènes, eux, comprennent majoritairement les vitamines C et E, les caroténoïdes et des composés phénoliques (McCall et Frei, 1999).

La vitamine C ou acide ascorbique est une molécule hydrosoluble présente dans la plupart des fruits et légumes (non synthétisée par l'Homme). Elle est connue pour son action protectrice contre l'oxydation membranaire (Retsky *et al.*, 1999). Son caractère antioxydant provient de sa forme ionisée abondante (AscH<sup>-</sup>) qui peut aisément réagir avec des radicaux et produire le radical ascorbate tricarbonyle (AscH•), stabilisé par résonance. Du fait de son très faible pK, la forme non protonée radicalaire faiblement réactive est privilégiée (Asc•-) (Valko *et al.*, 2006).

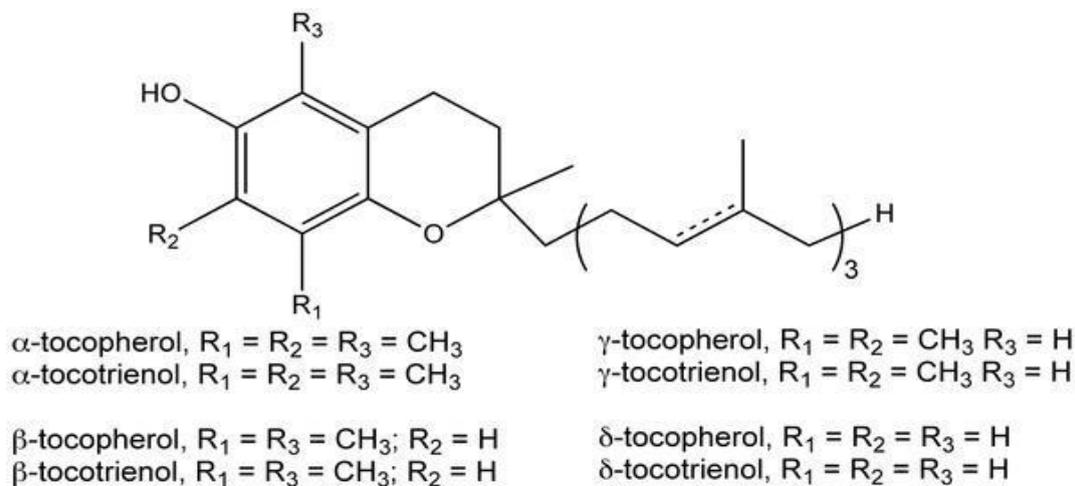
Paradoxalement, les études *in vivo* de la supplémentation en vitamine C montrent, pour la plupart, une réduction de l'oxydation de l'ADN, des protéines et de la lipoperoxydation, alors que certains auteurs relatent l'effet pro-oxydant *in vitro* de cette molécule dans des milieux tamponnés contenant du fer en accélérant la réaction de Fenton (Kang *et al.*, 1998; Seon Hwa *et al.*, 2001; Valko *et al.*, 2006).



**Figure 13 :** Différentes structures chimiques de l'acid ascorbique lors de sa réaction avec les radicaux libres (Nimse and Pal., 2015)

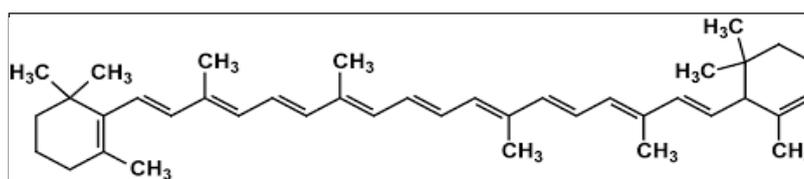
La vitamine E est le terme générique utilisé habituellement pour désigner les différents tocophérols et tocotriénols (ensemble de 8 molécules dont 4 tocophérols et 4 tocotriénols. Ce sont de bons antioxydants alimentaires, mais surtout leur rôle physiologique chez l'Homme, comme protecteurs des structures membranaires et des lipoprotéines ou pour lutter contre le

stress oxydant, est très important. Elle prévient l'apparition d'hydroperoxydes en piégeant les radicaux LOO• (Figure 22) (Kaiser *et al.*, 1990; Yoshida *et al.*, 1993).



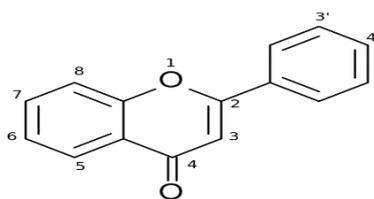
**Figure 14 :** Structure chimique des tocophérol et des tocotriéol (Qureshi *et al.*, 2011).

Les caroténoïdes (Car) sont des pigments issus des plantes et microorganismes, et sont regroupés en deux grandes familles : les carotènes et les xanthophylles. On en dénombre environ 600 présents dans la nature. L'activité antioxydante de ceux-ci est liée à leur longue chaîne polyénique qui leur permet de réagir avec les radicaux ROO•, HO•, O<sub>2</sub>•-, R• par simple addition électrophile et transfert d'électron. Ils permettent, en particulier, de neutraliser l'oxygène singulet (Valko *et al.*, 2006).



**Figure 15 :** Exemple du  $\beta$  carotène

Les composés phénoliques (Ph), et en particulier les flavonoïdes, sont des métabolites secondaires des plantes caractérisés par une structure commune de type 2-phénylbenzopyrane (Figure 16). Leur capacité antioxydante réside dans leur faculté à « terminer » les chaînes radicalaires par des mécanismes de transfert d'électrons et de protons, et à chélater les ions des métaux de transition capables de catalyser la peroxydation lipidique (Schroeter *et al.*, 2002; Leopoldini *et al.*, 2011).



**Figure 16 :** Structure chimique de la 2- phénylbenzopyrane

De façon générale, l'activité biologique des flavonoïdes est fortement dépendante de la nature et de la position des substituants, en particulier du nombre de groupements hydroxyles (Schroeter *et al.*, 2002).

Une propriété importante des groupements hydroxyles des phénols est leur acidité due à la labilité des protons acides, qui entraîne la formation d'anionsphénoxydes (Figure 28) stabilisés par résonance. Cet anion, a la possibilité de perdre un électron pour former un radical (Sartori-Thiel, 2003) ; l'électron, lui, pouvant être récupéré par un radical libre. La structure aromatique du radical phénoxyde ainsi formé lui confère une certaine stabilité, donc une réactivité plus faible, en raison de la délocalisation du radical (Leopoldini *et al.*, 2011). Il peut, ensuite, réagir avec un autre radical libre (Korkina *et al.*, 2012).

Les substitutions les plus rencontrées sur les phénols des végétaux sont principalement la méthylation et la conjugaison avec des esters et des glycosides, lesquels peuvent être acylés. Les polyphénols sont généralement glycosylés dans leur état naturel (Sartori-Thiel, 2003).

Par conséquent, l'aptitude de certains polyphénols à être naturellement présents sous forme glycosidique dans l'aliment leur octroie une biodisponibilité toute relative. En effet, il a été montré que la glycosylation, la conjugaison et la polymérisation tendaient à diminuer leur absorption intestinale (Manach *et al.*, 2004).

La grande capacité des composés phénoliques à contrecarrer les radicaux libres, et à chélater les ions métaux de transitions est directement reliée à leurs caractéristiques structurales. Il est prouvé que cette activité est due aux nombres de groupements hydroxyles présents sur les cycles benzoïques, et aussi à la proximité des groupes alkyls. Ainsi, des différentes familles connues des polyphénols, les flavonoïdes sont- ils ceux qui, en particulier,

réunissent toutes ces caractéristiques (Rice-Evans et al, 1996).

#### 4. Ulcère peptique et stress oxydatif

L'ulcère peptique se forme dans l'estomac ou dans la partie supérieure de l'intestin grêle et est la maladie la plus fréquente du système digestif, affectant de manière significative des millions de personnes dans le monde entier. Les ulcères peptiques se produisent fréquemment le long de la courbure inférieure de l'extrémité antrale de l'intestin grêle. L'estomac ou, plus rarement, à l'extrémité inférieure de l'œsophage où il y'a souvent des reflux du jus d'estomac (Kansara et Sakhreliya, 2013). L'ulcère gastrique se caractérise principalement par des dommages à la muqueuse gastrique au niveau de la lumière de l'estomac, ce qui entraîne des douleurs abdominales, des saignements possibles, des douleurs. Fatigue, vomissements et perte de poids et autres symptômes gastro-intestinaux thoraciques (Awaad *et al.* 2013; Son *et al* 2015).

##### 4.1.Epidémiologie et etiologie

Les taux annuels d'incidence des maladies de l'ulcère peptique diagnostiquées au cours des dernières décennies étaient de 0,1 à 0,19% (Sung *et al.*, 2009). Sur la base de 31 articles publiés au cours des 3 dernières décennies qui ont signalé des estimations du taux d'incidence pour l'ulcère peptique dans la population générale, on a constaté que le taux d'incidence était de 1 cas par 1000 années-personnes (Lin *et al.*, 2011). Une étude réalisée en Suède, dans laquelle la maladie de l'ulcère peptique, symptomatique et asymptomatique a été considérée comme prévalence de l'ulcère peptique était de 4,1%, alors que 19,5% des ulcère peptique était asymptomatique (Aro *et al.*, 2006).

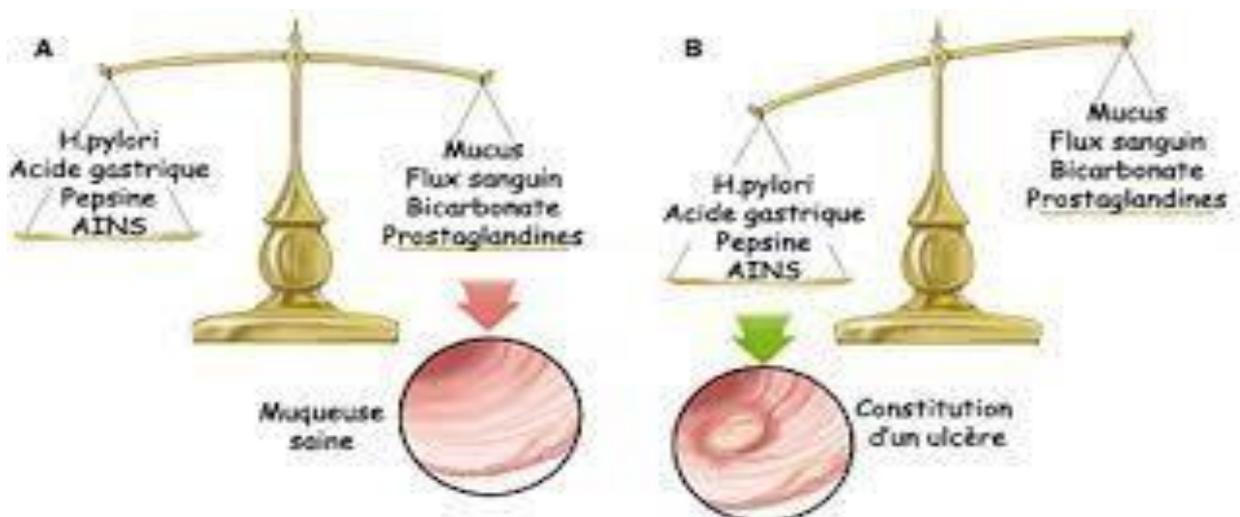
Chaque année, 4 millions de personnes sont diagnostiquées d'une maladie de l'ulcère gastrique dans le monde (Zelickson *et al.*, 2011). Des complications sont rencontrées chez 10 à 20% de ces patients et 14% des ulcères se perforent (Lau *et al.*, 2010). On estime que 6 000 personnes meurent chaque année en raison des complications associées à l'ulcère de l'estomac. 40 000 personnes subissent une intervention chirurgicale afin d'obtenir un soulagement des symptômes persistants de l'ulcère chaque année. On estime que 15 000 décès surviennent à la suite d'un ulcère gastro-intestinale (Sandhya *et al.*, 2013).

La consommation excessive d'alcool, le stress émotionnel, les radicaux libres, l'utilisation de médicaments anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens (AINS) et des déficiences nutritionnelles qui peuvent perturber la barrière de la muqueuse gastrique la

rendant vulnérable aux sécrétions gastriques habituelles. Les facteurs de risque ulcérogènes, tels que la consommation excessive d'alcool et l'utilisation de médicaments anti-AINS, provoquent la dispersion du gel protecteur du mucus et de la bicouche des phospholipides, ce qui entraîne une diffusion des acides et des sécrétions des muqueuses (Son *et al.*, 2015)

#### 4.2 .Physiopathologie des ulcères

La physiopathologie de l'ulcère est principalement attribuable à un déséquilibre entre les facteurs agressifs (acide, pepsine, H pylori, AINS et facteurs locaux de défense de la muqueuse (mucus, flux sanguin, sécrétions endogènes de prostaglandines (PG). Oxyde nitrique (NO), antioxydant etc...). La muqueuse duodénale est maintenue à travers un bilan homéostatique équilibré entre les facteurs agressifs et défensifs (Sumbul *et al.*, 2010, Kansara *et Sakhreliya*, 2013). La muqueuse gastrique et duodénale est couverte de mucus et de bicarbonate pour se protéger contre l'acide gastrique, le mucus et le bicarbonate sont sécrétés par l'épithélium gastrique et par les glandes de Brunners dans le duodénum. L'épithélium a également un rôle dans la protection contre l'acide. La surface apicale des membranes ainsi que les complexes de jonctions étroites entre les cellules de surface limitent la pénétration de l'ion hydrogène dans la muqueuse. En outre, le flux sanguin de la muqueuse transporte les nutriments, l'oxygène et le bicarbonate à la surface pour neutraliser l'acide (figure 3) (Allen *et Flemstrom*, 2005).



**Figure 17 :** Balance entre les facteurs protecteurs et agressifs. (Copyright Johns Hopkins Hospital ;2014).

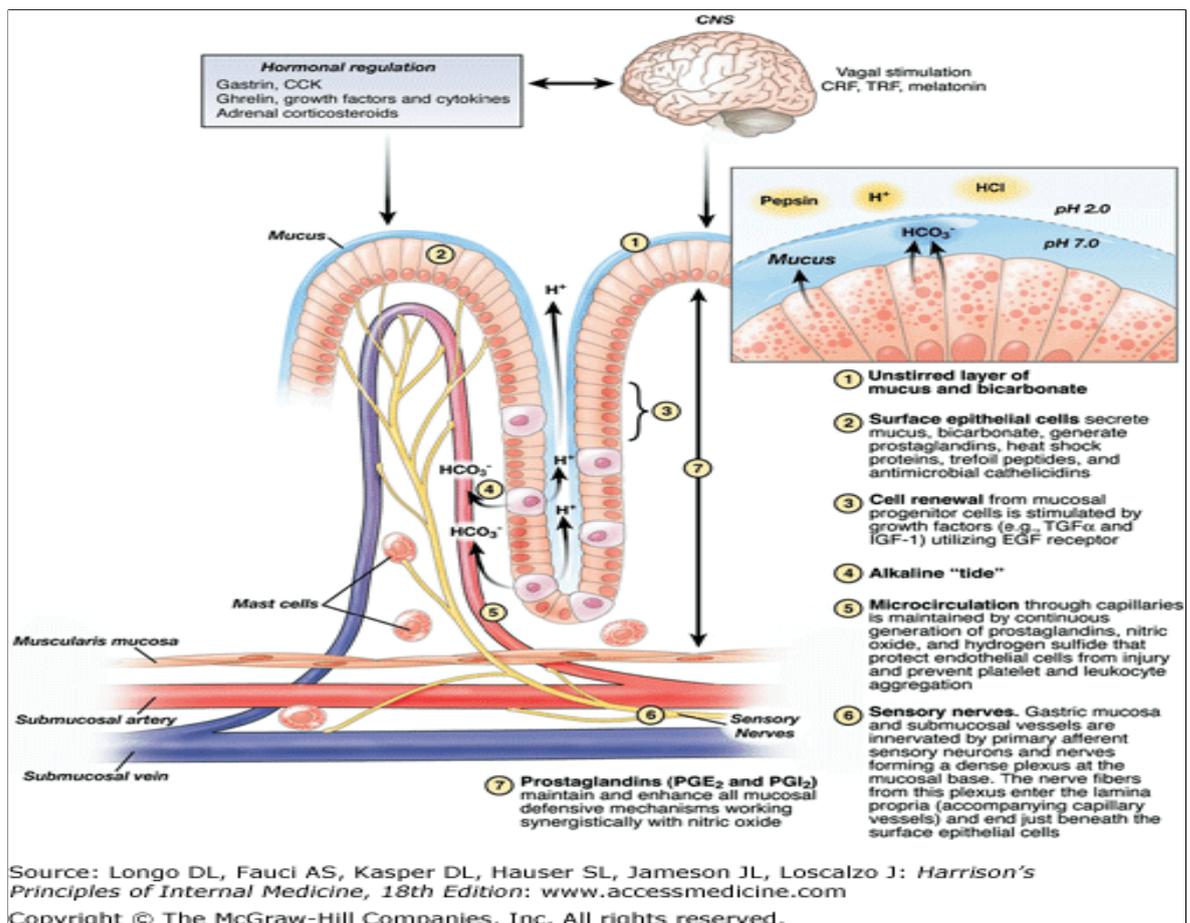


Figure 18 : Mécanismes de défense gastrique (McGraw, 2009).

### 4.3 .Modèles d'études des ulcères gastriques

Il existe plusieurs modèles qui sont utilisés pour évaluer les médicaments antiulcéral. Cependant, le choix d'un modèle approprié s'est avéré difficile car chaque modèle présente des avantages importants ainsi que des inconvénients. Le choix d'un modèle particulier est parfois influencé par les ressources locales, les objectifs de l'étude, l'hypothèse testée ou les questions de la recherche auxquelles le chercheur tente de répondre. Le choix du modèle peut également dépendre de la pertinence du type d'ulcère peptique à l'étude (Adinortey *et al.*, 2013 ; Thabrew et Arawwawala, 2016).

Les ulcères peptiques peuvent être induits par voie physiologique, pharmacologiques ou par des manipulations chirurgicales dans plusieurs espèces animales. Cependant, la plupart des expériences dans les études sur l'ulcère peptique sont effectuées chez les rongeurs.

Plusieurs modèles sont utilisés expérimentalement pour prévoir ou évaluer l'activité anti-ulcère peptique de différents extraits, d'agents ou de molécules, les principaux sont :

- ✓ Ulcères gastriques induits par l'éthanol.
- ✓ Ulcères gastriques induits par les AINS (indométacine, aspirine, ibuprofène).
- ✓ Ulcères gastriques induits par l'acide acétique.
- ✓ Ulcères gastriques induits par l'histamine.
- ✓ Ulcères gastriques induits par la réserpine.
- ✓ Ulcères gastriques induits par la sérotonine.
- ✓ Ulcères gastriques induits par ligature pylorique.

#### **4.3.1. Modèle de l'ulcère gastrique induit par l'éthanol**

La consommation d'alcool peut entraîner plusieurs maladies, y compris l'ulcère gastrique. En raison de son effet néfaste, l'éthanol a été exploré comme modèle dans l'ulcère gastrique. C'est l'un des modèles les plus utilisés pour tester les agents gastro-protecteurs. Les mécanismes de l'ulcère induits par l'éthanol sont divers, il peut affecter directement la muqueuse gastrique en réduisant les sécrétions de bicarbonate et de mucus et en l'exposant à l'effet dommageable de l'acide et de la pepsine ou en agissant sur des facteurs neuro-hormonaux qui stimulent la sécrétion d'acide (Bode et Bode, 1997). L'éthanol peut également diminuer le flux sanguin (Adinortey *et al.* 2013).

Le mécanisme crucial par lequel l'éthanol provoque l'ulcération gastrique est par l'augmentation du stress oxydatif et la réduction du système antioxydant (Hirokawa *et al.* 1998 ; samonina *et al.*, 2004). Les ROS sont responsables de l'oxydation des tissus conduisant à la peroxydation lipidique. Ils sont également responsables de l'oxydation des bases dans l'ADN cellulaire, ce qui en fait des agents mutagènes, cytotoxiques et réticulants, qui provoquent à leur tour une expression incontrôlée de certains gènes provoquant une multiplication accrue de cellules conduisant au cancer. Les antioxydants semblent avoir un rôle protecteur dans les ulcères gastriques. Le stress stimule à la fois le système sympathique

(vasoconstriction artériolaire directe) et parasympathique (induit une augmentation de la motilité et de la contraction musculaire de l'estomac), provoquant une hypoxie locale et une ischémie.

L'état ischémique provoque une augmentation du niveau de  $H_2O_2$  (par action de SOD), qui, en conjugaison avec  $O_2$ , génère OH via la réaction de Haber-Weiss catalysée par un méthyle. Les radicaux hydroxylés ainsi générés, oxydent des constituants cellulaires importants, tels que des protéines structurales et fonctionnelles, des lipides membranaires et des appauvrissements du glutathion.

La peroxydation lipidique provoque une perte de la fluidité de la membrane, un transport ionique perturbé et une intégrité membranaire altérée, tout cela conduit enfin à une perte des fonctions cellulaires (Suzuki *et al.*, 2012). En outre, l'éthanol provoque une accumulation intracellulaire massive de calcium conduisant à la mort cellulaire (Wong *et al.*, 1991). L'éthanol peut aussi assouplir le sphincter pylorique provoquant l'augmentation de la vidange gastrique qui peut entraîner des dommages (Dinosa *et al.*, 1972). Le modèle de l'ulcère induit par l'éthanol semble beaucoup plus approprié pour évaluer les agents cytoprotecteurs et / ou antioxydants, les voies générales de l'ulcère gastrique induit par l'éthanol sont résumées dans la figure 20.

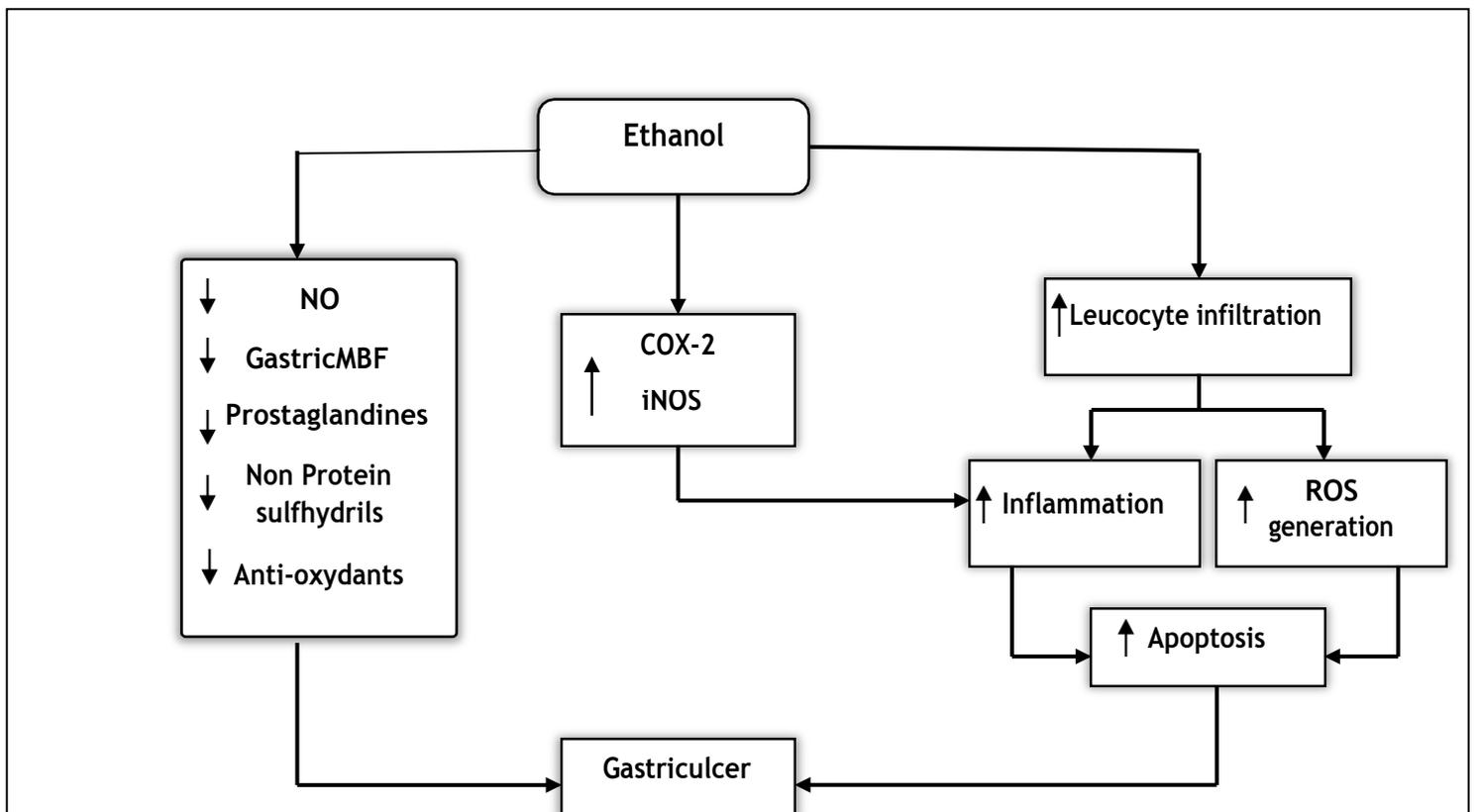


Figure 19 : Voies générales de l'ulcère gastrique induit par l'éthanol

#### 4.4 .Thérapie et phytothérapie

La maladie de l'ulcère péptique est un trouble gastro-intestinal grave qui nécessite une stratégie thérapeutique bien ciblée. Depuis plus d'un siècle, la maladie de l'ulcère peptique a été l'une des principales causes de la chirurgie gastro-intestinale, avec des taux élevés de morbidité et de mortalité. Plusieurs classes d'agents pharmacologiques se sont révélées efficaces dans la prise en charge des troubles gastriques acides. Ces groupes comprennent : les antiacides (hydroxyde d'aluminium, trisilicate de magnésium). Agents antioxydants (médicaments antisécrétoires incluant des inhibiteurs de la pompe à protons  $H^+ K^+$  ATPase (omeprazole, lansoprazole), antagoniste du récepteur de l'histamine  $H_2$  (cimétidine, ranitidine) et anticholinergique (pirenzepine), agents cytoprotecteur (Sucralfate et analogues de la prostaglandine (misoprostol). Les antimicrobiens (amoxicilline et clarithromycine) pour l'éradication de *H.pylori* et la thérapie triple (triple traitement d'une semaine consistant en un inhibiteur de la pompe à protons, comme l'oméprazole et les antibiotiques Clarithromycine et amoxicilline (Waller *et al.* 2005). Bien que ces médicaments soient efficaces, ils produisent de nombreux effets secondaires (maux de tête, diarrhée, douleurs abdominales et nausées), limitant ainsi leur utilisation.

Au cours des dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour les thérapies alternatives, en particulier celles des plantes en raison de leurs effets secondaires perçus (Adinortey *et al.*, 2013 ; Srinivas *et al.*, 2013 ; Al-Snafi, 2016). En effet, un grand nombre de plantes médicinales et leurs métabolites secondaires possèdent des effets bénéfiques sur les maladies gastriques, en particulier les maladies de l'ulcère peptique et dans les maladies intestinales, en particulier la diarrhée et la colite ulcéreuse, ces plantes incluent :

***Boswellia (Boswellia serrata)***, qui est considéré comme efficace dans les MIB. *Boswellia serrata* réprime la formation de leucotriène par inhibition de la 5-lipoxygénase avec l'action de deux acides *Boswellia*, à savoir l'acide 11-kéto-B-boswellic et l'acide acétyl-11-kéto-B-boswellic (Gupta *et al.*, 2001).

***Triticum aestivum*** , traitement des patients souffrant de jus d'herbe de blé (*Triticum aestivum*) (en tant que complément alimentaire, ou en tant que médicament), a été associée à une réduction significative de l'indice global de l'activité de la maladie et de la gravité du saignement rectal. En dehors de la nausée, aucun autre effet secondaire grave n'a été observé.

Aussi, Le jus de *Triticum aestivum* L. (Poaceae) est apparu efficace et sans dangers en tant que traitement simple ou comme adjuvant au traitement de l'UC distal active (Ben-Arye *et al.*, 2002).

---

---

# Chapitre III:

## Matériels et méthodes

---

---

## 1. Etude phytochimique de l'algue *Ulva lactuca*

### 1.1. L'algue *Ulva lactuca*



Figure 20 : *Ulva lactuca*

- **Classification.**

Domaine : Eukaryota

Règne : Plantae

Embranchement : Chlorophyta

Classe : Ulvophyceae

Ordre : Ulvales

Famille : Ulvaceae

Genre : *Ulva*

Espèce : *lactuca*

## 1.2. Récolte de l'algue *Ulva lactuca*

*U. lactuca* (laitue de mer) a été récolté au niveau des côtes de Jijel (à l'est de l'Algérie) au mois d'avril-juin 2014. L'échantillon recueilli a été lavé sur place avec l'eau de mer, pour éliminer les matières étrangères telles que le sable, les épiphytes et la contamination d'autres algues. Arrivé au laboratoire, l'échantillon a été de nouveau lavé avec de l'eau courante puis séché à l'air libre et à l'ombre pour éviter la photolyse, pendant 21 jours. Devenue sèche, l'échantillon est récupéré, broyé en poudre fine à l'aide d'un broyeur mécanique, stockée dans des bocaux fermés hermétiquement et placée dans un endroit à l'abri de la lumière et de la chaleur avant son utilisation.

## 1.3. Préparation des extraits algologiques

Pour la préparation de l'extrait méthanolique (MeOH) et acétate d'éthyle ( EtOAc) d'*Ulva lacuta* 50 g de l'échantillon algologique en poudre ont été transférés dans une fiole contenant un mélange de méthanol/eau 6: 1 (v/v), puis laissés durant 2 - 4 heures. Le mélange filtré sous vide est centrifugé (3000 tr/min, 15 min) avant d'être concentré par un évaporateur pour récupérer le solvant organique. Une deuxième extraction utilisant l'acétate d'éthyle a été procédé de la même manière. Les extraits concentrés obtenus sont conservés à -20 °C pour les analyses ultérieures (Hertog *et al.*, 1992).

### 1.3. 1. Criblage phytochimique préliminaire

L'extrait méthanolique (MeOH) et acétate d'éthyle (EtOAc ) d'*Ulva lacuta* ont été soumises à un criblage phytochimique préliminaire pour identifier ses différents constituants chimiques actifs selon des méthodes phytochimiques standards décrites par Harbone (Harbone.,1984) et Khandelwal (Khandelwal.,2005) . L'ensemble des ces produits comprend les alcaloïdes, les terpénoïdes, les triterpénoïdes, les stérols, les flavonoïdes, les saponines et les tannins et les carbohydrates.

### 1.3. 2. Dosage des phénols totaux

Le principe de dosage des phénols totaux au niveau des extraits MeOH et EtOAc repose sur les capacités réductrices des complexes ioniques polymériques formés à partir

des acides phosphomolybdiques et phosphotungstique (réactif de Folin-Ciocalteu) par les composés phénoliques (Oyaizu., 1986), Il en résulte la formation d'un complexe bleu qui accompagne l'oxydation des composés phénoliques et qui est stabilisé par l'addition de carbonate de sodium ( $\text{NaCO}_3$ ). La coloration produite, dont l'absorption maximum à 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents. Le dosage des phénols totaux est effectué par la comparaison de l'absorbance observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique. Les valeurs sont exprimées en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg GAE/g d'extrait).

### 1.3.3. Dosage des flavonoïdes totaux

La quantification du contenu flavonoïdes des deux extraits de la plante est estimée par la méthode du trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) (Ordon *et al.*,2006). Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par ce réactif ( $\text{AlCl}_3$ ), elle entraîne la formation d'un complexe brunâtre qui absorbe à 420 nm. La comparaison de l'absorbance observée à celle obtenue par un étalon de quercétine de concentration connue permet d'évaluer la teneur totale en flavonoïdes. les valeurs sont exprimées en mg équivalent de quercétin par g d'extrait (mg QE /g d'extrait).

### 1.4. Extraction des polysaccharides

Cent gramme (100g) de poudre sont prétraités deux fois par 2 volumes d'éther de pétrole (Wang *et al.*, 2013) pour éliminer les lipides pendant 5 heures à la température ambiante avec une agitation constante et douce. Les résidus sont séchés après filtration à l'abri de la lumière et à la température ambiante.

L'échantillon ainsi séchée est macérée dans 1 litre l'eau distillée pendant 3 heures à 90°C et sous agitation constante. L'extraction est répétée trois fois. Après une centrifugation à 4500 rpm pendant 15mn (Chen *et al.*, 2010), les trois surnageants sont réunis et centrifugés une dernière fois à 4500rpm, le surnageant est récupéré et concentrés à environs 200mL.

Les polysaccharides de l'extrait concentré, sont précipités à l'aide de 3 volumes d'éthanol (95%) (Ibanez et Ferrero, 2003; Boual., 2015) pendant 24 heures et gardé à 4°C. Après une dernière centrifugation à 4000rpm pendant 15mn, le culot est récupéré puis lavé trois fois par l'éthanol (Yan *et al.*,2008). L'extrait brut de polysaccharides a été obtenu en filtrant la solution à travers une membrane en nylon (taille des pores, 0,45 mm).

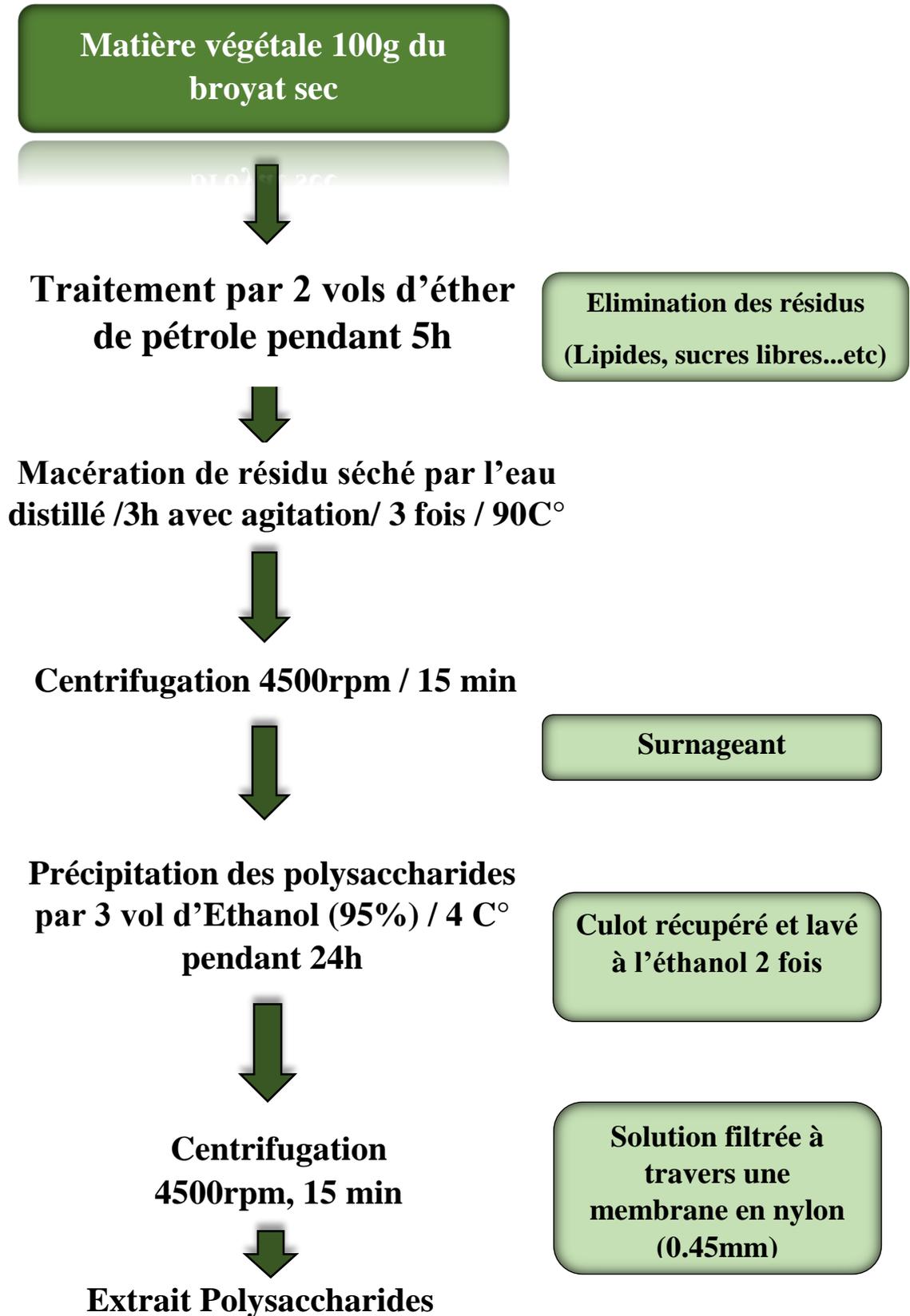


Figure 21 : Protocole d'extraction des polysaccharides.

- **Calcul du rendement des polysaccharides (extraits bruts)**

Le rendement massique, est un rapport entre la masse de l'extrait brut obtenu et la masse de la matière de départ. Il se calcule comme suit (Diallo *et al.*, 2004):

$$R (\%) = \frac{\text{poids de l'extrait brut de polysaccharides}}{\text{poids de la matière végétale sec}} \times 100$$

#### 1.4.1 .Dosages des oses totaux

Pour déterminer la concentration des oses totaux dans les extraits bruts, la quantification se fait selon la méthode de Dubois (1956).

- **Principe**

En milieu acide et à chaud, les liaisons glycosidiques sont hydrolysées. La déshydratation des unités osidiques conduit à la formation de dérivés furfuriques qui interagissent avec le phénol pour former des composés de coloration orange-jaune absorbant à 492 nm. Une gamme étalon de glucose est réalisée avec des concentrations comprises entre 0,1 et 1 g/l.

- **Réactif**

La solution du réactif de phénol à 5% est préparée par l'ajout de 100ml d'eau distillée à 5g de phénol. La solution mère d'étalon est préparée par l'ajout de 0,1g de glucose dans 100ml d'eau distillée.

- **Mode opératoire**

Dans des tubes en verres placer un mélange de 200µl d'échantillon et 200µl de phénol 5%. Après homogénéisation, 1ml d'acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96%), est rapidement introduit dans le milieu réactionnel. Les tubes sont ensuite incubés à 100°C pendant 5 mn, puis ils sont laissés 30 mn à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'absorbance est mesurée à 492 nm (Brudieux, 2007; Ruiz, 2005; Genestie, 2006).

#### 1.4.2 Dosage des protéines

La méthode de Bradford (1976) a servi à quantifier la concentration de protéines dans l'extrait brut des polysaccharides obtenus.

- **Principe**

En milieu acide, le réactif de Coomassie de coloration marron se lie aux protéines provoquant la formation d'un complexe de coloration bleue qui absorbe entre 465 et 595 nm. Une courbe d'étalonnage est tracée en utilisant du sérum albumine bovine (BSA) comme référence standard.

- **Composition du réactif de Bradford**

Bleu de Coomassie G-250..... 100 mg.

Ethanol absolu.....50 mL.

Acide phosphorique à 85%.....100 mL.

Compléter à 1000 ml avec l'eau distillée. Conservation pendant 3 semaines à 4 °C et à l'abri de la lumière.

- **Mode opératoire**

Dans des tubes en verre, il est additionné un volume 400ul de solution à doser, puis 2ml de réactif de coomassie. Le mélange est homogénéisé pendant 30 secondes. L'absorbance est mesurée à 595 nm après 2mn. La coloration est stable pendant une heure (Bradford., 1976).

## **1.5 .Extraction des lectines de l'algue *Ulva lactuca***

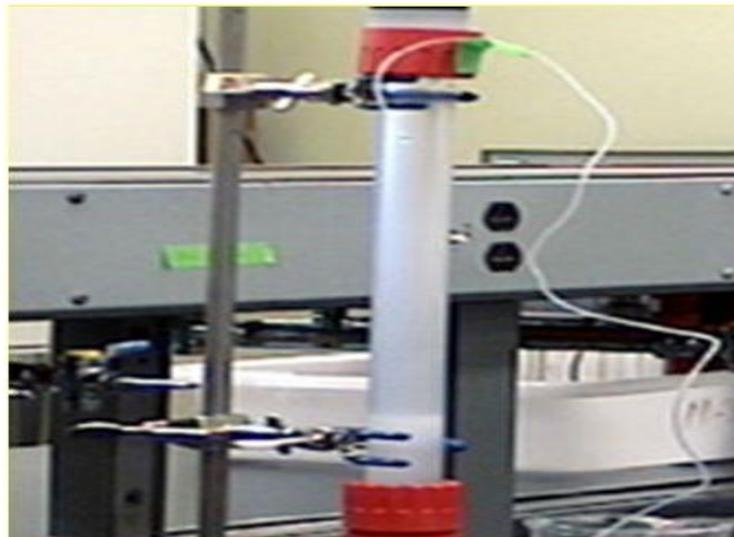
### **➤ Préparation de l'extrait protéique**

L'extraction des lectines a été suivie en utilisant la méthode de Shiomi *et al* (1981). la poudre sèche a été incubée dans 500 ml de tampon phosphate (0,75 M, pH 7,4) pendant environ 16 heures à 4 ° C. Le mélange a ensuite été centrifugé à 1200 tr / min pendant 15 minutes, les protéines du surnageant ont été précipitées par quatre paliers en utilisant le sulfate d'ammonium (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, le mélange a été laissé pendant environ 4 heures, puis centrifugé à 1200 tr / min pendant 45 minutes, le culot obtenu a été maintenu à 4 ° C et le surnageant a été mélangé avec 35 g de sulfate d'ammonium (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et laissé pendant 4 heures, puis ce mélange a été centrifugé à 1200 tr / min pendant 45 minutes, le culot obtenu a été maintenu à 4 ° C puis combiné avec celui préalablement obtenu et mis en suspension dans 200 ml de tampon phosphate (0,75 M, pH 7,4), les débris restants ont été enlevés en faisant passer la suspension à travers du papier filtre.

➤ *Chromatographie sur gel filtration (Sephadex G-200)*

Dans la chromatographie sur gel filtration, les molécules sont séparées selon leur taille et leur forme. Ici la phase stationnaire est constituée par des billes d'une substance hydratée spongiforme dont les pores correspondent à une zone relativement étroite de dimensions moléculaires.

Dans le présent travail, la phase stationnaire est constituée du gel de Sephadex G200 (Pharmacia). Ce gel possède un domaine de fractionnement situé entre 5 à 600 kDa. Une colonne d'une dimension de (50x2.5cm) a été préparée puis équilibrée avec du tampon phosphate (0,1 M, pH 7,2) jusqu'à stabilisation du débit à 0.5mL/min. Le volume mort ( $V_0$ ) de la colonne est déterminé par injection du bleu de dextran (103 kDa) à une concentration de 1 mg/mL.



**Figure 22 :** Colonne d'extraction Sephadex G-200.

La suspension a ensuite été appliquée sur la colonne de Sephadex G-200 (50 x 2,5 cm), l'absorbance à 280 nm a été utilisée pour estimer la teneur en protéines dans les éluats de la colonne et de calculer le rendement de l'extraction, les fractions exprimant le pic le plus important et montrant une activité hémagglutinante ont ensuite été combinées et dialysées contre de l'eau distillée. La fraction de lectines *U. Lactuca* (ULLF) a été récupérée pour les études *in vivo* et *in vitro*.

### 1.5.1. Test d'Hémagglutination

Le test d'hémagglutination est une méthode simple et facile pour obtenir des données sur la liaison au sucre et la spécificité d'une lectine. Une lectine active agglutine les érythrocytes en reconnaissant un hydrate de carbone sur la surface cellulaire et en formant un réseau réticulé en suspension. En ajoutant la lectine dans une plaque de microtitrage à 96 puits avec une quantité constante d'érythrocytes, l'activité de la lectine peut être observée.

Afin de détecter la présence des lectines, le test d'hémagglutination a été réalisé sur l'extrait protéique brut, ensuite sur les fractions obtenues après le passage sur la colonne contenant le gel de séparation de type sephadex G-200.

- **Préparation de la suspension d'hématies à 4% (v/v) pour le test d'hémagglutination**

Les prélèvements de sang ont été réalisés sur des rats, issus de l'animalerie de l'institut des sciences de la nature et de la vie, université des frères Mentouri, Constantine.

3 ml de sang ont été mis dans les tubes correspondants contenant 1 ml d'eau physiologique. Après agitation, le mélange a été centrifugé à 1000rpm pendant 5min. Les surnageants sont ensuite jetés et le culot d'hématies a été de nouveau mis en suspension avec de l'eau physiologique sous agitation. Cette opération a été reprise trois fois de suite sous les mêmes conditions. La suspension d'hématies a été préparée dans de nouveaux tubes à 4% dans l'eau physiologique.

## 2. Évaluation de l'activité antioxydante d'algue *Ulva lactuca*

### 2.1. Evaluation de l'activité antioxydante *in-vitro*

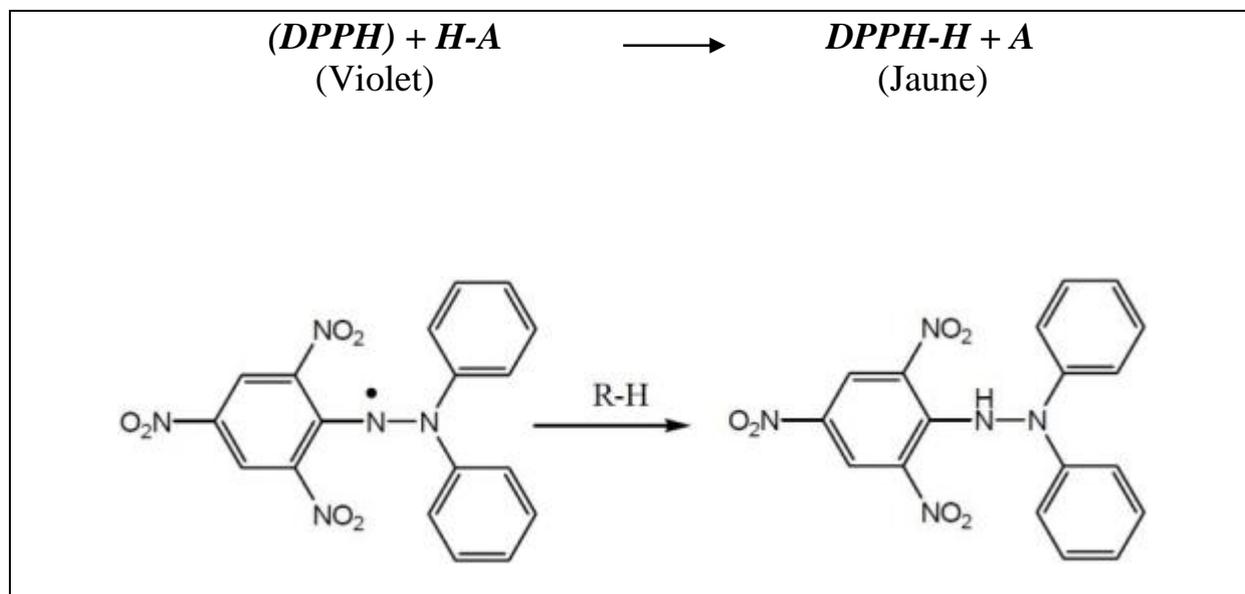
Beaucoup de tests standardisés évaluant l'activité antioxydante ont été retenus dans le cadre de cette étude.

#### 2.1.1 Effet anti-radicalaire par le test au DPPH°

- **principe**

Le composé chimique 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyle ( $\alpha, \alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante

des composés phénoliques (Blois, 1958 ; Brand-Williams *et al.*, 1995). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Figure 23). L'efficacité d'un antioxydant est proportionnelle à la réduction de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotométrie.



**Figure 23** : Principe de la technique du radicale DPPH

L'activité de piégeage des radicaux DPPH (Sigma-Aldrich, USA) des extraits a été mesurée comme décrit par Velazquez *et al.*, (2003). Brièvement, Une série de dilutions successives, dans le méthanol, sont réalisées. Pour chaque concentration, 1ml d'échantillon est ajouté à 1 ml de solution de DPPH+. (20 mg/ml dans du méthanol) fraîchement préparée. Après agitation, le mélange a été incubé pendant 15 min à l'obscurité à température ambiante, puis l'absorbance a été mesurée à 517 nm contre un blanc (mélange sans extrait). La quercétine (Sigma-Aldrich) a été utilisée comme témoin positif. Le pourcentage d'inhibition des radicaux libres DPPH+. L'activité antiradicalaire est exprimée en pourcentage de DPPH réduit selon la formule :

$$AAR (\%) = [(AC-AE)/AC] \times 100$$

AAR (%) : Pourcentage de l'Activité Anti-Radicalaire

AC : Absorbance en absence de l'extrait (contrôle négatif)

AE : Absorbance en présence de l'extrait

La concentration d'extrait réduisant 50% de DPPH (IC50) est obtenue à partir de la courbe donnant l'AAR en fonction de la concentration de l'extrait.

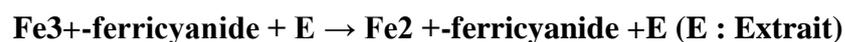
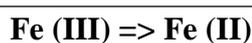
### 2.1.2. Le test du pouvoir réducteur

- *principe*

Le pouvoir réducteur détermine la capacité des antioxydants présents dans les extraits de plante à réduire le fer ferrique du complexe ferricyanide  $-\text{Fe}^{3+}$  en fer ferreux  $-\text{Fe}^{2+}$ . Cette réduction se traduit par une coloration verte dont l'intensité est proportionnelle au pouvoir réducteur. L'absorbance est lue à 700 nm.

La méthode utilisée est celle de Oyaizu (1986) et Topçu et ses collaborateurs (2008), avec quelques modifications. Ainsi, 2,5 ml de l'extrait sont mélangés à 2,5 ml du tampon phosphate (0.2M, pH 6.6) et 2,5 ml de ferricyanide de potassium (10mg/ml). Le mélange est incubé au bainmarie à une température de 50°C pendant 20 min, ensuite 2,5 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction puis les tubes sont centrifugés à 2790 rpm pendant 10min. Un aliquote de 2,5 ml du surnageant est combiné à 2,5 ml d'eau distillée et 0.5 ml d'une solution aqueuse de  $\text{FeCl}_3$  à 0,1%.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel est faite à 700nm contre un blanc préparé en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique. L'augmentation de l'absorbance est proportionnelle à l'augmentation du pouvoir réducteur.



**Figure 24** : réaction illustrant le pouvoir réducteur

### 2.1.3 Inhibition de la peroxydation lipidique (LPO induite par le système Fe<sup>2+</sup>/acide ascorbique)

- **Principe**

Le mélange réactionnel contenant l'homogénéat du foie de rat (0,1 ml, 25 % p/v) dans du Tris-HCl (30 mM), du sulfate d'ammonium ferreux (0,16 mM), de l'acide ascorbique (0,06 mM) et différentes concentrations de l'extrait dans un volume final de 0,5 ml a été incubé pendant 1 heure à 37 °C et la substance à réaction thiobarbiturique résultante (TBARS) a été mesurée à 532 nm (Aiyegoro *et al.*, 2010) Trolox a été utilisé comme référence. Les résultats ont été calculés, en pourcentage d'inhibition, selon l'équation suivante :

$$I \% = \frac{A_{blanc} - A_{échant}}{A_{blanc}} \times 100$$

### 2.1.4. Effet scavenger NO<sup>•</sup>

- **principe**

Le composé nitroprussiate de sodium est connu pour se décomposer dans l'eau à pH physiologique (7,2) produisant le NO<sup>•</sup> dans des conditions aérobies, le NO<sup>•</sup> réagit avec l'oxygène pour produire des espèces stables (nitrate et nitrite), dont les quantités peuvent être déterminées à l'aide du réactif de Griess (Marcocci *et al.*, 1994). Deux (2) ml de nitroprussiate de sodium 5 mM dissous dans 0,5 ml de solution saline tampon phosphate (pH 7,4) sont mélangés avec 0,5 ml d'échantillon à diverses concentrations. Le mélange est ensuite incubé à 25 °C. Après 120 min d'incubation, on retire 0,5 ml de la solution incubée et on mélange avec 0,5 ml de réactif de Griess [(1,0 ml de réactif acide sulfanilique (0,33% dans de l'acide acétique glacial à 20% à température ambiante pendant 5 min avec 1 ml de dichlorure de naphtyléthylènediamine (0,1% p / v)]. Le mélange est ensuite incubé à température ambiante pendant 30 min et son absorbance s'écoulant dans une cuvette est mesurée à 546 nm. Le pourcentage

$\%Inhibition = [(Ac - At) / Ac] \times 100$
--

d'inhibition du radical oxyde nitrique est calculée en suivant cette équation :

Ac : Absorbance à 546 nm du contrôle.

At : Absorbance à 546 nm de l'extrait testé.

## 2.2. Etude de l'activité antioxydante *in vivo*

- **Animaux de l'expérimentation**

Des souris albinos suisses mâles pesant 25 à 30g, issus de l'institut de pharmacie (université de Constantine) ont été utilisées dans l'étude. Toutes les expériences sur les animaux ont strictement respecté la charte sur l'éthique de l'expérimentation animale. Les animaux ont été maintenus dans des cages métalliques et maintenus dans des conditions habituelles de température (24-26 ° C) et d'humidité, avec des cycles lumière / obscurité. Ils ont été acclimatés pendant 15 jours. Les aliments ont été fournis sous la forme de pastilles sèches ainsi que de l'eau à volonté.

### 2.2.1. Etude de l'activité anti-ulcéreuse *in vivo*

- **Principe**

ce travail a été entrepris dans le but d'inspecter l'action anti-ulcéreuse des polysaccharides sulfatés extrait de l'algue verte *Ulva lactuca*. Les ulcérations gastriques sont induites expérimentalement (Kumar *et al.*, 2013) chez des souris mâles de 25 à 30 g par l'administration orale de l'éthanol. Nous avons examiné sur ce modèle le degré de protection de la muqueuse gastrique par ces extraits contre l'attaque de l'éthanol. Un produit pharmaceutique anti-ulcéreux : Ranitidine (*Ranitex*) a servi comme drogue de référence.

- **Modèle d'ulcère gastrique induit par l'éthanol**

Les souris ont été divisées en quatre groupes ; Chaque groupe se compose de six animaux. Tous Les animaux ont reçu un traitement pendant 3 jours.

➤ **Groupe 1** : Témoin (sain), eau physiologique p.o;

➤ **Groupe 2** : Témoin (éthanol).

- **Groupe 3:** Ranitidine 50 mg / kg de poids corporel, p.o;
- **Groupe 4:** ULPF 20 mg/kg de poids corporel, p.o
- Les ulcères gastriques ont été induits chez les souris par administration de 0.5 mL/100g d'éthanol à 97% v / v p.o.
- Les animaux étaient à jeun pendant 24 h avant l'administration de l'éthanol.
- ULPF, le témoin (eau physiologique) et la référence (Ranitidine) ont été administrés une dernière fois par voie orale, 30 minutes avant administration d'éthanol (90 % v/v) et le sacrifice a été réalisé 15 minutes après.
- L'estomac a été disséqué, le suc gastrique et son volume ont été mesurés. L'estomac était ouvert le long de la plus grande courbure, rincé sous un courant d'eau et fixé à plat sur un panneau.

Les érosions formées sur la partie glandulaire de l'estomac ont été inspectés à l'aide d'une loupe, comptées et chacune a reçu un score de sévérité sur une échelle de 0-3, en fonction de la nature de l'ulcère observé.

0 = rien à signaler (RAS)

1 = rougeur ou érosion superficielle de la muqueuse.

2 = ulcère profond ou nécrose transmurale.

3 = ulcère présentant des perforations.

- L'index de l'ulcère a été calculé à partir de ces observations selon la formule suivante (Adinortey *et al.*, 2013) :

$$UI = (\text{Nombre d'ulcère grade 1}) \times 1 + (\text{Nombre d'ulcère grade 2}) \times 2 + (\text{Nombre d'ulcère grade 3}) \times 3$$

A partir de ces résultats, les pourcentages d'inhibition des différents traitements et extraits ont été calculés en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = [(UI \text{ contrôle (+)} - UI \text{ prétraité}) / UI \text{ contrôle (+)}] \times 100$$

### 2.2.1.1. Evaluation des marqueurs du stress oxydant

- **Dosage du MDA**

- *Préparation de la fraction cytosolique*

Le tissu gastrique a été bien lavé avec le NaCl (0.9 %) et coupé en petits morceaux, pesés et homogénéisés (pour 1 g de l'estomac 9 mL de solution tampon phosphate (0.1 M pH 7.4) contenant KCl (1.15 %)). L'homogénat est ensuite centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min à 4°C, le surnageant récupéré a été centrifugé à 9600 rpm pendant 45 minutes à 4 °C. Le dernier surnageant (fraction cytosolique) récupéré est utilisé pour le dosage des marqueurs du stress oxydatif .

- *Méthode de dosage*

A 0.5 mL de la fraction cytosolique 10 % (KCl 1,15M) du tissu gastrique nous avons additionné 0.5 mL d'acide trichloracétique (TCA) 20% et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0.67 %. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 15 minutes, refroidi puis additionné de 4 ml de *n*-butanol. Après centrifugation de 15 minutes à 3000 tours/min, la densité optique est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre (Perkin Elmer, USA) à 530 nm. La quantité du MDA dans l'échantillon est exprimée en nm/gramme de tissu gastrique. Elle est obtenue grâce à une courbe standard réalisée avec du 1,1,3,3-tetraetoxypropane dans les mêmes conditions (Okahawa *et al.*,1979)..

- **Dosage du glutathion réduit(GSH)**

Le glutathion est un thiol intracellulaire le plus abondant présent dans toutes les cellules animales à des concentrations variables allant de 0.5 à 10 mM et de l'ordre du µM dans le plasma. Le glutathion se compose de trois aminoacides : l'acide glutamique, la cystéine et la glycine. De ces trois éléments, la cystéine est l'acide aminé essentiel à la synthèse du glutathion et la plus rare (Lahouel., 2005). Le glutathion se trouve dans la cellule sous deux formes : une forme oxydée « GSSG » et une forme réduite « GSH » représentant plus de 99% de la quantité total.

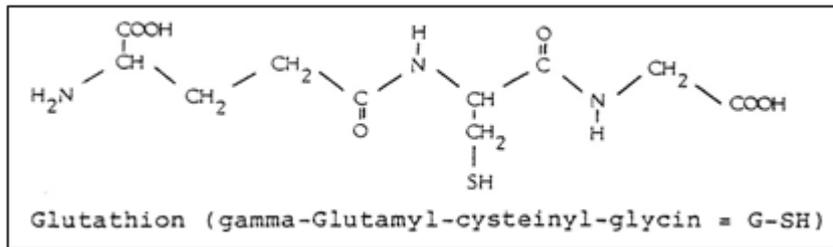


Figure.24 Formule chimique du glutathion.

- *Principe*

Pour le dosage du glutathion, la méthode colorimétrique par le réactif d'Ellman (DTNB) est la méthode la plus employée (Ellman, 1959). La réaction consiste à couper la molécule d'acide 5,5 dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) lequel à pH (8-9) alcalin présente une absorbance à 412 mn selon la réaction suivante:

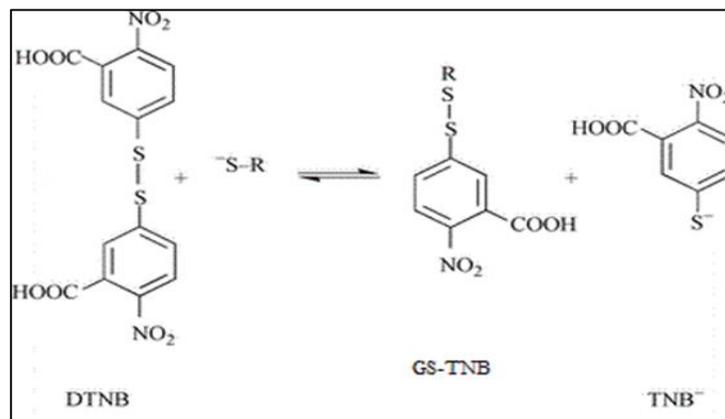


Figure : 24 Réaction d'Ellman

- *Méthode de dosage*

A 0.5 mL de la fraction cytosolique 10 % (KCl 1,15M) du tissu gastrique nous avons additionné 0.5 ml d'acide trichloracétique (TCA) 10 % puis centrifugé à 2000 tours/min pendant 5 minutes. Ensuite, à 1.7 mL du tampon phosphate 0.1 M, pH : 8 nous avons additionné 0.2 mL de surnageant et 0.1 ml du réactif d'Ellman 0.1M. La lecture de la densité optique est effectuée après 5 minutes à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA 10%. Les résultats sont déduits en se basant sur un coefficient d'extinction molaire de GSH 13100 cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>. Les

concentrations sont exprimées en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de protéine.

- **Dosage de l'activité de la SOD cytosolique**

L'activité de la SOD cytosolique est déterminée selon la méthode de Marklund, 1985.

- **Principe**

Le principe repose sur la capacité de l'inhibition de l'autoxydation du pyrogallol par la SOD.

- **Méthode de dosage**

Le dosage est réalisé dans un volume final de 3 mL. A 2.85 ml de tampon Tris HCL (0.1M, pH : 7.8) nous avons additionné 0.1 ml de la fraction cytosolique de l'échantillon (tissu gastrique), 25  $\mu\text{l}$  de la catalase (30  $\mu\text{mole/l}$  préparé dans un tampon phosphate 0.1M, pH : 9) et 25  $\mu\text{L}$  pyrogallol (24 mM préparé dans mM de HCl). Le changement de l'absorbance est mesuré à 420 nm après chaque minute dans un intervalle de temps de trois minutes.

- **Calcul**

L'activité de l'enzyme est exprimée en Unité/mg de protéine tissulaire (tissu gastrique). Une unité de l'activité de la SOD est définie comme l'enzyme qui causerait l'inhibition de 50 % de l'autoxydation de pyrogallol.

L'activité de l'enzyme est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition totale} = \frac{\text{Densité optique de blanc} - \text{Densité optique de l'échantillon}}{\text{Densité optique de blanc}} \times 100$$

$$\text{U de SOD / mg Pro} = \frac{\text{L'inhibition totale}}{n \times 50}$$

**n** : mg de protéines en mg présentent dans le volume de l'échantillon utilisé.

- **Dosage de l'activité de la catalase cytosolique**

L'activité de la catalase cytosolique est déterminée selon la méthode de Clairborne, (1985).

- **Principe**

Le principe repose sur la disparition de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  à  $25^\circ\text{C}$  par la présence de la source enzymatique dans la fraction cytosolique.

- **Méthode de dosage**

Le dosage est réalisé dans un volume final de 3 mL. A 2.95 mL d'une solution d' $\text{H}_2\text{O}_2$  19 mM (préparée dans un tampon phosphate 0.1M, pH : 7.4) nous avons additionné 50  $\mu\text{L}$  de la fraction cytosolique de l'échantillon. La réaction est contrôlée par une lecture continue du changement d'absorbance à 240 nm après chaque minute dans un intervalle de temps de deux minutes.

- **Calcul**

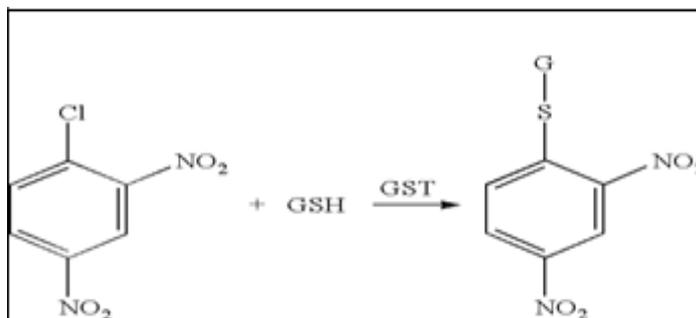
L'activité de l'enzyme est calculée en utilisant un coefficient d'extinction molaire :  $0.043 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ . Les résultats sont exprimés en U/mg de protéine gastrique (U:  $\mu\text{mol}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$  consommé par minute par mg de protéines).

• **Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST)**

La mesure de l'activité des GSTs a été réalisée par la méthode de Habig *et al.* (1974).

- **Principe**

Cette méthode consiste à fournir à l'enzyme un substrat en général du 1-chloro,2,4-dinitrobenzène (CDNB), qui se conjugue facilement avec glutathion sous l'action de nombreuses formes de GST. La réaction de conjugaison de ces deux produits entraîne la formation d'une molécule nouvelle qui absorbe la lumière à 340 nm de longueur d'onde.



**Figure 25** : Réaction de Conjugaison CDNB-GSH par la GST

- **Méthode de dosage**

La méthode utilisée dans cette étude consiste à faire agir les GSTs contenues dans l'homogénat sur un mélange (GSH + CDNB) à une température de 37 °C et à un pH de 6,5. La variation de la densité optique, due à l'apparition du complexe GSH-CDNB, est mesurée pendant 1 minute durant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm.

- **Calcul**

Les résultats sont déduits en utilisant un coefficient d'extinction molaire de CDNB : 9.6.cm-1 mM-1 et exprimés en U/mg de protéine de l'estomac (U:  $\mu$ mol de conjugué CDNB formé/min).

### 3. Etude de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*

#### 3.1. Etude *in vivo*

- **Animaux et conditions d'hébergement**

Les animaux de l'expérience sont des rats *Wistar* mâles (animalerie de l'institut de biologie) pesant entre 200-220 g. Tous les animaux sont d'un statut sanitaire EOPS (Exempts d'organismes pathogènes spécifiques). Dès leur réception, les rats sont placés aléatoirement en groupe de 6 dans des cages standards pour une période d'acclimatation (2 semaines) avant d'être utilisés dans les différentes expériences. Pendant cette période les animaux ont un accès libre à la nourriture et à l'eau (croquettes provenant de la société de production des aliments d'animaux, Ain Mlila) et sont maintenus dans une animalerie à température constante ( $22 \pm 2$ ) °C soumis à un cycle de lumière/obscurité..

- **l'œdème plantaire induit par la carragénine**

La recherche de propriétés anti-inflammatoires a été réalisée sur le modèle de l'œdème plantaire induit chez le rat par l'injection d'une suspension à 1 % (0,2 mL) de carragénine dans la patte droite; technique inspirée de celles décrites par winter (Winter *et al.*,1963, Adeyemi *et al.*, 2002). Les produits testés ont été administrés par injection intrapéritonéale 30 min avant l'injection de la carragénine. Les rats ont

été mis à jeun 16 heures avant le traitement et divisés en quatre groupes de six rats chacun.

- **Les groupes des animaux**

- **Groupe I** témoins : les témoins non traités ont reçu du 0.9 % NaCl (10ml/kg).
- **Groupe II** : traités par le Diclofénac, anti-inflammatoire de référence (10mg/kg).
- **Groupe III** : traités par la fraction des polysacchrides (ULPF ; 100 mg/kg)
- **Groupe IV** : traités par la fraction des lectines (ULLF .100 mg/kg)

L'évaluation de l'oedème a été suivie par l'enregistrement de l'épaisseur de la patte inflamée 0, 1, 3, 6 après l'injection de l'agent phlogogène. Pour chaque groupe traité, les épaisseurs moyennes obtenues à ces différents relevés ( $D_t$ ) ont été comparés à celui obtenu avant tout traitement ( $D_0$ ), permettant ainsi de calculer les pourcentages d'oedème (pourcentage d'inflammation), à partir de la formule suivante :

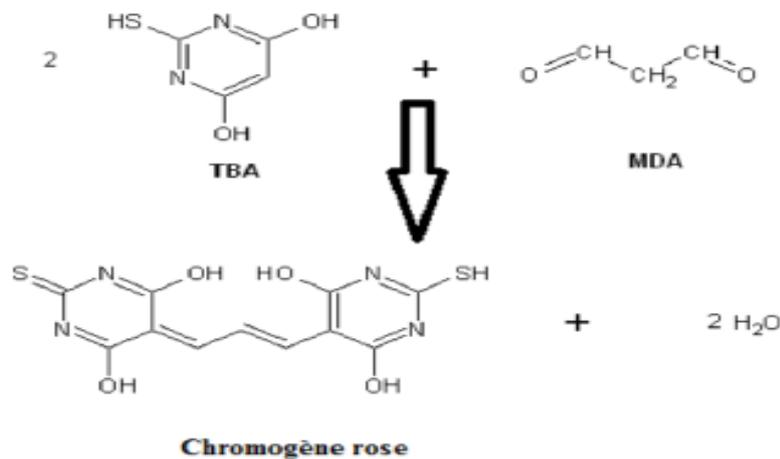
$$\%Inflammation = \frac{D_0 - D_t}{D_0} \times 100$$

### 3. 1.1. Dosages biochimiques

Au moment du sacrifice, la voûte plantaire de la patte droite inflamée est récupérée, rincée par l'eau physiologique salin 0.9 %, puis pesé et partagé en deux partie (sensiblement de poids égale); une des deux parties du tissu est additionné à la solution tampon phosphate 0.1M pH; 7.4 dans une proportion de (1V/10V) ,contenant du KCl 1,15 M, le mélange est homogénéisé à 1200 tours/minute par un ultra-turrax. L'homogénat est ensuite centrifugé à 4000 tours/minute pendant 10 minutes à 4 °C puis à 10000 tour /minute pendant 45 minutes à 4°C. La fraction tissulaire est récupérée et utilisée pour les dosages du taux de molonyldialdéhyde (MDA). L'autre partie du tissu est gardée dans un congélateur à -80°C.

### 3.1.1.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

Le malondialdéhyde (MDA) est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés sous l'effet des radicaux libres libérés au cours du stress. La réaction de dosage repose sur la formation en milieu acide et chaud (100 °C) entre le MDA et deux molécules de thiobarbiturique acide (TBA) donnant un pigment de couleur rose ayant une absorbance maximale à  $\lambda=532$  nm selon cette réaction :



### 3.1.1.2 Mesure de l'activité de myéloperoxydase (MPO)

L'accumulation des neutrophiles dans la patte des rats a été mesurée par l'évaluation de l'activité de la myéloperoxydase (MPO). Après 24 heures d'induction de l'inflammation les rats ont été sacrifiés par dislocation cervicale et les tissus des pattes derrières (50-100 mg) ont été recueillis et homogénéisés. L'activité de l'MPO dans les homogénats des pattes a été évaluée par la mesure du changement d'absorption à  $\lambda=450$  nm en présence d'*o*-dianisidine dihydrochlorure et 0.006% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selon le protocole de Bradley et ses collaborateurs (Bradley *et al.*,1982). L'activité MPO est calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire ( $1.13 \times 10^4$  cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>) de *O*-dianisidine oxydé. Les résultats sont exprimés en MPO U/mg de tissu dont l'unité (U) de l'activité MPO est définie par la conversion de 1  $\mu$ mol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau durant 1 min à 25 °C .

### 3.1.2. Étude histologique

Les petits morceaux de la surface plantaire des pattes derrières ont été pris 24 heures suivant l'injection intra-plantaire de la carragénine et ils ont été mis dans le formaldéhyde 10 % à pH 7,4 et stockés pour l'examen histologique. Les biopsies prises des pattes sont été inclus dans la paraffine, coupés (2 à 5  $\mu\text{m}$ ) puis subis une coloration avec l'hématoxyline-éosine.

## 3.2. Etude de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*

- **Lignée cellulaire utilisée RAW.264.7**

Les cellules macrophages de murine RAW264.7 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) ont été cultivées dans du DMEM contenant du bicarbonate et 10% de FBS, complété par 1% de pénicilline, 2% de sodium à 37 ° C, 5% de CO<sub>2</sub> et 71% d'humidité.

### 3.2.1. Test de Viabilité cellulaire

Les études de cytotoxicité ont été réalisées dans des plaques à 96 puits. Les cellules RAW 264.7 ont été grattées mécaniquement, plaquées à 2x10<sup>5</sup> / puits dans des plaques à 96 puits contenant 100  $\mu\text{l}$  de DMEM avec 10% de FBS inactivé par la chaleur et laissées croître pendant la nuit, puis incubées pendant 24 h.

Les cellules RAW ont été cultivées en présence de différentes concentrations de ULPF et ULLF dans des concentrations graduées (10, 30, 60  $\mu\text{g}$  / mL) dans un volume total de 1 mL pendant 1 heure après 1  $\mu\text{g}$  / mL de traitement LPS pendant 18 heures. Une solution de MTT (5 mg / ml) a été ajoutée et les cellules ont été incubées à 37 ° C pendant 4 heures. Le MTT cristallisé a été dissous dans du DMSO, et l'absorbance a été mesurée à 540 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque. La densité optique du formazan formé dans le contrôle a été prise comme 100% de la viabilité cellulaire.

### 3.2.2. Détermination des médiateurs de l'inflammation

Les cellules macrophages RAW ont été traitées avec la fraction ULLF et ULPF (10, 30, 60  $\mu\text{g}$  / mL) dans un volume total de 1 mL en présence de LPS (1  $\mu\text{g}$  / mL) pendant 24 heures et le milieu a été collecté pour l'analyse des médiateurs de l'immunité.

### 3.2.2.1. Détermination des niveaux de TNF- $\alpha$

La production de TNF- $\alpha$  a été mesurée par des essais immuno-enzymatiques en phase enzymatique (ELISA) tels que décrits par Martínez *et al* (2009). On a utilisé un TNF- $\alpha$  monoclonal anti-souris purifié (0.5 mg, BD Pharmingen) pour revêtir, à 2  $\mu$ g / mL à 4 °C pendant 16 heures.

Après lavage et blocage avec du PBS contenant 3% d'albumine de sérum bovin, des surnageants de culture ont été ajoutés à chaque puits pendant 12 h à 4 °C. Les molécules non-liées ont été éliminées par lavage, ensuite on a ajouté un TNF- $\alpha$  monoclonal anti-souris biotinylé (0,5 mg, BD Pharmingen) à 2  $\mu$ g / mL pendant 2 h. L'anticorps lié a été détecté par addition de l'avidine peroxydase pendant 30 minutes, suivie de l'addition de la solution du substrat ABTS. Les absorbances à 405 nm ont été prises 10 min après l'addition du substrat. Une courbe standard a été mise en place en utilisant diverses dilutions de TNF- $\alpha$  murin recombinant dans du PBS contenant 10% (FBS). La quantité de TNF- $\alpha$  dans les surnageants de culture a été déterminée par extrapolation des absorbances sur la courbe standard.

### 3.2.2.2. Détermination des niveaux d'oxyde nitrique (NO)

L'accumulation de NO dans les surnageants de culture a été testée en utilisant le réactif de Griess. L'accumulation de nitrite (NO<sub>2</sub>) dans les cellules traitées avec ULLF et ULLP a été utilisée comme indicateur de la production de NO dans le milieu. Le surnageant ( 100  $\mu$ L) de chaque puits a été recueilli dans tous les échantillons et mis en réaction avec 100  $\mu$ L du réactif de Griess , le mélange est ensuite incubé pendant 30 minutes à température ambiante dans le noir. L'absorbance a été mesurée à 540 nm. Les courbes standard ont été tracées à partir de normes de nitrite de sodium.

## 4. Test de l'activité immunomodulatrice *in vivo*

L'effet immunomodulateur des extraits ULPF et ULLF a été évalué et mesuré *in vivo* par le test de clairance de carbone (carbone clearance rate test) selon le protocole décrit par (Biozzi *et al.*, 1953).

Le test de clairance de carbone permet d'évaluer *in vivo* l'activité immunomodulatrice de certaines molécules sur le système réticulo-endothélial. Le système réticulo-endothélial (RES) est un système constitué majoritairement de cellules phagocytaires. Les cellules du RES jouent un rôle vital dans la clairance des particules de la circulation sanguine. Lorsque des particules de carbone colloïdales sous la forme d'encre sont injectées directement dans la circulation sanguine d'une souris, les cellules phagocytaires vont essayer de neutraliser ces particules. Cette activité phagocytaire exprimée par l'indice phagocytaire (K), est évaluée par la mesure du taux de particules de carbone présentes dans le sang dans un intervalle de temps bien précis. L'élimination des particules de carbone dans le sang est régie par équation exponentielle (Gokhale *et al.*, 2003). Dans le cas d'une immunostimulation, le taux de clearance des particules de carbone par les cellules phagocytaires sera très important, à l'inverse d'une immunosuppression ou le taux de clearance du carbone sera très faible.

#### 4.1. Animaux

Des souris albinos suisses mâles pesant 25 à 30g, issus de l'institut de pharmacie ont été utilisées dans l'étude. Toutes les expériences sur les animaux ont strictement respecté la charte sur l'éthique de l'expérimentation animale. Les animaux ont été maintenus dans des cages métalliques et maintenus dans des conditions habituelles de température (24-27 ° C) et d'humidité (60-65%) avec des cycles 12:12 lumière / obscurité. Ils ont été acclimatés pendant 15 jours. Les aliments ont été fournis sous la forme de pastilles sèches ainsi que de l'eau à volonté.

#### 4.2. Indice phagocytaire

ULPF et ULLF ont été testés pour leur indice d'activité phagocytaire chez des souris albinos femelle selon la méthode rapportée par Cheng *et al* (2008). Les rats ont été divisés en quatre groupes de 5 animaux chacun. Le groupe 1 (contrôle) a reçu 0,9% de NaCl par voie orale, le rat du groupe 2 et 3 ont reçu ULLF et ULLP à des doses de 50 mg / kg de poids corporel respectivement, le groupe 4 a été traité avec du lévamisole 50mg / kg. Après 48 heures, les souris ont été injectées, via la veine de la queue, une solution d'encre de carbone à une dose de 0,1 ml / 100 g, le mélange contenait 3ml d'encre de carbone noire, 4ml d'une solution saline et 4ml d'une solution de gélatine à 3%.

Des échantillons sanguins sont prélevés à partir de la veine rétro-orbitale grâce à des tubes capillaires à hématocrites après 5 et 15 min de l'injection. Les prélèvements sanguins (30µL) sont mixés avec 4 mL d'une solution de carbonate de sodium à 0.1% afin de provoquer la lyse

des hématies, et l'absorbance est directement mesurée au spectrophotomètre à 675nm (Singh *et al.*, 2012).

- Après cette étape, les souris sont immédiatement sacrifiées, le foie ainsi que la rate de chaque individu sont prélevés, lavés à l'eau physiologique puis pesés.
- L'activité phagocytaire est exprimée par l'indice phagocytaire K qui mesure toutes les fonctions du système réticulo-endothélial en contact avec le sang.
- Le taux de clairance est exprimé quant à lui par la période de demi-vie des particules de carbone dans le sang ( $t_{1/2}$ , min). Ces paramètres sont calculés au moyen des équations suivantes : (Biozzi *et al.*, 1953; Drissi *et al.*, 2006):

$$K = (\ln OD1 - \ln OD2) / (t2 - t1)$$

OD1 : densité optique au temps t1(5min).

OD2 : densité optique au temps t2 (15min).

---

---

# Chapitre IV:

## Résultats et discussion

---

---

## 1. Etude phytochimique

### 1.1. Criblage phytochimique préliminaire

Les résultats du criblage phytochimique préliminaire des extraits MeOH et EtOAc *U. lacuta* sont exposés dans le (Tableau 02). L'analyse a montré une présence importante des alcaloïdes et des stérols, des tannins, des saponines, des carbohydrates au niveau de la phase MeOH, tandis que l'extrait EtOAc a montré une bonne présence des flavonoïdes, des tannins, des saponines et des terpénoïdes.

**Tableau 02 :** Résultats des tests préliminaires des compositions chimiques des extraits MeOH et EtOAc d'*U. lacuta*

Groupes chimiques	MeOH /UL	EtOAc/. UL
Terpénoïdes	-	+
Stérols	++	-
Flavonoïdes	++	+++
Tannins	+++	+++
Alkaloids	++	+
Saponine	++	++
Carbohydrates	++	+

### 1. 2. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

Selon le (tableau 03), la fraction EtOAc a renfermé un taux de polyphénols de  $5.3 \pm 0.56$  mgGAE/g dont les flavonoïdes représentent  $32.41 \pm 1.63$  %, alors que la fraction MeOH a donné un taux de polyphénols de  $2.3 \pm 0.89$  mgGAE/g dont  $19 \pm 0.89$  % sont des flavonoïdes.

**Tableau : 03** Teneur en polyphénols et flavonoïdes dans les extraits MeOH et EtOAc issus d'*U. lacuta*

	Teneur en polyphénols (mgGAE/g d'extrait)	Pourcentage des flavonoïdes (%)
MeOH	$2.3 \pm 0.89$	$19 \pm 0.89$
EtOAc	$5.3 \pm 0.56$	$32.41 \pm 1.63$

### 1.3. Rendement des extraits bruts de polysaccharides

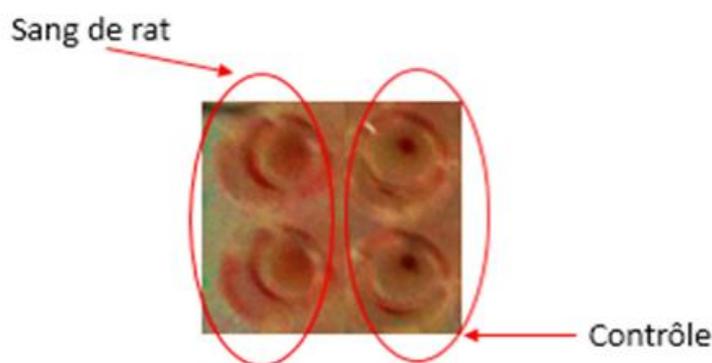
Le rendement massique de l'extrait brut de polysaccharides obtenu d'*U. lactuca* est de l'ordre de 20.31 %. Les oses totaux représentent 88.19 % de l'extrait brut alors que les protéines totales représentent 0.745 %, (tableau 04).

**Tableau 04 :** Rendement d'extraction et teneur en oses totaux et protéines totales

Le rendement massique de l'extrait brut de polysaccharides obtenu d' <i>U. lactuca</i>			
Fraction	Rendement %	Oses totaux %	Proteines totales %
ULPF	13.31	88.19	0.745

### 1.4. Extraction des lectines

Le test préliminaire d'hémagglutination réalisé sur l'extrait brut de *Ulva lactuca* a bien confirmé la présence de lectines



**Figure 26 :** Test d'hémagglutination de l'extrait brut de *Ulva lactuca*

Après précipitation de l'extrait brut de *Ulva lactuca* au sulfate d'ammonium et dialyse, l'extrait obtenu a ensuite été soumis à une chromatographie sur gel filtration Sephadex G200.

Les fractions présentant les plus hautes absorbances à 280 nm, en plus d'une activité hémagglutinante (figure 27), ont ensuite été regroupées et gardées au frais.

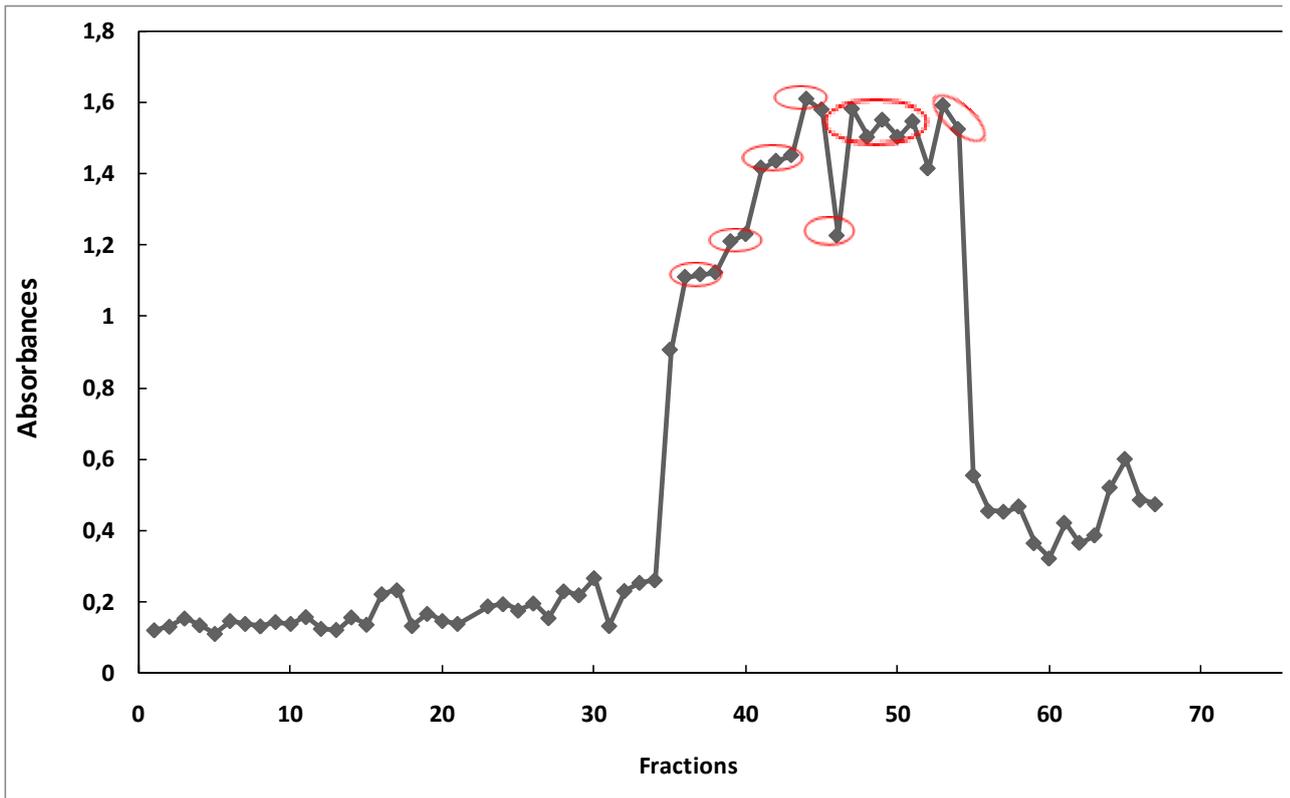


Figure 27 : Chromatogramme de la purification des lectines sur colonne gel de filtration.

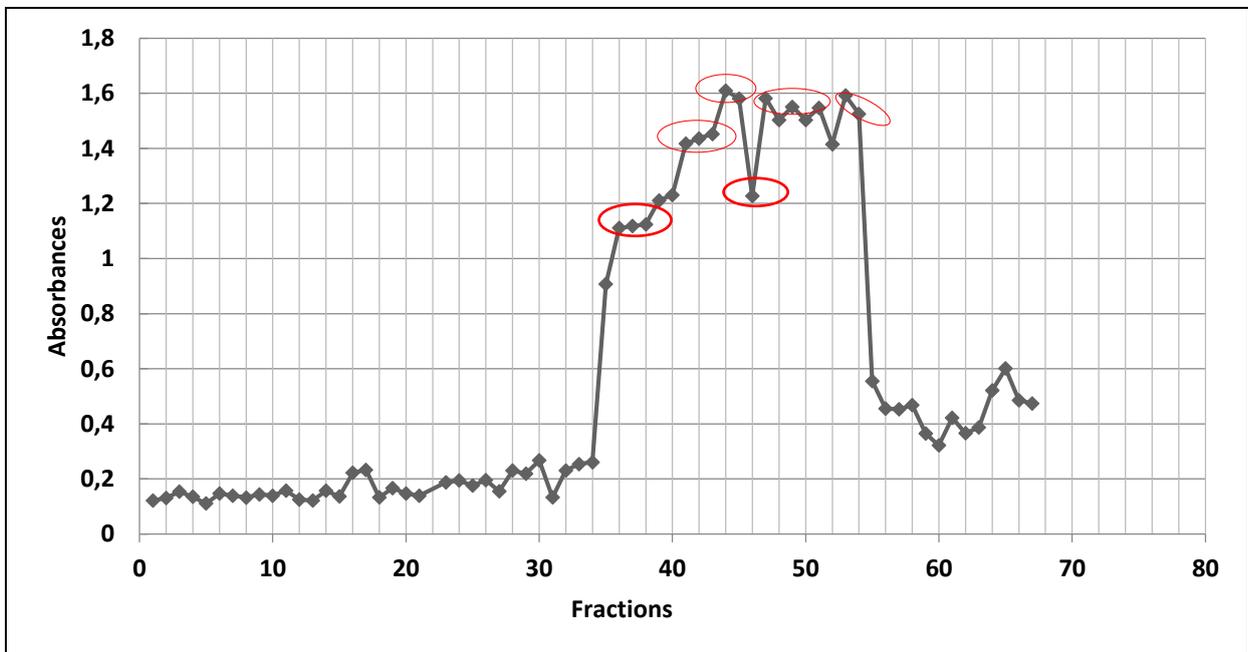
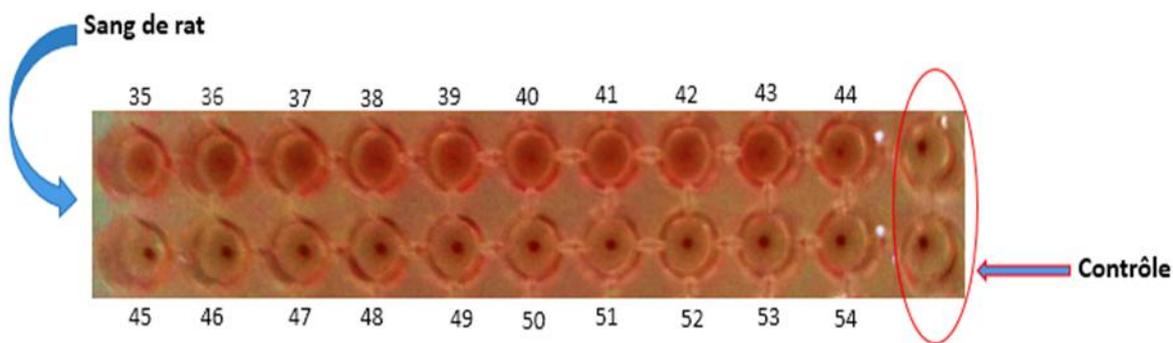


Figure 28 : Chromatogramme de la purification des lectines sur colonne gel de filtration.

La filtration de l'extrait de *Ulva alctuca* sur colonne de sephasex G200 et la lecture à 280nm a montré différents pics (Figure IV.1). Afin de confirmer la présence des lectines au niveau de ces tubes, un test d'hémagglutination a été effectué avec les hématies de rat selon le protocole décrit précédemment.

Les résultats obtenus par la suite ont réellement confirmé la présence de lectines avec une bonne hémagglutination (figure 29).



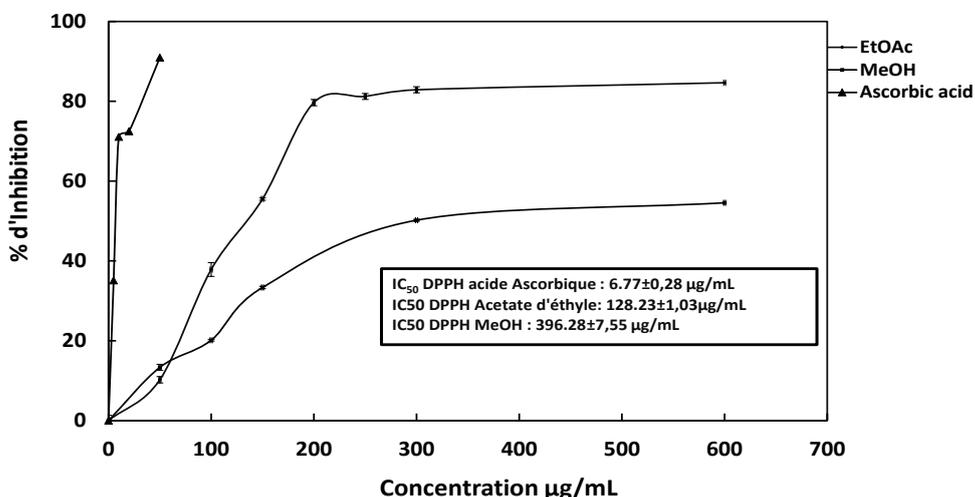
**Figure 29** : Test d'hémagglutination des différentes fractions avec le sang de rat

Extrait	Volume (ml)	Protéines (mg)	Rendement (%)
Extrait brut	230	1237	100
Fractions regroupées séphadex G200	35	514	41

**Tableau 5** : Résultats de la purification de l'extrait brut sur colonne séphadex G-200

## 2. Propriétés antioxydants des extraits MeOH et EtOAc d'*U. lacuta*

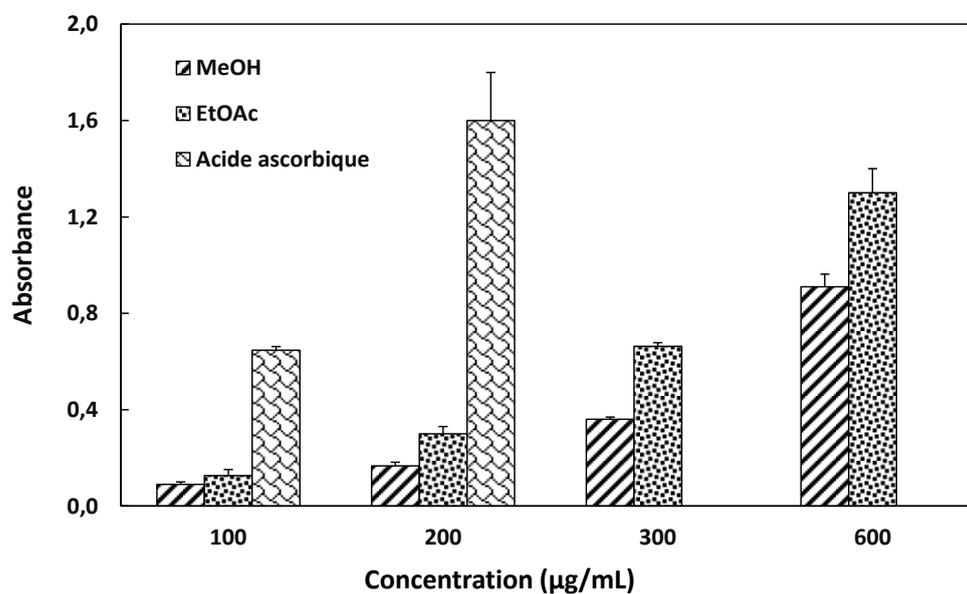
### 2.1. L'effet scavenger du DPPH°



**Figure 30 :** Activités scavenger du radical DPPH des fraction MeOH et At OAc d'*U. Lacuta*; (n = 3, p <0.05 ).

La méthode DPPH a reçu la plus grande attention en raison de sa rapidité, sensibilité, commodité et de sa reproductibilité (Nur Alam *et al.*, 2013). Durant ce test, l'activité de piégeage du radical DPPH par les deux extraits d'*U. Lacuta* s'est révélée augmenter de manière dose-dépendante. L'extrait AcOEt a montré un maximum de  $84,64 \pm 0,77\%$ , atteint à la concentration de  $600 \mu\text{g/mL}$  (figure 30). A la même concentration la phase MeOH n'a montré que  $54,56 \pm 0,23 \%$ . La phase AcOEt est plus active vis-à-vis le DPPH° ( $\text{IC}_{50} = 128.32 \pm 1.03 \mu\text{g/mL}$ ) comparativement à la phase MeOH ( $\text{IC}_{50} = 398.26 \pm 7.55 \mu\text{g/mL}$ ). Ces résultats se concordent avec le contenu flavonoïdique de chaque fraction évoquée dans le tableau 02. L'acide ascorbique a montré une activité scavenger très importante avec des valeurs ( $\text{IC}_{50} = 6.77 \pm 0.28$ ).

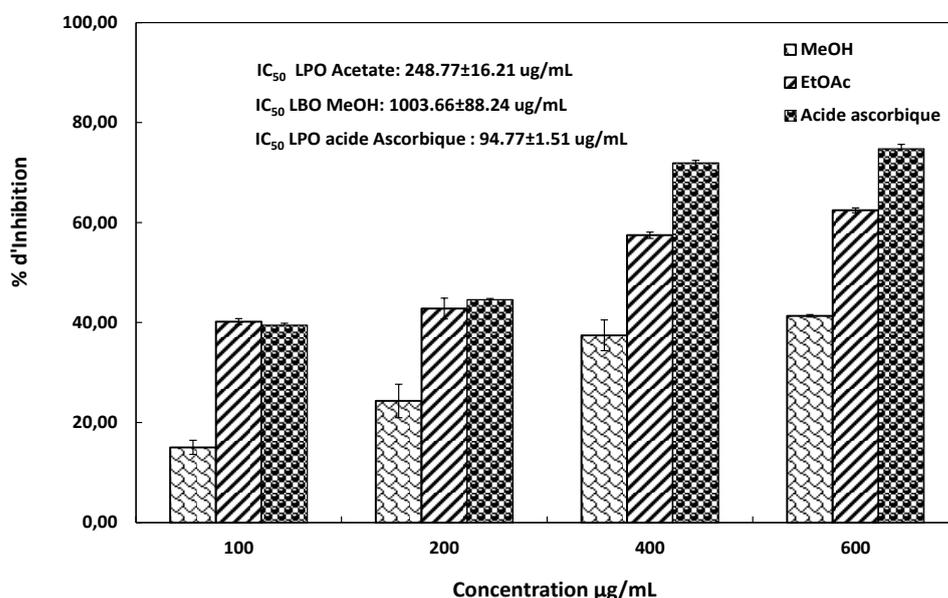
## 2.2. Le pouvoir réducteur



**Figure 31:** Le pouvoir réducteur des fraction MeOH et At OAc d'*U. Lacuta*; ( n = 3, p <0.05). d'*U. Lacuta* (n = 3, p <0,05).

La **figure 31** montre que l'extrait MeOH ( $0,91 \pm 0,05$ ; 600 µg/mL) a le pouvoir de réduire l'ion ferrique du ferricyanide, ceci se manifeste par l'augmentation de l'absorbance proportionnellement à la concentration. Cependant cet extrait reste moins efficace par rapport au AcOEt ( $1,30 \pm 0,10$ ; 600 µg/mL) et L'acide ascorbique ( $1,60 \pm 0,20$ ; 200 µg/mL) utilisé comme référence.

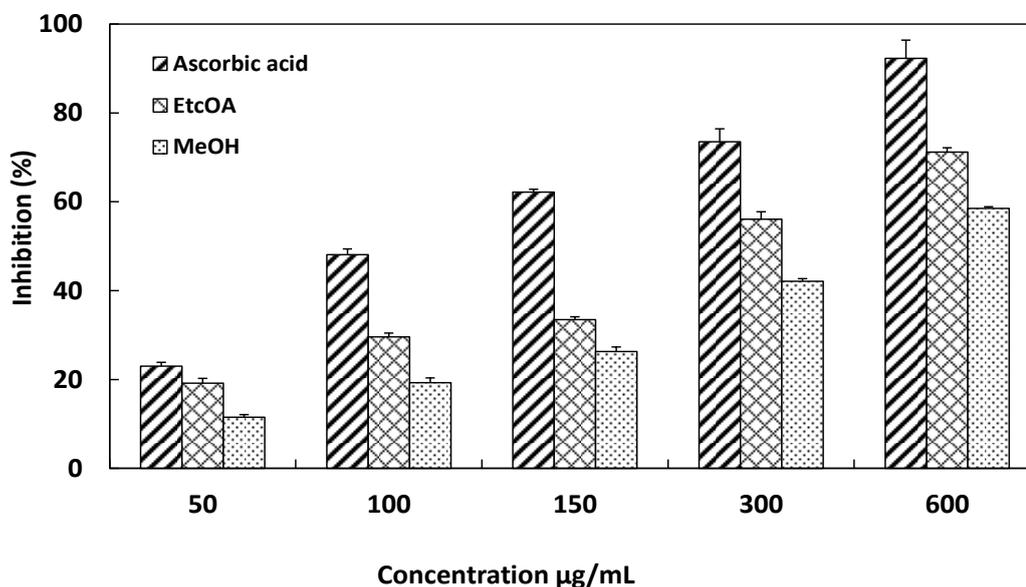
### 2.3. L'effet antiperoxydative



**Figure 32:** le pouvoir antiperoxydative des fraction MeOH et At OAc d'*U. Lacuta*; ( n = 3, p <0.05). d'*U. Lacuta*; (n = 3; p <0,05).

La **figure 32** montre que La capacité antiperoxydative de la fraction EtOAc ( $IC_{50} : 248.77 \pm 16.21 \mu\text{g/mL}$ ), avec une concentration dépendante, est la plus considérable comparativement à la fraction MeOH ( $IC_{50} : 1003.66 \pm 88.24 \mu\text{g/mL}$ ). A 600  $\mu\text{g/mL}$  les deux fractions ont manifesté inhibition de l'ordre suivant :  $62,46 \pm 0,48 \%$  ( EtOAc), et  $41,35 \pm 0,24 \%$  (MeOH). Quant à l'acide ascorbique, a atteint  $74,78 \pm 0,869 \%$ . Le pouvoir antiperoxydative dépendant de la présence des principes actifs est en concordance avec le contenu qualitatif et quantitatif de ces fractions illustré dans le **tableau 02**.

## 2.4. Activité scavenger du NO<sup>°</sup>



**Figure 33:** Activités scavenger du NO<sup>°</sup> des fraction MeOH et At OAc d'*U.Lacuta*; ( n = 3, p <0.05 ).

Au pH physiologique, le NO<sup>°</sup> issue de la solution aqueuse de nitroprussiate de sodium interagit avec l'oxygène pour produire l'ion nitrite. La capacité scavenger du NO<sup>°</sup> induite par les antioxydants est déterminée par la diminution de l'absorbance à 546 nm. La (figure 33) montre que les extrait EtOAc et MeOH d'*U.Lacuta* inhibe la formation du nitrite d'une façon dépendante de la dose. L'inhibition maximale du NO<sup>°</sup> (71,20±0,94%) a été observée chez l'extrait EtOAc à une concentration élevée de 600 µg/mL, tandis que l'extrait MeOH n'approuve comme d'inhibition maximale que 58,50±0,41 %, comparativement à l'acide ascorbique (92,30±4,08 %). La capacité neutralisant le NO<sup>°</sup> pourrait être due à la présence des constituants antioxydants qui entrent en compétition avec l'oxygène.

## 2.5. Discussion

Les algues marines peuvent représenter une source riche donnant des métabolites structurellement nouveaux et biologiquement actifs, ils ont l'avantage d'être une matière première moins coûteuse et d'un rendement important de métabolites secondaires. La capacité des algues à produire des métabolites secondaires d'intérêt potentiel biologique et thérapeutique a fait l'objet de plusieurs recherches (Rocha *et al.* 2007; Tabarsa, *et al.*, 2012). Dans notre

travail, la fraction d'EtOAc d'*U. lactuca* a exhibé une diversité structurale très importante en termes de métabolites secondaires comparativement à la fraction méthanolique. Il a été rapporté que les algues marines peuvent contenir plus de 600 métabolites secondaires (Banerjee *et al.* 2009 ; Awad, 2000). Les solvants utilisés dans l'isolement des polyphénols des algues marines peuvent avoir un impact sur le rendement d'extraction (Hagerman 1988,). Wang *et al.* (2009b) ont observé que le rendement d'extraction des extraits aqueux était supérieur à celui obtenu par l'acétone à 70 %, ce qui peut suggérer que la majorité des composants solubles dans les macroalgues sélectionnées sont d'une forte polarité. Les résultats obtenus dans notre étude indiquent clairement que les deux extraits de *U. lactuca* ont montré une présence phénolique et un contenu des flavonoïdique d'une variabilité quantitative importante. Dans notre étude, la teneur totale en composés phénoliques obtenue s'échelonne entre  $5.3 \pm 0.56$  et  $2.3 \pm 0.89$  GAE g<sup>-1</sup>. Il a été rapporté que la teneur en flavonoïdes des extraits des espèces appartenant au genre *ulva* varient entre 8,048 et 33,094 mg RE g (Kelman *et al.*, 2012). D'autres études ont rapporté que les taux en composés phénoliques totaux des macroalgues varient de 4 à 264,38 GAE/100 g poids frais, ceux des flavonoïdes se situaient entre 3,16 et 74,17 mg de quercétine/100 g poids frais. Meenakshi *et al.* (2009) ont montré que la teneur totale en flavonoïdes de l'extrait méthanolique était de l'ordre de 1,35 à 2,02 GAE/g chez *U. lactuca*. Des études précédentes ont révélé des changements notables dans les constituants chimiques corrélés aux changements saisonniers et aux conditions environnementales. Les composés phénoliques sont généralement plus solubles dans les solvants organiques polaires que dans l'eau; par conséquent, les agents d'extraction efficaces recommandés sont des mélanges aqueux de méthanol, d'éthanol et d'acétone (Waterman et Mole, 1994). L'environnement des cultures des algues peut avoir une incidence sur leur teneur en métabolites bioactifs. Il a été trouvé que la variabilité des teneurs en flavonoïdes peut être due aux changements des paramètres physicochimiques tels la salinité des zones sélectionnées (Arnold, *et al* 1995). L'exposition prolongée des algues aux radiations UV solaires peut se résulter en production des composés bioactifs, par exemple, il a été mentionné que les changements des conditions des cultures, telles les variations spatiales, peuvent modifier le contenu polyphénolique chez l'espèce algologique brune *Ascophyllum nodosum* (Lesser, 2006). Et il a été remarqué que les variations des teneurs polyphénoliques des algues brunes avaient une corrélation avec la disponibilité de l'azote, la saison, l'intensité lumineuse, la pression herbivore et la salinité.

Les résultats de l'activité antioxydante des deux fractions issues d'*U. lactuca* suggère que l'effet le plus actif aux pourrait être attribué aux constituants de l'extrait d'acétate qui a manifesté un effet scavenging potentiel vis-à-vis des radicaux libres. L'activité inhibitrice du DPPH° et du NO°, le

pouvoir réducteur, l'inhibition de la peroxydation lipidique (LPO) étaient plus prononcés dans le cas de l'extrait EtOAc. Ces résultats sont compatibles avec ceux mentionnés par Zakaria *et al.* (2011) qui ont révélé que les extraits d'acétate d'éthyle de *U. lactuca* présentaient un meilleur effet antioxydant. La même remarque a été également signalée par Ganesan *et al.* (2008) qui ont montré que la fraction d'acétate d'*Acanthophora spicifera* a montré une activité antioxydante totale plus élevée parmi toutes les fractions étudiées. Seulement les résultats obtenus par Suresh *et al.* (2008) représentent une controverse, ils ont rapporté que l'extrait méthanolique de l'espèce *Kappaphycus alvarezii* manifesta une activité antioxydante supérieure à celle de l'extrait acétate d'éthyle. Khan *et al.* (2008) ont signalé que les extraits méthanoliques des algues brunes ont montré une activité antioxydante meilleure par rapport à l'extrait méthanolique d'*U. lactuca*, or dans le cas de l'extraction effectuée par le *n*-hexane aucune activité n'a été retenue.

L'abondance des polyphénols chez les algues marines, varie selon l'habitat, le moment de la récolte, l'exposition à la lumière et la disponibilité des nutriments (Ragan et Glombitza 1986). Les études de Khairy *et al.* (2015) ont montré que les extraits d'algues issus de différents solvants ont présenté des activités antioxydantes variables. D'autres études déterminant la capacité antioxydante chez différentes trois espèces comestibles du genre espèces d'*Ulva*, à savoir *U. compressa*, *U. linza* et *U. tubulosa*, ont montré via le système acide linoléique que les trois espèces sont dotées d'une grande activité antioxydante. Par contre, l'espèce *U. compressa* a prouvé un meilleur effet scavenging du radical DPPH via la fraction méthanolique de (Márcia de Pádua *et al.* 2004). En général, les flavonoïdes sont les principaux contributeurs de l'activité antioxydante. Chez les espèces appartenant à *Ulva*, les tests de l'effet scavenger des radicaux libres ont révélé des propriétés antioxydantes vis-à-vis les sesquiterpènes de l'espèce d'*Ulva fasciata* (Devi 2011). Les composés phénoliques algologiques exercent leurs effets inhibiteurs vis-à-vis la peroxydation lipidique, via les groupements phénols transférant facilement un atome d'hydrogène au cycle peroxy lipidique et formant l'aryloxy, qui devient incapable à agir comme un transporteur de chaîne, se couple avec un autre radical, ainsi il éteint le processus radical (Li, *et al.*, 2009). Autrement dit, les composés phénoliques contenus dans l'*Ulva* sont capables de donner un atome d'hydrogène au radical libre, stoppant ainsi la réaction en chaîne de propagation au cours du processus d'oxydation des lipides (Rice-Evans, *et al.*, 1996). Les données de la littérature montrant l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de deux algues *Ulva lactuca* et *Sargassum wightii* (Meenakshi *et al.* 2009) établissent une corrélation positive entre les composés phénoliques et les activités antioxydantes. Ces corrélations ont été largement rapportées chez *Sargassum boveanum* (Zarah *et al.*, 2007), *Sargassum horneri* (Heo *et al.*, 2003) et *Fucus vesiculosus*.

### 3. Propriétés antioxydantes *in vivo*

#### 3.1. Activité gastroprotectrice (Modèle éthanol)

##### 3.1.1. Indices d'ulcère

L'éthanol à la dose de 0,5 ml/100g a montré des ulcères superficiels et profonds ainsi que des perforations chez les souris traités. Cependant, les animaux traités par l'extrait de polysaccharide (ULPF) à une dose de 20 mg/kg ont montré une réduction significative (55 % ;  $P < 0,05$ ) du nombre d'ulcères (Tableau 06). L'effet anti-ulcérogène de ULPF était comparable à celui de la ranitidine (80 %,  $P < 0,05$ ).

**Tableau 06** : Effet de l'extrait ULPF sur l'ulcère gastrique induit par l'éthanol.

groupe	Dose	Ulcer index	% ulcer inhibition
Group-ethanol	0,5ml/100g	5.663	-
Group -Ranitidine	50 mg/kg	1.166	80
Group-polysaccharides	20 mg/kg	2.833	55

#### 3.1.2. Effets de l'extrait ULPF sur les paramètres du stress oxydatifs gastriques

##### 3.1.2.1. Effets de l'extrait ULPF sur l'MDA et le taux du GSH

Le malondialdéhyde (MDA), représentant le produit majoritaire issu de la peroxydation lipidique, a augmenté chez les souris traitées par l'éthanol ( $1,62 \pm 0,64$  nmol/g). Les souris recevant l'extrait ULPF ont manifesté une protection significative de l'ordre de  $68\% \pm 3,05\%$  ( $p < 0,05$ ), ceux prenant la Ranitidine ont eu une protection de  $85\% \pm 4,29\%$  (figure 34).



Figure 34 : Effet gastroprotecteur de ULPF contre le stress oxydatif (MDA.GSH).

### 3.1.2.2. Effet sur le taux de CAT, GST ET SOD

La figure 35 montre que les paramètres de stress (activité enzymatique des CAT, GST, SOD) ont subi une diminution significative après administration de l'éthanol. Le prétraitement des souris par ULPF avait significativement augmenté le taux du rétablissement de ces paramètres : CAT (65 %), GST, (69 %), SOD (58 %). Le groupe traité par le Ranitidine avait manifesté un pourcentage de restitution de 83, 87 et 80% respectivement.

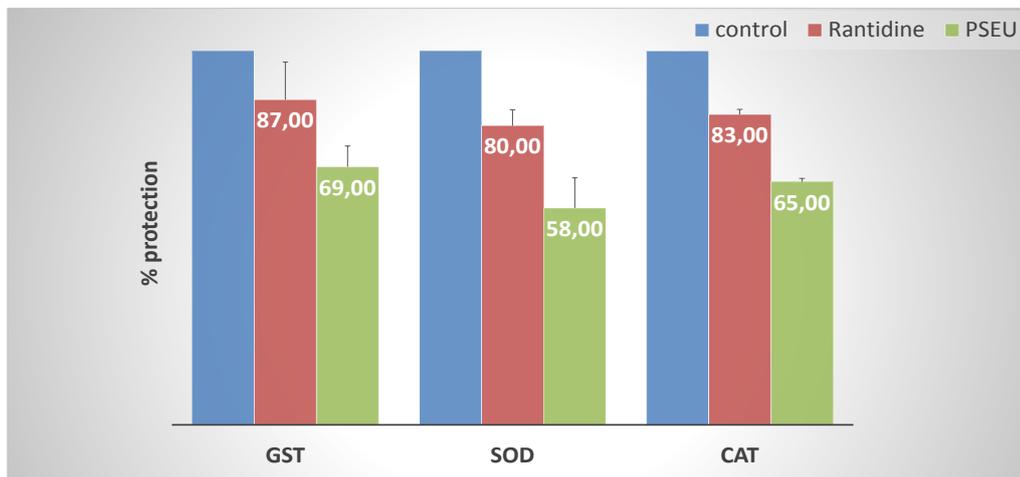


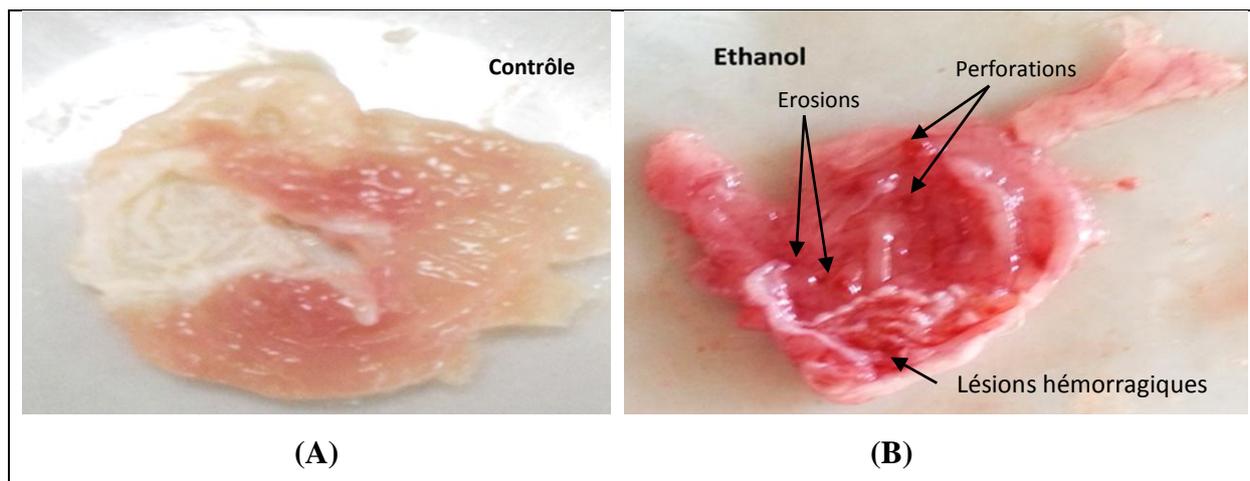
Figure 35 : Effet gastroprotecteur de ULPF contre le stress oxydatif (GST, SOD, CAT).

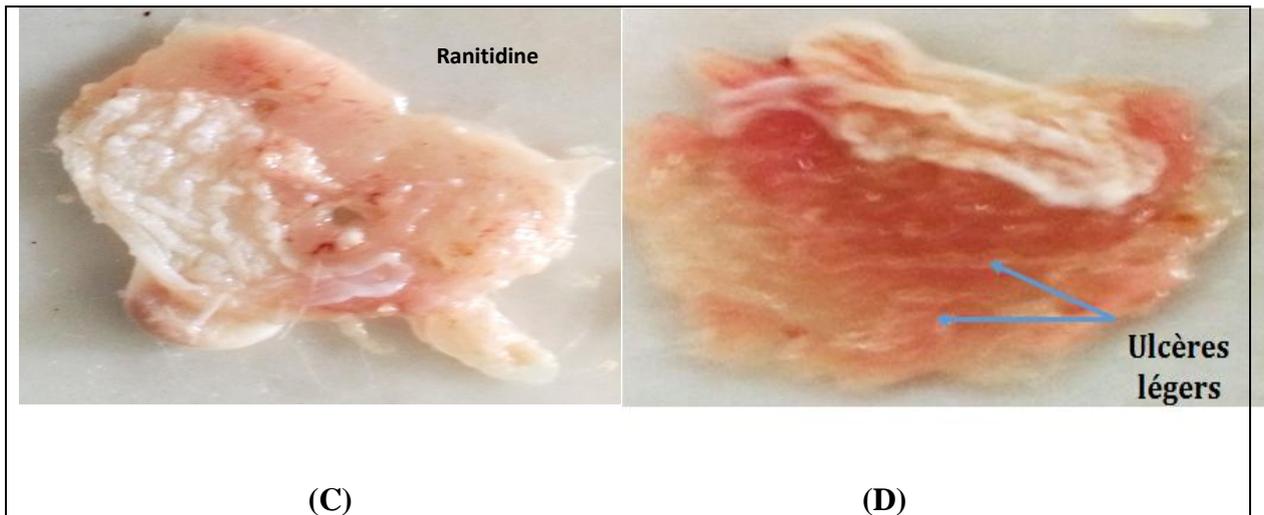
### 3.1.3. Etude macroscopique et microscopique

#### 3.1.3.1. Etude macroscopique

Chez le groupe du contrôle, on constate l'absence de lésions ou d'ulcérations, l'estomac a gardé un aspect macroscopique naturel. Des érosions multiples, des saignements sévères et des perforations se sont développées dans l'estomac glandulaire 30 min après l'administration d'éthanol. Les muscles associés à la muqueuse gastrique se sont présentés comme des bandes étirées de lésions hémorragiques de différentes tailles le long de l'axe longitudinal de la muqueuse gastrique. L'administration du Ranitidine à 50 mg/kg a montré une diminution conséquente des lésions et des dommages provoqués par l'administration de l'éthanol comparé au groupe témoin. Le prétraitement avec l'extrait de polysaccharides 30 min avant l'administration d'éthanol inhibe significativement les lésions gastriques, présence d'ulcères légers, une hémorragie interstitielle réduite.

L'administration gastrique de l'éthanol entraîne une rougeur macroscopique de la membrane muqueuse, lésions hémorragiques et une réduction significative de la quantité de mucus a été observée. Nous avons également observé une augmentation significative de la quantité du mucus gastrique chez les rats traités par les polysaccharides comparé au groupe de l'ulcère EtOH. L'estomac de tous les rats traités avec les polysaccharides n'a révélé qu'une légère congestion, la forme de l'estomac était normale



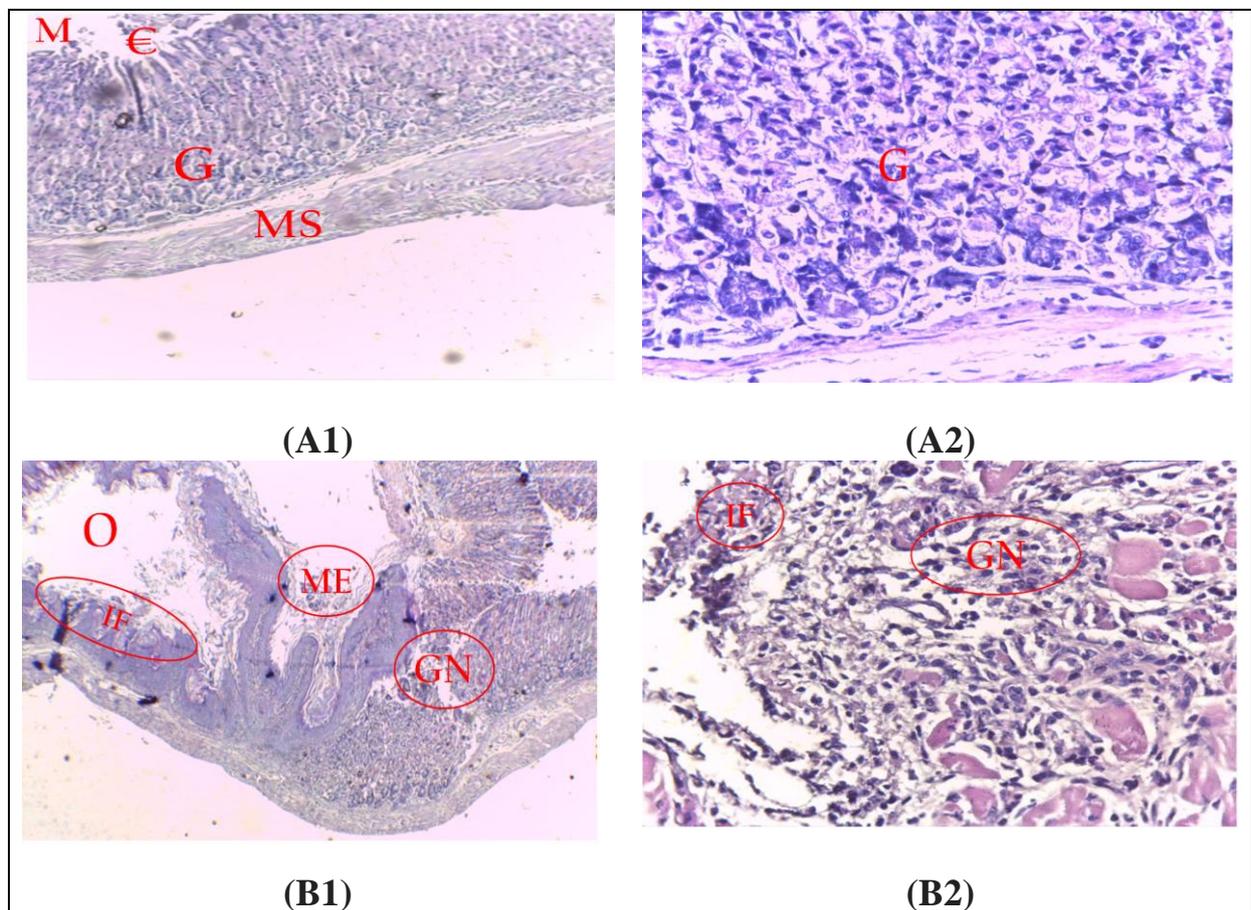


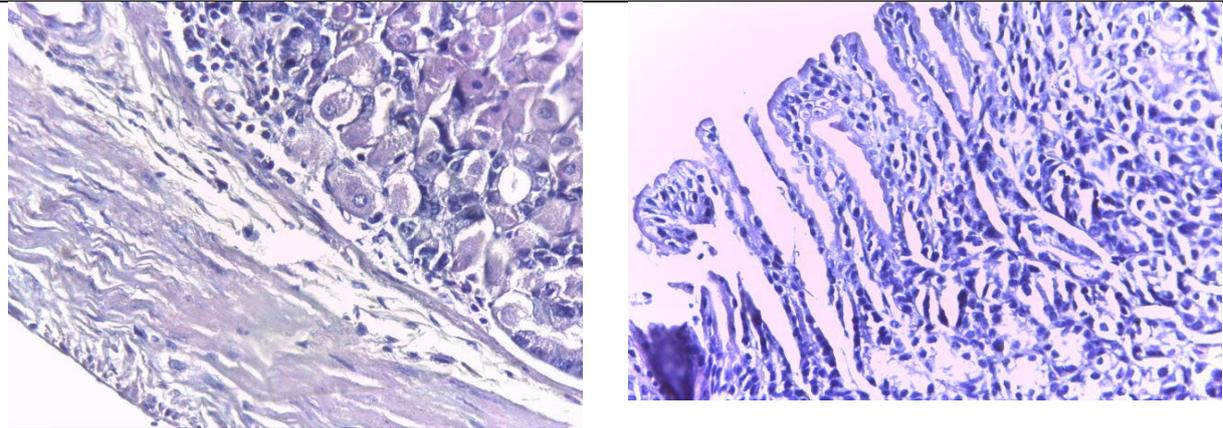
**Figure 36 :** L'aspect macroscopique de l'estomac témoins chez les souris traités témoins et traités.

- A. Groupe - témoin :** absence de lésions ou d'ulcérations, l'estomac a gardé un aspect macroscopique naturel
- B. Groupe - éthanol (-) :** Des érosions multiples, des saignements sévères et des perforations développés dans l'estomac glandulaire 30 min après l'administration d'éthanol. Les muscles associés à la muqueuse gastrique apparaissent comme des bandes étirées de lésions hémorragiques de différentes tailles le long de l'axe longitudinal de la muqueuse gastrique,
- C. Groupe-Ranitidine (50 mg/kg) (+):** Une diminution conséquente des lésions et dommages provoquées par éthanol
- D. Groupe-polysaccharides (20 mg/kg) :** inhibition significative des lésions gastriques, présence d'ulcères légers, une hémorragie interstitielle réduite.

### 3.1.3.2. Etude microscopique

La **figure 37** (40X et 100X) montre que l'architecture cellulaire est homogène chez le groupe témoin, il n'y a aucune perturbation et aucune d'infiltration des neutrophiles. L'administration d'éthanol a entraîné une perturbation significative de l'intégrité de la desquamation épithéliale de la muqueuse gastrique, une vasodilatation locale(O), une hémorragie(H) et une infiltration importante de cellules inflammatoires (IF) dans la muqueuse, nécrose au niveau des glandes **figure 37. B**). Le groupe de souris traitées par les polysaccharides (**figure 37 C**) a manifesté un degré modéré de lésions et un infiltrat inflammatoire moins intense. Chez le groupe des souris recevant le Ranitidine ; (**figure 37. D**), on observe une architecture cellulaire conservée, une absence quasi-totale de lésions, et un infiltrat inflammatoire moindre par rapport au groupe éthanol





(C)

(D)

**Figure 37 :** Photomicrographie histopathologique de l'estomac. L'effet protecteur par les polysaccharides (20 mg/kg) vis-à-vis la gastrite induite par l'éthanol. A (témoin) : Architecture cellulaire homogène, aucune perturbation et une absence d'infiltration des neutrophiles.; B (éthanol) : L'administration d'éthanol a entraîné une perturbation significative de l'intégrité de la desquamation épithéliale de la muqueuse gastrique, une vasodilatation locale (O), une hémorragie (H) et une infiltration importante de cellules inflammatoires (IF) dans la muqueuse ,nécrose au niveau des glandes; C (éthanol + polysaccharides) : Un degré modéré de lésions et un infiltrat inflammatoire moins intense est observé chez ce groupe; D (éthanol + Ranitidine) : Architecture cellulaire conservée, absence quasi-totale de lésions, et un infiltrat inflammatoire moindre par rapport aux group- éthanol.

### 3.1.4. Discussion

Il est largement admis que l'ulcère gastrique résulte d'un déséquilibre entre les facteurs défensifs et agressifs. Les principaux facteurs agressifs comprennent l'acide, la pepsine, *Helicobacter pylori* AINS, éthanol, ROS, tandis que les principaux facteurs défensifs sont la mucine, le bicarbonate, l'oxyde nitrique et les facteurs de croissance (Sumbul *et al.*, 2010; Kansara et Sakhreliya, 2013). La consommation excessive d'alcool peut induire une gastrite, des érosions gastriques hémorragiques, un œdème muqueux, une exfoliation cellulaire et une infiltration de cellules inflammatoires (Hussain *et al.*, 2015). L'éthanol est bien connu comme agent nécrosant puissant qui détruit les facteurs défensifs de la muqueuse, conduisant à l'épuisement du mucus de la paroi gastrique (Wallace, 2001). Il est également rapporté que l'exposition aiguë de la muqueuse gastrique de rats à l'éthanol peut entraîner des lésions gastriques similaires à celles qui se produisent dans l'ulcère gastrique ; par conséquent, les ulcères gastriques induits par

l'éthanol ont été largement utilisés pour l'évaluation de l'activité gastro-protectrice (Boligon *et al.* , 2014).

Dans la présente étude, on a observé que l'administration de l'éthanol à des souris provoquait des lésions macroscopiques dans le tissu gastrique, telles que la perte de couleur normale et du mucus avec la présence de pétéchies, hémorragie et œdème. Ces lésions sont probablement liées à la déplétion du mucus et à un effet constrictif sur les veines et les artères de la muqueuse gastrique, entraînant congestion, inflammation et lésion tissulaire. Afin de confirmer les résultats de l'effet antiulcéreux, les estomacs ont également été évalués en utilisant un examen histopathologique. L'observation histologique des estomacs chez les animaux en bonne santé (animaux non traités) n'a montré aucuns dommages, alors que les rats exposés à l'éthanol présentaient des lésions au niveau gastrique. La lésion histopathologique causée par l'administration d'éthanol est caractérisée par un décollement sévère de l'œdème de l'épithélium de surface, la formation de lésions gastriques et l'hémorragie, ainsi que le processus inflammatoire caractérisé par l'infiltration neutrophiles. Le traitement par des extraits d'ULPF a inversé l'effet néfaste de l'éthanol en préservant l'épithélium et le système vasculaire. Cet effet se traduit par une diminution de l'indice d'ulcère et un pourcentage élevé de protection. L'ulcère gastrique induit par l'éthanol est étroitement liée à l'augmentation du taux des ROS. L'effet ulcératif des ROS est contrôlé par le système antioxydant endogène composé de systèmes enzymatiques (SOD, CAT, GSH, GPx) et non-enzymatiques, tels que le GSH, la vitamine C et la vitamine E (Bonamin *et al.*, 2014).

Le GSH et la CAT sont la première ligne de défense contre les ROS. Le GSH est un antioxydant intracellulaire important qui protège la muqueuse contre les lésions provoquées par les ROS (Sidahmed *et al.* 2013). La CAT convertit les radicaux peroxyde ( $H_2O_2$ ) en eau (Kwiecien *et al.*, 2002). La SOD joue un rôle catalyseur de la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire. L'activité du glutathion peroxydase (GPx) est de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur (Delattre *et al.*, 2005).

Les systèmes antioxydants non-enzymatiques endogènes incluent de nombreux thiols dont le majoritaire est le glutathion, largement présent sous forme réduite, qui est capable de réagir avec les radicaux  $HO^*$ ,  $RO_2^*$ ,  $RO^*$ ,  $1O_2$ ,  $ONOO^-$ , des radicaux centrés sur le carbone, mais aussi l'acide hypochloreux  $HOCl$ .

Pour évaluer le stress oxydatif de l'ulcère gastrique induit par l'éthanol chez la souris, plusieurs paramètres oxydants et antioxydants ont été évalués. Les résultats de la présente étude ont montré que l'administration d'éthanol induisait un stress oxydatif important, comme en témoignent la peroxydation lipidique et la diminution de la capacité antioxydante, due à la baisse du taux de GSH et à l'atténuation des activités de la CAT et la SOD. Le traitement par ULPF a significativement diminué le taux de MDA et a augmenté celui du GSH, CAT et SOD. L'extrait présente également une bonne activité antioxydante, comme en témoignent les tests antioxydants *in vitro*, tels que le DPPH et le pouvoir réducteur. Ceci suggère que les effets gastroprotecteurs de *U. lactuca* sont dûs, au moins en partie, à son activité antioxydante. En fait, plusieurs constituants phytochimiques tels que ceux présents dans *U. lactuca* et qui ont fait partie de cette étude (polysaccharides) possèdent des propriétés antioxydantes et donc, protègent l'estomac contre l'ulcérogénèse (Huimin *et al.*, 2006; (Jinze *et al.*, 2016; Slovis *et al.*, 2017).

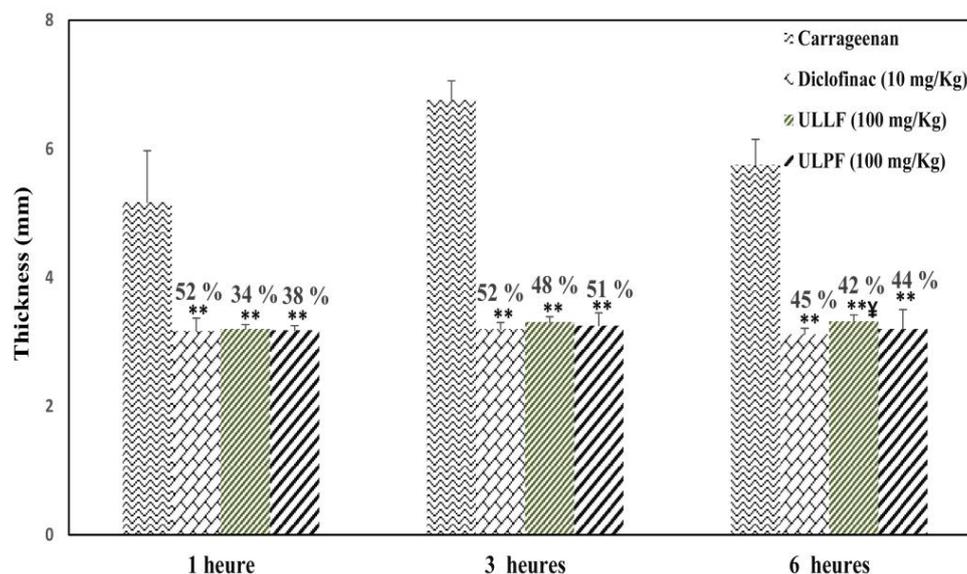
La barrière de la muqueuse gastrique joue un rôle crucial dans la protection contre l'ulcère gastrique. Les substances ulcérogènes induisent la dissipation de la couche de gel de mucus et provoquent ainsi une ulcération (Al-Batran *et al.*, 2013; Adzu *et al.*, 2015). Dans la présente étude, un prétraitement avec ULPF dans le modèle d'ulcère induit par l'éthanol, a augmenté de manière significative la teneur en mucus gastrique, indiquant que la gastroprotection de ULPF est également médiée par la conservation de la couche du mucus gastrique. D'autres mécanismes possibles de protection gastrique pourraient inclure la voie de la cyclooxygénase, la voie nitrogénique, l'inhibition de la sécrétion gastrique et le renforcement du flux sanguin vers la muqueuse. Une étude similaire a été réalisée par Senthil *et al.* (2013), elle porta sur les algues *Turbinaria ornata*, *Gracillaria crassa* et *Laurencia papillosa* sélectionnées sur la base de criblages préliminaires ainsi que sur leurs molécules bioactives extraites à l'acétone et évaluées pour leurs activités antiulcéreuse, cicatrisante et hépatoprotectrice. *L. papillosa* a montré le plus haut niveau d'activité de protection gastrique, comparable à la ranitidine standard. *G. crassa* et *L. papillosa* ont montré une activité cicatrisante marquée. *G. crassa* a aussi montré un effet marqué sur les enzymes du marqueur sérique indiquant une activité hépatoprotectrice importante. Les propriétés remarquables de cicatrisation des plaies et d'hépatoprotection de *G. crassa*, en plus de l'activité antiulcéreuse près de *L. papillosa*, étaient révélatrices de son potentiel d'examen ultérieur. D'autres études concernant *Gracillaria changi*, une

algue rouge comestible, ont montré que son extrait méthanolique possède des propriétés anti-inflammatoires, gastroprotectrices et anti-ulcérogènes (Shu *et al.*, 2013).

## 4. Etude de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*

### 4.1. Modèle d'inflammation aiguë : œdème induit par la carragénine

L'œdème de la patte de rat, comme modèle standard d'inflammation aiguë, a été utilisé pour tester l'activité anti-inflammatoire d'ULPF (fraction des polysaccharides) et ULLF (fraction des lectines). L'injection sous-plantaire de  $\lambda$ -carragénine (1%) a induit un gonflement progressif de la patte du rat ( $5,17 \pm 0,8$  mm) qui a atteint un niveau maximal à la troisième heure ( $6,76 \pm 0,3$  mm) (figure 38). Un effet anti-œdème significatif des phases ULPF et ULLF a été observé à 1 heure (34% - 38%), 3 h (48% - 51%), 6 h (42% - 44%), l'effet anti-œdème de l'ULPF et de l'ULLF a été significativement ( $P < 0,01$ ) plus prononcé à 3 heures, cet effet est clairement comparable au diclofénac-sodium (52%) (figure 38).

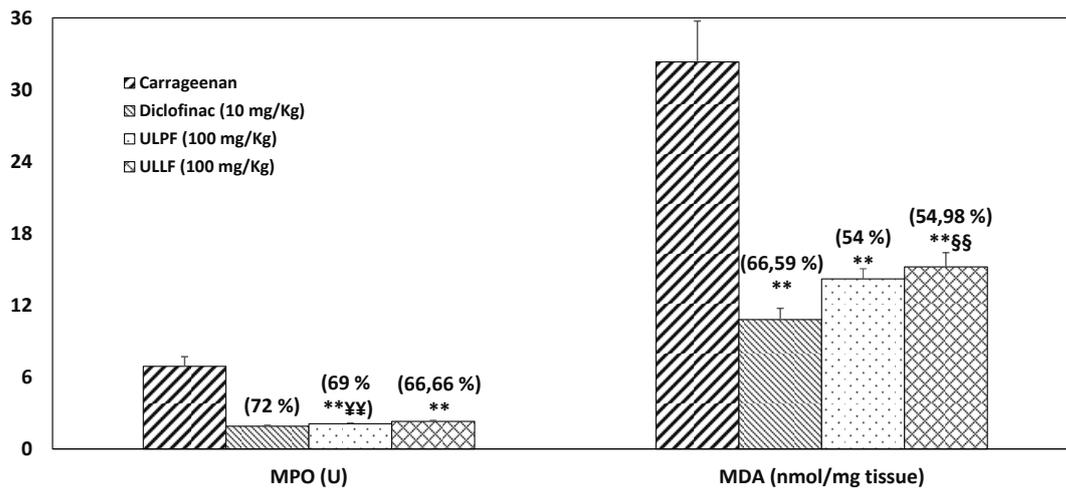


**Figure 38 :** Réduction de l'œdème plantaire induit par la carragénine en présence des extraits ULPF et ULLF, ( $n = 6^*$ :  $< 0,05$ ,  $** p < 0,01$ ).

#### 4.1.1. Taux du MDA et du MPO dans l'œdème des pattes

Les niveaux de MDA et MPO ont été testés après 6 heures de l'injection de carragénine. Les effets des phases ULPF et ULLF sur les niveaux de MDA et de MPO sont illustrés dans la (figure 39). L'injection de carragénine dans la patte arrière du rat a provoqué une augmentation marquée ( $32,33 \pm 3,4$  nmol/mg de tissu) des taux de MDA. Les deux phases ULPF et ULLF (100 mg / kg) ainsi que le diclofénac-sodium (mg/kg) ont diminué d'une manière hautement significative, ces taux à un pourcentage de 54 % et 52,98 %, 66,59 % respectivement. Le traitement par la carragénine s'est également traduit par une

augmentation significative de l'activité de MPO dans le tissu de la patte du rat ( $6,9 \pm 0,8$  U/mg de tissu). La diminution de l'activité de MPO chez le groupe traité par la phase ULPF (69 %) était significativement supérieure par rapport au groupe traité par la phase ULLF (66,66%). Dans le cas du diclofénac-sodium (10 mg/kg) la diminution de l'activité MPO atteint 72 %

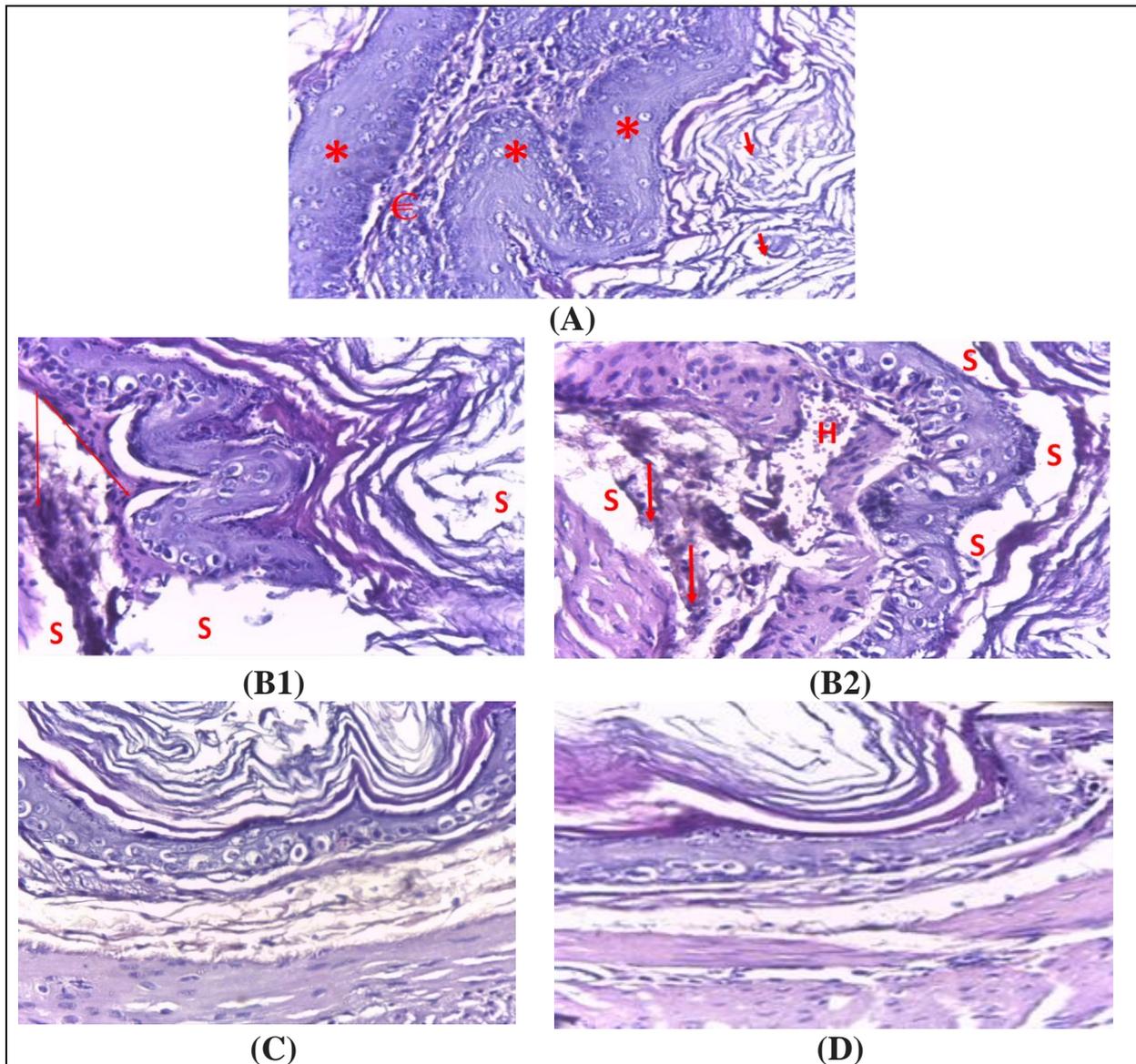


**Figure39 :** Taux du MDA et du MPO dans l'œdème des pattes en présence des extraits ULPF et ULLF, (n = 6, \*: <0,05, \*\* p<0,01).

\* : Comparaison de tous les groupes contre le groupe controle (\*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01),  
 ¥ : Comparaison de ULPF et ULLF contre le groupe diclofénac ( ¥: p < 0.05, ¥¥: p < 0.01),  
 § : Comparaison de ULPF contre ULLF : (§: p < 0.05, §§: p < 0.01),  
 les valeurs entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition.

#### 4.1.2. Etude histopathologique

L'analyse histopathologique de l'œdème de la patte des rats induit par le carragénine 24 heures après l'induction de l'inflammation (100X), a révélé des altérations tissulaires très importantes. Ces dommages se récapitulent par une spongieuse, une hyperplasie épidermique et une infiltration des cellules inflammatoires (**Figure 40. B1 et B2**). Les pattes des rats prétraités par es phases ULPF et ULLF (100 mg / kg) et le diclofinac-sodium (10 mg / kg) ont présentés moins de lésions histopathologiques (**Figure 40 C et D**).



**Figure 40 : monographies** de l'œdème de la patte des rats induit par le carragénine après l'induction de l'inflammation.

**A** : contrôle.

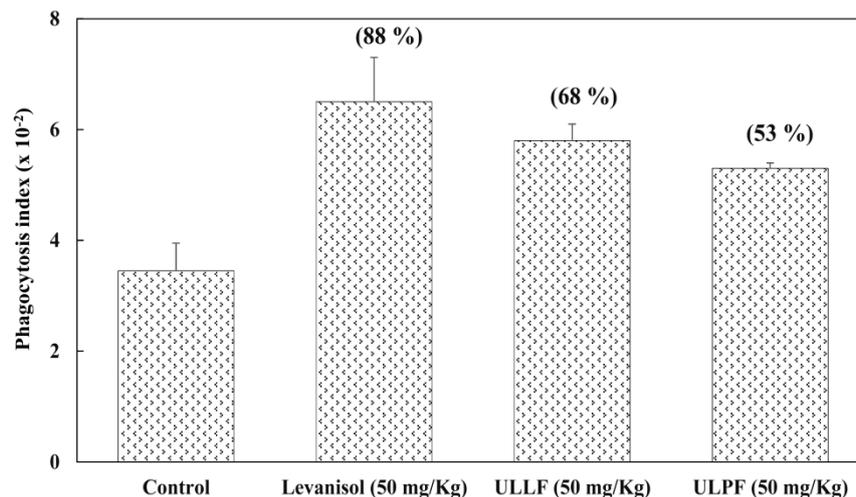
**B1 et B2** : des dommages d'une spongieuse, une hyperplasie épidermique et une infiltration des cellules inflammatoires.

**C et D** : Les pattes des rats prétraités par es phases ULPF et ULLF (100 mg/kg) et le diclofinac-sodium (10 mg/kg) ont présentés moins de lésions histopathologiques.

## 4.2. Activité Immunomodulatrice

### 4.2.1. La clairance du carbon

Le taux d'élimination des particules de carbone *in situ* est fréquemment utilisé comme mesure de l'effet immunomodulateur de l'activité phagocytaire des macrophages par le biais du système réticulo-endothélial (RES). Une augmentation significative ( $5,8 \times 10^{-2} \pm 0,003$ ) et ( $5,3 \times 10^{-2} \pm 0,001$ ) respectivement dans l'indice phagocytaire a été observée après l'administration orale de ULPF ou ULLF (50 mg / kg) par rapport au lévamisole ( $6,5 \times 10^{-2} \pm 0,008$ ). Cette augmentation est plus prononcée (68 %) dans le groupe ULLF que dans le groupe ULPF (53 %). L'augmentation arriva à 88 % dans le cas du lévamisole (**Figure 41**). Ceci indique que la fraction ULLF a des effets plus puissants dans l'amélioration de l'activité phagocytaire des macrophages.

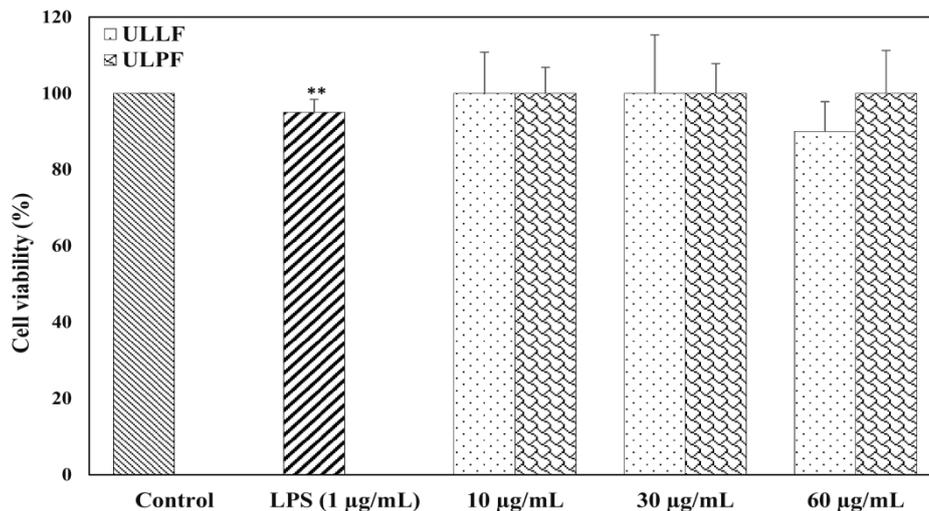


**Figure 41** : Activité immunomodulatrice (test de clairance carbone) des extraits de lectines et de polysaccharides *U.Lucuca* (ULPF et ULLF), (n = 5).

## 5. Activité anti-inflammatoire *invitro* (modèle LPS-RAW 264.7)

### 5.1. La viabilité cellulaire

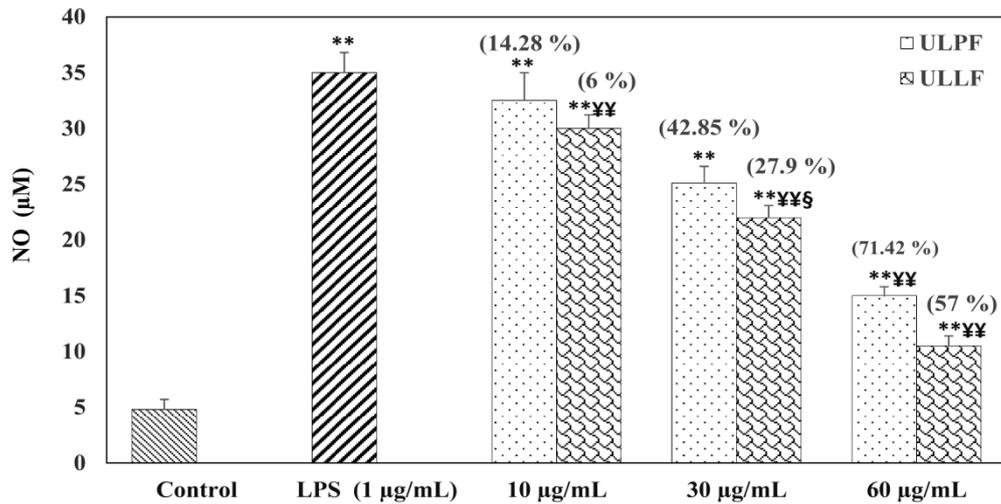
La viabilité cellulaire a été évaluée par un essai MTT. Comme illustre montre **la figure 42**, les deux fractions ULPF ou ULLF d'*Ulva* n'ont montré aucun effet inhibiteur vis-à-vis la prolifération cellulaire à des concentrations allant de 10 à 60 µg/mL. Ainsi, on peut déduire que les fractions des lectines et des polysaccharides issues *U. lactuca* sont faiblement cytotoxiques sur la prolifération des cellules RAW même à 60 µg/mL.



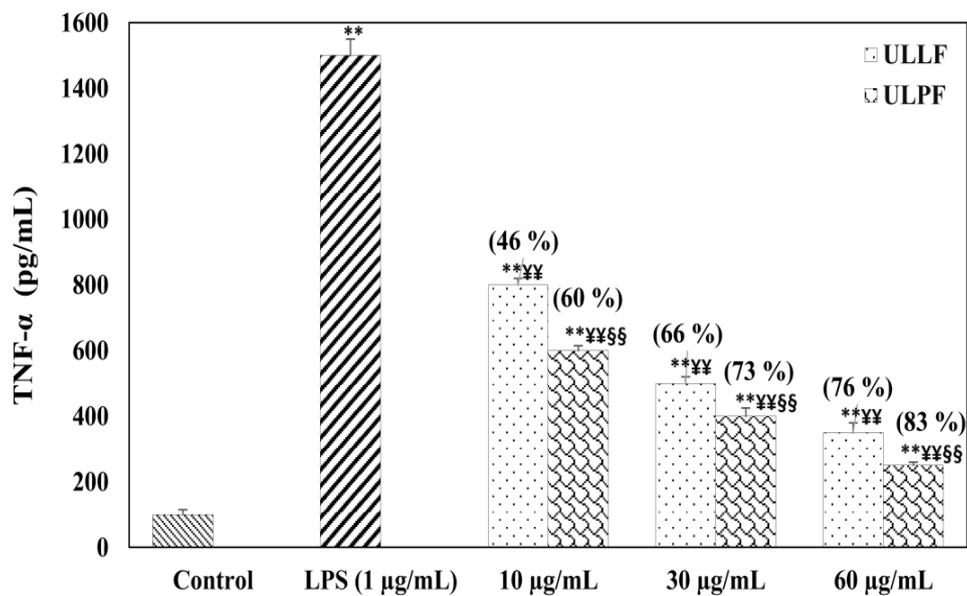
**Figure 42 :** Effet protecteur des extraits ULPF et ULLF sur la viabilité des macrophages RAW 264.7 mesurés par le test MTT.

## 5.2. L'effet ULPF et ULLF sur les taux de TNF- $\alpha$ et NO des cellules LPS-RAW 264.7

Cette l'expérience, vise à explorer si l'ULPF et ULLF ont le pouvoir d'exercé une protection contre l'inflammation s'interposé par le LPS dans les cellules RAW264. L'incubation des macrophages RAW264.7 avec LPS (1 µg/mL) significativement a augmenté la surproduction de NO plus de 4 fois ( $35 \pm 1,8$  pg/mL) et a induit la libération de TNF- $\alpha$  près de 15 fois ( $1500 \pm 50$  pg/mL). L'effet de protection de l'ULPF et de l'ULLF sur la libération de TNF- $\alpha$  et NO induite par LPS est illustré aux figures 4 et 5. L'exposition des macrophages murins RAW 264.7 à 10, 30 et 60 µg/mL ULPF ou ULLF a révélé de manière significative une régulation négative de la production de macrophages de NO (14,28 % - 71,42%) et (6% - 57%) ainsi qu'une diminution significative du TNF- $\alpha$  (60 % à 83%) et (46% à 76%) (Fig. 4, 5). L'effet inhibiteur de la fraction de polysaccharide était plus forte que celle de la fraction de lectine à 60 µg/mL.



**Figure 43 :** Effet des extraits ULPF et ULLF sur la libération de NO dans le milieu par des macrophages RAW 264.7 activés par LPS, (n = 3, \*: <0,05, \*\* p<0,01).



**Figure 44 :** Effet des extraits de lectines et de polysaccharides de *U. lactuca* (ULPF et ULLF) sur la libération de TNF-α dans le milieu par des macrophages RAW 264.7 activés par LPS.

### 5.3. Discussion

L'inflammation est un processus physiologique intimement lié et impliqué dans un grand nombre de maladies aiguës ou chroniques (Lawrence and Gilroy, 2007). Cependant, les médicaments commercialisés (anti-inflammatoires non stéroïdiens, anti-inflammatoires stéroïdiens...) sont insatisfaisants, contraignants et entraînant beaucoup d'effets indésirables comme des ulcères gastriques (Wallace, 2000), des accidents cardiovasculaires (Stewart et al, 2003

Plusieurs composés possèdent des structures chimiques variées et une activité anti-inflammatoire puissante a été isolée des algues marines (Lee *et al* 2013 ; Aabad *et al.*, 2008). L'inflammation se manifeste par l'activation d'immunocytes tels les monocytes et les macrophages ainsi que la sécrétion de médiateurs inflammatoires tels l'oxyde nitrique (NO), prostaglandine E2 (PGE2) et le TNF- $\alpha$ . (Fujiwara *et al.*, 2005). Un état inflammatoire implique l'induction d'un œdème et le recrutement de cellules, principalement des neutrophiles, sur le site de l'inflammation. (Vinegar *et al.*, 1969, 1987) Les composés d'algues marines peuvent affecter de multiples cibles dans les systèmes immunitaires et inflammatoires qui influencent la progression de la maladie. Nos expériences ont montré que le niveau d'inflammation augmentait après l'injection de carraghénane en induisant un gonflement progressif de la patte du rat, qui atteignait une valeur maximale à la troisième heure, puis l'œdème a diminué au cours des heures subséquentes. La fraction ULPF et ULLF a révélé l'activité anti-inflammatoire significative à une dose de 100 mg/kg. La capacité de réduire les effets de l'inflammation produite par le carraghénane en tant qu'agent phlogistique est plus prononcée dans le cas de l'ULPF d'une manière comparable au diclofénac sodique qui inhibe la deuxième phase de l'œdème induit par la carraghénine par l'inhibition de la synthèse des prostaglandines par les isozymes COX COX-1 et COX-2. (Temponi *et al.*, 2012). L'inflammation engendrée par le carraghénane est un œdème biphasique; la première phase est caractérisée par un développement de l'œdème dû à une perméabilité vasculaire améliorée, cette phase initiale qui se produit au cours de la première heure d'exposition, déclenchant la libération d'histamine, de sérotonine, de bradykinine et de prostaglandines (Perianayagam., 2006). Après environ 1 heure, les cellules polymorphonucléaires, principalement les neutrophiles, sont recrutées et continuent la production de prostaglandines et de NO. L'effet anti-inflammatoire de l'ULPF mis en évidence dans notre étude a révélé que les polysaccharides sulfatés présents dans les algues présentaient des propriétés anti-

inflammatoires. Margret *et al.*, (2003) ont montré que *U. lactuca* disponible dans la côte de a montré un effet anti-inflammatoire reflété par une comme la réduction de l'inhibition de l'œdème au 4<sup>ème</sup> jour de l'expérience. Khan *et al.* (2008) ont montré que l'extrait d'algues brunes (*Undaria pinnatifida*) possède des effets anti-œdème sur l'inflammation de l'orteil de souris induite par le phorbol 12-myristate-13-acétate. El megeed *et al.*, (2014) ont mentionné que les constituants phytochimiques de *U. lactuca* de la côte d'Alexandrie, en Égypte, ont démontré des propriétés anticoagulantes. L'effet anti-inflammatoire de l'ULLF et de l'ULPF confirment les résultats des études antérieures montrant un éventuel effet anti-inflammatoire des polysaccharides et des lectines (Wijesekara *et al.*, 2011). Des études antérieures ont suggéré que les lectines peuvent inhiber l'inflammation vasculaire médiée par l'adhésion des cellules immunitaires (Assreuy *et al.*, 1997, Rocha *et al.*, 2007). Les sulfolipides des algues rouges *Porphyridium cruentum* ont présenté une activité anti-inflammatoire *in vitro* et une activité anti-proliférative (Bergé *et al.*, 2002). Les constituants de l'algue rouge *Gracilaria verrucosa* se sont révélés un effet anti-inflammatoire (Dang *et al.*, 2008), l'alga *Bryothamnion seaforthii* contient des glucides avec activité antinociceptive (Vieira *et al.* , 2004), la lectine de *Ziziphus oenoplia*, a montré un potentiel antiallergique et anti-inflammatoire (Buttle *et al.*, 2016).

L'activité MPO est un marqueur sensible et spécifique pour l'inflammation aiguë reflétant l'infiltration de cellules polymorphonucléaires du parenchyme (Loria *et al.*, 2008 ; chaves *et al.*, 2013). Les espèces réactives d'oxygène (ROS) ont été associées à une inflammation dans un certain nombre de processus pathophysiologiques (Deng *et al.*, 2011), ce processus a été clairement démontré par le haut niveau de MDA tissulaire. L'ULPF et ULLF ont réussi à moduler ces marqueurs. Le concept d'immunomodulation concerne l'activation non spécifique de la fonction et l'efficacité des macrophages, des granulocytes, du complément, des cellules tueuses naturelles et des lymphocytes, ainsi qu'à la production de diverses molécules effectrices générées par des cellules activées. Il est bien connu que l'objectif primaire de la plupart des immunomodulateurs sont les macrophages qui jouent un rôle majeur en engouffrant les pathogènes (Mosser *et al.*, 2008). La phagocytose est le processus par lequel certains phagocytes ingèrent et éliminent les microorganismes, les cellules malignes, les particules inorganiques et les débris tissulaires (Chen *et al.*, 2008). Ainsi, la phagocytose qui a été améliorée par ULLF, pourrait impliquer l'élévation de la réponse immunitaire innée (Martinez., 2009). Dans notre expérience, lorsque l'encre contenant du carbone colloïdal est injectée par voie intraveineuse chez des rats Wistar, les

macrophages englobent les particules de carbone de l'encre; le taux de clairance de l'encre (particules de carbone) du sang est connu sous le nom d'indice phagocytaire. Le système réticuloendothélial est le mieux défini fonctionnellement par sa capacité à éliminer les débris ou d'autres corps étrangers et forme la première ligne de défense (Mukherjee., 2010). Dans notre étude, ULPF et ULLF ont stimulé le système réticuloendothélial en augmentant l'indice phagocytaire. Les groupes traités par ULLF présentaient un indice phagocytaire significativement élevé par rapport au groupe ULPF. Cette étude fournit également des preuves que la lectine d'*U. lactuca* possède des activités de modulation immunitaire *in vivo* en termes d'activités phagocytaires plus que celles exposées par le polysaccharide. Plusieurs lectines manifestent une activité immunomodulatrice vis à vis des macrophages en améliorant la phagocytose et la sécrétion des cytokines. L'importance immunomodulatrice des lectines pourrait se manifester par de multiples façons. La lectine issue de l'algue marine verte *Caulerpa cupressoides* a le pouvoir de réduire le nombre de contorsions induites par l'acide acétique (Rivanor., 2014). Les résultats de notre étude sont également en concordance avec ceux de Matsui et *al.* (2003) qui ont signalé que l'administration de polysaccharides intracellulaires à partir de microalgues marines, comme *Porphyridium*, *Phaeodactylum* et *Chlorella stigmatophora*, a montré une activité anti-inflammatoire et des activités immunomodulatrices qui ont été mises en évidence par l'activité phagocytaire positive. Les polysaccharides sulfatés acides obtenus à partir des l'algue *Ulva* a montré des activités immunomodulatrices (Leiro., 2007). L'extrait de polysaccharide de *Ganoder malucidum* a montré des activités immunomodulatrices et adjuvantes (Lai *et al.*, 2010), le polysaccharide de *Tinospora cordifolia* avait également montré un effet immunomodulateur et modulait les réponses des macrophages (Desai et al., 2007). Compte tenu des résultats ci-dessus, nous avons cherché à explorer le mécanisme d'action impliqué dans l'immunomodulation et les effets anti-inflammatoires promus *in vivo* par les deux fractions obtenues d'*U. lactuca*, en utilisant l'inflammation des macrophages RAW 264.7 induite par LPS comme modèles de cellules *in vitro*. L'activation des macrophages serait l'un des mécanismes d'autodéfense pour protéger l'hôte contre les agents pathogènes microbiens. (Fujiwara *et al.*, 2005). En revanche, la production dérégulée de ces médiateurs immunitaires par des macrophages pendant une inflammation prolongée est associée à des pathologies différentes, telles que les maladies auto-immunes et les cancers (Patel *et al.*, 20017). Dans la présente étude, l'ULPF et ULLF n'ont montré aucun effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire des macrophages RAW 264.7 en concentrations graduées (10, 30, 60 µg / mL). Lorsqu'ils ont été évalué par un essai MTT, cette étude a révélé que les fractions de lectines et de polysaccharides d'*U. Lactuca* étaient

faiblement actives contre la prolifération des cellules RAW, favorisant un faible effet cytotoxique même à 60 µg/mL. Parmi les médiateurs inflammatoires et les voies cellulaires étudiées de manière approfondie en association avec les pathologies humaines, on trouve les cytokines (Bernebaum *et al.*, 2000). L'effet immunodulateur des polysaccharides des algues vertes repose principalement sur la modulation des macrophages (Scheptekin *et al.*, 2006). Le polysaccharide isolé de *Ganoderma atrum* a montré une activité immunomodulatoire des macrophages (Martinez., 1997), le polysaccharide hydrosoluble obtenu à partir d'*Acorus calamus* active les macrophages et stimule la réponse Th1 (Belska., 2010), le polysaccharide isolé d'*Opuntia polyacantha* (Scheptekin *et al.*, 2008) et *Glycyrrhiza uralensis* (Cheng *et al.*, 2008) avait des activités immunomodulateurs des macrophages. Yoshizawa *et al.* (1995) ont signalé que les extraits de *porphyra yezoensis* marine possèdent des activités activatrices de macrophages en augmentant les médiateurs immunitaires et les activités phagocytaires. Schepetkin *et al.* (2008) ont révélé que les polysaccharides isolés à la fois de *Juniperus scopolorum* et d'*Opuntia polyacantha* présentaient une activité immunomodulatrice des macrophages. L'activité des polysaccharides isolés de *Glycyrrhiz auralens* est une immunomodulatrice des macrophages (Cheng *et al.*, 2008). Au cours de la réaction inflammatoire, les macrophages servent également de sources de cytokines ou de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'oxyde nitrique (NO), le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et l'IFN-c. (Li *et al.*, 2000). Le NO joue un rôle important dans la réponse inflammatoire en tant que molécule pro-inflammatoire, qui est produite par iNOS. La production incontrôlée ou en excès de NO conduit au développement de diverses maladies inflammatoires. (Balkwill *et al.*, 2009) Le TNF- $\alpha$  joue un rôle important dans divers processus physiologiques et pathologiques y compris les réponses immunitaires et inflammatoires (Wajant *et al.*, 2008). Le TNF- $\alpha$  n'est pas seulement une cytokine inflammatoire majeure et une puissante cytokine anticancéreuse, mais aussi le TNF- $\alpha$  induit une réponse pro-inflammatoire. Nos résultats ont indiqué que l'ULLF et l'ULPF possèdent des activités anti-inflammatoires en supprimant la production stimulée par le LPS du TNF- $\alpha$  et le NO dans la cellule RAW 264.7 traitée avec LPS de manière dépendante de la dose, mais n'ont pas affecté la prolifération cellulaire. L'effet anti-inflammatoire des polysaccharides est plus prononcé que celui des lectines, ces résultats sont bien compatibles avec ceux obtenus par Hwang *et al.* (2011) qui a mentionné que l'extrait de polysaccharides sulfatés provenant d'extrait d'eau chaude d'algues marines *Sargassum hemiphyllum*, inhibe la libération de NO et TNF- $\alpha$  activée par le LPS, en bloquant la translocation NF-kB et l'expression régulatrice de la protéine inductible d'oxyde nitrique synthase (iNOS). O'Shea *et al.*,(2002) et Pacheco-Sanchez *et al.*, (2007) ont également

signalé que le polysaccharide extrait de *Collybia Dryophila* présentait un effet de régulation négative de la production de NO. Les constituants d'algues peuvent présenter un comportement différent en ce qui concerne la sécrétion des médiateurs inflammatoires par les cellules RAW ; il a été rapporté que les algues endémiques stimulent la production de médiateurs pro-inflammatoires dans la lignée cellulaire des macrophages de souris RAW 264.7 (Wang *et al.*, 2013). L'effet antitumoral de *Ganoderma lucidum* est médié par les cytokines libérées par les macrophages activés et les lymphocytes T (Wang *et al.*, 1997). La fraction de polysaccharide d'algue marine *Porphyra yezoensis* possède une activité de stimulatrice des macrophages (Yoshizawa *et al.*, 1993).

---

---

# Chapitre V: Conclusion

---

---

## CONCLUSION

Les algues marines représentent une source riche de métabolites secondaires, biologiquement actives, ayant l'avantage d'être une matière première moins coûteuse et d'une quantité élevées. Dans notre étude l'extrait d'EtOAc d'*Ulva lacuta* a montré la présence de nombreux métabolites secondaires ayant des différences structurelles importantes de celles composant l'extrait MeOH.

Les deux extraits, EtOAc et MeOH, ont montré une présence phénolique et un contenu des flavonoïdique. Les oses totaux représentent la part la plus importante du rendement massique de l'extrait brut des polysaccharides de l'*U. lactuca*, alors que les protéines totales représentent une quantité réduite. L'administration de l'éthanol à des souris provoque des lésions macroscopiques et microscopiques dans le tissu gastrique, telles la présence de pétéchies, l'hémorragie et l'oedème sévère de l'épithélium de surface, ainsi que le processus inflammatoire. Le traitement par des extraits d'ULPF a diminué l'effet néfaste de l'éthanol. Dans notre étude portant sur l'activité antioxydante des extraits MeOH et EtOAc, on a remarqué que la meilleure activité revient à l'extrait EtOAc qui possède un effet scavenging potentiel vis-à-vis des radicaux libres (DPPH°, NO°), un pouvoir réducteur, et une potentialité inhibitrice de la peroxydation lipidique; tous ces marqueurs étaient plus prononcés dans le cas de l'extrait EtOAc par rapport à l'extrait MeOH, ces différences pourraient être dues à la différence de leurs phytoconstituants.

L'administration d'éthanol induisa un stress oxydatif important, comme le témoignent la peroxydation lipidique et la diminution de la capacité antioxydante. Ce stress revient à la baisse du taux de GSH et à l'atténuation des activités de la CAT et la SOD. Le traitement par ULPF a diminué le taux de MDA et a restauré le taux du GSH ainsi que l'activité de la CAT et la SOD. Les deux extraits ULPF (polysaccharides) et ULLF (lectines) ont pu protéger plusieurs cibles des systèmes immunitaires et inflammatoires. Nos résultats ont montré que le niveau d'inflammation augmente après l'injection de carragénine en induisant un gonflement progressif de la patte du rat. Les fractions ULPF et ULLF ont révélé une activité anti-inflammatoire. Ce processus a été clairement démontré par la réduction du taux de l'MPO tissulaire, l'effet de la fraction ULPF fut plus important. Cette étude fournit également des preuves que l'ULLF possède des activités de modulation immunitaire *in vivo*, en termes d'activités phagocytaires, supérieures à celles exprimés par l'ULPF.

---

Nos résultats ont indiqué que l'ULLF et l'ULPF possèdent des activités anti-inflammatoires en supprimant la production stimulée du TNF- $\alpha$  et le NO par le LPS dans la cellule RAW 264.7 d'une manière dépendante de la dose, mais ils n'ont pas affecté la prolifération cellulaire. L'effet Anti-inflammatoire des polysaccharides est plus prononcé par rapport à celui des lectines, Ainsi, l'*U. lactuca* algérienne est dotée d'un potentiel antioxydant, anti-inflammatoire et gastro-protecteur, ces propriétés pourraient être dues aux effets synergétiques de ses constituants comprenant en particulier les polyphénols, les lectines et les polysaccharides.

---

---

# Références bibliographiques

---

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Abad MJ**, Bedoya LM, Bermejo P. (2008). Natural marine anti-inflammatory products. *Mini Rev Med Chem.* 8(8): 740-754.

**Adeyemi OO**, Okpo SO, Ogunti OO. (2002). Analgesic and antiinflammatory effect of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* Mill (Lauraceae). *Fitoterapia* ;73: 375-380.

**Adinortey MB**, Ansah C, Galyuon I, Nyarko A. (2013). *In vivo* models used for evaluation of potential antigastroduodenal ulcers agents. *Ulcers*; Article ID 796405, 12 pages 1-12.

**Ainouz IL**, Sampaio AH, Benevides NMB, Freitas ALP, Costa FHF, Carvalho MR, Pinheiro-Joventino F. (1992). Agglutination of enzyme treated erythrocytes by Brazilian marine algal extracts. *Bot Marina.* 35: 475-479.

**Ainouz IL**, Sampaio AH. (1991). Screening of Brazilian marine algae for hemagglutinins. *Bot Marina.* 34: 211-214.

**Aiyegoro OA**, Okoh AI. (2010). Preliminary phytochemical screening and In vitro antioxidant activities of the aqueous extract of *Helichrysum longifolium* DC. *BMC Complementary and Alternative Medicine* ; 10(21): 1-8.

**Al Batran R**, Al-Bayaty F, Al-Obaidi MMJ, Abdulkader AM, Hadi HA *et al.* (2013). In Vivo Antioxidant and Antiulcer Activity of *Parkia speciosa* Ethanolic Leaf Extract against Ethanol-Induced Gastric Ulcer in Rats. *PLOS ONE*, volume8, issue 5, e64751.

**Allen A** and Flemstrom G. (2005). Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am J physiol-Cell Phy*; 288: C1-C19.

**Al-Snafi AE**. (2016). Beneficial medicinal plants in digestive system disorders (part 2): plant based review. *IOSR J Pharm*; 6(7): 85-92.

**Apel K** et H. Hirt. (2004). "Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction." *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.

**Arnold T M**, Tanner C E, Hatch, W.I. (1995). Phenotypic variation in polyphenolic content of the tropical brown algae *lobophora variegata* as a function of nitrogen availability. *Mar Ecol Prog Ser* 123, 177-183.-

**Aro P**, Storskrubb T, Ronkainen J, Bolling-Sternevald E, Engstrand L, Vieth M, Stolte M, Talley NJ, Agéus L. (2006). Peptic ulcer disease in general adult population: the Kalixanda study: a random population-based study. *Am J Epidemiol*; 1; 1025-34.

**Assreuy AMS**, Shibuya MD, Martins GJ, de Souza MLP, Cavada BS, Moreira RA, Oliveira JTA, Ribeiro RA, Flores CA. (1997). Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans, *Mediat. Inflamm.* 6: 201-210.

**Awaad AS**, El-Meligy RM, Soliman GA. (2013). Natural products in treatment of ulcerative colitis and peptic ulcer. *J Saudi Chem Soc*; 17:101-124.

**Awad N E**. 2000. Biologically active steroid from the green alga *Ulva lactuca*. *Phytother. Res.*, 14: 641-37

**Balkwill F**. (2009). Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer.* 9: 361-371.

**Banerjee K**, Ghosh R, Homechaudhuri S and Abhijit M. (2009). Biochemical composition of marine macroalgae from Gangetic Delta at the apex of Bay of Bengal. *African J. Basic Appl. Sci.* 1: 96-104.

**Barsanti L**, Gualtieri P. (2010). *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*, Second Edition. *Taylor and Francis group.* (1).

**BAS TF**. (2014). An Illustrated Review on Cultivation and Life History of Agronomically Important Seaplants. In *Seaweed: Mineral Composition, Nutritional and Antioxidant Benefits and Agricultural Uses*, Eds Vitor Hugo Pomin, 39-70. *Nova Publishers.*

**Belska NV**, Guriev AM, Danilets MG, Trophimova ES, Uchasova EG, Ligatcheva AA., Belousov MV, Agaphonov VI., Golovchenko VG, Yusubov MS., Belsky YP. (2010). Water-soluble polysaccharide obtained from *Acorus calamus* L. classically activates macrophages and stimulates. *International Immunopharmacology.* 10(8): 933-942.

**Ben Hankamer**, Lehr F., Rupprecht J., Mussnug J.H., Posten C. & Kruse O. (2007). Photosynthetic biomass and H<sub>2</sub> production by green algae: from bioengineering bioreactor scale up. *Physiologia Plantarum*, 131:10-21.

**Ben-Arye E**, Goldin E, Wengrower D, Stamper A, Kohn R, Berry E. (2002). Wheat grass juice in the treatment of active distal ulcerative colitis: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Scand J Gastroenterol*; 37: 444-4449.

**Benavente-Garcia O** et J. Castillo (2008). "Update on uses and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(15): 6185-6205.

**Berenbaum F**. (2000). Proinflammatory cytokines, prostaglandins, and the chondrocyte: mechanisms of intracellular activation. *Joint Bone Spine.* 67: 561-564.

**Bergé JP**, Debiton E, Durand P, Barthomeuf C. (2002). In vitro anti-inflammatory and anti-proliferative activity of sulfolipids from the red alga *Porphyridium cruentum*. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6227-6232.

- Biozzi G**, Benacerraf B., & Halpern B N. (1953). Quantitative study of the granuloplectic activity of the reticulo-endothelial system. II. A study of the kinetics of the R. E. S. in relation to the dose of carbon injected; relationship between the weight of the organs and their activity. *British Journal of Experimental Pathology*, 34(4), 441–57.
- Bisault L.** (2008). Les rendements du blé et du maïs ne progressent plus. *Agreste Primeur*, Vol. 210.
- Blois MS.** (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.*;181:1199–1200.
- Blunden G**, Rogers DJ, Farnham WF. (1975). Survey of British seaweeds for hemagglutinins. *Lloydia* 38: 162-168.
- Boczkowski J**, Lisdero CL, Lanone S, Samb A, Carreras MC, Boveris A, Aubier M, Poderoso JJ. (1999). Endogenous peroxynitrite mediates mitochondrial dysfunction in rat diaphragm during endotoxemia. *Faseb J* 13:1637-1646.
- Bode C** and Bode JC. (1997). Alcohol's role in gastrointestinal tract disorders. *Alcohol Health Res World*: 21: 76-83.
- Boual Z.**, Pierre G., Delattre C., Benaoun F., Petit E., Gardarin C., Michaud P., Ould El hadj M. D. (2015). Mediterranean semi-arid plant *Astragalus armatus* as a source of bioactive galactomannan. *Bioactive Carbohydrate and Dietary Fibre*; 5:10-18.
- Boyd WC**, Almodovar LR, Boyd LG. (1966). Agglutinins in marine algae for human erythrocytes. *Transfusion* 6: 82-83.
- Bradford MM.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Bradley P P**, Priebat D A, Christensen RD, Rothstein G. (1982) Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophils content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol*; 78:206–209.
- Brand-Williams W**, Cuvelier ME, Berset C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technology* 28:25-30.
- Bravo L.** (1998). "Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance." *Nutrition Reviews* 56(11): 317-333.
- Brudieux V.** (2007). Extraction, modification enzymatique et caractérisation chimique de nouvelles structures pectiques. A l'occasion de la relation structure/activité à la dermocosmétique. Thèse de Doctorat, Université de Limoges, 220p.

**Bruhn A**, Dahl J , Bangsø Nielsen H, Nikolaisen L, Rasmussen MB, Markager S, Olesen B, Arias C, Jensen PD. (2010). Bioenergy potential of *Ulva lactuca*: Biomass yield, methane production and combustion.. *Bioresource Technology*., 102: 2595–2604.

**Butle A**, Talmale S, Patil MB. (2016). Potential in vivo immunomodulatory effects of the most active lectin isolated from seeds of *Zizyphus oenoplia*. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*. 7(1): 1-6.

**Calvete JJ**, Costa FHF, Saker-Sampaio S, Moreno-Murciano MP, Nagano CS, Cavada BS, Grangeiro TB, Ramos MV, Bloch Jr C, Silveira SB, Freitas BT, Sampaio AH. (2000). The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. *Cell Mol Lif Sci* 57: 343-350.

**Castaneda-Ovando, A.**, M. d. L. Pacheco-Hernandez, M. E. Paez-Hernández, J. A. Rodriguez et C. A. Galan-Vidal. (2009). "Chemical studies of anthocyanins: A review." *Food Chemistry* 113(4) : 859-871.

**Chaves L de S**, Nicolau LA, Silva RO, et al. (2013). Anti-inflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudate*. *Immunopharm Immunot*; 35:93-100.

**Chen Q**, Chen L, Liu B, Vialli C, Stone P, Ching LM, Chamley L. (2010). The role of autocrine TGFβ1 in endothelial cell activation induced by phagocytosis of necrotic trophoblasts: a possible role in the pathogenesis of pre-eclampsia. *The Journal of Pathology*. 221(1): 87-95.

**Chen R.**, Meng F., Liu Z., Chen R., et Zhang M. (2010). Antitumor activities of different fractions of polysaccharide purified from *Ornithogalumcaudatum* Ait. *Carbohydrate*; 80(3):845-851.

**Cheng AW**, Wan FC, Wang JQ, Jin ZY, Xu XM. (2008). Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Glycyrrhiza uralensis* Fish. *Int. Immunopharmacol*. 8: 43-50.

**Cheng, S. S.**, J. Y. Liu, E. H. Chang et S. T. Chang. (2008). "Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi." *Bioresource Technology* 99(11): 5145-5149.

**Chiles TC**, Bird KT. (1989). A comparative study of animal erythrocyte agglutinins from marine algae. *Comp Biochem Physiol* 94: 107-111.

**Chisti Y.** (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25: 294-306.

**Choe E.** et Min DB. (2005). "Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods." *Journal of Food Science* 70(9) : R142-R159.

**Chouikhi A.** (2013). Les applications potentielles des macroalgues marines et les activités pharmacologiques de leurs métabolites : Revues. USTHB-FBS 4<sup>Th</sup> International Congress of

the populations & Animal communities “Dynamic & Biodiversity of the terrestrial & aquatic ecosystems “. CIPCA TAGHIT (Bechar) ALGERIA, 19-21 November.

**Clairborne A** (1985). *Catalase activity*. In: *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Greenwald, R.A. ed Boca Raton, Fla: *CRC Press*, 283-284.

**Conforti F**, Sosa S, Marrelli M, Menichini F, Statti GA, D. Uzunov, A. Tubaro et R. D. Loggia. (2008). "In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants." *Journal of Ethnopharmacology* 116(1): 144-151.

**Cowan M M.** (1999). "Plant products as antimicrobial agents." *Clinical Microbiology Reviews* 12(4): 564-582.

**Cushnie, TP.** et Lamb AJ. (2005). "Antimicrobial activity of flavonoids." *International Journal of Antimicrobial Agents* 26(5): 343-356.

**Cynthia L F et al.** (2011). Bioactivity from marine algae of the genus *Gracilaria*. *Int Journal Mol Sciences*, 12, 4550-4573.

**Daglia M.** (2012). "Polyphenols as antimicrobial agents." *Current Opinion in Biotechnology* 23(2): 174-181.

**Dang HT**, Lee HJ, Yoo ES, Shinde PB, Lee YM, Hong J. (2008). Anti-inflammatory constituents of the red alga *Gracilaria verrucosa* and their synthetic analogues. *J. Nat. Prod.* 71: 232-240.

**Delattre J.**, Beaudoux JL et Bonnefont- Rousselot D. (2005). "Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques." 1- 23.

**Delattre J**, Beaudoux JL et Bonnefont- Rousselot D. (2005). "Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques." 45-60.

**Delattre J.**, Beaudoux JL et Bonnefont- Rousselot D. (2005). "Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques." 60-80.

**Delattre J.**, Beaudoux JL et Bonnefont- Rousselot D. (2005). "Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques." 87-108.

**Deng JS.**, Chi CS, Huang SS, Shie, PH, Lin, T., Huang GJ. (2011). Antioxidant, analgesic, and anti-inflammatory activities of the ethanolic extracts of *Taxillus liquidambaricola*. *Journal of Ethnopharmacology*. 137: 1161-71.

**Desai V**, Ramkrishnan R, Chintalwar G, Sainis KB. G1-4A. (2007). An immunomodulatory polysaccharide from *Tinospora cordifolia*, modulates macrophage responses and protects mice against lipopolysaccharide induced endotoxic shock. *Int. Immunopharmacol.* 2007; 7: 1375-1386.

**Devi GK**, Manivannan K, Thirumaran G, Rajathi FAA, Anantharaman P. (2011). In vitro antioxidant activities of selected seaweeds from south-east coast of India. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*; 4: 205- 211

**Diallo D**, Sanogo R, Yasambou H, Traore A, Coulibaly K, Maiga A. (2004). Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *C. R. Chimie*. 7: 1073–1080.

**Didderan I**, Destain J. et Thonart P. (2008). Le bioéthanol de seconde génération. Les presses agronomiques de Gembloux. 128 pages.

**Dinis TCP**, Madeira VMC, Almeida MLM (1994). Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.* 315: 161-169.

**Dinoso VP**. (1972). Gastric secretion and gastric mucosal morphology in chronic alcoholics. *Arch Int Med*; 130: 715.

**Dos Reis SB**, de Oliveira CC, Acedo SC, Miranda DD, Ribeiro ML, Pedrazzoli Jr J, Gambero A. (2009). Attenuation of colitis injury in rats using *Garcinia cambogia* extract. *Phytother Res*; 23(3): 324-329.

**Drissi A.**, Bennani, H., Giton, F., Charrouf, Z., Fiet, J., & Adlouni, A. (2006). Tocopherols and saponins derived from *Argania spinosa* exert an antiproliferative effect on human prostate cancer. *Cancer Investigation*, 24(6), 588–92.

**Dubois M**, Gilles KA, Hamilton J D, Rebers PA, Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.

**Ejebe DE**, Siminialayi IM, Emudainwho JOT, Ofesi U, Morka L. (2010). Analgesic and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of the leaves of *Helianthus Annus* in Wistar rats. *Asian Pac J Trop* ; 3(5): 341-347.

**El Gharras, H.** (2009). "Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review." *International Journal of Food Science and Technology* 44(12): 2512-2518.

**El-Abhar HS**, Abdallah DM, Saleh S. (2003). Gastroprotective activity of *Nigella sativa* oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischemia/reperfusion in rats. *J ethnopharmacol*; 84: 251-258.

**Ellman G.** (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70 -7.

**Elmegeed DFA**, Ghareeb DA, Elsayed M, El-Saadani M. (2014). Phytochemical constituents and bioscreening activities of green algae (*Ulva lactuca*). *International Journal of Agricultural Policy and Research*. 2(11): 373-378.

**Evans P.** et Halliwell B. (1999). "Free radicals and hearing: Cause, consequence, and criteria." *Annals of the New York Academy of Sciences* 884: 19-40.

- Fabregas J**, Munoz A, Llovo J, Abalde J. (1984). Agglutinins in marine red algae. *IRCS Medical Science* 12: 298-299.
- Flohe L**, Gunzler WA. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*; 105 114-21.
- Fujimura T.**, Tsukahara K., Moriwaki S., Kitahara T., Tomohiko S. and Takema Y. (2002). Treatment of human skin with an extract of *Fucus vesiculosus* changes its thickness and mechanical properties. *J. Cosmet Sci.*, 53(1):1-9
- Fujiwara N**, Kobayashi K. (2015). Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 4:281-286.
- Gallardo T**, Gómez Garreta, A , Ribera, M.A., Cormaci, M., Furnari, G., Giaccone, G. & Boudouresque, C.-F. (1993). Check-list of Mediterranean Seaweeds, II. *Chlorophyceae Wille s.l.*. *Botanica Marina* 36: 399-421.( citation algerie)
- Ganesan, P**, Chandani, P.K. & Bhaskar, N. (2008). In vitro Antioxidant activities of 3 selected red seaweeds of India. *J Bioresour Technol* 99, 717-723.
- Garon-Lardiere S**. Etude structural des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata*. These de doctorat en chimie., université de Bretagne occidentale école doctorale des sciences de la matière 226p.
- Gayral P**. (1975). Les algues : morphologie, cytologie, reproduction, écologie.. *Doin éditeurs*. 166p.
- Glicksman M**. (1987). Twelfth International Seaweed Symposium. *Developments in Hydrobiology*.: (41) pp 31-47.
- Glombitza KW**, Keusgen M. (1995). Fuhalols and deshydroxyfuhalols from the brown alga *Sargassum spinuligerum*. *Phytochemistry* 38: 987-95.
- Gokhale AB**, Damre AS., & Saraf MN. (2003). Investigations into the immunomodulatory activity of *Argyrea speciosa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 84(1), 109–14.
- Gross H**, Goeger P. Hills *et al.* (2006). “Lophocladines, bioactive alkaloids from the red alga *Lophocladia* sp,” *Journal of Natural Products*, vol. 69, no. 4, pp. 640–644.
- Gupta I**, Parihar A, Malhotra P, *et al.* (2001). Effects of gum resin of *Boswellia serrata* in patients with chronic colitis. *Planta Med*; 67:391-395.
- Habig WH**, Pabst MJ, Jakoby WB. (1974) .Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in. *Biol Chem*. 25;249(22):7130-9
- Hagerman A E**. (1988) Extraction of tannin from fresh and preserved leaves. *J Chem Ecol* 14, 453-461.

**Halliwell B**, Gutteridge JMC & Aruoma O.I. (1987). The deoxyribose method: a simple 'test tube' assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.*, 165, 215 ± 219.

**Hao LH**, Wang ZY, Xing BS. (2009). Effect of sub-acute exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile carp (*Cyprinus carpio*). *J Environ Sci China* 21:1459–1466.

**Harborne J.B.** (1984) Methods of Plant Analysis. In: *Phytochemical Methods*. Springer, Dordrecht.

**Hennebelle**, T. (2006). "Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants." *Chimie Organique et Macromoléculaire Docotrat*: 303.

**Heo SJ**, Lee, KW, Song CB & Jeon YJ. (2003) Antioxidant activity of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Algae* 18, 71-81.

**Hirokawa M**, Miura S, Yoshida H, Kurose I, Shigematsu T, Hokari R *et al.* (1998). Oxidative stress and mitochondrial damages precedes gastric mucosal cell death induced by ethanol administration. *Alcoholism: Clinic Experim Res*; 22:111-114.

**Hori K**, Ikegami S, Miyazawa K, Ito K. (1988). Mitogenic and antineoplastic isoagglutinins from red alga *Solieria robusta*. *Phytochemistry*. 27: 2063-2067.

**Hwang PA**, Chien SY, Chan YL, Lu MK, Wu CH, Kong ZL, Wu CJ. (2011). Inhibition of lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses by *Sargassum hemiphyllum* sulfated polysaccharide extract in RAW 264.7 macrophage cells. *J Agric Food Chem*. 59: 2062-2068.

**Ibanez M. C.** et Ferrero C. (2003). Extraction and characterization of the hydrocolloid from *Prosopis flexuosa* DC seeds. *Food Research International*. 36: 455–460.

**Ortiz J**, Romero N, Robert P, Araya J, Lopez-Hernandez J, Bozzo C, Navarrete E. (2006). A. Osorio A. Rios. Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea Antarctica*. *Food Chemistry*. 99(1), 98–104.

**Julien JC.**, Description de *Ulva lactuca*. (2010). *mer-littoral*. Jean-Claude Julien © 2010-2017.

**Kahn F**, et De Granville JJ. (1992). "Palms in forest ecosystems of amazonia." *Ecological studies*, Springer - Verlag.

**Kaiser S**, Di Mascio, M E, Murphy et H. Sies. (1990). "Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 277(1): 101-108.

**Kamiya H**, Ogata K, Hori K. (1982). Isolation and characterization of a new lectin in the red alga *Palmaria palmata* (L.) O. Kuntze. *Bot Marina*. 15: 537-540.

**Kang, J.**, C. Xie, Z. Li, S. Nagarajan AG, Schauss T, Wu et X. Wu. (2011). "Flavonoids from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities." *Food Chemistry* 128(1) : 152-157.

**Kang J**, Li Z, Wu T, Jensen GS, Schauss AG et X. Wu. (2010). "Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.)." *Food Chemistry* 122(3): 610-617.

**Kang S**, Jang YJ et Park H. (1998). "In vivo dual effects of vitamin C on paraquat-induced lung damage: Dependence on released metals from the damaged tissue." *Free Radical Research* 28(1) : 93-107.

**Kansara S and Sakhreliya BD.** (2013). PEPTIC ULCER –Its Pathogenesis and Recent Approaches for the treatment. *JPSBR*; 3(4): 136-144.

**Kansara S and Sakhreliya BD.** (2013). PEPTIC ULCER- Its Pathogenesis and Recent approaches for the treatment. *JPSBR*; 3(4): 136-144.

**Kappaphycus alvarezii** (Doty) Doty – An edible seaweed. *Food Chemistry*. 107, 289–295

**Kelman D**, Posner EK, McDermid KJ, Tabandera NK, Wright PR, Wright AD.(2012). Antioxidant activity of Hawaiian marine algae. *Mar Drugs*, 10(2):403–416.

**Khairy HM**, El-Sheikh MA. (2015) Antioxidant activity and mineral composition of three Mediterranean common seaweeds from Abu-Qir Bay, Egypt. *Saudi Journal of Biological Sciences* ;22(5):623-630.

**Khan M**, Choi JS, Lee MC, Kim E, Nam TJ, Fujii H and Hong YK. Anti-inflammatory activities of methanol extracts from various seaweed species. *J. Environ. Biol.* (2008) 29: 465-469.

**Khan MNA**, Yoon SJ, Choi JS, NG Park, HH Lee, JY Cho, YK Hong. (2009). Anti-edema effects of brown seaweed (*Undaria pinnatifida*) extract on phorbol 12-myristate13-acetate-induced mouse ear inflammation. *Am J Chin Med.* 37: 373-81.

**Khandelwal KR.** Pune, India: Nirali prakashan; (2005). *Practical book of pharmacognosy.* 129.

**Kim S H.**, Choi D.S., Athukorala Y., Jeon Y.J., Senevirathne M, Rha C.K. (2007). Antioxidant activity of sulphated polysaccharides isolated from *Sargassum fulvellum*. *J Food Sci Nut* 12: 65-73.

**Kitayamai T**, Gapas N B, Trono G C. (2000). The two algal herbaria in the Philippines. Proceedings of the first and Second *Symposium on Collection Building and natural history studies in Asia*. K. Matsuura.Tokyo. pp. 51-57.

**Korkina L**, C. De Luca et S. Pastore. (2012). Plant polyphenols and human skin: Friends or foes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1259: 77-86.

**Kotakadi VS**, Jin Y, Hofseth AB, Ying L, Cui X, Volate S, Chumanevich A, Wood PA, Price RL, McNeal A, Singh UP, Singh NP, Nagarkatti PS, Matesic LE, Auclair K, Wargovich MJ, Hofseth LJ. (2008). *Ginkgo bilboa* extract EGb 761 has anti-inflammatory properties and ameliorates colitis in mice by driving effector T cell apoptosis, *carcinogenesis*; 29(9): 1799-1806.

**Kulkarni SK**, Mehta AK, Kunchandy J. (1986). Anti-inflammatory actions of clonidine, guanfacine and B-HT 920 against various inflammagen-induced acute paw oedema in rats. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*. 279: 324-334.

**Kumar K**, Mruthunjaya K, Kumar S, Mythreyi R. (2013). Anti ulcer activity of ethanol extract of the stem, bark of *Careya arborea* Roxb. *International Current Pharmaceutical Journal*. 2(3): 78-82.

**Lahouel M**. (2005). Interaction Flavonoïdes-Mitochondrie et rôle de la Propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de Doctorat Université de Constantine.

**Lai CY**, Hung JT, Lin HH, Yu AL, Chen SH, Tsai YC, Shao LE, Yang WB, Yu J. (2010). Immunomodulatory and adjuvant activities of a polysaccharide extract of *Ganoderma lucidum* in vivo and in vitro. *Vaccine*. 28: 4945-54.

**Langmead L**, Feakins RM, Goldthorpe S, *et al.* (2004). Randomized double-blind placebo-controlled trial of oral aloe vera gel for active ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*; 19: 739-747.

**Lau JY**, Sung J, Hill C, Henderson C, Howden CW, Metz DC. (2011). Systematic review of the epidemiology of complicated peptic ulcer disease: incidence, recurrence, risk, factors and mortality. *Digestion*; 84:102-113.

**Lawrence T**, Gilroy D. (2007). Chronic inflammation: a failure of resolution. *Int J Exp Pathol*. 88(2): 85-94.

**Lee J**, Hou MF. (2013). Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. *Cancer Cell Int*. 13: 55.

**Leiro JM**, Castro R, Arranz JA, Lamas J. (2007). Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *Int. Immunopharmacol*. 7: 879-888.

**Leopoldini, M.**, N. Russo et M. Toscano. (2011). "The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants." *Food Chemistry* 125(2): 288-306.

**Lesser PM**. (2006). Oxidative stress in marine environments: biochemistry | and physiological ecology. *Annu Rev Physiol*, 68, 253-278.

**Li MC**, Lei LS, Wang QB, Liang DS, Xu ZM, Yang SQ, Sun LS. (2000). Effect of Ganoderma polysaccharides on interleukin 1 $\alpha$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  mRNA expression in murine peritoneal macrophages. *Chin J Pharmacol Toxicol.* 14: 237-240.

**Li P**, Qi, JL, Wang, L, Huang, QN, Han, ZH, and Yin, LP. *Plant Sci.* (2006). 171: 52–59.

**Li Y**, Qian ZJ , Ryu B, Lee SH, Kim MN , Kim SW. (2009) Chemical Components and its Antioxidant properties in-vitro, an edible marine brown alga Ecklonia cava. *J Bioorganic Med Chem* 17, 1963-1973.

**Lin KJ**, Garcia Rodriguez LA, Hernandez-Diaz S. (2011). Systemic review of peptic ulcer disease incidence rates: Do studies without validation provide reliable estimate? . *Pharmacoepidemiol Drug Saf* ; 20(7): 718-28.

**Lohmann M.** (1995). Flore et faune du littoral. p 34.

**Loria V**, Dato I, Graziani F, Biasucci LM. (2008). Myeloperoxidase: A new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. *Mediat Inflamm.* ID135625:1-4.

**Macheix JJ**, Fleuriet A and Jay-Allemand C. (2005).Les composés phénoliques des végétaux :un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne*, p. 4-5.

**MacMicking J**, Xie QW, Nathan C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 15: 323-350.

**Manach C**, Scalbert A, Morand C, Remesy C et Jimenez L. (2004). "Polyphenols: Food sources and bioavailability." *American Journal of Clinical Nutrition* 79(5): 727-747.

**De Pádua M**, Paulo S. Growoski F., Alvaro L. M. Chemical Composition of Ulvaria oxysperma (Kützing) Bliding, Ulva lactuca (Linnaeus) and Ulva fascita Brazilian Archives Of Biology and Techno logy, 47, (1) :49-55, March 2004 ISSN 1516-8913 Printed in Brazil

**Marcocci L**. Packer M T. Droy-Lefaix A. Sekaki and M. Gardes-Albert. (1994). Antioxidant action of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *Methods Enzymol.*, 234: 462-475.

**Marfaing H.** et Lerat Y. (2007). Les algues ont-elles une place en nutrition ? *Phytothérapie, Numéro Hors-série* : HS2-HS5

**Margret RJ**, Kumaresan S, Ravikumar S. (2009). A preliminary study on the anti-inflammatory activity of methanol extract of Ulva lactuca in rat. *J Environ Biol.* 30:899-902.

**Margret RJ**, Kumaresan S, Ravikumar S. A preliminary study on the anti-inflammatory.

**Marklund SL.** (1985). Pyrogallol autooxidation. In: Handbook of Methods for Oxygen Radical Greenwald, R.A. ed. Boca raton, Fla: *CRC Press*, 243-247.

- Martinez FO**, Helming L, Gordon S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol.* 27: 451-83.
- Masella R**, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C et Giovannini C. (2005). "Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes." *Journal of Nutritional Biochemistry* 16(10): 577-586.
- Mates J M**, Pérez-Gomez C et De Castro IN. (1999). "Antioxidant enzymes and human diseases." *Clinical Biochemistry* 32(8): 595-603.
- Matsui SM**, Muizzudin N, Arad SM, Marenus K. (2003). Sulfated polysaccharides from red microalgae anti-inflammatory properties in vitro and in vivo. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 104: 13-22.
- Mazzon E**, Muia C , Paola RD, Genoverse T, Menegazzi M, De Sarro A, Suzuki H, Cuzzocrea S. (2005). Green tea polyphenol extract attenuates colon injury induced by experimental colitis. *Free Rad Res*; 39(9): 1017-1025.
- Mc Lachlan J.** (1985). Macroalga (seaweeds): industriel resources and their utilization. *Plant and Soil* 89: 137-157.
- McCall MR.** et Frei B. (1999). "Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans?" *Free Radical Biology and Medicine* 26(7-8): 1034-1053.
- Meenakshi S**, Gnanambigai DM, Mozhi ST, Arumugam M, Balasubramanian T.(2009). Total flavanoid and in vitro antioxidant activity of two seaweeds of Rameshwaram coast. *Global J Pharmacol* , 3(2):59–62
- Mena S**, Ortega A et Estrela JM. (2009). "Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis." *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 674(1-2): 36-44.
- Mosmann T.** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* ;65(1-2):55-63.
- Mosser DM**, Edwards JP. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 8(12): 958-69.
- Moujahid B.** Bencharki L, Hilali A, Bagri L, Najim. (2004). Activité antibacterienne et antifongique des extraits d'algues marines d'origine marocaine. *Biologie et Santé.* Vol 4: 2.
- Moure A J**, Cruz D, Franco J, Manuel Dominguez, J. Sineiro, H. Dominguez, M. J. Nunez et J. Carlos Parajo. (2001). "Natural antioxidants from residual sources." *Food Chemistry* 72(2): 145-171.
- Mukherjee D**, Khatua TN, Venkatesh P, Saha BP, Mukherjee PK. (2010). Immunomodulatory potential of rhizome and seed extracts of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *J Ethnopharmacol.* 128: 490-494.

- Nagarathna PKM**, Reena K, Sriram R, Johnson W. (2013). Review on Immunomodulation and Immunomodulatory, Activity of Some Herbal Plants. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 22(1): 223-230.
- Nassiri-Asl, M.** et H. Hosseinzadeh. (2009). "Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (grape) and its bioactive compounds." *Phytotherapy Research* 23(9): 1197-1204.
- Neori, A.**, Msuya, F. E., Shauli, L., Schuenhoff, A., Kopel, F., and Shpigel, M. (2003). A novel three-stage seaweed (*Ulva lactuca*) biofilter design for integrated mariculture. *Journal of Applied Phycology* 15, 543-553.
- Nimse SB** and Pal D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *The Royal society of chemistry.* 5, 27986-28006.
- Chen-Xiao Zhang**, Zi-Ru Dai, Qiu-Xing Cai: Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Sipunculus nudus* L. extract. *J. Ethnopharmacol* 2011; 137:1177–1182.
- O’Shea JJ**, Ma A, Lipsky P. (2002). Cytokines and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 37-45.
- Okhawa H**, Ohishi N, Yagi K. (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95: 351–358.
- Ordon Ez.**, Gomez AAL, Vattuone, Isla MI, (2006).Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swart extracts. *Food Chem.*, 97: 452-458.
- Oyaizu M.** (1986). Studies on products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japan Journal of Nutrition.* 44:307-315.
- Pacheco-Sánchez M**, Boutin Y, Angers P, Gosselin A, Tweddell RJ. (2007). Inhibitory effect of CDP, a polysaccharide extracted from the mushroom *Collybia dryophila*, on nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in macrophages. *Eur J Pharmacol.* 555: 61-66.
- Packer L.** K. Kraemer et G. Rimbach. (2001). "Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications." *Nutrition* 17(10): 888-895.
- Palmer J D.** Soltis D E, Chase M W. (2004). "The plant tree of life: an overview and some points of view". *Am. J. Bot.* 91 (10): 1437–1445.
- Panfili G.** A. Fratianni et M. Irano. (2003). "Normal phase high-performance liquid chromatography method for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(14): 3940-3944.
- Paschapur S M**, Patil M B, Kumar R, Sachin R P. (2009).Evaluation of aqueous extract of leaves of *Ocimum kilimandscharicum* on wound healing activity in albino wistar rats. *Int. J. Pharm. Tech. Res*, 1(3), 544-550.
- Patel P**, Asdaq SMB. (2010). Immunomodulatory activity of methanolic fruit extract. *Saudi Pharmaceutical Journal.* 18: 161-65.

- Patel U**, Rajasingh S, Samanta S, Cao T, Dawn B, Rajasingh J. (2017). Macrophage polarization in response to epigenetic modifiers during infection and inflammation. *Drug Discov Today*. 22(1): 186-193.
- Percival E.** (1979). The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: Their basic structure, biosynthesis and function, *British Phycological Journal*. 14:2, 103-117.
- Pérez R** , Kaas R., Campello F, Arbault S. et Barbaroux O. (1992). La culture des algues marines dans le monde. *Ifremer*, 614 pages.
- Perianayagam JB**, Sharma SA, Pillai KK. (2006). Anti-inflammatory activity of *Trichodesma indicum* root extracts in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*. 104: 410-414.
- Prieur C**, Rigaud J, Cheynier V et Moutounet M. (1994). "Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds." *Phytochemistry* 36(3): 781-784.
- Quideau S**, Deffieux D, Douat-Casassus C et Pouységu L. (2011). "Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis." *Angewandte Chemie - International Edition* 50(3): 586-621.
- Ragan MA**, Glombitza KW. (1986) .Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Prog phycol Res* 4:130-230.
- Raven.** (2005). Evert and Eichhorn. *The Biology of Plants* 7th edition, pg. 335. W. H. Freeman and Company, New York.
- Retsky, K. L.**, K. Chen, J. Zeind et B. Frei. (1999). "Inhibition of copper-induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation." *Free Radical Biology and Medicine* 26(1-2): 90-98.
- Reviere B.** (2002). Biologie et Phylogénie des algues. *Editions Belin.*, tome1. pp 34.
- Rice-Evans, C. A.**, N. J. Miller et G. Paganga. (1996). "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids." *Free Radical Biology and Medicine* 20(7): 933-956.
- Rice-Evans, C.**, Miller, N.J. & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol Med* 20, 933-956
- Rivanor RLD**, Chaves HV, Do Valb DR, Freitas AR, Lemosb JC, Rodriguesa JAG, Pereirac KMA, De Araújo IWF, Bezerra MM, Benevides NMB. (2014). A lectin from the green seaweed *Caulerpa cupressoides* reduces mechanical hyper-nociception and inflammation in the rat temporomandibular joint during zymosan induced arthritis. *International Immunopharmacology*. 21: 34-43.
- 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 Ulves (Ulvales, Chlorophytes). *Doctorat Biotechnologies végétales, Université de Nantes*. 175 p.

**Rocha BAM**, Delatorre P, Oliveira TM, Benevides RG, Pires AF, Sousa AS., Souza LAG, Assereuy AMS, Debray MH, Azevedo WF, Sampaio AH, Cavada BS. (2011). Structural basis for both proand anti-inflammatory response induced by mannose-specific legume lectin from *Cymbosema roseum*. *Biochimie*. 93: 806-816.

**Rocha FD**, Pereira RC, Kaplan MAC, Teixeira VL (2007). Natural products from marine seaweeds and their antioxidant potential. *Braz. J. Pharmacogn.* 17, 631-639 | 18

**Rogers DJ**, Hori K. (1993). Marine algal lectins: new developments. *Hydrobiologia*, 260/261: 589-593.

**Ruiz G.** (2005). Extraction, détermination structurale et valorisation chimique de phycocolloïdes d'algues rouges. *Thèse de doctorat, 'université de Limoges, 230p.*

**Samara R B D**, Jocélia CR, Renan O S, Lucas A D N, Luciano S C et al. (2013). Role of the NO/KATP pathway in the protective effect of a sulfated-polysaccharide fraction from the algae *Hypnea musciformis* against ethanol-induced gastric damage in mice.

**Samonina GE**, Kopylova GN, Lukjanzeva GV, Zhuykova SE, Smirnova EA, German SV et al. (2004). Antiulcer effects of amylin: a review. *Pathophysiology*; 11:1-6.

**Sampaio AH**, Rogers DJ, Barwell CJ. (1998). A galactose specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. *Phytochemistry* 48: 765-769.

**Sandhya S**, Ramana VK, Vinod KR, Reddy S, Begum A. (2013). Scope of medical flora as effective antiulcer agents. *African J plant Sci*; 7(11): 504-512.

**Sartori-Thiel A.** (2003). "Activités anti-microbiennes d'extraits végétaux enrichis en polyphénols." Science et Agronomie ED 380 Doctorat: 177.

**Schepetkin IA**, Faulkner CL, Nelson-Overton LK, Wiley JA, Quinn MT. (2015). Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperus scopolorum*. *Int Immunopharmacol.* 5: 1783-1799.

**Schepetkin IA**, Quinn MT. (2006). Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int Immunopharmacol.* 6: 317-333.

**Schepetkin IA**, Xie G, Kirpotina LN, Klein RA, Jutila MA, Quinn MT. (2008). Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Opuntia polyacantha*. *Int Immunopharmacol.* 8: 1455-1466.

**Schroeter H**, Boyd JP E. Spencer, Williams RJ, Cadenas E et Rice-Evans C. (2002). "MAPK signaling in neurodegeneration: Influences of flavonoids and of nitric oxide." *Neurobiology of Aging* 23(5): 861-880.

**Senthil KA**, Murugan A. (2013). Antiulcer, wound healing and hepatoprotective activities of the seaweeds *Gracilaria crassa*, *Turbinaria ornata* and *Laurencia papillosa* from the southeast coast of India. *Braz. J. Pharm. Sci.* 49: 669-678.

**Seon Hwa, L, T. Oe et I. A. Blair.** (2001). "Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins." *Science* 292(5524): 2083-2086.

**Sharma P, Jha AB, Dubey RS et Pessarakli M.** (2012). "Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions." *Journal of Botany* 2012: 1-26.

**Sharma U., Sharma KK, Sharma N, Sharma A, Singh HP et Sinha AK.** (2008). "Microwave-assisted efficient extraction of different parts of *Hippophae rhamnoides* for the comparative evaluation of antioxidant activity and quantification of its phenolic constituents by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(2): 374-379.

**Shiomi K, Yamanaka H, Kikuchi T.** (1981). Purification and physicochemical properties of hemagglutinin (GVA-1) in the red alga *Gracilaria verrucosa*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 47: 1079–1084.

**Shu MH, 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*; 14:13-61.

**Simpore J, Kabore F, Zongo F, Dansou D, Bere A.** (2006). Nutrition rehabilitation of undernourished children utilizing *Spirulina* and *misola*. *Nutr. J.*, 23(5): 3-9.

**Smirnoff, N.** (2005). "Antioxidants and reactivities oxygen species in plants."

**Smith, A. R., S. V. Shenvi, M. Widlansky, J. H. Suh et T. M. Hagen.** (2004). "Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress." *Current Medicinal Chemistry* 11(9): 1135-1146.

**Son DJ, Lee GR, Ch S, Oh S, Lee SE, Cgoi WS.** (2015). Gastroprotective efficacy and safety evaluation of scoparone derivatives induced gastric lesions in rodents. *Nutrients*; 7(3): 1945-64.

**Spavieri, J., Kaiser, M., Casey, R., Hingley-Wilson, S., Lalvani, A., Blunden, G., and Tasdemir, D.** (2010). Antiprotozoal, antimycobacterial and cytotoxic potential of some British green algae. *Phytotherapy Research* 24, 1095-1098.

**Srinivas TL, Lakshmi SM, Shama SN, Reddy GK, Prassanna KR.** (2013). Medicinal Plants as Anti-ulcer Agents. *J Pharmacog Phytochem*; 2(4): 91-97.

**Stewart J**, Kellett N et Castro D. (2003). The central nervous system and cardiovascular effects of levobupivacaine and ropivacaine in healthy volunteers. *Anesth. Analg.*, 97, 412-416.

**Sumaya Martinez**, M. T. (2004). "Valorisation d'hydrolysats de co-produits de crevettes : étude de l'activité antiradicalaire et antioxydante, fractionnement des substances actives et effet de la glycation." Microbiologie Doctorat : 188.

**Sumbul S**, Ahmed MA, Asif M, Saud I, Akhtar M. (2010) . Evaluation of *Myrtus communis* Linn. Berries(common myrtle) in experimental ulcer models in rats. *Hum Experim Toxicol*; 29(11): 935-944.

**Sung JJY**, Kuipers EJ, El-Serag HB. (2009). Systematic review: the global incidence and prevalence of peptic ulcer disease. *Aliment Pharmacol Ther* ; 29: 938-946.

**Suresh Kumar K**, Ganesan K and Subba Rao PV. Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty – An edible seaweed. *Food Chem*, 2008, 107:289-295  
**Suzuki H**, Nishizawa T, Tsugawa H, Mogami S, Hibi T. (2012). Roles of oxidative stress in stomach disorders. *J Clin Biochem Nutr*; 50(1): 35-3.

**Suzuki, T.**, Takeda, S., Suzuki, M., Kurosawa, E., Kato, A., Imanaka, Y. (1987). Constituents of marine plants. Part 67 Cytotoxic squalene-derived polyethers from the marine red alga *Laurencia obtusa* (Hudson) Lamouroux. *Chem. Lett.*, 361–364.

**Tabarsa M**, Rezaei M, Ramezanpour Z and Waaland JR. (2012). Chemical compositions of the marine algae *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta) and *Ulva lactuca* (Chlorophyta) as a potential food source. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92, 2500-2506.

**Tarascou, I., J. P.** Mazauric, E. Meudec, J. M. Souquet, D. Cunningham, S. Nojeim, V. Cheynier et H. Fulcrand. (2011). "Characterisation of genuine and derived cranberry proanthocyanidins by LC-ESI-MS." *Food Chemistry* 128(3): 802-810.

**Temponi VS**, da Silva JB, Alves MS, Ribeiro A, de Jesus Ribeiro Gomes de Pinho J, Yamamoto CH, PintoMA, Del-Vechio-Vieira G, Vieira de Sousa OV. (2012). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Vernonia polyanthes* leaves in Rodents. *Int J Mol Sci.* 13: 3887-3899.

**Temponi VS**, da Silva JB, Alves MS, Ribeiro A, de Jesus Ribeiro Gomes de Pinho J, Yamamoto CH, PintoMA, Del-Vechio-Vieira G, Vieira de Sousa OV. (2012). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Vernonia polyanthes* leaves in Rodents. *Int J Mol Sci.* 13: 3887-3899.

**Thabrew MI** and Aarawwawala LDAM. (2016). An overview of *in vivo* models that can be used for evaluating anti-gastric ulcer potencial plants. *Austin biol*; 1(2): 1007.

**Topcu G**, Yesilyurt V, Halfon B, Ozturk M. (2008). Antioxidant potential and phenolic constituents of *Salvia cedronella*. *Food Chem.* 108:31–39.

- Turner A**, (2012). Brice D, Brown MT. Interactions of silver nanoparticles with the marine macroalga, *Ulva lactuca*. *Ecotoxicology*. 21:148–154.
- Udenigwe, C. C.**, V. R. Ramprasath, R. E. Aluko et P. J. H. Jones. (2008). "Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy." *Nutrition Reviews* 66(8): 445-454.
- Valko M**, Rhodes C J, Moncol J, Izakovic M et Mazur M. (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." *Chemico-Biological Interactions* 160(1): 1-40.
- Valko M**, Izakovic M, Mazur M., Rhodes CJ et Telser J. (2004). "Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence." *Molecular and Cellular Biochemistry* 266(1-2) : 37-56.
- Velazquez E**, Tournier H A, Buschiazzo PM, Saavedra G, Schinella G R. (2003). Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia*. 74:91–97.
- Viana GSB**, Freitas ALP, Lima MML, Vieira LAP, Andrade MCH & Benevides NMB (2002). Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red algae *Bryothamnion seaforthii*(Turner) Kütz. and *B. triquetrum* (S.G. Gmel.) M. Howe. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35: 713-722.
- Vieira LAP**, Freitas ALP, Feitosa JPA, Silva DC, Viana GSB. (2004). The alga *Bryothamnion seaforthii* contains carbohydrates with antinociceptive activity. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37: 1071-1079.
- Vineager R**, Traux JF, Selph JH, Johnston PR, Vinal AH, McKenzie KK. (1987). Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. *Federal Proceedings*. 46: 118-126.
- Vinegar R**, Schreiber W, Hugo R. (1969). Biphasic development of carrageenan edema in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 166, 96-103.
- Wajant H**, Pfizenmaier K, Scheurich P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 10: 45-65.
- Waller DG**, Renwick AG, Hillier K. (2005). *Medical pharmacology and therapeutics, 2<sup>nd</sup> ed.* El Sevier Limited: 347-401.
- Wang M**, Jiang C., MA L., Zhang Z., Cao L., Liu J., Zeng X., (2013).-Preparation, preliminary characterization and immunostimulatory activity of polysaccharide fractions from the peduncles of *Hoveniadelphicis*. *Food Chemistry*, vol.138 (1): 41–47.
- Wang ML**, Hou YY, Chiu YS, Chen YH. (2013). Immunomodulatory activities of *Gelidium amansii* gel extracts on murine RAW 264.7 macrophages. *Journal of food and drug analysis*. 21: 397-403.

**Wang SY**, Hsu ML, Hsu HC, Tzeng CH, Lee SS, Shiao MS, Ho CK. (1997). The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *Int J Cancer*. 70(6): 699-705.

**Wang T**, Jonsdotter R & Olafsdotter, G. (2009b). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal ion chelation of extracts from icelandic seaweeds. *J Food Chem* 116, 240-248.

**Wardman P** et Candeias LP. (1996). "Fenton chemistry: *An introduction.*" *Radiation Research* 145(5): 523-531.

**Waterman P G.** & Molle S. (1994) Analysis of phenolic plant metabolites. *Blackwell scientific publications*, Oxford. 238 p

**Wijesekara I**, Pangestuti R, Kim SK. (2011). Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydr Polym*. 84: 14-21.

**Winter CA**, Risely EA, Nuss GW. (1962). Carrageenan induced edema in hind paw of the rat as assay for anti-inflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*. 111:544-7.

**Wong SH**, Cho CH, Ogle CW. (1991). Calcium and ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Pharmacol Res*; 23:71-79.

**Wwallace JL**. Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. *Best pract Res Clin Gastroenterol*; 15(5): 691-703.

**Xia E Q**, G. F. Deng, Y. J. Guo et H. B. Li. (2011). "Biological activities of polyphenols from grapes." *International Journal of Molecular Sciences* 11(2): 622-646.

**Yan H**, Zhu D, Xu D, Wu J, Bian X. (2008). A study on *Cordycepsmilitaris* polysaccharide purification, composition and activity analysis. *African Journal of Biotechnology* ; 7: 4004-4009.

**Yoshida H**, Kajimoto G et Emura S. (1993). "Antioxidant effects of d-tocopherols at different concentrations in oils during microwave heating." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 70(10): 989-995.

**Yoshizawa Y**, Ametani A, Tsunehiro J, Nomura K, Itoh M, Fukui F, & Kaminogawa S. (1995). Macrophage stimulation activity of the polysaccharide fraction from a marine alga (*Porphyra yezoensis*): structure-function relationships and improved solubility. *Biosci Biotechnol Biochem*. 59: 1933-1937.

**Yoshizawa Y**, Enomoto A, Todoh H, Ametani A, Kaminogawa S. (1993). Activation of murine macrophages by polysaccharide fractions from marine algae (*Porphyra yezoensis*). *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 57: 1862-1866.

**Zakaria NA**, Ibrahim D, Sulaiman SF and Supardy A. (2011). Assessment of antioxidant activity, total phenolic content and in-vitro toxicity of Malaysian red seaweed, *Acanthophora spicifera*. *J. Chem. Pharm. Res*. 3: 182-191.

**Zarah R** , Mehranian, M, Farzaneh, V. & Kohzad, S. (2007). Antioxidant activity of extract from a brown alga, *Sargassum boveanum*. *Afr J Biotechnol* 6, 2740-2745.

**Zelickson MS**, Bonder CM, jhonson BL, Camunas JA, Smith DE, Rawlinson D, Von S, Stone HH, Taylor SM. (2011). *Helicobacter pylori* is not the predominant etiology of peptic ulcers requiring operation. *Am Surg*; 77: 1054-1060.

## Thème

### POTENTIEL ANTIOXYDANT DES ALGUES DES CÔTES DE L'EST ALGERIEN

#### Résumé

Le nombre d'études des extraits des algues marines issues de l'espèce algérienne *Ulva lactuca* reste très petit. Cette étude vise à examiner le potentiel biologique des fractions polysaccharides et lectines de l'espèce *U. lactuca* collectée de l'Est algérien (Jijel). Ces fractions sont évaluées en testant l'activité antioxydante *in vitro*, l'activité anti-inflammatoire induite par la carragénine chez le rat *Albino wistar* ainsi que l'effet immuno-modulateur *in vivo* via l'évaluation de l'index de la phagocytose. Les métabolites d'*U. lactuca* sont aussi étudiés pour leurs pouvoirs à inhiber la synthèse de TNF- $\alpha$  et la libération du NO chez les macrophages RAW 264.7 stimulés par LPS. L'effet gastro-protecteur de la phase polysaccharides vis-à-vis les lésions inflammatoires et ulcéraives de la muqueuse gastrique a été estimé par le modèle animale des altérations gastriques induite par une administration intra-gastrique de l'éthanol absolu. Toutes ces études sont supporté par une examinations microscopiques et macroscopiques minutieuses. Les résultats montrent que les phases poly phénoliques (MeOH et EtOAc ) d'*U. lactuca* ont prouvé un potentiel antioxydant *in vitro*. Les résultats montrent que la phase polysaccharide a prouvé un potentiel antioxydant *in vitro* (DPPH, le pouvoir réducteur,). Les phases polysaccharides et lectines à 100 mg/Kg ont manifesté un effet anti-œdème si significatif. La diminution de l'activité MPO et des taux du MDA au niveau des tissus inflammatoire des pieds des rats était significative dans les cas de la phase polysaccharides en comparaison à celle des lectines. Les deux phases ont augmenté l'activité phagocytaire des macrophages *in vivo*, seulement cette augmentation était plus prononcée chez les groupes traités par la phase lectines. A 60  $\mu$ g/mL les deux phases ont manifesté un effet cytotoxique faible vis-à-vis les cellules RAW, mais elles ont exercé un effet protecteur contre l'inflammation provoquée par les LPS chez les cellules RAW264 et ont révélé une dose dépendante significative régulant en aval la production du NO par les macrophages, la libération TNF- $\alpha$ ; ces effets sont plus évidentes dans les cas de la phase polysaccharides. Les résultats de cette étude ont montré que *U. lactuca* algérienne a une importante activité immuno-modulateur dû spécifiquement à la fraction lectines et un effet antiinflammatoire dû spécifiquement à la fraction polysaccharides. Ces résultats ont révélé que le prétraitement des rats par l'extrait des polysaccharides préserve les biomarqueurs de la muqueuse gastrique altérée et compense le déficit des mécanismes de défense antioxydant, GSH, CAT, GPX, SOD and GST et élimine la peroxydation lipidique. L'étude histologique a également confirmé une restauration importante de l'architecture de la muqueuse gastrique. Ainsi, *U. lactuca* algérienne est dotée d'un potentiel antioxydant, anti- inflammatoire et gastro-protecteur, ces propriétés pourraient être due aux effets synergétique de ses constituant comprenant en particulier les lectines et les polysaccharides.

**Mots clé :** *U. lactuca*, polysaccharides, lectines, anti-inflammatoire, immune-modulateur antioxydant,

#### Membre de jury :

**Président :** Pr. AMEDAH. Souad.

Université des Frères Mentouri Constantine 1.

**Directeur :** Pr. MENAD. Ahmed

Université des Frères Mentouri Constantine 1.

**Examineurs :** Pr. DAHAMNA. Saliha

Université Abbas Ferhat Sétif 1.

Pr. LALAOUI Korichi

Université des Frères Mentouri Constantine 1.

Dr. ZOUAGHI Youcef

Université des Frères Mentouri Constantine 1.

Année universitaire 2017/2018.