



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ ABOU BEKR BELKAID TLEMCCEN

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de biologie

Laboratoire des Produits Naturels « LAPRONA »



THÈSE

En vue de l'obtention du diplôme de **Doctorat en Biologie**

Option : **Produits Naturels, Aspects Nutritionnels et Activités Biologiques**

Présentée par **M^{elle} Ghania AISSAOUI**

Thème _____

Étude phytochimique et activités biologiques de trois algues marines de la côte ouest d'Algérie: *Sargassum vulgare*, *Cladostephus hirsutus* et *Rissoella verruculosa*.

Date de soutenance : 05/12/ 2024

Devant le jury:

Présidente :	Mme. BEKHECHI Chahrazed	<i>Professeur</i>	<i>Université de Tlemcen</i>
Directrice de thèse :	Mme. BELYAGOUBI-BENHAMMOU Nabila	<i>Professeur</i>	<i>Université de Tlemcen</i>
Examineurs :	M. DJEBLI Noureddine	<i>Professeur</i>	<i>Université de Mostaganem</i>
	M. BELYAGOUBI Larbi	<i>M.C.A</i>	<i>Université de Tlemcen</i>
	Mme. ZITOUNI Saida Hanane	<i>M.C.A</i>	<i>Université Oran 1</i>
Invitée d'honneur :	Mme. BENGUEDDA-RAHAL Wacila	<i>M.C.A</i>	<i>Université de Tlemcen</i>

Année universitaire : 2023-2024

Remerciements

Je tiens à remercier, Dieu à qui je rends grâce

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués au Laboratoire des produits naturels (LAPRONA) du département de biologie, de la faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers (SNV/STU) de l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen

La reconnaissance est la mémoire du cœur. La thèse est un long chemin à parcourir certes accompagné de personnes généreuses et encourageantes que je souhaite remercier ici. Alors je leur dis Merci de m'avoir permis d'arriver au bout de ce chemin...

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement, Mme ATIK-BEKKARA Fawzia Professeur au département de Biologie, Faculté des SNV-STU, Université de Tlemcen, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je vous exprime toute ma reconnaissance pour votre disponibilité, votre écoute et la rigueur scientifique par laquelle j'ai été guidé ainsi que pour la qualité de vos conseils avisés. Merci pour la confiance que vous avez su m'accorder, merci d'avoir pu faire de cette expérience une aventure unique malgré toutes les difficultés.

Je voudrais remercier tout spécialement ma directrice de thèse, Mme BELYAGOUBI-BENHAMMOU Nabila, Professeur au département de biologie, Faculté SNV-STU, Université de Tlemcen qui a toujours été présente durant cette thèse. Ça a été un honneur d'être sa doctorante pendant ces longues années. Son implication, son aide et son soutien permanent m'ont été crucial. Je tiens aujourd'hui à vous remercier chaleureusement pour votre rôle dans l'élaboration de ce travail.

Je tiens également à remercier Mme BENGUEDDAWassila, Professeur au département d'Ecologie et Environnement, Faculté des SNV-STU, Université de Tlemcen, pour m'avoir aidée dans l'identification des algues étudiées.

Je remercie profondément Mme BEKHECHI Chahrazed, Professeur à l'Université de Tlemcen, de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ma thèse. Vos remarques et suggestions seront de grande valeur pour enrichir ce travail.

Je remercie Mr DJEBLI Noureddine, Professeur à l'Université de Mostaganem, pour avoir accepté de lire, instruire et juger cette Thèse. Merci pour votre contribution à l'amélioration de ce document. Veuillez Trouvez ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Mes remerciements vont également à Mme ZITOUNI Hanane, MCA à l'Université d'Oran, qui m'a honoré en acceptant d'examiner ce travail et de participer au jury de cette thèse.

A Monsieur BELYAGOUBI Larbi, MCA à l'Université de Tlemcen, vont mes remerciements les plus sincères, pour l'aide précieuse qui m'a apporté, je vous remercie, monsieur, pour votre esprit humain et scientifique de grande qualité. Je vous remercie aussi d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens également à exprimer mes sincères remerciements au Laboratoire de Parasitologie du Muséum National d'Histoire Naturelle, pour leur soutien dans l'étude de l'activité antiparasitaire de mes extraits.

Je suis également très reconnaissant au Laboratoire de Pharmacognosie et Api-Phytothérapie de l'Université de Mostaganem, dirigé par le Professeur DJEBLI, pour leur collaboration dans l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*.

Un remerciement tout particulier va au Laboratoire d'Anatomie Pathologique de l'Hôpital Militaire d'Ain El Baida d'Oran, sous la direction précieuse du Dr BOUAKLINE, pour sa supervision et son expertise dans la réalisation de l'étude histologique.

J'adresse également mes remerciements à tous les membres du laboratoire des produits Naturels de l'Université de Tlemcen, pour tous les conseils et les discussions scientifiques que nous avons pu échanger ensemble. Mariem Benmahdjoub plus qu'une collègue de travail, un grand merci pour ton aide dans tous les moments de ma thèse. Sabah Gheddouchi, tu as toujours su être présente pour moi dans les bons comme dans les moments les plus durs, merci pour ton soutien, et ton optimisme à toutes épreuves. J'espère que notre amitié demeurera pour toute la vie.

A tous ceux qui me sont très chers et que ma réussite leur tient à cœur.

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. Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour...C'est grâce à vous, Maman, Papa, que j'ai trouvé la force et le courage de ne jamais abandonner malgré toutes les difficultés.

توصلت البحوث العلمية عن المركبات الطبيعية ذات الخصائص الدوائية إلى أن الطحالب البحرية تعد مصدرا مهما لمركبات جديدة ذات نشاط حيوي متنوع. أجريت هذه الدراسة بهدف البحث عن الأنشطة البيولوجية لثلاث طحالب من الغرب الجزائري، *Sargassum vulgare*، *Cladostephus hirustus* و *Rissoella verruculosa*.

تم تحديد المحتوى الفينولي الكلي، فلافونويد الكلي، الفلافونول الكلي ومجموع العفص المكثف في المستخلصات الخام وإثير البترول، و أسيتات الإيثيل، ثنائي كلورو ميثان، بيوتانول والمترسبات المائية. تم تحديد النشاط المضاد للأكسدة عن طريق عدة تحاليل في المختبر. إجمالي القدرة المضادة للأكسدة، قوة إرجاع و تثبيط الحديد، الطاقة المضادة للأكسدة و تثبيط الجذر الحر DPPH*. كما تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات من المستخلصات الخام والمستخلصات الجزئية ضد البكتيريا إيجابية الجرام والسالبة الجرام والخميرة باستخدام اختبارات مختلفة مثل إختبار الانتشار عبر الأقراص، والحد الأدنى من التركيز المثبط والحد الأدنى من التركيز المبيد للجراثيم. تم دراسة النشاط المضاد للطفيليات في المختبر ضد أشكال مجرى الدم من *Trypanosoma brucei brucei* والمراحل داخل كريات الدم الحمراء *Plasmodium falciparum*. كما تمت دراسة السمية الحادة للمستخلص الخام من *C. hirustus* و النشاط الحيوي المضاد للالتهابات.

كشفت المستخلصات الخام عن قدرة عالية مضادة للأكسدة الكلية تتراوح بين 1.272 إلى 1.630 ملغ مكافئ حمض الاسكوربيك/غ من المادة الجافة. بالنسبة للطحالب الثلاثة، أظهرت المستخلصات الجزئية لخلات الإيثيل أعلى نشاط مضاد للأكسدة من خلال المقاييسات الثلاث التي تم اختبارها، مع ما يصل إلى 67% من نشاط الكسح الجذري و EC₅₀ من 1.114 مل/مغ بواسطة مقاييس الحد من قدرة الحديدك لجزء إي من *R. verruculosa*. وأظهرت المستخلصات الجزئية لأسيتات الإيثيل من الطحالب الثلاثة اختبار أكثر فعالية في النشاط المضاد للميكروبات ضد *S. aureus* (7-14.5 مل) *B. cereus* (7-10.75 مل)، وتراوحت وقيم CMI من 0.937 إلى 7.5 مل/مغ و قيم MBC > 15 مل/مغ. وفيما يتعلق بالنشاط المضاد للطفيليات، وجد أن مستخلصات أسيتات الإيثيل لكل من *S. vulgare* و *R. verruculosa* تكون أكثر فعالية ضد *T. b. brucei* مع قيم IC₅₀ من 9.3 و 11.0 ميكروغرام/مل على التوالي، في حين أن المستخلصات الجزئية إي الثلاثة كانت ضئيلة النشاط ضد *Plasmodium falciparum* لم يلاحظ أي علامات للسمية الحادة في مستخلص الخام من *C. hirustus* في 150 و 300 ملغ / كغ. وأظهرت نتائج النشاط ضد انخفاض التهاب أرجل الفئران بقيمة تعادل 58.86% و 71.01% في 150 و 300 ملغ/كغ، على التوالي، في الساعة السادسة.

الكلمات المفتاحية: *Sargassum vulgare*، *Cladostephus hirustus*، *Rissoella verruculosa*، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للميكروبات، نشاط مضاد للطفيليات، السمية الحادة، نشاط مضاد للالتهابات.

Résumé

Les algues marines constituent une source prometteuse de nouveaux composés bioactifs doués de diverses activités pharmacologiques. L'objectif visé dans ce présent travail est l'évaluation des activités biologiques de trois algues marines de la côte ouest d'Algérie, il s'agit de *Sargassum vulgare*, *Cladostephus hirsutus* et *Rissoellav erruculosa*.

Les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes, flavonols et en tanins condensés ont été déterminées dans les extraits bruts et leurs fractions: éther de pétrole, acétate d'éthyle, dichlorométhane, butanol et dans la fraction aqueuse. L'activité antioxydante *in vitro* a été réalisée par le biais de trois tests, à savoir la capacité antioxydante totale, la réduction du fer et le piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl DPPH. L'activité antimicrobienne des extraits bruts et de leurs fractions contre des bactéries Gram-positives, bactéries Gram-négatives et une levure ont été évaluées en utilisant divers tests tels que le test de diffusion du disque, la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB). L'activité antiparasitaire a été étudiée *in vitro* contre les formes sanguines de *Trypanosoma brucei brucei* et les stades intra-érythrocytaires de *Plasmodium falciparum*. La toxicité aiguë et l'activité anti-inflammatoire *in vivo* de l'extrait brut de *Cladostephus hirsutus* ont également été étudiées.

Les extraits bruts ont révélé une capacité antioxydante totale élevée allant de 1,272 à 1,630 mg d'équivalent acide ascorbique/g de matière sèche. La meilleure activité réductrice du fer est obtenue avec la fraction acétate d'éthyle de *R. verruculosa* avec une concentration de EC₅₀ égale à 1.114±0.001 mg/mL, et une activité considérable à piéger le radical DPPH 67,877%. Les fractions acétate d'éthyle des trois algues testées ont montré une activité antimicrobienne plus intéressante contre *S. aureus* (7-14,5 mm) et *B. cereus* (7-10,75 mm), des valeurs de CMI allant de 0,937 à 7,5 mg/mL et des valeurs MBC>15 mg/mL. En ce qui concerne l'activité antiparasitaire, les fractions acétate d'éthyle de *S. vulgare* et *R. verruculosa* se sont révélées plus efficaces contre *T. b. brucei* avec des valeurs de IC₅₀ de 9,3 et 11,0 µg/mL, respectivement, alors que les trois fractions étaient peu actives contre *P. falciparum*. Aucun signe de toxicité aiguë n'a été observé dans l'extrait brut de *C. hirsutus* à 150 et 300 mg/kg. Une réduction de l'œdème de la patte des souris de 58.86% et de 71.01% à 150 et 300 mg/kg, respectivement, a été enregistrée à la sixième heure.

Mots clés: *Sargassum vulgare*, *Cladostephus hirsutus*, *Rissoella verruculosa*, activité antioxydante, capacité antimicrobienne, activité antiparasitaire, toxicité aiguë, activité anti-inflammatoire.

Abstract

The search for natural compounds with pharmaceutical activity indicated marine macroalgae as promising source to supply novel compounds with varying bioactivities. This study was carried out the biological activities of three Algerian algae, *Sargassum vulgare*, *Cladostephus hirsutus* and *Rissoella verruculosa*.

The total phenolic contents, Total flavonoids, total flavonols and total condensed tannins were determined in the crude extracts and their fractions petroleum ether, ethyl acetate, dichloromethane, butanol and aqueous fraction. The antioxidant activity was performed via several *in vitro* assays: Total Antioxidant Capacity, Ferric Reducing Antioxidant Power and DPPH radical scavenging activity. Antimicrobial activity of the crude extracts and their fractions against Gram-positive, Gram-negative bacteria, and yeast was assessed using various tests such as the disc diffusion assay, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Antiparasitic activity was studied *in vitro* against the blood stream forms of *Trypanosoma brucei brucei* and the intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. The *in vivo* anti-inflammatory activity and acute toxicity of the crude extract of *Cladostephus hirsutus* were also investigated.

Crude extracts revealed high total antioxidant capacity ranging from 1.272 to 1.630 mg ascorbic acid equivalent/g of dry matter. For the three algae, ethyl acetate fraction showed the highest antioxidant activity by the three assays tested, with up to 67,877% of DPPH radical scavenging activity and an EC₅₀ of 1.114 mg/mL by ferric reducing power assay for the ethyl acetate fraction of *R. verruculosa*. ethyl acetate fractions of the three tested algae showed more interesting antimicrobial activity against *S. aureus* (7-14.5 mm) and *B. cereus* (7-10.75 mm), MIC values ranged from 0.937 to 7.5 mg/mL and MBC values >15 mg/mL. Concerning the antiparasitic activity, ethyl acetate fractions of *S. vulgare* and *R. verruculosa* were found to be more effective against *T.b. brucei* with IC₅₀ values of 9.3 and 11.0 µg/mL, respectively, whereas the three ethyl acetate fractions were little active against *Plasmodium falciparum*. No signs of acute toxicity were observed in the crude extract of *C. hirsutus* at 150 and 300 mg/kg. Significant and dose-dependent activity was showed against acute inflammation with edema reduction of 58.86% and 71.01% at 150 and 300 mg/kg, respectively, at 6 hour.

Keywords: *Sargassum vulgare*, *Cladostephus hirsutus*, *Rissoella verruculosa*, Antioxidant activity, antimicrobial activity; antiparasitic activity, acute toxicity, anti-inflammatory.

Table des matières

Remerciements	i
مقدمة.....	iii
Résumé	iv
Abstract	v
Table des matières	vi
Liste des figures	x
Liste des tableaux	xii
Liste des abréviations	xiii
Introduction	1
1^{ère} partie. Données bibliographiques	3
Chapitre 1 : Généralités sur les algues	3
1 Définition	3
2 Caractéristiques structurales des algues.....	3
2.1 Les microalgues	3
2.2 Les macroalgues.....	4
3 Les grands groupes des algues marines	5
3.1 Les algues vertes (Chlorophytes)	5
3.2 Les algues rouges (Rhodophytes)	5
3.3 Les algues brunes (Chromophytes)	6
4 Modalités reproductives:.....	6
4.1 Mode sexué	6
4.2 Mode asexué	6
5 Principales applications des algues	7
5.1 Dans l'industrie alimentaire	7
5.2 Dans le domaine pharmaceutique et médical.....	7
5.3 Dans le domaine cosmétique	8
5.4 En Agronomie	9
Chapitre 2. Constituants essentiels des algues marines	10
1 Les composés phénoliques d'algues	10
1.1 Phlorotannins	11

1.2	Flavonoïdes :	11
1.3	Quinones	12
2	Alcaloïdes	13
3	Caroténoïdes	13
4	Terpènes	14
5	Stérols	15
Chapitre 3. Activités biologiques des algues marines		16
1	Activité Antioxydante	16
2	Activité antimicrobienne	18
3	Activité anti-inflammatoire	18
4	Activité antiparasitaire	20
4.1	Maladie du sommeil ou Trypanosomiase Africaine (TA)	20
4.2	<i>Plasmodium</i> , parasite hématozoaire du paludisme	21
Chapitre 4. Présentation des espèces investiguées		23
1	<i>Sargassum vulgare</i> C. Agardh.	23
1.1	Description botanique	23
1.2	Travaux antérieurs	25
2	<i>Cladostephus hirsutus</i> (Linnaeus) Boudouresque & M.Perret.	26
2.1	Description botanique	26
2.2	Travaux antérieurs	27
3	<i>Rissoella verruculosa</i> (Bertoloni) J. Agardh.	28
3.1	Description botanique	28
3.2	Travaux antérieurs	29
2 ème partie. Matériel et méthodes		31
1	Matériel végétal	31
1.1	Critères de sélection	31
1.2	Collecte et échantillonnage	31
1.3	La récolte	33
2	Préparation des extraits	33
2.1	Préparation de l'extrait brut	33
2.2	Fractionnement de l'extrait brut	34
2.3	Calcul des rendements en extraits secs	35
3	Dosage des composés phénoliques	35

3.1	Dosage des phénols totaux.....	35
3.2	Dosage des flavonoïdes	35
3.3	Dosage des tanins condensés	36
3.4	Dosage des flavonols.....	36
4	Evaluation des activités biologiques.....	37
4.1	Le potentiel antioxydant	37
4.1.1	Capacité antioxydante totale (CAT).....	37
4.1.2	Piégeage du radical DPPH'	37
4.1.3	Réduction du fer	38
4.2	Evaluation de l'activité antimicrobienne	38
4.2.1	Souches microbiennes testées	39
4.2.2	Méthodes d'étude du pouvoir antimicrobien	39
4.2.2.1	Mise en culture des souches	39
4.2.2.2	Méthode de diffusion sur disque	40
4.2.2.3	Méthode de micro-dilution en milieu liquide.....	40
4.3	Etude de l'activité antiparasitaire.....	42
4.3.1	Activité antiplasmodiale	42
4.3.1.1	Culture <i>in vitro</i> de la phase intraérythrocytaire de <i>P. falciparum</i>	42
4.3.1.2	Évaluation <i>in vitro</i> de l'activité antiplasmodiale des fractions acétates d'éthyle	42
4.3.2	Activité antitrypanosomale	43
4.4	Test de toxicité	44
4.4.1	Principe	44
4.4.2	Matériel biologique	44
4.4.3	Protocole	45
4.5	Activité anti-inflammatoire.....	45
4.5.1	Protocole expérimental.....	45
4.5.1.1	Prétraitement par l'extrait	45
4.5.1.2	Induction de l'inflammation.....	46
4.5.1.3	Injection de la carragénine	46
4.5.1.4	Évaluation de l'activité anti-inflammatoire	46
4.5.1.5	Etude histologique	47
5	Etude statistique	49
3^{ème}	partie. Résultats et discussion	50

1 Résultats	50
1.1 Rendement d'extraction.....	50
1.2 Dosage des composés phénoliques	51
1.3 Evaluation des activités biologiques	52
1.3.1 Potentiel antioxydant.....	52
1.3.1.1 Capacité Antioxydante Totale (CAT).....	52
1.3.1.2 Réduction du fer	53
1.3.1.3 Piégeage du radical DPPH'	54
1.3.1.4 Relation entre les teneurs en composés phénoliques et les activités antioxydantes.....	56
1.3.2 Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	57
1.3.3 Evaluation de l'activité antiparasitaire	63
1.3.4 Activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	65
1.3.4.1 Toxicité aigue	65
1.3.4.2 Œdème de la patte induit par la carragénine	65
1.3.4.3 Etude histologique	67
2 Discussion	69
Conclusion	79
Références bibliographiques	81
Annexes	
Valorisation des travaux de recherches	

Liste des figures

Figure 1. Microalgues	4
Figure 2. Représentation schématique d'une macroalgue brune de type fucale.....	4
Figure 3. Exemples de structures chimiques de certains phlorotannins détectés dans les algues.....	11
Figure 4. Squelette de base des flavonoides.....	12
Figure 5. Structures de quelques motifs quinoniques.....	12
Figure 6. Exemples de structures alcaloïdiques	13
Figure 7. La structure de la fucoxanthine.....	14
Figure 8. Exemples de structure de terpènes.....	14
Figure 9. Exemples de structures des stérols d'algues.....	15
Figure 10. Photo de <i>Sargassum vulgare</i>	24
Figure 11. Photo de <i>Cladostephus hirsutus</i>	26
Figure 12. Photo de <i>Rissoella verruculosa</i>	29
Figure 13. Localisation géographique du site d'échantillonnage.....	32
Figure 14. Plage Madrid (W. Ain Témouchent).....	32
Figure 15. Protocole d'extraction.....	34
Figure 16. Mécanisme réactionnel du test de la réduction de fer.....	38
Figure 17. Réduction de la résazurine en résorufine.....	44
Figure 18. Capacité antioxydant totale des extraits bruts et des fractions des trois algues.....	53
Figure 19. Pouvoir réducteur exprimé par les valeurs de EC ₅₀ des extraits bruts et des fractions des trois algues.....	54
Figure 20. Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits bruts et des fractions de <i>S. vulgare</i> , <i>R. verruculosa</i> et <i>C. hirsutus</i>	55
Figure 21. Effet antimicrobien des FAE et FDCM de <i>S. vulgare</i> à différentes concentrations.....	62
Figure 22. Effet antimicrobien des FAE et FDCM de <i>C. hirsutus</i> à différentes concentrations.....	62
Figure 23. Effet antimicrobien des FAE et FDCM de <i>R. verruculosa</i> à différentes concentrations.....	62

Figure 24. Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte (%AUG) des souris pendant 6h.....	66
Figure 25. Pourcentage d'inhibition (% INH) de l'œdème de la patte des souris pendant 6h.....	67
Figure 26. Coupe histologiques des tissus enflammés de la patte des souris. Coloration Hématoxyline Eosine Grossissement X 200.....	68

Liste des tableaux

Tableau 1. Paramètres géographiques et bioclimatiques de la station de la récolte (Encarta, 2009).....	31
Tableau 2. Liste des microorganismes testés.....	39
Tableau 3. Rendements des extraits bruts et des différentes fractions des trois algues.....	50
Tableau 4. Teneurs en composés phénoliques des extraits bruts et des fractions obtenus à partir des trois algues.....	51
Tableau 5. Coefficients de corrélation linéaire (r) entre les teneurs en composés phénoliques et les activités	57
Tableau 6. Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des extraits bruts et des différentes fractions de <i>S. vulgare</i>	59
Tableau 7. Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des extraits bruts et des différentes fractions de <i>C. hirsutus</i>	60
Tableau 8. Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des extraits bruts et des différentes fractions de <i>R. verruculosa</i>	61
Tableau 9. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales bactéricides (CMB) des fractions d'acétate d'éthyle vis-à-vis des souches <i>B. cereus</i> et <i>S. aureus</i>	63
Tableau 10. Activité antiplasmodiale des fractions acétate d'éthyle des trois algues.....	64
Tableau 11. Activité antitrypanosomale des fractions acétate d'éthyle des trois algues.....	64
Tableau 12. Test de toxicité aux doses de 150 mg/Kg et 300 mg/ Kg de P.C de l'extrait brut de l'algue brune <i>C. hirsutus</i> au cours des 24 heures.....	65

Liste des abréviations

BHA : butylhydroxyanisole

BHT : butylhydroxytoluène

CAT : capacité antioxydante totale (Total antioxidant capacity)

CE: Concentration inhibitrice (Efficace inhibition)

CMI: Concentration minimale inhibitrice

DO : densité optique

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

EAA : équivalents d'acide ascorbique

EAG : équivalent d'acide gallique

EC : équivalent de catéchine

EC₅₀ (IC₅₀) : concentration inhibitrice à 50 %

SOD : superoxydedismutase

ERO : espèces réactives de l'oxygène

et al. : et autres auteurs

FeCl₃: Chlorure ferrique

FRAP : Capacités réductrices ferriques d'antioxydants (Ferric reducing/antioxidant power)

GSH : glutathion réduit

H₃PMO₁₂O₄₀ : Acide phosphomolybdique

HCl : Acide chlorhydrique

H₂O₂: peroxyde d'hydrogène

HO·: Radical hydroxyle

K₃Fe(CN)₆: Ferricyanure de potassium

MS : matière sèche

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium

NaCl : Chlorure de sodium

NaNO₂ : Nitrite de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

O₂^{·-} : Radical superoxyde

OH : radical hydroxyle

ROO[·] : radical peroxyde

Introduction générale

La terre est la planète bleue où l'eau recouvre près des trois-quarts (70 %) de sa surface. Elle abrite une extraordinaire diversité d'organismes vivants. Aujourd'hui, Environ 2 million d'espèces différentes ont été décrites par les scientifique, dont 300 000 appartiennent à l'univers marin (**Gattuso et Duarte, 2021**).

Foyer de la biodiversité, la mer Méditerranée constitue un véritable réservoir d'organismes marins. En effet, on dénombre plus de 8500 espèces appartenant à tous les niveaux évolutifs et dont la moitié ne se trouve nulle part ailleurs. Ce chiffre correspond à peu près entre 4% et 18% des espèces marines mondiales, bien que cette mer ne représente que 0,82% en superficie et 0,32% en volume par rapport à la superficie et au volume total de l'ensemble des océans (**Bianchi et Morri, 2000**).

Parmi les organismes marins, les algues, forment la principale végétation des mers et des océans. Elles vivent dans des habitats complexes, et en s'adaptant aux conditions environnementales et écologiques extrêmes (pression, salinité, absence de lumière, compétence inter et intra spécifique, etc...), elles élaborent une grande variété de substances spécifiques et puissantes qui possèdent des caractéristiques structurelles uniques par rapport aux métabolites de leurs analogues terrestres (**Larsen et al., 2005 ; Eom et al., 2012**).

Depuis quelques années, les études chimiques, dans le domaine des végétaux marins, se sont intensifiées de façon considérable. Cet engouement est dû à l'essor qu'ont pris les algues dans des domaines variés: l'alimentation, l'agriculture, l'industrie, la médecine et la pharmacie. Les algues, en tant que bioressource cruciale, sont riches en composés naturels (**Zhang et al., 2012**); comprenant notamment les polyphénols, les caroténoïdes, les terpénoïdes, les alcaloïdes, les polysaccharides, les vitamines, les acides aminés et les lipides (**Cabrita et al., 2010; Govindasamy et al., 2012**). Ces composés sont associés à une grande palette d'activités biologiques ; à savoir: antioxydante (**Shibata et al., 2008**), antimicrobienne (**Al-Saif et al., 2014**), anti-inflammatoire (**Sarithakumari et al., 2012**), anticancéreuse (**Ermakova et al., 2011**), et antiparasitaire (**Moo-Puc et al., 2008**).

L'Algérie, avec sa grande façade maritime s'étalant sur 1200 km, offre une biomasse algale extrêmement riche et variée. Cependant, seulement 497 taxons ont été inventoriés (**Séridi, 2007**). Il est à signaler qu'à l'exception des travaux de type inventaire floristique, la plupart des recherches menées sur les algues en Algérie, ont porté pour l'essentiel sur les aspects d'ordre écologiques et chimiques (**Zitouni, 2015**). Néanmoins, l'intérêt accordé à la

leur valorisation est très récent et les données évaluant leurs potentialités pharmacologiques sont limitées (**Bedjou *et al.*, 2011 ; Metidji *et al.*, 2015; Sahnouni *et al.*, 2016**).

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à la valorisation du patrimoine naturel dont dispose notre pays. Ainsi, nous avons jugé nécessaire d'apporter des éléments de connaissances chimiques et biologiques relatifs à deux espèces d'algues brunes : *Cladostephus hirsutus*, *Sargassum vulgare* ainsi qu'à l'algue rouge *Rissoella verruculosa* récoltées de la cote ouest algérienne. Les travaux scientifiques antérieurs réalisés sur ces trois espèces se sont avérés rares.

Notre travail est organisé en trois parties principales.

- La première se focalise sur une revue bibliographique des algues : leur définition, classification, composition et utilisation. Elle traite également des métabolites secondaires des algues, de leurs activités biologiques, et offre une vue d'ensemble des espèces étudiées.
- La deuxième partie présente le matériel utilisé ainsi que la méthodologie expérimentale adoptée: les techniques d'extraction, de dosage des composés phénoliques et les méthodes d'évaluation des activités biologiques, entre autre l'activité antioxydante, antimicrobienne, antiparasitaire et anti-inflammatoire.
- La troisième partie est relative aux résultats obtenus et à la discussion.

Enfin, une conclusion générale de l'ensemble des travaux réalisés clôturera ce manuscrit, ouvrant la voie à de futures perspectives.

Données bibliographiques

Chapitre 1 : Généralités sur les algues

1 Définition

Les algues, organismes photoautotrophes chlorophylliens, conventionnellement définies comme des végétaux peuplant le milieu aquatique tels que les océans, les lacs, les rivières et même les glaciers, les lieux humides et de nombreux milieux terrestres y compris les roches et autres surfaces dures. Elles sont dépourvues de tige, de racine, de feuille ou de fleur, leurs appareil végétatif relativement simple est appelé « thalle » (**Guillaume, 2011**). Elles peuvent être libres ou fixés sur un support, et ont des formes et des dimensions très variables. Certaines sont microscopiques et d'autres mesurent plusieurs mètres de longueur. L'ensemble des algues compte 156 000 espèces décrites dans le monde (**Guiry & Guiry 2019**).

2 Caractéristiques structurales des algues

2.1 Les microalgues

Les microalgues sont des organismes microscopiques unicellulaires. La cellule unique des microalgues contient au sein de son cytoplasme de nombreux organites nécessaires à son fonctionnement et à son métabolisme. Les microalgues mesurent une dizaine de microns, de formes et de couleurs différentes et la plupart d'entre elles sont adaptées à la flottaison (**Figure 1**). De nombreuses espèces possèdent un ou plusieurs flagelles mobiles qui leur confèrent une véritable aptitude à la nage (**Hortense, 2011**).

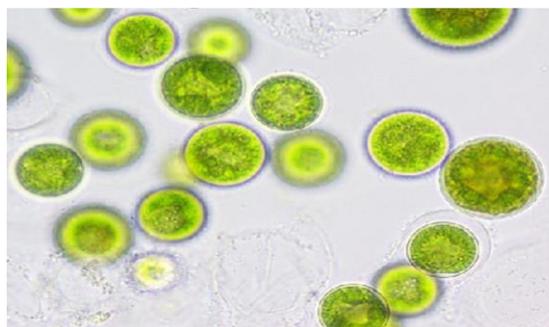


Figure 1. Microalgues (**Rodriguez et al., 2015**).

2.2 Les macroalgues

Les macroalgues sont des composants essentiels des écosystèmes côtiers, riches d'une très grande diversité génétique et pouvant occuper des milieux très diversifiés (Person, 2011). Elles sont constituées à leur base par des crampons, leurs permettant de se fixer sur un support. Elles n'ont pas besoins de racines pour s'alimenter car elles absorbent les nutriments par toute la surface du thalle en contact avec l'eau. Les crampons sont surmontés d'un pédoncule de longueur et de diamètre variable appelé le stipe qui se termine par une fronde qui peut être découpée en filaments, cordons ou lanières (Figure 2) (Hortense, 2011). Cependant 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 (Garon-Lardiere, 2004).

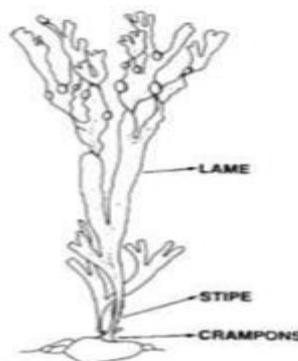


Figure 2. Représentation schématique d'une macroalgue brune de type fucale (Person, 2011).

3 Les grands groupes des algues marines

De nombreux critères écologiques, physiologiques ou biochimiques interviennent dans la phylogénie des algues comme les structures cellulaires, le mode de nutrition, l'habitat ou même la nature et la localisation des pigments et glucanes de réserve.

En se basant sur la nature des pigments surnuméraires associés à la chlorophylle, on peut distinguer les algues rouges (Rhodophytes), brunes (Chromophytes) et vertes (Chlorophytes).

3.1 Les algues vertes (Chlorophytes)

Sont un ensemble d'algues dont le thalle est de couleur typiquement vert en raison des chlorophylles a et b prépondérantes dans les chloroplastes. Toutefois, l'exposition prolongée aux fortes intensités lumineuses provoque la synthèse de pigments photoprotectants (caroténoïdes), qui confèrent aux thalles de couleurs orangées à jaunâtres. Elles sont présentes dans tous les systèmes aquatiques depuis les milieux marins jusqu'aux eaux douces, cependant certaines espèces peuvent également se développer sur terre (**Pérez, 1997; Garon-Lardiere, 2004**). Jusqu'à maintenant, environ de 4270 espèces d'algues vertes ont été identifiées à l'échelle mondiale (**Guiry 2012; Guiry & Guiry 2019**). Toutefois, tous les végétaux aquatiques de couleur verte ne doivent obligatoirement pas être catalogués comme des algues vertes.

3.2 Les algues rouges (Rhodophytes)

Elles sont, pour la plus grande majorité, pluricellulaires, macroscopiques et marines. L'association de la phycoérythrine à d'autres pigments chlorophylliens est à l'origine de la coloration rosâtre des plastes de ces algues. Les proportions relatives entre les différents pigments, conjuguées avec la forme du thalle, donnent à la lumière du jour toutes les couleurs imaginables depuis le brun noirâtre jusqu'au rose très clair en passant par les rouges pourpres et les orangés. De plus, pour une même espèce, la couleur varie en fonction de l'exposition aux rayons lumineux: souvent les individus qui se développent aux forts éclaircissements montrent des couleurs délavées, où dominent les jaunes orangés en raison de la forte concentration en pigments caroténoïdes photoprotectants. Environ 7280 espèces d'algues rouges ont été décrites (**Guiry 2012; Guiry & Guiry 2019**).

3.3 Les algues brunes (Chromophytes)

Ce sont des algues presque exclusivement marines, de structure généralement pluricellulaire et de dimensions très variables. Leur couleur jaunâtre à brune est due à

l'association de pigments dominants, à savoir la xanthophylle et la fucoxanthine, qui masque les chlorophylles a et c. Il existe 4250 espèces différentes d'algues brunes; ce sont les algues marines les plus abondantes (**Guiry 2012; Guiry & Guiry 2019**). Elles montrent une grande diversité morphologique depuis les formes filamenteuses relativement simples aux grandes algues brunes dont l'organisation morphologique complexe évoque les tiges feuillées des végétaux supérieurs, retrouvées surtout au niveau des côtes rocheuses à faible profondeur. (**Garon-Lardiere, 2004**).

4 Modalités reproductives:

Les algues, pour assurer leur descendance font usage d'une multiplicité de moyen que les plantes supérieures sont loin de manifester. En effet, certaines ont uniquement recours aux procédés de la multiplication asexuelle, d'autres exclusivement à celui de la reproduction sexuelle et enfin d'autre encore sont douées à la fois du pouvoir de ce multiplier par voie asexuée et de se reproduire par sexualité (**Naegelé, 1967**).

4.1 Mode sexué

Il est fréquent et aléatoire, les cellules de l'algue forment des gamètes mâles et femelles qui devront s'unir formant un nouvel individu génétiquement différent de l'individu souche (**de Reviere, 2002**).

4.2 Mode asexué

Le mode asexué est assez fréquent chez l'ensemble des algues. Dans ce cas, l'algue se reproduit sans l'intervention d'organes sexuels, ce qui fait que l'individu descendant manifètera des caractéristiques génétiques identiques à l'individu souche. Elle se fait de différentes façons, soit par une simple scissiparité de cellules isolées (cas des cyanobactéries), soit par une fragmentation de thalles aboutissant à la formation de plusieurs organismes identiques, ou via la formation de cellules spécialisées: les spores (**de Reviere 2002**).

5 Principales applications des algues

De nos jours, de nombreux secteurs économiques manifestent un intérêt croissant pour les algues marines en raison de leur potentiel exceptionnel en tant qu'une source nutritionnelle

et un produit à valeur montante. Cette tendance est particulièrement prononcée en Asie, où les algues sont utilisées directement comme aliment et indirectement par l'industrie des phycocolloïdes, comprenant notamment les agars et les alginates. Par ailleurs, les algues sont également largement exploitées dans l'agriculture, tant comme engrais que comme fourrage, ainsi que dans divers autres secteurs tels que l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique, textile, la santé, la cosmétique, l'environnement et, plus récemment, dans le domaine des aliments fonctionnels et de la chimie (El Gamal, 2010 ; Tremblin, 2016).

5.1 Dans l'industrie alimentaire

Les algues sont un aliment traditionnel qui présente un intérêt nutritionnel connu et exploité depuis de nombreuses années par les populations du Sud-Est asiatique. Leur valeur nutritive peut s'expliquer en grande partie par la présence conjointe de trois principales catégories de composants (fibres, minéraux et protéines), ainsi que par la présence de métabolites dotés de propriétés antioxydantes et antiradicalaires tels que caroténoïdes, polyphénols, vitamines ou acides gras polyinsaturés (Marfaing *et al.*, 2007).

Dans le secteur agroalimentaire, les algues jouent un rôle important en fournissant des gélifiants comme les carraghénanes et les alginates. En effet, les extraits d'algues accompagnent notre quotidien comme additifs texturants (gélifiants, épaississants, stabilisants) utilisés entre autre dans les crèmes, les flans, les soupes et les charcuteries (Person, 2010).

5.2 Dans le domaine pharmaceutique et médical

En médecine humaine les algues marines, tout comme de nombreux autres végétaux, sont susceptible, en raison des composés qu'elles renferment, d'emplois très intéressants. Elles ont même donné lieu à une thérapeutique qui mérite d'être prise en considération, actuellement plus de 15000 composés naturels ont été extraits à partir des algues marines (Naseri, Holdt et Jacobsen, 2016).

Les composés extraits des algues marines trouvent leur application principale dans l'utilisation des phycocolloïdes en tant qu'agent texturant et mucoprotecteur (sirop contre les ulcères, pommades contre les hémorroïdes, ainsi que comme agent protecteur dans les pansements pour les accidentés de la route...). Les applications reconnues chez les macroalgues sont leurs propriétés antioxydantes du fait que certaines molécules puissent neutraliser les radicaux libres entraînant des réactions en chaîne dans les cellules. Ceci permet

de réduire les risques de mutations cellulaires à l'origine de cancers et de maladies cardiaques (**Montero et al., 2018**). Certaines publications mentionnent des effets positifs sur le cancer du sein, des maladies cardiaques, des problèmes de thyroïde, de la réponse immunitaire, l'inflammation et des activités à la fois antivirales et antibactériennes (**Philpott et Bradford, 2006**).

5.3 Dans le domaine cosmétique

Les applications cosmétiques des algues marines sont bien connues depuis des milliers d'années (**Michalak et al., 2016**), mais leurs principes actifs ne sont reconnus que depuis l'époque moderne. L'utilisation des extraits marins est en forte progression dans le domaine de la cosmétique. De nombreuses recherches tendent à valoriser l'utilisation des algues, notamment à la vue des enjeux économiques considérables liés aux produits cosmétologiques d'appellation biologique (**Thomas et Kim, 2013**).

Les algues sont utilisées comme excipients pour leurs propriétés gélifiantes ou épaississantes. Sous forme de poudres capables de se disperser dans l'eau, elles entrent alors dans la formulation de gels aqueux, de gels solaires protecteurs comme des gels cicatrisants après-soleil, des gels anti-inflammatoires, d'agents gainants pour les cheveux dans les lotions capillaires, fixateurs pour cheveux, les lotions démêlantes. Les extraits d'algues sont aussi susceptibles d'être utilisés en tant que principe actif pour leurs propriétés anti-âges, tonifiantes, hydratantes, blanchissantes, nourrissantes ou photoprotectrices. Enfin, ils peuvent être intégrés comme additifs qui contribuent aux propriétés organoleptiques; pour la stabilisation et la conservation du produit (**Bedoux et al., 2014**).

5.4 En Agronomie

Dans le domaine agricole, à proximité des côtes, les algues sont employées depuis l'antiquité de façon empirique pour amender les sols. Les algues par l'apport important en macro et micro nutriments, en vitamines, en acides aminés et en hormones végétales jouent le rôle de biofertilisants, stimulent le conditionnement des graines et la croissance, stimulent les défenses des plantes contre les parasites et les maladies, favorisent l'adaptabilité aux variations environnementales avec une meilleure tolérance à la chaleur, au manque d'eau et à l'augmentation de la concentration en sels. A l'époque, les algues étaient étalées sur le sol,

depuis des engrais biologiques à base d'algues brunes broyées ou concentrées sous forme d'extraits liquides sont commercialisés. Très récemment des extraits de laminaires sont utilisés en prévention des maladies cryptogamiques comme éliciteur de défenses naturelles des plantes cultivées. Les farines d'algues sont intégrées dans l'alimentation animale, généralement en quantités ne dépassant pas 10% (**Tremblin, 2016**).

Chapitre 2. Constituants essentiels des algues marines

La biodiversité extraordinaire présente dans le du monde marin se manifeste à travers une variété de composés biologiquement actifs. Les organismes marins tels que les plantes, les animaux et les algues sont parfois confrontés à des conditions extrêmes de température, pH, salinité, pression, lumière et d'autres paramètres ce qui constitue un défi quotidien pour leur survie dans ces habitats complexes (**Hamed et al., 2014; Ak et al., 2015**).

Pour assurer leur survie, ces organismes produisent une variété de substances naturelles, bénéfiques et présentant des avantages potentiels et multiples. Parmi ces composés on retrouve des protéines, des peptides, des acides aminés, des acides gras, des stérols, des polysaccharides, des oligosaccharides, des composés phénoliques, des pigments photosynthétiques, des vitamines et des sels minéraux. Il convient de souligner que les constituants bioactifs marins diffèrent d'un organisme à un autre et d'une espèce à l'autre, en raison de leurs conditions de vie distinctes. Dans l'ensemble, elles sont riches en hydrates de carbone, en polysaccharides, en matières azotées et polyphénoliques, en acides aminés et en protéines, et trouvent des applications diverses, notamment dans les industries de l'alimentation humaine et animale et autres (**Ak et al., 2015; Satpati et al., 2011**).

1 Les composés phénoliques d'algues

Les composés phénoliques sont reconnus comme l'un des antioxydants naturels les plus importants présents dans diverses sources alimentaires telles que les fruits, les légumes, les céréales, les légumineuses, les épices et les plantes telles que le café, le thé ou les plantes de la famille des Lamiacées (**Scalbert et al., 2005**). Ces composés qui sont des dérivés non azotés dont le ou les cycles aromatiques sont issus de deux grandes voies métaboliques : la voie du shikimates et celle de l'acétate (**Crozier et al., 2006**). Sur le plan chimique, les polyphénols peuvent être divisés en plusieurs classes, comprenant les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les stilbènes et les lignanes (**Ignat et al., 2011**).

Bien que les composés phénoliques aient longtemps été associés aux plantes, il est essentiel de noter que les algues constituent également une source riche en polyphénols. Parmi les différentes classes d'algues, les algues brunes sont considérées comme celles

contenant la plus grande quantité de ces composés intéressants (Heffernan *et al.*, 2015). En fait, il existe une variété de composés phénoliques appelés phlorotannins qui n'ont été décrits que dans la composition des algues brunes (Li *et al.*, 2011).

1.1 Phlorotannins

Les phlorotannins sont des composés phénoliques résultants de la polymérisation d'unités monomères de phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzène) et sont biosynthétisés à travers la voie de l'acétate-malonate, également connue sous le nom de voie des polykétides. Ces composés se caractérisent par leur nature hautement hydrophiles avec une large gamme de tailles moléculaires allant de 126 Da à 650 kDa. Selon le type de liaison présente, les phlorotannins peuvent être classés en quatre sous-classes, à savoir (Li *et al.*, 2011) :

- Fuhalols et phlorethols (phlorotannins avec une liaison éther)
- Fucols (avec une liaison phényle)
- Fucophloroéthols (avec une liaison éther et phényle)
- Eckols (avec une liaison dibenzodioxine)

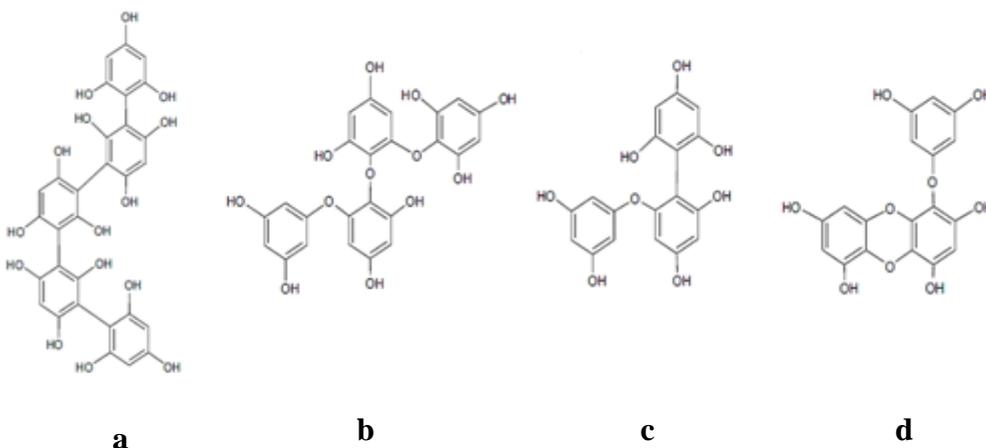


Figure 3: Exemples de structures chimiques de certains phlorotannins détectés dans les algues : **a.** pentafucol ; **b.** tétraphloretole ; **c.** fucophlorethol ; **d.** eckol (Montero *et al.*, 2018).

1.2 Flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des produits naturels qui sont composés d'une structure carbonée en C6-C3-C6, plus précisément d'une fonction phénylbenzopyrane. Selon l'emplacement de la liaison de l'anneau aromatique à la fraction benzopyrane, les flavonoïdes peuvent être classés en trois catégories (**Grotewold, 2007**)

- Flavonoïdes (2-phénylbenzopyranes)
- Isoflavonoïdes (3-benzopyranes)
- Néoflavonoïdes (4-benzopyranes)

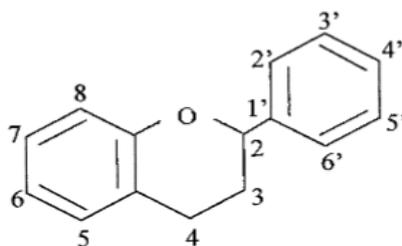


Figure 4: Squelette de base des flavonoïdes (**Yoshie-Stark et al., 2003**)

1.3 Quinones

Les quinones constituent une classe des composés oxygénés caractérisés par un noyau benzène dans lequel deux atomes d'hydrogène ont été remplacés par deux atomes d'oxygène, formant ainsi deux liaisons carbonyles. Dans le contexte des algues marines, différents types de quinones ont été identifiés, chacun ayant des implications distinctes. La plastoquinone A, l' α -tocopherylquinone et l'ubiquinone; la quinone-hydroquinone (**Amico et al., 1982**) ; sesquiterpenequinone-hydroquinone (**Blunt et al., 2009**) ; le naphtoquinone qui est particulièrement rare chez les algues marines et l'antraquinone isolé à partir de microorganismes qui vivent sur les algues marines (**Feng et al., 2014**).

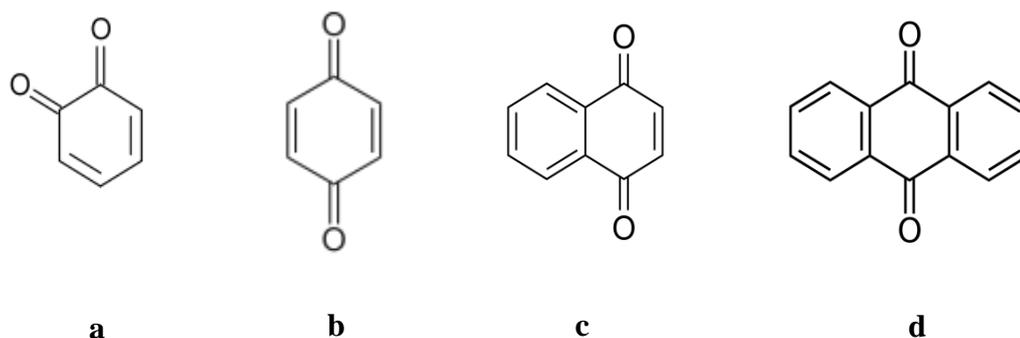


Figure 5 : Structures de quelques motifs quinoniques : **a.** ortho-quinone ; **b.** para-quinone ; **c.** antraquinone ; **d.** naphtoquinone (**Bruneton, 2009**).

2 Alcaloïdes

Les alcaloïdes se retrouvent dans un large éventail d'algues marines, y compris les algues vertes, brunes, et rouges, et ils sont classés en trois groupes distinctes : alcaloïdes phényléthylamine, indole et alcaloïdes indoliques halogénés (voir **Figure 6**). Les alcaloïdes isolés des algues marines pour la plupart appartiennent à des groupes de la phényléthylamine et de l'indole (**Aniszewski, 2007**). Les activités biologiques de ces alcaloïdes n'ont pas été complètement étudiées. Les alcaloïdes des algues marines sont relativement rares, comparés aux alcaloïdes végétaux terrestres, ils possèdent des activités antibactériennes, anti-inflammatoires, antioxydantes, antitumorales et ont donc de grandes utilisations dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (**Jin et al., 2014**).

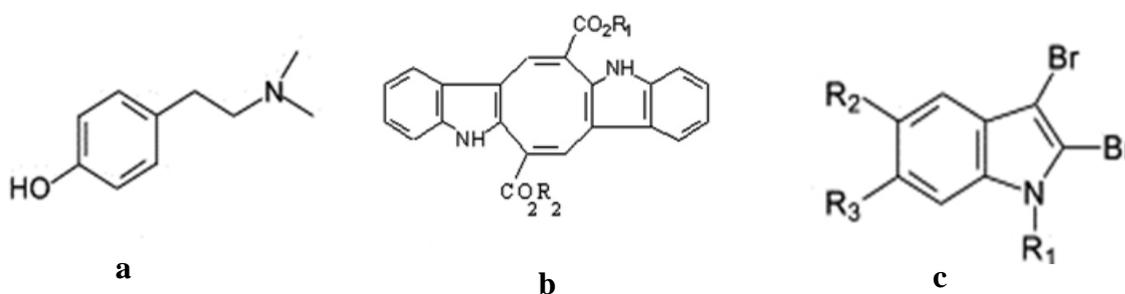


Figure 6 : Exemples de structures alcaloïdiques : **a.** alcaloïdes dérivés de Phényléthylamine ; **b.** alcaloïdes dérivés de l'indole; **c.** alcaloïdes halogénés (**Güven et al., 2010**).

3 Caroténoïdes

Les caroténoïdes algaux sont de puissants antioxydants, ils représentent en moyenne 0,1 % du poids sec de l'algue. Cependant, certaines espèces peuvent en produire beaucoup plus dans des conditions environnementales spécifiques. Les algues brunes sont particulièrement riches en caroténoïdes et notamment en fucoxanthine, β -carotène et violaxanthine. En ce qui concerne les algues rouges, les principaux caroténoïdes sont le β -carotène, l' α -carotène et leurs dérivés dihydroxylés, zéaxanthine et lutéine. Quand aux algues vertes, elles sont principalement caractérisées par la présence de β -carotène, l' α -carotène et leurs dérivés dihydroxylés, siphoxanthine, vislaxanthine, nexanthine et lutéine (**Takaichi, 2011**). Ces molécules sont formées par des unités d'isoprène à cinq carbones. Ils sont polymérisés par voie enzymatique formant ainsi une structure régulière hautement conjuguée à 40-carbone (**VonElbe et al., 1996**).

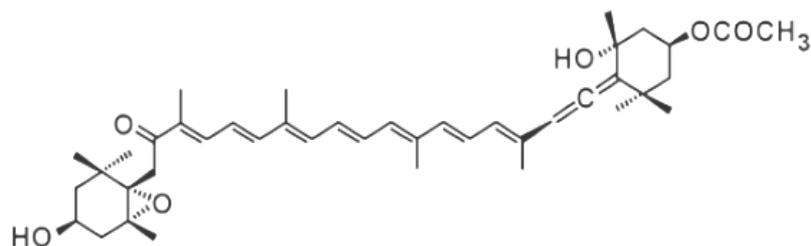


Figure 7 : La structure de la fucoxanthine (Mikami & Hosokawa, 2013).

4 Terpènes

La présence des terpènes a été montrée chez de nombreux organismes marins et terrestres tels que les bactéries, les champignons, les micro- et macroalgues, les plantes et également chez certains animaux. Cette famille de composés est caractérisée par une grande diversité structurale classée en fonction de leur structure de base C_5H_8 (Zwenger, 2008). Les études ont permis d'identifier sept classes de terpènes, à savoir les hémiterpènes (qui possède 5 carbones (C_5) et présente une unité isoprène), les monoterpènes (C_{10} ; 2 unités isoprènes), les sesquiterpènes (C_{15} ; 3 unités isoprènes), les diterpènes, (C_{20} ; 4 unités isoprènes) les triterpènes (C_{30} ; 6 unités isoprènes), les tétraterpènes (C_{40} ; 8 unités isoprènes), et enfin les polyterpènes qui regroupent les molécules plus importantes avec un nombre d'unités isoprènes supérieur à 8 ($8 < n < 30000$) et un nombre de carbone supérieur à 40 (C_{5n}) (Figure 8).

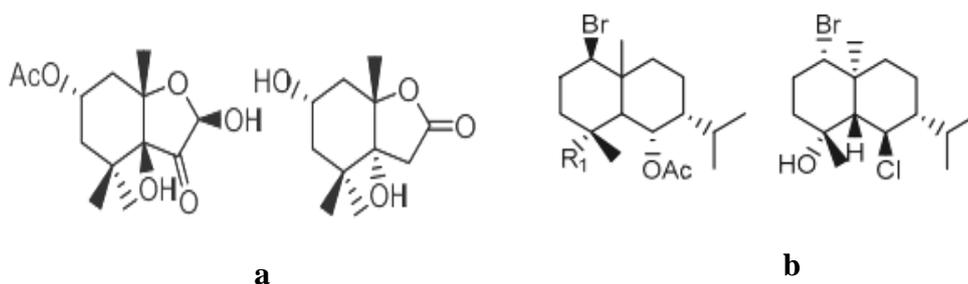


Figure 8 : Exemples de structure de terpènes : **a.** monoterpène ; **b.** sesquiterpènes (Lever *et al.*, 2020).

5 Stérols

Les stérols sont des stéroïdes portant un groupe hydroxyle en position C-3 (Lamparczyk, 1992). On trouve des stérols dans les plantes et les animaux, bien qu'ils soient classés comme lipides, leur structure et leur fonction diffèrent considérablement de celles des triglycérides et des phospholipides. Les molécules de stérol sont composées de plusieurs cycles principalement constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène qui sont reliés entre eux (Fink et Mikesky, 2013).

Les Phaeophyceae contiennent généralement des niveaux de stérols plus élevés que les algues rouges et vertes. Les stérols prédominants des algues brunes sont le fucostérol et ses dérivés. Quant aux algues rouges, le stérol majeur est le cholestérol. Néanmoins, certaines espèces contiennent principalement du démostérol et 22-déhydrocholestérol (Terasaki *et al.*, 2009).

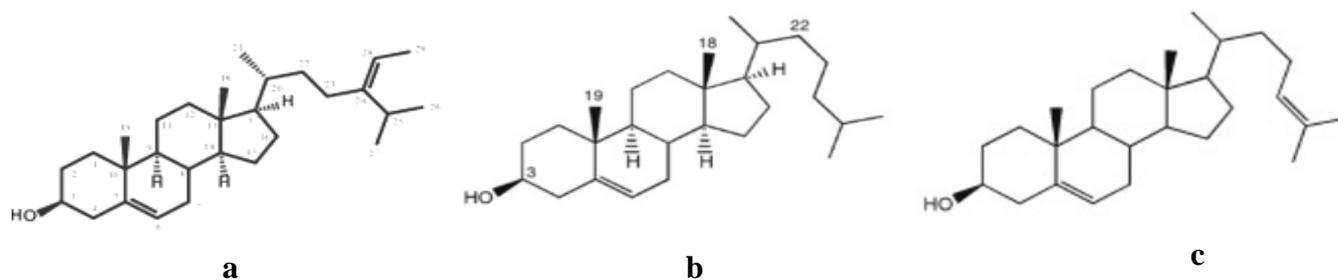


Figure 9 : Exemples de structures des stérols d'algues : **a.** fucostérol ; **b.** cholestérol ;
c. démostérol (Ibrahim *et al.*, 2017).

Chapitre 3. Activités biologiques des algues marines

Les organismes marins possèdent un grand potentiel en tant que sources de métabolites secondaires hautement bioactifs qui pourraient représenter des pistes prometteuses dans le développement de nouveaux agents pharmaceutiques (Iwamoto *et al.*, 2001). Les études menées sur ces organismes mettent en évidence la grande variété des structures chimiques et des activités biologiques qu'ils renferment. Elles ont permis l'identification de milliers de molécules, allant des polysaccharides et des lipides aux métabolites secondaires comme les polyphénols, les phénols halogénés et les méroterpènes (Lin *et al.*, 2010). Ces composés sont associés à une diversité d'activités biologiques, englobant des propriétés antioxydantes, anticancéreuses, antimicrobiennes, antiprotozoaires, anti-inflammatoires, anticoagulantes, antithrombotiques et antivirales (El Gamal, 2010; Lee *et al.*, 2013).

1 Activité Antioxydante

L'oxydation est une conséquence naturelle du métabolisme chez les organismes biologiques, le résultat est la formation des espèces réactives d'oxygène (ERO). Leur production excessive et leur accumulation peuvent induire l'apoptose et causer des dommages, en particulier aux protéines cellulaires, aux acides gras polyinsaturés et à l'ADN (Sies *et al.*, 2017). En temps normal, le système antioxydant dans le corps humain peut éliminer ces radicaux, maintenant ainsi l'équilibre entre l'oxydation et l'antioxydation. Cependant, lorsque le corps ne peut pas éliminer l'excès d'ERO en utilisant le système d'enzymes antioxydantes intracellulaires et les composés antioxydants extracellulaires, un stress oxydatif se produit, conduisant de manière significative à des maladies chroniques et dégénératives telles que l'ostéoarthrite, l'athérosclérose, le cancer et d'autres maladies dégénératives liées au vieillissement (Preiser *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2017; Ji *et al.*, 2020).

Les antioxydants sont responsables des mécanismes de défense de l'organisme contre les pathologies associées à l'attaque des radicaux libres. Ainsi, la prise d'antioxydants d'origine végétale est impliquée dans la prévention des maladies dégénératives causées par le stress oxydatif (Pisoichi & Nagulescu, 2011).

L'intérêt pour les antioxydants naturels en ce qui concerne les avantages pour la santé et l'amélioration de la durée de conservation des aliments a poussé la recherche dans diverses sources. En particulier, les composés phénoliques sont considérés comme l'une des classes les plus importantes d'antioxydants naturels, et leur principale propriété associée est l'activité antioxydante, qui peut être bénéfique pour réduire les réactions oxydatives nuisibles à la santé (**Gupta & Sharma, 2006**).

Un certain nombre de composés antioxydants puissants ont été isolés et identifiés à partir d'algues brunes, rouges et vertes, notamment les phlorotanines, les polysaccharides sulfatés, les caroténoïdes tels que la fucoxanthine et l'astaxanthine, les stérols, les catéchines et les protéines (**Farvin & Jacobsen, 2013**).

Les algues marines possèdent de fortes concentrations de molécules phénoliques, ce qui en fait l'une des plus grandes sources d'antioxydants naturels (**Elangovan et al., 2019**). Parmi ces algues, *Ecklonia*, *Fucus*, *Cystosiera* et *Sargassum* sont particulièrement plus étudiées en raison de leur teneur élevée en : acide gallique, acide protocatéchique, acide génistique, acide vanillique et acide caféique responsables de la grande activité antioxydante de ces algues (**Barreiro et al. 2011 ; Shahin et al., 2022**).

2 Activité antimicrobienne

Les maladies infectieuses représentent la cause majeure de mortalité dans le monde; ce sont des affections provoquées par des microorganismes pathogènes telles que les bactéries, les virus, les parasites ou les champignons et touchent des millions de personnes (**Alwash et al., 2013**). De nombreux antibiotiques sont développés pour traiter les infections microbiennes, cependant leur utilisation abusive est à l'origine de l'apparition de la multirésistance bactérienne. Cette résistance aux antimicrobiens est l'un des plus grands défis de santé publique mondiale (**Mezouar et al., 2014**).

L'émergence et l'augmentation de la résistance microbienne envers de nombreux traitements conventionnels rendent nécessaire l'exploration et la découverte de nouvelles sources naturelles d'agents antimicrobiens (**Roca et al., 2015 ; Akremi et al., 2017**). Les propriétés antibiotiques des algues marines ont été explorées pour la première fois en 1951, et depuis lors, de nombreux travaux ont été réalisés sur les activités antibactériennes et antifongiques des algues (**Thinakaran & Sivakumar, 2013**). Divers espèces ont été signalées pour leurs effets antimicrobiens contre plusieurs agents pathogènes et infections

humaines, ce qui en fait le point central de la découverte de nouveaux médicaments. (Charway *et al.*, 2018). Plusieurs recherches sur des composés tels que les terpénoïdes, les phlorotannins, l'acide acrylique, les composés phénoliques, les stéroïdes, les cétones et alcanes halogénés, ainsi que les polysulfures cycliques présents dans les algues marines, ont été rapportées comme des agents bactéricides prometteurs. La présence de ces composés suggère plusieurs mécanismes alternatifs d'action antimicrobienne (Pérez *et al.*, 2016).

Les extraits de l'algue brune *Dictyopteris membranacea* ont montré une bonne activité antimicrobienne contre certaines souches bactériennes (Akremi *et al.*, 2015). L'extrait méthanolique de l'algue verte, *Chlamydomonas reinhardtii* s'est révélé efficace contre les agents pathogènes bactériens et fongiques, y compris *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* et *Proteus mirabilis* (Alsenani *et al.*, 2020). Kamei *et al.* (2009) ont identifié un nouveau terpénoïde antibactérien, la sargafurane, extrait de l'algue brune marine *Sargassum macrocarpum*. Certains sesquiterpènes halogénés, ont été isolés des algues rouges de genre *Laurencia* sp. contre les bactéries pathogènes, ce qui prouve leur nature antibactérienne par un mécanisme d'action similaire à celui des antibiotiques (Vairappan *et al.*, 2008).

Nagayama *et al.* (2002) ont examiné l'effet antibactérien des phlorotannins provenant d'*Ecklonia kurome* contre diverses bactéries pathogènes d'origine alimentaire. Leurs observations ont révélé que les phlorotannins étaient efficaces contre différentes souches microbiennes. Les composés phénoliques des algues marines peuvent se lier aux protéines bactériennes, telles que les enzymes et les protéines de la membrane cellulaire, et induire la lyse cellulaire. Les cycles aromatiques et les groupes OH des unités de phloroglucinol se lient aux groupes -NH des protéines bactériennes par des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes (Venkatesan *et al.*, 2019).

3 Activité antiparasitaire

Les infections parasitaires humaines demeurent une préoccupation majeure dans diverses régions tropicales et subtropicales (Camacho *et al.*, 2000). De nombreux médicaments actuellement utilisés pour traiter ces infections ne répondent pas aux exigences modernes et présentent de nombreuses limitations, à savoir ; la toxicité, la non disponibilité des molécules dans le commerce, l'émergence de la résistance médicamenteuse chez les parasites, les effets secondaires non négligeables, et le mode d'administration du traitement qui est le plus souvent par voie parentérale, nécessitant une hospitalisation et un coût

important (Ollivier & Legros, 2001 ; Besednova *et al.*, 2021). Il est donc impératif de développer de nouveaux agents antiprotozoaires plus efficaces et plus sûrs, avec de nouveaux modes d'action.

3.1 Maladie du sommeil ou Trypanosomiase Africaine

La Trypanosomiase Africaine, plus communément appelée « maladie du sommeil » est une maladie tropicale parasitaire à transmission vectorielle. Le parasite responsable est un protozoaire flagellé ; il existe différentes sous espèces de *Trypanosoma brucei*. *T. b. gambiense* qui cause la maladie en Afrique centrale et en Afrique de l'Ouest, *T. b. rhodesiense* qui cause une maladie plus aigue en Afrique de l'Est et en Afrique du Sud et *T. b. brucei* qui infecte les animaux domestiques et sauvages mais pas les humains. Une autre trypanosomiase humaine, la maladie de Chagas dont l'agent responsable est *Trypanosoma cruzi* sévit quant à elle dans les régions tropicales d'Amérique latine (Laphookhieo *et al.*, 2006).

Les glossines, communément appelées mouches tsé-tsé, sont des diptères vecteurs qui piquent habituellement en journée et qui sont attirés par des couleurs sombres. Ce sont des insectes gris brun de la taille d'une abeille ; leur durée de vie est d'environ trois mois (Van Bogaert, 1958).

La maladie est causée par la transmission des parasites aux vertébrés à la suite d'une piqûre d'une mouche tsé-tsé infectée mâle ou femelle. Les hôtes vertébrés peuvent être des animaux domestiques (chiens, moutons, etc...) ou sauvages (buffles, antilopes, etc...) ainsi que des êtres humains. Le cycle du parasite est uniquement extracellulaire et alterne entre le sang et les tissus de l'hôte vertébré et entre le tractus intestinal et les glandes salivaires de l'insecte. En l'absence de soins, la mort est inévitable (Cattand, 2001; Bero, 2012).

3.2 *Plasmodium*, parasite hématozoaire du paludisme

L'agent responsable du paludisme est un parasite protiste du phylum des Apicomplexes et du genre *Plasmodium*. Cinq espèces sont naturellement infectieuses pour l'homme : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, et *Plasmodium knowlesi* (Singh *et al.*, 2004).

La résistance du *Plasmodium falciparum* aux anciens antipaludiques tels que, la chloroquine et la sulfadoxine/pyriméthamine, a atteint des niveaux critiques dans de

nombreuses régions endémiques du paludisme, entraînant des effets néfastes sur la santé humaine. Selon plusieurs rapports, les parasites responsables du paludisme ont commencé à développer une tolérance aux thérapies à base d'association d'artémisinine, menaçant le dernier pilier du traitement du paludisme non compliqué dans les pays endémiques (**Dorndrop et al., 2009**).

On estime que deux tiers de la population mondiale ont recours à des remèdes traditionnels, car les produits naturels possèdent des propriétés antiparasitaires d'une efficacité et d'une sélectivité surprenante (**Camacho et al., 2000**), et la biodiversité marine pourrait être une source de diversité chimique à cette fin (**Magez et al., 2004**).

Les algues marines ont été utilisées dans la médecine traditionnelle et populaire par les populations côtières de nombreuses régions du monde pour lutter contre les maladies parasitaires (**Vonthron-Sénécheau, 2016**). Plusieurs espèces, telles que *Chondria* sp., *Sargassum vulgare* C. Agardh, *Ulva* sp. et *Sargassum thunbergii*, sont utilisées comme antihelminthiques (**Chapman et Chapman, 1980; Kang et al., 2008**).

Le potentiel pharmacologique des algues marines en tant que sources de nouveaux traitements contre les maladies parasitaires est confirmé par des exemples tels que l'acide kainique, un acide aminé isolé de l'espèce tropicale *Digenea simplex* (Wulfen) C. Agardh (Rhodophyta, Ceramiales). Aujourd'hui, l'acide kainique est vendu commercialement à cette fin, avec un effet antihelminthique intense, environ 10 fois plus puissant que le santonin universellement utilisé dérivé des herbes du genre *Artemisia* et sans effets secondaires (**Nitta et al., 1958**). Les extraits de nombreuses algues ont été étudiés sur un large éventail de parasites humains, tels que *Plasmodium* spp, *Leishmania* spp, *Tripanosoma* spp, ...etc (**Nara et al., 2005 ; Yamthe et al., 2020**). Ces extraits sont susceptibles d'inhiber la liaison des parasites aux cellules cibles ou d'exercer un effet toxique direct sur les protozoaires (**Moo-Puc et al., 2008**).

4 Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est un processus physiologique complexe impliquant l'activation du système immunitaire. Elle survient à la suite d'une lésion physique ou de l'invasion par des bactéries pathogènes, des virus ou des cellules tumorales chez l'hôte (**Henderson et al., 1996**). La phase initiale de l'inflammation aiguë implique l'afflux cellulaire associé à la libération de médiateurs tels que l'histamine et la sérotonine, suivie de la production de bradykinine et de prostaglandines. Au cours d'une réponse inflammatoire, plusieurs

médiateurs pro-inflammatoires sont libérés, notamment l'interleukine-1 bêta (IL-1 β), le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) et la cyclooxygénase-2 (COX-2). Ces médiateurs ont des fonctions importantes dans l'initiation et l'amplification des processus inflammatoires. L'un des mécanismes impliqués dans la résolution de l'inflammation est l'expression de l'enzyme hème oxygénase-1 (HO-1), responsable de la catalyse de l'hème en monoxyde de carbone (CO), biliverdine/bilirubine et fer libre. Ces produits réduisent l'inflammation et préviennent le développement de maladies inflammatoires (**Coura et al., 2015**).

Bien que la fonction principale de l'inflammation soit bénéfique à la défense de l'organisme, une résolution aberrante et une inflammation prolongée peuvent s'avérer nocives. Au cours des dernières décennies, de nombreuses études ont démontré que l'inflammation excessive est liée à un large éventail de maladies progressives, notamment le cancer, l'obésité, le vieillissement, le diabète, les maladies neurologiques, les troubles métaboliques et les maladies cardiovasculaires (**Gautam & Jachak, 2009**). Actuellement, plusieurs classes de médicaments anti-inflammatoires tels que les corticostéroïdes, les antihistaminiques, les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont utilisés pour soulager la douleur et les maladies inflammatoires (**Bounhoure et al., 2015**). L'administration à long terme de ces traitements peut entraîner plusieurs effets secondaires, notamment des ulcères gastro-intestinaux, des saignements, une hépatotoxicité et des troubles rénaux (**Tapiero et al., 2002 ; Corley et al., 2003**), ce qui suscite un intérêt croissant pour la recherche sur le développement d'outils alternatifs présentant de nouveaux mécanismes d'action issus de diverses origines (**Pereira et al., 2012**).

Récemment, les recherches ont révélé que les algues marines constituaient d'excellentes sources d'agents anti-inflammatoires qui présentent un profil de sécurité favorable et ne possèdent pas les propriétés toxiques généralement associées aux médicaments chimiques. Leur consommation pourrait ainsi fournir une défense contre plusieurs maladies inflammatoires chroniques (**Fernando et al., 2016**).

Plusieurs espèces d'algues marines présentant des effets anti-inflammatoires ont été démontrées pour cibler et moduler la réponse inflammatoire en inhibant des enzymes médiant l'inflammation telles que la synthase inductible d'oxyde nitrique (iNOS), la cyclooxygénase (COX)-2 et les phospholipases A2 (PLA2), en piégeant les ROS et en inactivant le facteur nucléaire κ B (NF- κ B) (**Le Lann, 2009**). Les algues marines, telle que *Turbinaria conoides*, a été découverte pour son effet anti-inflammatoire contre l'œdème auriculaire induit par le phénylpropionate d'éthyle et l'œdème de la patte arrière induit par la carraghénine chez les rats. Son activité est comparable à celle du phénylbutazone et de l'acide acétylsalicylique qui

ont été utilisés comme médicaments de contrôle de référence (**Boonchum *et al.*, 2011**). *Sargassum fulvellum* et *Sargassum thunbergii*, sont mentionnées pour leurs multiples utilisations dans le traitement de l'hydropisie, des gonflements et des douleurs du scrotum (**Sugiura *et al.*, 2017**).

Différents types de composés phénoliques tels que les flavonoïdes, les tanins condensés et les tanins galliques sont connus pour inhiber certaines cibles moléculaires des médiateurs pro-inflammatoires au sein des réponses inflammatoires (**Dahanukar *et al.*, 2000**). Des études ont identifiées des composés phénoliques isolés de certaines espèces d'algues marines, notamment le phloroglucinol, l'eckol, le dieckol, le 7-phloroeckol, le phlorofucofuroeckol A et le dioxinodehydroeckol, comme des agents capables d'inhiber la production d'oxyde nitrique (NO) induite par le LPS dans les cellules (**Jung *et al.*, 2013**).

Chapitre 4. Présentation des espèces investiguées.

1 *Sargassum vulgare* C. Agardh.

1.1 Description botanique

La famille des **Sargassaceae** est un groupe taxonomique faisant partie de la classe des Phéophyceae. Elle a été établie en 1843 par Kützing, avec près de 1000 taxons décrits (**Mattio, 2008**). Cette famille montre une forte diversité. En effet, d'après **Guiry et Guiry (2015)**, 488 espèces de Sargassaceae ont été recensées à ce jour. En nombre d'espèces, les Sargassaceae représentent ainsi 92% des espèces connues au sein de l'ordre des Fucales qui comptent 597 espèces à ce jour. Elle est divisée en 26 genres dont le plus important, en nombre d'espèces, est le genre *Sargassum* avec 400 espèces décrites dont la majorité sont des espèces benthiques (**Mattio et Payri, 2011**).

Décrit pour la première fois il y a près de 200 ans par **Agardh (1820)**, le genre *Sargassum* est présent dans la quasi totalité des océans, tempérés et tropicaux, du globe (**Liu et al., 2012**). Néanmoins, on retrouve la plus forte diversité spécifique du genre *Sargassum* dans les régions intertropicales du Pacifique Ouest avec plus de 130 espèces recensées dont 60% seraient endémiques au Pacifique (**Mattio, 2008**). Face à ce grand nombre d'espèces, les taxonomistes ont rapidement divisé le genre en 4 sous-genres qui sont *Bactrophycus*, *Phyllotrichia*, *Schizophycus* et *Sargassum*. Ces sous-genres se différencient par la morphologie des frondes, des réceptacles et des vésicules aérifères. De plus ces caractères morphologiques peuvent présenter une forte plasticité en fonction des saisons et des facteurs de l'environnement, ce qui rend la taxonomie de ce genre très complexe (**Mattio, 2008**).

Sargassum vulgare est une espèce dressée pouvant mesurer jusqu'à 70 cm de hauteur. Fixé au substrat par un disque basal, l'axe primaire est court, 2 à 4 cm de hauteur. Les rameaux primaires sont très développés, cylindriques, 2 mm de diamètre, lisses ou muriculés. Les 'Pseudo-feuilles' sont abondantes, allongées ayant une nervure médiane et dont les bords portent des denticulations profondes ou simplement ondulés. Les aérocytes sont subsphériques, non-mucronés et pédicellées, avec un diamètre de 3 à 5 mm, et un pédicelle arrondi ou comprimé, parfois ailé et denté. Les organes reproducteurs sont petits, 3 à 10 mm de longueur, et formés d'un pédicelle stérile cylindrique ramifié une fois et terminé par des réceptacles verruqueux, fusiformes, simples ou bifurqués (**Figures 10**). L'espèce peut être

fertile presque toute l'année, avec un pic au printemps et en été. Cette algue se développe dans l'horizon supérieur de l'étage infralittoral en mode semi battu des côtes rocheuses méditerranéennes et atlantiques françaises souvent à l'abri d'un surplomb. Espèce voisine : *Sargassum muticum* (Mattoo *et al.*, 2013).



Figure 10. Photo de *Sargassum vulgare* (Prise par Aissaoui Ghania, Juin 2013).

L'espèce *Sargassum vulgare* est classée d'après Cavalier-Smith (2004) ; Lee (2008) et Guiry and Guiry (2015) comme suit :

Position Systématique

Embranchement : Ochrophyta

Classe : Phéophycées

S/classe : Fucophycidées

Ordre : Fucales

Famille : Sargassaceae

Genre : *Sargassum*

Espèce : *Sargassum vulgare*

1.2 Travaux antérieurs

De nombreuses études sur l'isolement et la détermination de la structure chimique des composés pouvant présenter des activités biologiques à potentialités pharmacologiques ont été réalisées à partir de *Sargassum vulgare*.

Des travaux de **Silva et al., (2013)** sur la composition de *S. vulgare* en lipide ont montré sa richesse en acides gras polyinsaturés particulièrement les oméga 3 et les oméga 6. **Aknin et al., (1992)** ont caractérisés une autre classe de lipides, les stérols dont le principal composé, est le fucostérol. Les extraits ainsi que les glycolipides de *Sargassum vulgare* ont montré une bonne activité contre les microorganismes et les microalgues responsables du microfouling en milieu marin (**Plouguerné et al., 2010; Plouguerné et al., 2020**). Ces mêmes auteurs ont signalé une bonne activité antivirale des glycolipides (**Plouguerné et al., 2013**).

Les activités biologiques des polysaccharides de *Sargassum vulgare* ont été largement étudiées (**De Sousa et al., 2007; Dore et al., 2013; Guedes et al., 2013; Lins et al., 2013; Sari-Chmayssem et al., 2016; Kumar et al., 2020**). Les résultats ont indiqué que les alginates et les fucoïdanes isolés de cette algue possèdent des propriétés biologiques et pharmacologiques très intéressantes. Néanmoins, peu de travaux ont été consacrés à l'étude des composés phénoliques (**Rastian et al., 2007; Martins et al., 2013; Arguelles et al., 2019**). Ces auteurs ont mis en évidence la présence des phénols, des flavonoïdes, des proanthocyanidine, des phlorotanins, dans les extraits méthanoliques et aqueux qui se sont avérés actifs. **Shreadah et al., (2018)** et **Abhishek et al., (2021)** ont montré que les composés phénoliques de *S. vulgare* ont des activités biologiques très variées : antioxydante, antimicrobienne, anti-inflammatoire, anticancéreuse, antivirale et anti-Alzheimer.

Dans une étude très récente **Ibrahim et al., (2022)** ont caractérisé par HPLC de puissants composés phénoliques dans l'extrait méthanolique de cette espèce à savoir, des phénols (principalement l'acide gallique, l'acide férulique, l'acide salicylique, l'acide chlorogénique et l'acide *p*-coumarique) et des flavonoïdes (la rutine, le kaempférol et l'héspéridine). Ces auteurs ont constaté que cette algue pourrait être considérée comme un aliment fonctionnel potentiellement prometteur, avec de puissantes caractéristiques antioxydantes, utile pour atténuer et améliorer les différents schémas de stress oxydatif apoptotique et inflammatoire.

2 *Cladostephus hirsutus* (Linnaeus) Boudouresque & M.Perret.

2.1 Description botanique

Les **Cladostephaceae** est un groupe taxonomique appartenant à la classe des Phéophycées, **Oltmanns (1904)** a été le premier auteur à séparer la famille des Cladostephaceae des Sphacelariaceae (**Prud'Homme, 1982**). Cette famille est dite monotypique et ne comporte qu'un seul genre, *Cladostephus*.

Cladostephus, genre établi par Agardh (1817), caractérisé par des filaments articulés, rameaux chargés de ramules également articulées par sections transversales, simples ou légèrement divisées disposées en verticilles simples autour des articulations des rameaux principaux (**de Saint-Vincent, 1824**). Le genre *Cladostephus* comprends trois espèces distribuées principalement des les mers tempérées (**Heesch et al., 2020**).

Cladostephus hirsutus est une algue brune de 10 à 20 centimètres, thalles noirâtres, rigides, formés d'axes "en queue de rat", portant des verticilles de ramules courts, peu ramifiés et recourbés vers le sommet du thalle. A la mauvaise saison, les ramules verticilles disparaissent progressivement de la base vers le sommet. Le thalle est fixé au substrat par un disque basal formé de rhizoïdes étroitement accolés (**Fischer, 1987**).

Cette espèce est pérennante et plus fréquente dans les cuvettes sableuses. Elle est largement distribuée en mer méditerranéenne (**El hattab et al., 2008**), en mer noire, en Atlantique (**Feldmann, 1937**), en Nouvelle-Zélande, en Australie et sur la cote pacifique du Mexique (**Heesch et al., 2020**).



Figure 11. Photo de *Cladostephus hirsutus* (Prise par Aissaoui Ghania, Juin 2013).

Selon Cavalier-Smith. (1981-1995), Boudouresque & M.Perret. (1984) la classification botanique de *Cladostephus hirsutus* est la suivante

Position Systématique

Embranchement : Ochrophyta
Classe : Phéophycées
S/classe : Dictyotophycidées
Ordre : Sphacelariales
Famille : *Cladostephacées*
Genre : *Cladostephus*
Espèce : *Cladostephus hirsutus*

2.2 Travaux antérieurs

Très peu de travaux sur l'étude phytochimique et sur les activités biologiques de l'espèce *C. hirsutus* ont été rapportés dans la littérature. Néanmoins quelques études sont à signaler ;

Dere et al., (1998) ont étudié l'effet du solvant d'extraction sur les teneurs en chlorophylle a et b et en caroténoïdes totaux chez quatre espèces d'algues dont *C. hirsutus* qui a présenté la valeur la plus élevée en caroténoïdes.

Taskin et al., (2007) ont évalué l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques de six espèces d'algues de la mer Égée (Turquie), dont *C. hirsutus* contre six bactéries pathogènes, 3 bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* et *Enterococcus faecalis*) et 3 bactéries Gram négative (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*).

Les travaux de **Bouzidi et al., (2008)** sur l'analyse des stérols totaux de quatre espèces d'algues brunes dont *Cladostephus hirsutus*, par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, ont démontré que le fucostérol est le stérol majoritaire chez toutes ces algues.

L'étude chimique effectuée par **El Hattab et al., (2008)** sur l'algue brune *C. hirsutus* de la cote algérienne a abouti à l'identification de nouveaux métabolites qui sont: l'apo-fucoxanthine et le loliolide.

3 *Rissoella verruculosa* (Bertoloni) J. Agardh

3.1 Description botanique

La famille des **Rissoellaceae** appartient aux Rhodophyceae désignées communément sous le vocable générique «algues rouges». C'est en **1956** que **Kylin** a proposé pour la première fois cette nouvelle famille pour l'unique espèce méditerranéenne *Rissoella verruculosa*. Des travaux récents de biologie moléculaire ont appuyé sur le placement des Rissoellaceae dans l'ordre des Gigartinales (**Saunders et al., 2004**).

Le genre *Rissoella* est monotype et peut-être le seul que l'on puisse considérer comme endémique dans la méditerranée (**Feldmann, 1937**).

Rissoella verruculosa est une algue de couleur jaune orangé constituée de frondes rubanées simples ou peu ramifiées, souvent vrillées, à bordures ondulées et denticulées. Ses frondes sont longues de 5 à 20 cm, larges de 0,5 à 2 cm et épaisses de près d'un mm. Elles sont reliées par un stipe à une base discoïde les fixant solidement à la roche. Sa consistance est caoutchouteuse. Elle n'est que rarement émergée puisque nous la trouvons à fort ressac où elles sont régulièrement mouillées par les vagues (**Figure 12**). La couleur jaune, plus ou moins orangé ou rougeâtre varie avec l'éclairage et l'humectation. Elle se racornit et devient friable et plus brune lorsqu'elle est longtemps exposée à l'insolation. Elle reprend son aspect normal lorsqu'elle est à nouveau mouillée. Certaines lames portent de petites verrues sur les deux faces (**Coppejans, 1972**).

Rissoella verruculosa qui est une des rares algues endémiques de la Méditerranée se rencontre couramment dans le sous-étage supérieur du médiolittoral (**Iatrides et al., 1983**). Elle forme tout autour des rochers battus, au dessus du niveau, une ceinture dorée très caractéristique. Les frondes dressées de cette espèce sont minuscules au début de l'hiver, s'accroissent rapidement pendant l'hiver et le printemps, pour atteindre leur taille maximum en mai ou juin et disparaître progressivement au cours de l'été (**Feldmann, 1937**).



Figure 12. Photo de *Rissoella verruculosa* (Prise par Aissaoui Ghania, Juin 2013).

L'espèce *Rissoella verruculosa* est classée d'après **Agardh, (1851)** et **Kylin, (1956)**, comme suit :

Position Systématique

Embranchement : Rhodophyta

Classe : Florideophycées

S/classe : Rhodymeniophycidées

Ordre : Gigartinales

Famille : Rissoellacées

Genre : *Rissoella*

Espèce : *Rissoella verruculosa*

3.2 Travaux antérieurs

Très peu de travaux ont été effectués sur l'espèce *R. verruculosa*. En effet, une étude faite par **Iatrides *et al.*, (1983)** sur la composition en stérols de différentes espèces algues récoltées sur les cotes méditerranéennes françaises, a mis en évidence la richesse de *R. verruculosa* en cholestérol et en desmostérol.

Les travaux de (**Mollion *et al.*, 1986 ; 1988**) sur l'analyse des polysaccharides de *R. verruculosa*, par spectroscopie RMN du ¹³C ont conduit à l'isolement et à l'identification d'un

nouveau type de carraghénane, nommé oméga carraghénane. Cette algue contient également deux autres types de carraghénane : le kappa et le beta.

Une autre étude menée par **Flores-Moya *et al.*, (1998)** et qui porte sur l'effet du rayonnement solaire sur les performances photosynthétiques, teneur en pigments et les activités des enzymes liées à l'absorption des nutriments chez *R. verruculosa*. Les résultats ont indiqués que les concentrations en pigments photosynthétiques à savoir, la chlorophylle a, la phycocyanine et la phycoérythrine n'ont pas montrés de différences significatives en fonction des conditions d'ensoleillement.

A notre connaissance, et suite à l'interrogation des différentes bases de données bibliographiques, aucune étude sur la teneur en composés phénoliques ainsi que sur les activités biologiques de *R. verruculosa* n'a été publiée.

Matériel et méthodes

1 Matériel végétal

1.1 Critères de sélection

En vue de la valorisation de la biomasse algale que dispose notre pays, selon la disponibilité au moment de la récolte et en se basant sur une recherche approfondie dans la littérature, trois espèces algales ont été sélectionnées, à savoir : deux algues brunes ; *Sargassum vulgare*, *Cladostephus hirsutus*, et une algue rouge ; *Rissoella verruculosa*.

1.2 Collecte et échantillonnage

Les espèces algales qui ont fait l'objet de cette étude ont été récoltées en Juin 2013 au niveau d'une plage nommée « Madrid », sur la côte de béni saf à Ain timouchent située à l'ouest d'Algérie (**Tableau 1**). **La figure 13 et 14** représente une cartographie détaillée du site de la récolte, une station où un immense champ d'algues se découvre à marée basse. *Sargassum vulgare* s'y trouve flottante dans l'eau et accompagnée par *Cladostephus hirsutus*. Sur les rochers, on observe une répartition de *Rissoella verruculosa*. La récolte de ces algues se fait à la main et de façon "aléatoire", sans choisir forcément des algues de même âge et de même taille.

Tableau 1. Paramètres géographiques et bioclimatiques de la station de la récolte (Encarta, 2009).

Station	Période de récolte	Altitude (m)	Latitude (N)	Longitude (O)	étage bioclimatique
Plage Madrid (W. Ain Témouchent)	Juin 2013	0	35°18'	1°28'	Littoral

O: Ouest, N: Nord

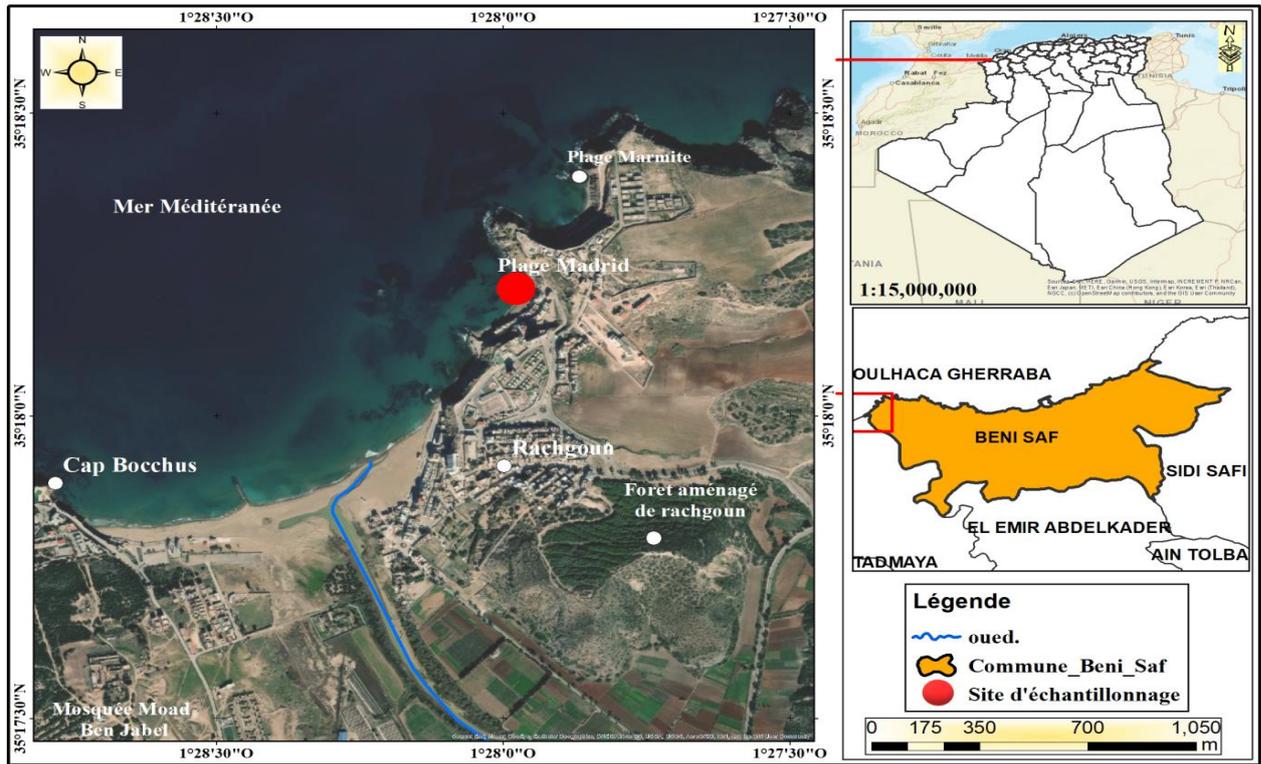


Figure 13. Localisation géographique du site d'échantillonnage.



Figure 14. Plage Madrid (W. Ain Témouchent) (Prise par Aissaoui Ghania, Juin 2013).

1.3 La récolte

Après chaque collecte, les échantillons ont été transportés au laboratoire pour être triés, nettoyés manuellement et ensuite identifiés. L'identification des trois espèces algales a été confiée au professeur Benguedda Wassila du département d'écologie de l'université de Tlemcen.

Les algues récoltées sont lavées 3 fois à l'eau douce, puis elles sont rincées plusieurs fois à l'eau distillée afin d'éliminer l'excès de sel, les espèces épiphytes et tout corps étranger qui pourrait influencer l'évaluation des activités biologiques.

Le matériel végétal est ensuite séché à température ambiante dans un endroit sec à l'abri de la lumière. Les algues sont complètement sèches après trois ou quatre jours, ensuite elles sont entreposées dans des sacs en papier, et conservées à température ambiante au laboratoire jusqu'à utilisation. Ainsi séchée, l'algue peut conserver la totalité et l'intégrité des substances actives que nous souhaitons extraire et étudier.

2 Préparation des extraits

L'extraction de produits naturels est généralement de type solide-liquide, c'est-à-dire qu'un solide, la matrice algale, est mélangé avec un liquide, le solvant d'extraction. Des méthodes dites traditionnelles, comme la macération, l'hydrodistillation, l'extraction par reflux et le Soxhlet sont utilisées et considérées comme techniques de choix pour extraire les composés naturels. Ces techniques se basent le plus souvent sur le choix du solvant et sur l'utilisation de chauffage et/ou d'agitation (**Azmir et al., 2013**). L'extraction au Soxhlet est une technique de référence, simple d'utilisation et couramment pratiquée, elle permet l'extraction relativement complète des métabolites présents dans la matrice végétale (**Romanik et al., 2007**), cette méthode dépasse en performance les autres techniques conventionnelles d'extraction (**De Castro and Garcia-Ayuso, 1998**).

2.1 Préparation de l'extrait brut

La méthode d'extraction utilisée est celle décrite par **Duan et al. (2006)**. Dans un extracteur de Soxhlet, 100 g de la poudre algale est extraite avec 500 mL du mélange méthanol : chloroforme (2:1) (V:V) pendant 6 h. L'extraction a été répétées trois fois, les trois solutions organiques sont combinées et évaporées à sec sous pression réduite et à une température 40°C, puis conservées à 4°C.

2.2 Fractionnement de l'extrait brut

L'extrait sec a été dissout dans le méthanol à 90%, puis extrait avec 3 x 100 mL d'éther de pétrole (FEP). La solution méthanolique est évaporée sous pression réduite jusqu'à obtention d'un extrait semi-solide, qui sera ensuite dissout dans 200 mL d'eau distillée puis extrait successivement avec 3 x 100 mL d'acétate d'éthyle (FAE), 3 x 100 mL de dichlorométhane (FDCM) et 3 x 100 mL de n-butanol (FBOH) (**Figure 04**).

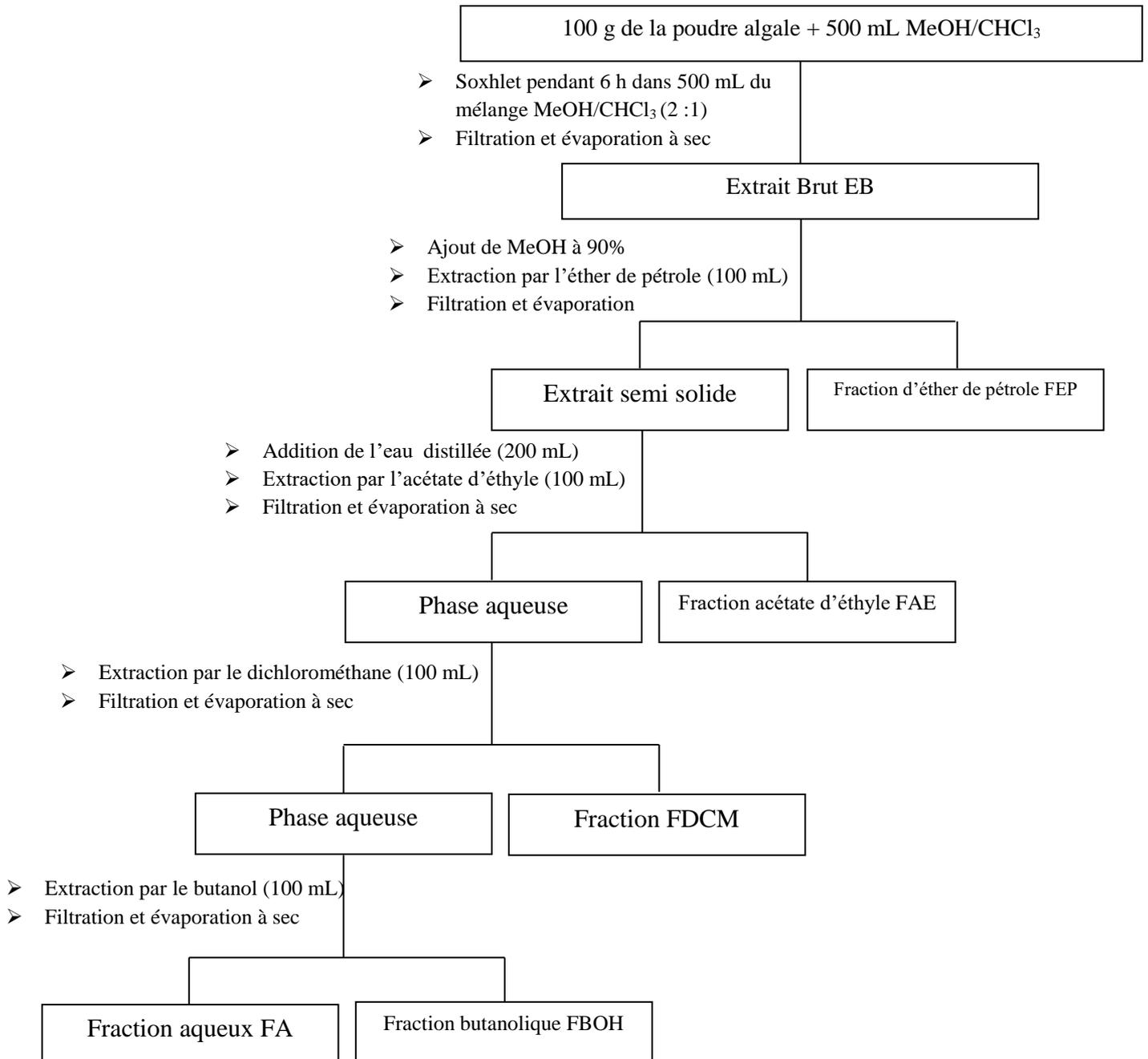


Figure 15. Protocole d'extraction (Duan et al., 2006).

2.3 Calcul des rendements en extraits secs

Le rendement désigne le poids de l'extrait déterminé après évaporation du solvant organique, il est exprimé en pourcentage par rapport au poids initial de la poudre d'algue soumise à l'extraction. Le rendement (Rdt) est calculé par le rapport suivant :

$$Rdt \% = [P_1 - P_2] / P_3 \times 100$$

Rdt: Rendement exprimé en % ; **P₁:** poids du ballon après évaporation ; **P₂:** poids du ballon vide ; **P₃:** poids de la matière végétale sèche de départ.

3 Dosage des composés phénoliques

3.1 Dosage des phénols totaux

Le dosage des phénols totaux des extraits bruts et des fractions des trois algues étudiées est effectué avec le réactif du Folin-Ciocalteu selon la méthode de **Singleton et Rossi (1965)**.

Une quantité de 200 µL de l'extrait est introduite dans des tubes à essai, puis 1 mL du réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois et 0.8 mL de carbonate de sodium à 7.5% sont additionnés. Les tubes sont agités et conservés durant 30 min à la température ambiante. L'absorbance est mesurée à 765 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre SPECORD 200 Plus. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif.

Les teneurs en phénols totaux sont exprimées en milligramme (mg) équivalents acide gallique par gramme (g) de matière sèche (mg EAG/g MS).

3.2 Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes totaux des extraits et des fractions des trois algues a été effectué par une méthode colorimétrique selon **Zhishen et al (1999)** avec le trichlorure d'aluminium (AlCl₃) et la soude (NaOH); 500 µL de chaque extrait (préparé dans le

méthanol) avec des dilutions convenables, a été ajouté à 1500 µL de l'eau distillée. Au temps zéro, 150 µL de nitrite de sodium (NaNO₂) à 5 % est ajouté au mélange. Après 5 min, 150 µL de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) à 10 % (m/v) est rajouté. Après incubation de 6 min à la température ambiante, 500 µL d'hydroxyde de sodium (NaOH) (1 M) est additionné. Immédiatement, le mélange est complètement agité. L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est mesurée à 510 nm. Un essai à blanc est préparé dans les mêmes conditions, en absence d'extrait.

La teneur en flavonoïdes a été déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la catéchine et exprimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme (g) du poids de la matière sèche (EC/g). Chaque échantillon est répété trois fois.

3.3 Dosage des tanins condensés

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en milieu acide (**Julkunen-Titto, 1985**). Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide concentré pour produire un complexe de couleur rouge spécifique, cela s'explique par la propriété des tanins à se transformer en anthocyanidols (**Sun et al., 1998**).

Une prise de 50 µL de l'extrait convenablement dilué est additionnée à 1500 µL de vanilline (4 %) et 750 µL de l'acide chlorhydrique concentré (HCl). Après 20 minutes de repos à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 550 nm. La courbe d'étalonnage établie à partir des solutions de différentes concentrations de catéchine permet d'exprimer la concentration des tanins condensés en mg équivalents de catéchine par gramme de matière sèche (mg EC/g MS).

3.4 Dosage des flavonols

La méthode du trichlorure d'aluminium AlCl₃ (**Kumaran et al., 2007**) est utilisée pour quantifier les flavonols dans les extraits bruts et les différentes fractions des trois algues étudiées.

Un volume de 250 uL d'extrait dilué a été mélangé avec 250 uL d'AlCl₃ (2 mg mL/L) et 1500 uL d'acétate de sodium (50 mg mL/L). Le mélange est vigoureusement agité, puis l'ensemble est laissé au repos pendant 2,5 heures à température ambiante. L'absorbance est ensuite lue à 440 nm. La quantification des flavonols se fait en fonction d'une courbe

d'étalonnage réalisée par un flavonoïde standard, la quercétine. La teneur en flavonol a été exprimée en mg d'équivalents de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS).

4 Evaluation des activités biologiques

4.1 Le potentiel antioxydant

4.1.1 Capacité antioxydante totale (CAT)

La capacité antioxydante totale (CAT) des extraits bruts et des fractions est déterminée selon la méthode de phosphomolybdène de **Prieto *et al.* (1999)**. L'essai est basé sur la réduction de molybdène (Mo^{6+}) au molybdène (Mo^{5+}) en présence d'un antioxydant pour former un complexe vert de phosphate/ Mo^{5+} à pH acide. Brièvement, Un volume de 0,3 mL de chaque échantillon est mélangé avec 3 ml d'une solution de réactif composée d'acide sulfurique (0.6 N), de phosphate de sodium (Na_3PO_4 , 28 mM) et de molybdate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 4 mM). Le mélange est ensuite incubé à 95 °C pendant 90 min. Après refroidissement à la température ambiante, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre un blanc contenant 3 mL de la solution du réactif et 0,3 mL du méthanol et incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon.

La capacité antioxydante totale est exprimée en milligrammes équivalents d'acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg EAA/g MS). Les expériences sont répétées 3 fois.

4.1.2 Piégeage du radical DPPH'

Au cours de ce test, l'évaluation de l'activité antiradicalaire est réalisée selon la méthode décrite par **Sanchez-Moreno *et al.* (1998)**. 50 μL de chacune des différentes concentrations des extraits est mélangé avec 1,950 mL d'une solution méthanolique de DPPH (0.025 g/L) fraîchement préparée. Après agitation, le mélange est gardé pendant 30 min à l'obscurité à température ambiante, puis l'absorbance est mesurée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, en se référant à un témoin sans extrait.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition, calculés selon l'équation suivante:

$$\text{PI} = (\text{DO}_{\text{témoin}} - \text{DO}_{\text{extrait}} / \text{DO}_{\text{témoin}}) \times 100$$

Où : PI: pourcentage d'inhibition ; $DO_{\text{témoin}}$: absorbance du témoin négatif ; DO_{extrait} : absorbance de l'extrait.

La courbe donnant la variation du pourcentage d'inhibition (%) du radical DPPH en fonction des concentrations (mg/mL) des extraits est ensuite tracée afin de calculer la concentration inhibitrice IC_{50} , qui représente la concentration de l'échantillon nécessaire pour neutraliser 50% des radicaux de DPPH.

4.1.3 Réduction du fer

L'essai de la réduction de fer est réalisé selon la méthode décrite par **Oyaizu (1986)**. Cette méthode mesure le pouvoir réducteur des antioxydants présents dans un mélange par leur capacité de réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) de couleur jaune en fer ferreux (Fe^{2+}) de couleur bleu par un transfert d'électron (**figure 16**)

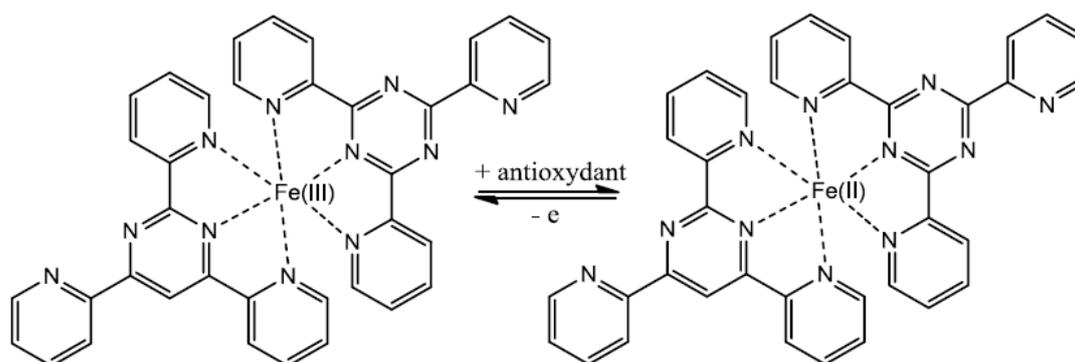


Figure 16. Mécanisme réactionnel du test de la réduction de fer.

Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations (de 1 à 6 mg/mL) est mélangé avec 2,5 mL d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 30 min par la suite, 2,5 mL d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés à 3000 tours, pendant 10min, puis 2,5 mL du surnageant recueilli sont combinés avec 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL d'une solution aqueuse de $FeCl_3$ (0,1%) préparée extemporanément. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée. Le contrôle positif est représenté par une solution d'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

4.2 Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'utilisation des algues marines en médecine et en pharmacie est connue depuis la plus haute antiquité mais reste limitée. Les molécules naturelles issues des algues conçoivent une panoplie de principes bioactifs susceptibles de renforcer ou de diversifier les gammes existantes en antibiotiques. Dans Cette partie, nous tentons de trouver une activité antimicrobienne chez *Sargassum vulgare*, *Cladostephus hirsutus* et *Rissoella verruculosa*.

4.2.1 Souches microbiennes testées

Pour mettre en évidence la capacité antimicrobienne des extraits bruts et des fractions des trois algues, un total de sept souches microbiennes a été utilisé (3 bactéries à Gram+, 3 bactérie à Gram- et une levure) comme montré dans le **tableau 2**. Les sept souches sont des souches de référence de type ATCC (American Type Culture Collection).

Tableau 2. Liste des microorganismes testés.

Type de microorganisme	Espèces	Références	Famille
Bactéries à Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Micrococaceae
	<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341	
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876	Bacillaceae
Bactéries à Gram négatif	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	Enterobacteriaceae
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC700603	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Pseudomonadaceae
Levure	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Cryptococcaceae

ATCC: American Type Culture Collection

4.2.2 Méthodes d'étude du pouvoir antimicrobien

Le test de susceptibilité des extraits bruts et des fractions est effectué selon deux méthodes différentes: la méthode de diffusion en disque en milieu gélosé comme un test préliminaire et qui permet la mise en évidence de l'activité antimicrobienne et la méthode de micro-dilution en milieu liquide qui a pour but de déterminer la concentration minimale inhibitrice CMI à partir d'une gamme de concentrations.

4.2.2.1 Mise en culture des souches

Les tests antimicrobiens sont effectués à partir de colonies jeunes de 18 à 24 h en phase exponentielle de croissance. Une suspension microbienne est réalisée dans le bouillon BHB stérile pour chaque souche. La turbidité est ensuite ajustée à 0,5 McFarland, ce qui correspond à $1-2 \times 10^8$ UFC/mL pour les bactéries (D.O = 0,08 à 0,1/ λ = 625 nm), $1-5 \times 10^6$ UFC/mL pour *C. albicans* (D.O = 0,12 à 0,15 / λ = 530 nm) (NCCLS, 2001).

4.2.2.2 Méthode de diffusion sur disque

La technique de diffusion en milieu gélosé, plus couramment appelée la méthode des disques, est une technique fiable et reproductible qui repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition et en fonction du diamètre d'inhibition, la souche sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. Dans cette technique, il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester (Broadasky *et al.*, 1976).

La technique retenue est celle de Boulekbache-Makhlouf *et al.* (2013), avec quelques modifications. Chaque inoculum a été ensemencé par écouvillonnage sur des boîtes de Pétri contenant la gélose Mueller-Hinton pour les bactéries et le milieu Sabouraud pour *C. albicans*. Ensuite, des disques de papier filtre de 6 mm de diamètre individuellement imprégnés avec 10 μ L de l'extrait à différentes concentrations 50, 100 et 200 mg/mL ce qui correspond à 0,5, 1 et 2 mg/disque solubilisés dans le DMSO sont déposés sur la surface des milieux gélosés préalablement inoculés avec les microorganismes testés. En parallèle, nous avons utilisé un disque témoin négatif imbibé par le DMSO (10 μ L/disque) et des antibiotiques standards comme témoins positifs à savoir, l'ampicilline (10 μ g/disque), et la nystatine (30 μ g/disque) comme antifongique. Les boîtes de Pétri ainsi préparées sont laissées 1 h à température ambiante puis conservées à + 4 °C pendant 2 h, afin de permettre la pré-diffusion des substances. Après incubation de 24 h à 37 °C pour les bactéries et de 24 - 48 h à 37 °C pour *C. albicans*, les diamètres des zones d'inhibition (mm) sont mesurés, y compris le diamètre des disques.

4.2.2.3 Méthode de micro-dilution en milieu liquide

Ce test en milieu liquide a pour objectif de déterminer les valeurs des paramètres antimicrobiens dont la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB). La méthode employée est celle décrite par **Okusa et al. (2007)**, avec quelques modifications. La CMI est étudiée seulement pour les microorganismes qui ont montré une certaine sensibilité aux extraits. Les extraits étudiés sont dissouts dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration de 30 mg/250 µL, puis dilués avec 5 mL de bouillon Mueller-Hinton. La concentration finale en DMSO dans le milieu est de 5%. 200 µL de la solution préparée sont transférés dans une microplaque à 96 puits et une gamme de concentrations de chaque extrait est effectuée par des dilutions au demi dans le milieu de culture.

A partir d'une culture microbienne de 24 h d'incubation, nous avons préparé un inoculum bactérien de 10^6 UFC/mL dans une solution de chlorure de sodium (0,9%). Ensuite 100 µL de cet inoculum sont homogénéisés dans chaque puits de la gamme de concentrations préalablement préparée puis incubée à 37 °C pendant 24 h. Les concentrations finales de la gamme ainsi générée sont comprises entre 15 et 0,117 mg/mL. Deux puits représentent les témoins négatifs : un 1er puits contient le milieu de culture et l'inoculum et un 2ème puits contient uniquement le milieu de culture.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la plus faible Concentration de l'extrait à laquelle le microorganisme ne démontre pas une croissance visible à l'œil nu après un temps d'incubation de 18 à 24 heures. Elle mesure donc, un effet bactériostatique et ne renseigne pas sur l'état de la population bactérienne, ne permettant notamment pas de préciser si elle a été tuée en partie ou totalement ou si elle a seulement cessé de se multiplier (**Bergogne-Bérézin et Brogard, 1999**). La turbidité de chaque puits est appréciée à l'œil nu à la lumière du jour.

La Concentration minimale bactéricide (CMB) est la plus faible concentration en extrait capable de tuer 99,9% de l'inoculum bactérien initial. Elle définit l'effet bactéricide d'un échantillon donné. Des prélèvements sont effectués dans le puits témoin et dans chacun des puits dépourvus de culot microbien puis déposés « en spots » sur gélose Mueller-Hinton. Les boîtes de géloseensemencées sont incubées à 37°C pendant 24h.

A la lecture, La CMB des extraits est déduite à partir de la première boîte dépourvue de bactérie. Chaque expérience est réalisée trois fois au cours de trois expériences successives.

4.3 Etude de l'activité antiparasitaire

Les maladies parasitaires posent encore de nombreux problèmes de santé. Parmi celles-ci, citons la maladie du sommeil dont l'agent responsable est le *Trypanosoma brucei* et la malaria transmise par le *Plasmodium* dont l'espèce la plus dangereuse est le *Plasmodium falciparum*. Avec l'ambition de découvrir de nouveaux composés naturels d'origines algales présentant une activité antiparasitaire, nous avons testé l'effet de trois espèces d'algues envers deux souches différentes : *Plasmodium falciparum* et *Trypanosoma brucei brucei*. Seules les fractions d'acétate d'éthyle, qui se sont révélées plus actives dans l'activité antimicrobienne, ont été évaluées pour leurs activités antiparasitaires.

Ces bioessais ont été effectués au *Laboratoire de parasitologie du Muséum National d'Histoire Naturelle, France 3206 CNRS, (61 rue Buffon à Paris)*.

4.3.1 Activité antiplasmodiale

4.3.1.1 Culture in vitro de la phase intraérythrocytaire de *P. falciparum*

La souche de *P. falciparum* utilisée est de type FcB1, provenant de Colombie et résistante à la chloroquine. Selon la méthode de **Trager et Jensen (1976)**, elle est maintenue en culture sur hématies humaines O+ à un hémocrite de 4%, sous une atmosphère de 91% de N₂, 3% de CO₂, 6% d'O₂, à 37 °C. Le milieu de culture est le milieu RPMI 1640 contenant 25 mM d'Hepes et 2,05 mM de L-Glutamine. Ce milieu est ensuite enrichi à raison de 5% d'un mélange de sérum humain.

4.3.1.2 Évaluation in vitro de l'activité antiplasmodiale des fractions acétates d'éthyle

L'activité antiplasmodiale est évaluée selon la technique de **Desjardin et al. (1979)**. Elle utilise comme précurseur radioactif l'hypoxanthine tritiée, un intermédiaire de synthèse des acides nucléiques du parasite. Les hématies humaines étant anucléées, l'incorporation d'hypoxanthine tritiée dans l'ADN parasitaire est le reflet de l'activité antiparasitaire des fractions testées.

Une culture asynchrone de *P. falciparum* est mise en présence de concentrations successives décroissantes de la drogue testée dans une plaque 96 puits suivant la technique de **Labaied et al. (2004)**. Le volume total de chaque puits est de 200 µL; 100 µL de chaque échantillon préalablement préparé à 50 mg/mL dans le DMSO puis dilué dans le milieu de

culture et 100 µL de suspension d'hématies parasitées dans du milieu de culture (1% de parasitémie, 1% d'hématocrite). La chloroquine a également été testée et constitue la molécule de référence, le contrôle négatif étant le DMSO seul. La plaque est incubée 24 heures à 37°C sous une atmosphère appauvrie en oxygène puis 25 µL d'hypoxanthine tritiée (0,5 µCi) sont distribués dans chaque puits. La plaque est une nouvelle fois incubée dans les mêmes conditions pendant 24 heures puis congelée à -80°C pour lyser les cellules. Après décongélation, le lysat cellulaire est aspiré sur papier en fibre de verre afin de récupérer l'ADN parasitaire. Le filtre est lavé, séché et imbibé de liquide scintillant. La radioactivité est alors mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'inhibition de la croissance parasitaire pour chaque concentration de produit est déterminée par comparaison entre la radioactivité incorporée dans une culture traitée et celle incorporée dans une culture non traitée (contrôle négatif) contenant la même quantité de DMSO et maintenue sur une même plaque. La valeur d'IC₅₀ est calculée à partir de la moyenne des courbes dose-réponse obtenues pour plusieurs expériences indépendantes. Les résultats ont été exprimés en moyenne ± erreur standard à partir de trois expériences indépendantes. La chloroquine est utilisée comme antipaludique.

4.3.2 Activité antitrypanosomale

Le test est effectué sur les formes sanguines de *T. brucei brucei* cultivées dans un milieu HMI9 additionnée de 10% de sérum fœtal et maintenues *in vitro* pendant 24 heures dans l'obscurité à 37°C dans une atmosphère de 5% de CO₂.

La prolifération des parasites suite à l'ajout d'extraits en différentes concentrations est mesurée à l'aide d'une molécule fluorescente, la résazurine. Il s'agit d'un réactif pro-fluorescent qui permet une mesure quantitative de la prolifération de nombreuses lignées cellulaires (Bosc et al., 2012). En présence de substances réductrices, celui-ci passe d'une couleur bleue non fluorescente (forme oxydée de l'indicateur) à une couleur rose fluorescente (forme réduite de l'indicateur). Or, seules les cellules viables contiennent des enzymes capables de réduire cette molécule (Figure 17).

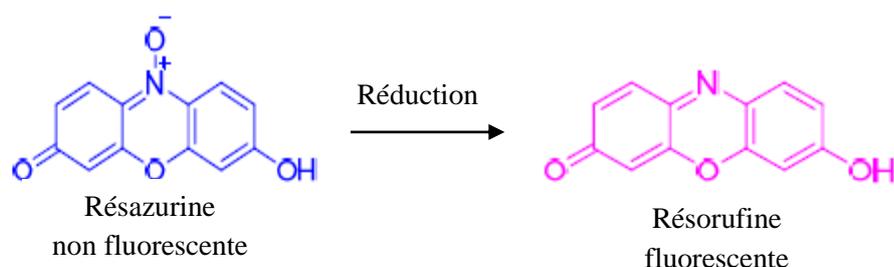


Figure 17. Réduction de la résazurine en résorufine.

Les solutions stocks des différents composés sont préparés dans du DMSO pur. Ces solutions sont ensuite diluées pour assurer une concentration finale en DMSO de maximum 1%.

Les tests sont réalisés dans des plaques à 96 puits, chacun contenant 10 μ L de la solution de DMSO du composé et 190 μ L d'un inoculum de trypanomastigotes (3×10^4 cells/mL). La croissance du parasite est comparée à un inoculum non traité (100% de croissance) et un contrôle non infecté (0% de croissance). Après trois jours d'incubation à 37 °C, la quantité de parasites est mesurée après avoir ajouté la solution de résazurine dans chaque puits à une concentration finale de 45 μ M. Après 4 h d'incubation à 37°C, le changement de coloration (la fluorescence) est mesuré à une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et d'émission de 590 nm.

Les pourcentages de croissance sont ensuite relevés en fonction de la concentration en extrait (dans une graphique semi-logarithmique) et l'IC₅₀ est calculé par interpolation linéaire. L'IC₅₀ correspond à une inhibition de 50% de la croissance des trypanosomes pour une concentration en extrait donnée ; plus la valeur de l'IC₅₀ est basse, plus l'activité antitrypanosomale est grande. La pentamidine est employée comme référence.

4.4 Test de toxicité

4.4.1 Principe

L'étude de la toxicité aigüe de l'extrait brut de *Cladostephus hirsutus* a été réalisée conformément à la méthode décrite par l'Organisation de la Coopération Economique et de Développement (OECD) (Ejebe *et al.*, 2010). Ce test consiste à administrer par voie orale les doses expérimentales aux animaux et observer toute manifestation de toxicité, augmentation

dans l'activité, salivation, convulsion, coma et mort. Ces observations sont faites régulièrement jusqu'à 24 heures (Paschapur *et al.*, 2009).

4.4.2 Matériel biologique

L'étude *in vivo* est réalisée sur des souris mâles dont le poids varie entre 20 et 30 g procurés aux prés de l'Institut Pasteur d'Alger. Les animaux sont élevés dans des cages de polypropylène à une température ambiante, avec accès libre à l'eau et à l'aliment. Après une période d'adaptation, les souris sont pesées, marquées, et soumises à jeûne pendant une nuit avant leur utilisation.

4.4.3 Protocole

Le test est réalisé sur un effectif de 12 souris réparties en deux lots. Ces souris sont privées de nourriture et d'eau 12 heures avant la période d'expérimentation. Chaque lot reçoit par voie orale la solution test à 2 doses :

Lot 1: Reçoit l'extrait brut de *C. hirsutus* à la dose de 150 mg/Kg de poids corporel dissous dans du NaCl 0,9%.

Lot 2: Reçoit l'extrait brut de *C. hirsutus* à la dose de 300 mg/Kg de poids corporel dissous dans du NaCl 0,9%.

4.5 Activité anti-inflammatoire

Pour étudier l'activité anti inflammatoire de l'extrait brut de *C. hirsutus* après une inflammation aigüe, un œdème local est provoqué par la carragénine dans la patte de souris.

4.5.1 Protocole expérimental

4.5.1.1 Prétraitement par l'extrait

Dans le cadre de cette étude, un effectif de 24 souris pesant 25 ± 5 g a servi d'animaux d'expérience. Une heure avant l'injection de la carragénine, les souris ont été réparties en 4 lots de 6, chaque lot reçoit par voie orale les solutions expérimentales comme suit :

- **Lot contrôle** (n=6): Reçoit une solution de NaCl (0,9%).

- **Lot standard** (n=6): Reçoit l'anti-inflammatoire diclofénac (50 mg/Kg) dissous dans du NaCl 0,9%.
- **Lot EB1** (n=6): Reçoit l'extrait brut de *C. hirsutus* à la dose de 150 mg/Kg de P.C dissous dans du NaCl 0,9%.
- **Lot EB2** (n=6): Reçoit l'extrait brut de *C. hirsutus* à la dose de 300 mg/Kg de P.C dissous dans du NaCl 0,9%.

4.5.1.2 Induction de l'inflammation

L'étude expérimentale de l'activité anti-inflammatoire a été réalisée selon la méthode décrite par (**Winter et al. 1962**). L'inflammation est induite par injection sub-plantaire (intra-articulaire) de la carragénine au niveau de la voûte plantaire de la patte arrière droite des souris. L'œdème causé par cet agent phlogogène sera traduit en volume et mesuré par le Pléthysmomètre ce qui permet de suivre l'évolution du processus inflammatoire. L'intensité de cet œdème peut être évaluée par l'augmentation du volume de la patte en pourcentage par rapport au volume initial. L'administration de l'extrait ayant une activité anti-inflammatoire réduit de façon significative le développement de l'œdème.

4.5.1.3 Injection de la carragénine

Une heure après l'administration orale des traitements, un œdème aigu est induit dans la patte arrière droite des souris par injection sub-plantaire de 0,1 mL de carragénine à 0,5% en suspension dans du sérum physiologique NaCl 0,9%.

4.5.1.4 Évaluation de l'activité anti-inflammatoire

➤ **Mesure de l'œdème**

Le volume de la patte a été mesuré par un micromètre digital avant et après induction de l'œdème à des intervalles d'une heure pendant six heures.

L'évolution de l'œdème de la patte a été déterminée à 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h et 6 heures après l'injection de la carragénine (**Anupana et al., 2012**).

➤ **Calcul du pourcentage d'augmentation du volume de la patte (%AUG)**

L'importance de l'œdème a été appréciée par la détermination de la moyenne du pourcentage d'augmentation (%AUG) de volume de la patte de souris par la formule suivante (Ndiaye *et al.*, 2006):

$$\%AUG = (D_n - D_0) \times 100 / D_0$$

Où : D_n: diamètre de la patte la i^{ème} heure après l'injection de la carragénine ; D₀: diamètre de la patte avant l'injection de la carragénine.

➤ **Calcul du pourcentage d'inhibition de l'œdème (% INH)**

L'activité anti-inflammatoire a aussi été évaluée par le calcul du pourcentage d'inhibition de l'œdème (%INH) selon la formule suivante (Ndiaye *et al.*, 2006):

$$\%INH = (\%AUG_{\text{témoin}} - \%AUG_{\text{traité}}) \times 100 / \%AUG_{\text{témoin}}$$

4.5.1.5 Etude histologique

4.5.1.5.1 Echantillons

A la fin de l'expérimentation, les souris de chaque lot sont anesthésiées au chloroforme et les pattes sont soigneusement prélevées, ensuite trempées dans du formol à 10% pour l'étude histologique.

L'étude histologique est effectuée au niveau du service d'Anatomie Pathologie de l'hôpital militaire régional universitaire d'Oran.

4.5.1.5.2 Méthodes

L'étude histologique est réalisée selon le protocole suivant :

- **Fixation** : Les pattes prélevées sont fixés avec du formol dilué à 10%.
- **Décalcification**

La dureté du tissu osseux nécessite un traitement à l'aide d'agents chimiques permettant de chélater le calcium. La décalcification facilite l'obtention de coupes fines

exploitables d'un point de vue microscopique. Durant cette étape on introduit les pattes dans une solution décalcifiant (980 mL de l'eau distillée + 20 mL de l'acide nitrique), pendant trois heures.

➤ **Circulation**

Introduction des cassettes dans un appareil de circulation ou de déshydratation durant 24 heures en passant par 12 bacs comme suit :

- Bac1 : formol à 10% durant une heure et demi heure,
- Bac2 : éthanol à 50° durant une heure,
- Bac3 : éthanol à 60° durant une heure,
- Bac4 : éthanol à 70° durant une heure,
- Bac5 : éthanol à 80° durant une heure,
- Bac6 : éthanol à 90° durant une heure,
- Bac7 : éthanol à 96° durant une heure,
- Bac8 : xylène ou toluène durant une heure et demi heure,
- Bac9 : xylène ou toluène durant une heure et demi heure,
- Bac10 : xylène ou toluène durant une heure et demi heure,
- Bac11 : paraffine liquide durant deux heures,
- Bac12 : paraffine liquide durant deux heures.

➤ **Inclusion et enrobage**

Le paraffinage a lieu grâce à un appareil muni d'un compartiment alimenté en chaleur pour faire couler la paraffine (56°C-58°C), et d'une plaque refroidissante sur laquelle est mis un moule métallique contenant les cassettes où les pièces sont mises. Une fois les pièces couvertes de paraffine liquide, elles sont laissées refroidir sur une plaque à froid, ainsi, on obtient les blocs qui seront utilisés pour donner de fines coupes. Les blocs sont conservés au froid jusqu'à la coupe des pièces.

➤ **Coupe**

Des coupes de 4 µ sont réalisées à l'aide d'un microtome, le ruban fractionné est porté sur une lame de verre, la lame est mise sur une plaque chauffante pour permettre un bon étalement et éviter la formation des plis. Les lames sont marquées sur leur bord par un stylo à diamant.

Ensuite elles sont mises dans un plateau et l'incubation est effectuée sous une température de (50°C-56°C) pendant toute la nuit.

➤ **Coloration**

La coloration est réalisée dans un appareil spécifique avec de l'Hématoxyline Eosine, les échantillons sont traités par plusieurs produits et dans plusieurs bacs comme suit :

- 3Bacs de xylène durant 5 minute chacune.
- 3Bacs d'éthanol de concentration de 50°, 60°, 90°.
- 1Bac d'eau distillée pendant 5 minutes.
- 1Bac d'hématoxyline d'Harris durant 8 minutes.
- 1Bac de solution de lavage, pour faire laver les lames pendant 5 minutes.
- 1Bac d'alcool-acide durant 3 secondes.
- 1Bac de solution de lavage
- 1Bac d'eau amoniacale durant 15 secondes.
- 1Bac de solution de lavage durant 5 minutes.
- 1Bac d'Eosine durant 3 minutes suivi par un lavage pendant 5 minutes.
- 2Bacs d'éthanol de 5 minutes pour chacun
- 2Bacs de xylène de 5 minutes pour chacun

➤ **Montage**

Une goutte d'une solution (EUKITT) est déposée permettant l'adhésion sur la lame, en présence d'une lame propre et sèche en inclinant progressivement cette dernière de façon que la solution s'étende peu à peu et recouvre la coupe sans emprisonner les bulles d'air. La lamelle est adhérente et la préparation est prête pour l'observation microscopique.

➤ **Lecture microscopique**

La lecture microscopique est réalisée et chaque coupe est photographiée.

5 Etude statistique

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyennes \pm écart type de trois expériences indépendantes. Les valeurs d'IC₅₀ ont été calculées à partir des équations linéaires, logarithmiques ou projections directe sur les courbes. Plus la valeur d'IC₅₀ est petite, plus l'activité en question est grande. Les coefficients de corrélation entre les composés phénoliques et les méthodes de l'activité antioxydante ont été démontrés en utilisant EXCEL (2010).

Résultats et interprétation

1 Résultats

1.1 Rendement d'extraction

Les extractions des différents composés nous ont permis de calculer les rendements des extraits bruts (EB) obtenus par un système d'extraction au soxhlet et de leurs fractions: éther de pétrole (FEP), acétate d'éthyle (FAE), dichlorométhane (FDCM), butanolique (FBOH) et aqueuse (FA). Les rendements qui ont été déterminés par rapport à 100 g du matériel végétal sec et broyé sont exprimés en pourcentage et reportés dans le **tableau 3**.

Tableau 3. Rendements des extraits bruts et des différentes fractions des trois algues.

Extrait brut et fractions	Rendement (%)		
	<i>S. vulgare</i>	<i>C. hirsutus</i>	<i>R. verruculosa</i>
EB	3.101±0.556	2.483±0.164	1.953±0.379
FEP	0.847±0.004	0.579±0.093	0.543±0.070
FAE	0.444±0.094	0.449±0.003	0.207±0.077
FDCM	0.024± 0.006	0.026±0.013	0.021±0.011
FBOH	0.136± 0.016	0.191±0.037	0.200±0.031
FA	0.286±0.157	0.823±0.157	0.539±0.240

EB: Extrait brut; FEP: fraction d'éther de pétrole; FAE: fraction d'acétate d'éthyle; FDCM: fraction dichlorométhane; FBOH: fraction butanolique; FA: fraction aqueuse.

Les résultats obtenus, montrent que l'extrait brut de *S. vulgare* détient le rendement le plus élevé à raison de 3.101±0.556%, suivi de l'extrait brut de *C. hirsutus* (2,483±0.164%) et de *R. verruculosa* (1.953±0.379%). Pour les fractions, les rendements les plus élevés ont été obtenus à partir des fractions d'éther de pétrole de *S. vulgare* (0.847±0.004%) et de *R. verruculosa* (0.543±0.070%) et de la fraction aqueuse de *C. hirsutus* (0.823±0.157%), tandis que les fractions dichlorométhane des trois espèces ont donné les rendements les plus faibles et qui ne dépassent pas 0.021±0.011%.

1.2 Dosage des composés phénoliques

Les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes, en flavonols et en tanins condensés des trois algues sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage: exprimées en mg équivalents d'acide gallique (mg EAG) pour le dosage des phénols totaux (**Figure A.1**), en mg équivalents de catéchine (mg EC) pour le dosage des flavonoïdes (**Figure A.2**) et des tanins condensés (**Figure A.3**) et en mg équivalents de quercétine (mg EQ) par g de la matière sèche (MS) pour le dosage des flavonols (**Figure A.4**) (**voir Annexes 1**). Les teneurs en composés phénoliques sont résumées dans le **tableau 4**.

Tableau 4. Teneurs en composés phénoliques des extraits bruts et des fractions obtenues à partir des trois algues.

Extraits bruts et les fractions		Phénols totaux (mg EAG/g MS)	Flavonoïdes (mg EC/g MS)	Flavonols (mg QE/g MS)	Tanins condensés (mg EC/g MS)
<i>S. vulgare</i>	EB	0.662 ± 0.011	0.340 ± 0.005	0.640±0.041	2.636 ± 0.285
	FEP	0.182 ± 0.004	0.087 ± 0.002	0.287±0.005	0.800 ± 0.025
	FAE	0.280 ± 0.009	0.140 ± 0.001	0.248±0.012	2.164 ± 0.055
	FDCM	0.027 ± 0.000	0.021 ± 0.000	0.026±0.001	0.052 ± 0.000
	FBOH	0.029 ± 0.000	0.022 ± 0.000	0.074±0.001	0.060 ± 0.001
	FA	0.104 ± 0.003	0.021 ± 0.001	0.002±0.000	0.009 ± 0.000
<i>C. hirsutus</i>	EB	1.042±0.003	0.427±0.003	0.559±0.026	2.738±0.008
	FEP	0.157±0.002	0.094±0.001	0.205±0.004	0.814±0.003
	FAE	0.525±0.001	0.278±0.003	0.286±0.009	2.783±0.034
	FDCM	0.070±0.000	0.024±0.001	0.058±0.000	0.158±0.001
	FBOH	0.096±0.000	0.006±0.000	0.063±0.004	0.068±0.003
	FA	0.144±0.000	0.017±0.000	0.006±0.000	0.049±0.001
<i>R. verruculosa</i>	EB	1.101±0.007	0.399±0.003	0.273±0.010	1.520±0.005
	FEP	0.080±0.001	0.091±0.000	0.145±0.004	0.235±0.022
	FAE	0.144±0.002	0.125±0.001	0.171±0.006	0.285±0.005
	FDCM	0.008±0.002	0.005±0.001	0.005±0.000	0.027±0.007
	FBOH	0.072±0.001	0.016±0.000	0.034±0.001	0.052±0.036
	FA	0.686±0.005	0.020±0.000	0.011±0.000	0.041±0.001

EB: Extrait brut; FEP: fraction d'éther de pétrole; FAE: fraction d'acétate d'éthyle; FDCM: fraction dichlorométhane; FBOH: fraction butanolique; FA: fraction aqueuse.

La teneur la plus élevée en phénols totaux a été observée dans l'extrait brut de *R. verruculosa* à raison de 1.101 ± 0.007 mg EAG/g MS, suivi par les extraits bruts de *C. hirsutus* (1.042 ± 0.003 mg EAG/g MS) et de *S. vulgare* (0.662 ± 0.011 mg EAG/g MS). Les fractions acétates d'éthyle ont enregistré les plus grandes concentrations dans les deux algues brunes tandis que la fraction aqueuse possède la teneur la plus élevée (0.686 mg EAG /g MS) dans l'algue rouge. Le dosage des flavonoïdes a révélé des teneurs nettement faibles dans les trois algues testées. L'extrait brut de *C. hirsutus* détient la meilleure teneur à raison de 0.427 ± 0.003 mg EC/g MS par rapport aux autres extraits et fractions. De même pour les flavonols, les teneurs sont aussi faibles et ne dépassent pas 0.640 ± 0.041 mg QE/g MS. Quant aux tanins condensés, la quantification de cette famille a démontré que les deux algues brunes, *C. hirsutus* et *S. vulgare* sont riches en ces composés. Les teneurs les plus élevées sont enregistrées dans la fraction acétate d'éthyle et l'extrait brut de *C. hirsutus* avec des valeurs respectives de 2.783 ± 0.034 et 2.738 ± 0.008 mg EC/g MS. Les autres fractions ont présenté des concentrations en tanins légèrement élevées comparativement à celles des flavonoïdes et des flavonols.

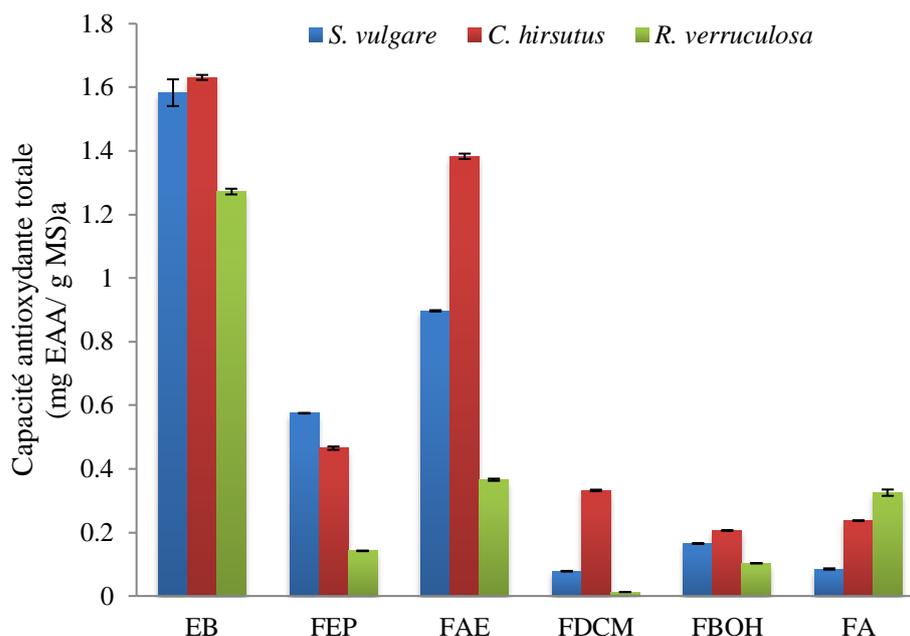
1.3 Evaluation des activités biologiques

1.3.1 Potentiel antioxydant

1.3.1.1 Capacité Antioxydante Totale (CAT)

La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalents d'acide ascorbique par gramme de matière sèche (mg EAA/g MS) à partir d'une courbe d'étalonnage établie en utilisant l'acide ascorbique comme référence (**Annexe**).

La figure 18 résume les capacités antioxydantes totales des extraits bruts et des fractions des trois espèces algales.



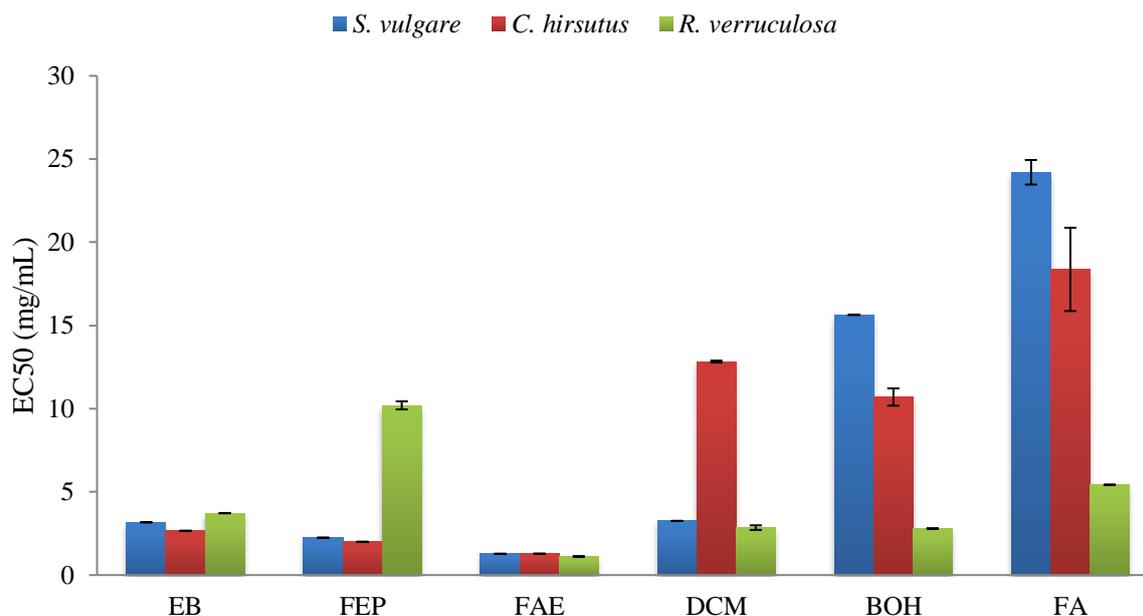
EB: Extrait brut; FEP: fraction d'éther de pétrole; FAE: fraction d'acétate d'éthyle; FDCM: fraction dichlorométhane; FBOH: fraction butanolique; FA: fraction aqueuse ; ^a mg équivalent d'acide ascorbique /g de la matière sèche

Figure 18: Capacité antioxydant totale des extraits bruts et des fractions des trois algues.

Les résultats obtenus indiquent que les extraits bruts et les fractions acétate d'éthyle détiennent les meilleures capacités antioxydantes totales. En effet, la valeur la plus élevée est enregistrée dans l'extrait brut de *C. hirsutus* (1.631 ± 0.008 mg EAA/g MS), suivi de l'extrait brut de *S. vulgare* (1.583 ± 0.042 mg EAA/g MS) et de *R. verruculosa* (1.272 ± 0.009 mg EAA/g MS). La fraction acétate de *C. hirsutus* possède une capacité antioxydante de l'ordre de 1.383 ± 0.008 mg EAA/g MS, plus forte que celle de *S. vulgare* (0.897 ± 0.002 mg EAA/g MS). Pour le reste, la gamme de cette capacité est limitée entre 0.0125 ± 0.000 et 0.3657 ± 0.003 mg EAA/g MS.

1.3.1.2 Réduction du fer

L'activité réductrice du fer est estimée par la concentration efficace (EC_{50}) qui correspond à une absorbance égale à 0,5. Les valeurs sont obtenues à partir de la courbe de régression linéaire entre la concentration de l'extrait et la densité optique (DO) correspondante. Les résultats de ce test des trois algues sont consignés dans **la figure 19**.



EB: Extrait brut; FEP: fraction d'éther de pétrole; FAE: fraction d'acétate d'éthyle; FDCM: fraction dichlorométhane; FBOH: fraction butanolique; FA: fraction aqueuse.

Figure 19. Pouvoir réducteur exprimé par les valeurs de EC_{50} des extraits bruts et des fractions des trois algues.

La fraction acétate d'éthyle de *R. verruculosa* a montré la plus forte capacité à réduire Fe^{+3} ($EC_{50} = 1,114$ mg/mL) suivie des fractions acétate d'éthyle de *C. hirsutus* et de *S. vulgare* qui ont approximativement la même valeur. L'activité la plus faible a été observée dans la fraction d'éther de pétrole de *R. verruculosa* et dans les fractions aqueuses des deux algues brunes. Cette activité est nettement inférieure à celle de l'acide ascorbique ($EC_{50} = 0.063 \pm 0.002$ mg/mL).

1.3.1.3 Piégeage du radical DPPH'

Les variations des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits bruts et des fractions de *S. vulgare*, de *C. hirsutus* et de *R. verruculosa* sont illustrées dans la **Figure 20**.

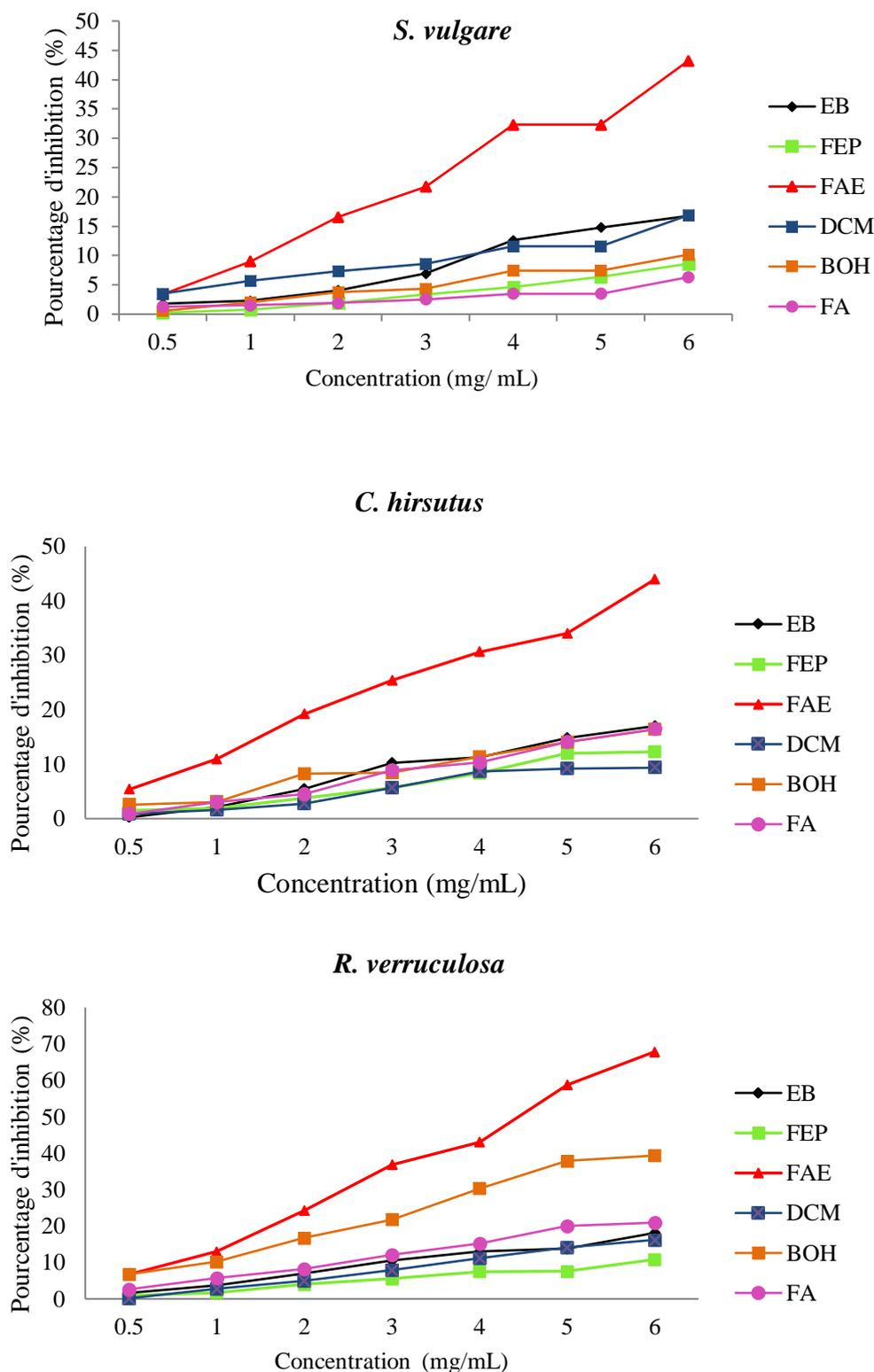


Figure 20: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits bruts et des fractions de *S. vulgare*, *R. verruculosa* et *C. hirsutus*.

EB: Extrait brut; FEP: fraction d'éther de pétrole; FAE: fraction d'acétate d'éthyle; FDCM: fraction dichlorométhane; FBOH: fraction butanolique; FA: fraction aqueuse.

L'examen des courbes de régressions montre que le pourcentage d'inhibition est fortement dépendant des concentrations en extrait. Plus précisément l'augmentation en concentration de l'échantillon provoque l'élévation de pourcentage d'inhibition du radical libre et par conséquent l'augmentation de l'activité antiradicalaire.

La figure 20 a révélé l'existence d'une activité modérée avec de faibles taux d'inhibition du radical DPPH'. Cette activité est plus importante chez la fraction acétate d'éthyle de l'algue rouge *R. verruculosa* ($67.877 \pm 0.454\%$) à la concentration 6 mg/mL, par rapport aux algues brunes *S. vulgare* et *C. hirsutus* qui ont enregistré des pourcentages d'inhibition comparables et égalent à 43%. Cette activité est nettement inférieures à celle de l'acide ascorbique, pour ce dernier la réduction est presque totale (90,42%) à partir d'une concentration de 0,27 mg/mL.

1.3.1.4 Relation entre les teneurs en composés phénoliques et les activités antioxydantes

Dans cette partie nous avons cherché à établir une relation entre la présence des composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits et des fractions des trois algues. L'étude de cette relation a été réalisée par la mesure du coefficient de corrélation linéaire de Bravais-Pearson (r). Ce dernier varie entre -1 et +1. Plus la valeur absolue du coefficient est importante, plus la relation linéaire entre les variables est forte. Les résultats de cette analyse sont présentés dans le **tableau 5**.

Tableau 5. Coefficients de corrélation linéaire (r) entre les teneurs en composés phénoliques et les activités antioxydantes.

	<i>S. vulgare</i> et <i>C. hirsutus</i>						<i>R. verruculosa</i>					
	TPT	TFT	TF	CAT	FRAP		TPT	TFT	TF	TTC	CAT	FRAP
TPT	1	0,977	0,883	0,874	0,933	-0,469	1	0,753	0,519	0,788	0,898	-0,011
TFT		1	0,929	0,936	0,976	-0,574		1	0,922	0,990	0,958	-0,055
TF			1	0,875	0,931	-0,638			1	0,866	0,808	-0,042
TTC				1	0,975	-0,674				1	0,965	-0,062
CAT					1	-0,620					1	-0,133
FRAP						1						1

TPT: Teneur en polyphénols totaux ; TFT: teneurs en flavonoïdes totaux; TF: Teneurs en flavonols; TTC: Teneurs en tanins condensés; CAT: Capacité Antioxydante Totale; FRAP: Réduction de fer.

Les coefficients de Pearson (r) ont révélé l'existence d'une très bonne corrélation linéaire et positive entre les composés phénoliques présents (phénols totaux, flavonoïdes, flavonols et tanins condensés) et la capacité antioxydante totale (CAT) qu'ils manifestent ($0,9766 \geq r \geq 0,8081$). Cependant, la régression linéaire établit entre la teneur en composés phénoliques et la méthode de réduction de fer (FRAP) donne des corrélations négatives modérées ($-0,4691 \geq r \geq -0,6740$) pour les deux algues brunes *S. vulgare* et *C. hirsutus*; cette relation est extrêmement faible ($-0,0110 \geq r \geq -0,1336$) chez l'algue rouge *R. verruculosa*.

1.3.2 Evaluation de l'activité antimicrobienne

1.3.2.1 Méthode de diffusion des disques sur milieu solide

Le screening de l'activité antimicrobienne des extraits bruts et des fractions obtenus à partir des trois algues a été réalisé par la méthode de diffusion sur disque. Les résultats obtenus sont mentionnés dans **les tableaux (6, 7, 8)** et **les figures** ci-dessous.

Les souches *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, ainsi que la levure *Candida albicans* n'ont montré aucune activité. A l'inverse des deux souches *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* qui ont révélé une certaine sensibilité.

Du fait que les extraits algaux ont été récupérés par le DMSO, ce dernier était testé vis-à-vis des souches microbiennes mises en expérimentation afin de vérifier son pouvoir antimicrobien et les résultats étaient négatifs, ce qui prouve qu'il n'a aucun effet inhibiteur. La sensibilité des souches aux antibiotiques de référence, l'ampicilline et la nystatine a été aussi testée.

D'après les résultats, nous avons constaté une variation de la zone d'inhibition en fonction de la variation de la concentration pour la plupart des extraits et fractions testés. Parmi les extraits des trois algues, la fraction acétate d'éthyle de *C. hirsutus* a présenté l'activité la plus importante envers *Staphylococcus aureus*. Les diamètres des zones d'inhibition sont de l'ordre de 12, 13 et 14.5mm aux concentrations 0.5, 1 et 2 mg/disque, respectivement. Pour le reste, les zones d'inhibition sont faibles, la valeur la plus élevée est enregistrée dans l'extrait brut de *C. hirsutus* et dans la fraction acétate d'éthyle de *R. verruculosa* à la concentration de 2 mg/disque (10,5mm).

De même pour *B. cereus*, la fraction acétate d'éthyle de *C. hirsutus* marque la zone d'inhibition la plus intéressante 10.75 ± 0.3 mm à 1 et à 2 mg/disque suivi de la fraction acétate de *S. vulgare* avec une zone d'inhibition égale à 9 ± 1.4 mm, à la concentration 2mg/disque. Des valeurs plus inférieures ont été enregistrées dans le reste des extraits bruts et fractions des trois algues. En revanche, aucune activité antibactérienne n'a été signalée pour la fraction butanolique et aqueuse vis-à-vis de toutes les souches.

Tableau 6 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des extraits bruts et des différentes fractions de *S. vulgare*.

	Extraits bruts et fractions (mg/disque)	Diamètre des zones d'inhibition (mm) ^a						
		Bactéries à Gram +			Levure	Bactéries à Gram -		
		<i>B. cereus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
EB	0,5	6	6	7.5±0.4	6	6	6	6
	1	6	6	8.75±0.9	6	6	6	6
	2	6	6	9.25±0.5	6	6	6	6
FEP	0,5	6	6	7.25±0.3	6	6	6	6
	1	6	6	7.25±0.3	6	6	6	6
	2	6	6	7.75±0.3	6	6	6	6
FAE	0,5	7±0.0	6	8.37±0.7	6	6	6	6
	1	7.16±0.2	6	9.62±0.4	6	6	6	6
	2	9±1.4	6	10.37±0.7	6	6	6	6
FDCM	0,5	7±0.0	6	7±0.0	6	6	6	6
	1	7.16±0.2	6	7±0.0	6	6	6	6
	2	7.33±0.5	6	7.83±0.2	6	6	6	6
FBOH	0,5	6	6	6	6	6	6	6
	1	6	6	6	6	6	6	6
	2	6	6	6	6	6	6	6
FA	0,5	6	6	6	6	6	6	6
	1	6	6	6	6	6	6	6
	2	6	6	6	6	6	6	6
DMSO (10µL/disque)		6	6	6	6	6	6	6
AMP (10µg/disque)		6	6	18	Nt	6	Nt	6
Ny (30µg/disque)		Nt	Nt	Nt	16	Nt	Nt	Nt

EB: Extrait brut; FEP: fraction d'éther de pétrole; FAE: fraction d'acétate d'éthyle; FDCM: fraction dichlorométhane; FBOH: fraction butanolique; FA: fraction aqueuse; AMP: Ampicilline; Ny: Nystatine; DMSO : Diméthyle sulfoxyde (contrôle négatif); Nt: Non testé

^a zones d'inhibition exprimées en mm

Tableau 7 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des extraits bruts et des différentes fractions de *C. hirsutus*.

Extraits bruts et fractions (mg/disque)	Diamètre des zones d'inhibition (mm) ^a						
	Bactéries à Gram +			Levure	Bactéries à Gram -		
	<i>B. cereus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
EB	0,5	7.5±0.3	6	10±0.0	6	6	6
	1	8.0±0.0	6	10.5±0.7	6	6	6
	2	8.5±0.7	6	10.5±0.7	6	6	6
FEP	0,5	7.25±0.3	6	7±0.0	6	6	6
	1	7.5±0.0	6	7±0.0	6	6	6
	2	7.5±0.0	6	7.5±0.7	6	6	6
FAE	0,5	9.75±0.3	6	12±0.7	6	6	6
	1	10.75±0.3	6	13±0.0	6	6	6
	2	10.75±0.3	6	14.5±0.7	6	6	6
FDCM	0,5	7±0.0	6	9±0.7	6	6	6
	1	7±0.7	6	9.5±0.7	6	6	6
	2	7±0.7	6	9.5±0.7	6	6	6
FBOH	0,5	6	6	6	6	6	6
	1	6	6	6	6	6	6
	2	6	6	6	6	6	6
FA	0,5	6	6	6	6	6	6
	1	6	6	6	6	6	6
	2	6	6	6	6	6	6
DMSO (10µL/disque)		6	6	6	6	6	6
AMP (10µg/disque)		6	6	18	Nt	6	Nt
Ny (30µg/disque)		Nt	Nt	Nt	16	Nt	Nt

EB: Extrait brut; FEP: fraction d'éther de pétrole; FAE: fraction d'acétate d'éthyle; FDCM: fraction dichlorométhane; FBOH: fraction butanolique; FA: fraction aqueuse; AMP: Ampicilline; Ny: Nystatine; DMSO : Diméthyle sulfoxyde (contrôle négatif); Nt: Non testé

^a zones d'inhibition exprimées en mm

Tableau 8. Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des extraits bruts et des différentes fractions de *R. verruculosa*.

Extraits bruts et fractions (mg/disque)	Diamètre des zones d'inhibition (mm) ^a						
	Bactéries à Gram +			Levure	Bactéries à Gram -		
	<i>B. cereus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
EB	0,5	6	6	7±0.0	6	6	6
	1	6	6	7±0.0	6	6	6
	2	6	6	8±0.0	6	6	6
FEP	0,5	6	6	6	6	6	6
	1	6	6	6	6	6	6
	2	6	6	6	6	6	6
FAE	0,5	7±0.0	6	8.5±0.7	6	6	6
	1	7±0.0	6	9.5±0.7	6	6	6
	2	8±0.0	6	10.5±0.7	6	6	6
FDCM	0,5	7±0.0	6	7.75±0.7	6	6	6
	1	7±0.0	6	8.5±0.7	6	6	6
	2	7±0.0	6	9.25±0.3	6	6	6
FBOH	0,5	6	6	6	6	6	6
	1	6	6	6	6	6	6
	2	6	6	6	6	6	6
FA	0,5	6	6	6	6	6	6
	1	6	6	6	6	6	6
	2	6	6	6	6	6	6
DMSO (10µL/disque)	6	6	6	6	6	6	6
AMP (10µg/disque)	6	6	18	Nt	6	Nt	6
Ny (30µg/disque)	Nt	Nt	Nt	16	Nt	Nt	Nt

EB: Extrait brut; FEP: fraction d'éther de pétrole; FAE: fraction d'acétate d'éthyle; FDCM: fraction dichlorométhane; FBOH: fraction butanolique; FA: fraction aqueuse; AMP: Ampicilline; Ny: Nystatine; DMSO : Diméthyle sulfoxyde (contrôle négatif); Nt: Non testé

^a zones d'inhibition exprimées en mm

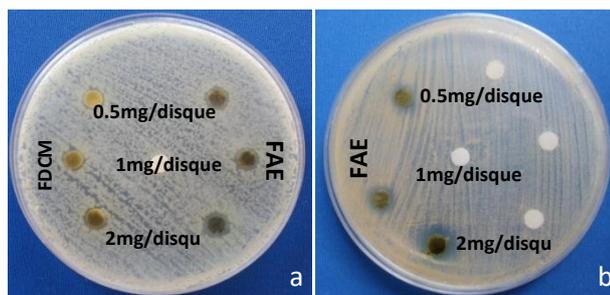


Figure 21. Effet antimicrobien des FAE et FDCM de *S. vulgare* à différentes concentrations. a: *Bacillus cereus* ; b: *Staphylococcus aureus* ATCC6538 ; FAE: fraction d'acétate d'éthyle; FDCM: fraction dichlorométhane.

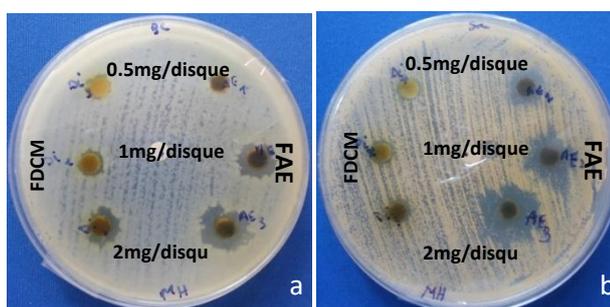


Figure 22. Effet antimicrobien des FAE et FDCM de *C. hirsutus* à différentes concentrations. a: *Bacillus cereus* ; b: *Staphylococcus aureus* ATCC6538 ; FAE: fraction d'acétate d'éthyle; FDCM: fraction dichlorométhane.

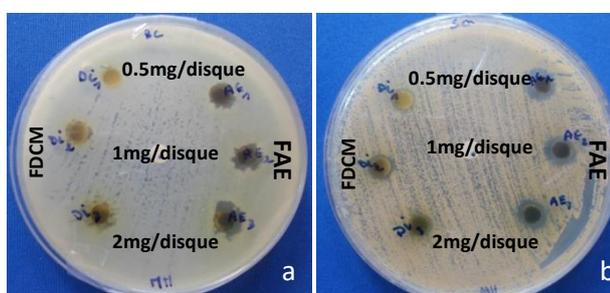


Figure 23. Effet antimicrobien des FAE et FDCM de *R. verruculosa* à différentes concentrations. a: *Bacillus cereus* ; b: *Staphylococcus aureus* ATCC6538 ; FAE: fraction d'acétate d'éthyle; FDCM: fraction dichlorométhane.

1.3.2.2 Méthode de micro-dilution en milieu liquide

Les fractions acétate d'éthyle qui se sont montrées les plus actives vis-à-vis des deux souches bactériennes *B. cereus* et *S. aureus* (les plus sensibles) ont été évaluées afin de déterminer leur concentration minimale inhibitrice (CMI) et leur Concentration minimale bactéricide (CMB). Les résultats obtenus figurent dans le **Tableau 9**.

Tableau 9. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales bactéricides (CMB) des fractions d'acétate d'éthyle vis-à-vis des souches *B. cereus* et *S. aureus*.

Espèces algales	<i>B. cereus</i> ATCC 10876		<i>S. aureus</i> ATCC 6538	
	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)
<i>S. vulgare</i>	3.75	>15	1.875	>15
FAE <i>C. hirsutus</i>	1.875	>15	0.937	>15
<i>R. verruculosa</i>	7.5	>15	3.75	>15

FAE: fraction acétate d'éthyle; CMI: Concentration minimale inhibitrice; CMB: concentration minimale bactéricide

Les valeurs de la CMI sont en accord avec les résultats obtenus dans le test préliminaire par la méthode de diffusion des disques, autrement dit, plus le diamètre autour du disque est important plus la CMI est plus petite. C'est le cas pour *S. aureus* qui est plus sensible à la fraction acétate d'éthyle de *C. hirsutus* avec une valeur de CMI égale à 0.937 mg/mL, et une CMI de 1.875 mg/mL contre *B. cereus*. La fraction acétate de *S. vulgare* a montré une activité maximale (1.875 mg/mL) contre *S. aureus*. Tandis que la concentration inhibitrice enregistrée chez la fraction acétate de *R. verruculosa* est moins intéressante, elle est de l'ordre de 3.75 mg/mL contre *S. aureus* et de 7 mg/mL contre *B. cereus*.

Les concentrations minimales bactéricides (CMB) sont supérieures à 15 mg/mL pour les trois fractions testées.

1.3.3 Evaluation de l'activité antiparasitaire

Les fractions d'acétate d'éthyle obtenues après fractionnement des extraits bruts ont été étudiées pour leur activité antiparasitaire par des tests *in vitro* sur *Plasmodium falciparum* et sur *Trypanosoma brucei brucei*. Les résultats des activités antiplasmodiale (en % d'inhibition) et antitrypanosomale (en % d'inhibition et en IC₅₀) des fractions acétate d'éthyle des trois algues sont consignés dans les **tableaux 10, 11** respectivement.

Tableau 10. Activité antiplasmodiale des fractions acétate d'éthyle des trois algues.

Parasite	FAE	Pourcentage d'inhibition (%)	
		50 µg/mL	10 µg/mL
<i>P. falciparum</i>	<i>S. vulgare</i>	95,5±2,5	11,7±19,2
	<i>C. hirsutus</i>	89,7±3,3	5,6±17,7
	<i>R. verrucolosa</i>	91,2±4,7	5,6±10,1
	DMSO	20,2±11,3	19±10,5

FAE: Fraction acétate d'éthyle; DMSO: Diméthylesulfoxyde; ±: écart type (entre trois expérimentations différentes).

L'analyse de ce tableau montre une faible activité antiplasmodiale des trois fractions d'acétate d'éthyle testées avec 95,5%, 89,7% et 91,2% d'inhibition de la croissance du parasite à la concentration de 50 µg/mL pour *S. vulgare*, *C. hirsutus* et *R. verrucolosa*, respectivement, mais aucune activité antiplasmodiale n'a été observée à 10 µg/mL. La chloroquine utilisée comme antipaludique a montré une valeur d'IC₅₀ de 0,1 µM.

Tableau 11 : Activité antitrypanosomale des fractions acétate d'éthyle des trois algues.

Parasite	FAE	Pourcentage d'inhibition (%)			IC ₅₀ µg/mL
		50 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL	
<i>T. brucei brucei</i>	<i>S. vulgare</i>	97,8±0,4	99,1±2	6,6±21,3	9,3±4,9
	<i>C. hirsutus</i>	100,9±1,5	95,9±3,2	6,1±15,2	27,2±5
	<i>R. verrucolosa</i>	98,7±1,8	100,2±0,9	28,6±2,3	11±1,1
	DMSO	12,4±19,8	-5,3±0,9	-4,5±11,1	-
	Pentamidine (nM)	-	-	-	5,4±0,4

FAE: Fraction acétate d'éthyle; IC₅₀: concentration d'inhibition à 50 %; ±: écart type (entre trois expérimentations différentes).

Le **tableau 11** indique que *S. vulgare* et *R. verruculosa* présentent l'activité la plus élevée contre *T. brucei brucei* avec des valeurs de IC₅₀ de $9,3 \pm 4,9$ et de $11,0 \pm 1,1$ µg/mL, respectivement. Cependant, *C. hirsutus* a montré une faible activité antitrypanosomale avec une valeur IC₅₀ de $27,2 \pm 5,0$ µg/mL. Le contrôle positif pentamidine a montré une valeur d'IC₅₀ de $5,4 \pm 0,4$ nM.

1.3.4 Activité anti-inflammatoire *in vivo*

1.3.4.1 Toxicité aigue

L'administration orale de l'extrait brut de *C. hirsutus* aux doses de 150 mg/kg et 300 mg/kg de P.C aux souris n'a induit aucun signe de toxicité aigue au cours des 24 heures d'observation (de comportement des animaux, mort, coma...) (**Tableau 12**).

Tableau 12. Test de toxicité aux doses de 150 mg/Kg et 300 mg/ Kg de P.C de l'extrait brut de l'algue brune *C. hirsutus* au cours des 24 heures.

Doses	Augmentation de l'activité	Salivation	Convulsion	Mort
Lot EB à 150 mg/Kg de P.C	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
Lot EB à 300 mg/Kg de P.C	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif

1.3.4.2 Œdème de la patte induit par la carragénine

Afin d'évaluer l'effet de l'extrait brut de l'algue brune *C. hirsutus* sur l'inflammation aigue, le modèle de l'œdème de la patte de souris induit par la carragénine à 0,5% a été utilisé. Notre extrait a été testé à deux dose : 150 mg/kg et 300 mg/kg de P.C, les résultats obtenus ont été comparé à ceux de diclofénac sodique un anti-inflammatoires non stéroïdiens utilisé comme molécule de référence testé à 50 mg/kg, et à ceux du contrôle physiologique.

1.3.4.2.1 Pourcentage d'augmentation du volume de la patte chez les souris (%AUG)

L'injection de 0,1 mL de carragénine a entraîné une augmentation progressive de l'œdème de la patte des souris du groupe contrôle (traitées avec l'eau physiologique).

L'administration de l'anti-inflammatoire, le diclofénac à 50 mg/kg prévient l'œdème de la patte induite par la carragénine. L'augmentation du pourcentage de l'œdème inflammatoire est de 50,90 et 54,35 %, à la quatrième et à la cinquième heure, respectivement. Après la cinquième heure, le volume de l'œdème du groupe standard a augmenté graduellement. Les groupes prétraités avec l'extrait brut de *C. hirsutus* à 300 mg/kg ont montré une meilleure prévention de l'œdème de la patte induite par la carragénine comparée à la dose de 150 mg/kg. Les pourcentages d'augmentation de l'œdème inflammatoire de la patte sont respectivement, 62,89 et 41,77 % à la sixième heure (**Figure 24**).

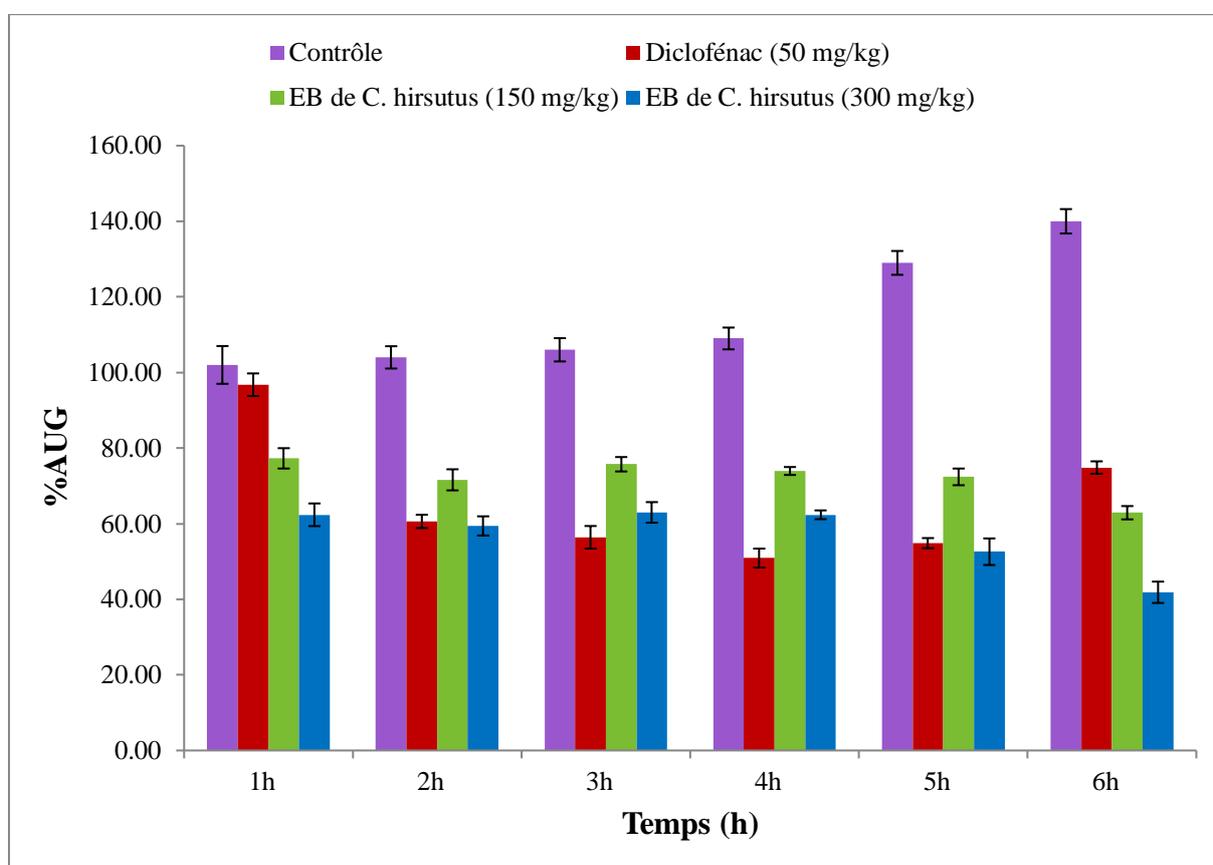


Figure 24 : Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte (%AUG) des souris pendant 6h.

Pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte (% INH)

Le pourcentage d'inhibition (% INH) de l'œdème de la patte des souris à différents intervalles de temps est indiqué sur **la figure 25**. L'œdème a été réduit par l'extrait brut de *C. hirsutus* d'une manière dose-dépendante jusqu'à la fin de l'expérimentation. Des pourcentages d'inhibition (% INH) maximum de 58,86 et de 71,01 % ont été obtenu pour la dose 150 mg/kg et 300 mg/kg de P.C, respectivement. Alors que le diclofénac sodique (50 mg/kg) prévient l'œdème de la patte induit par la carragénine avec un pourcentage d'inhibition maximal de 67,49% à la quatrième heure, et qui diminue jusqu'à atteindre 54,48% à la sixième heure.

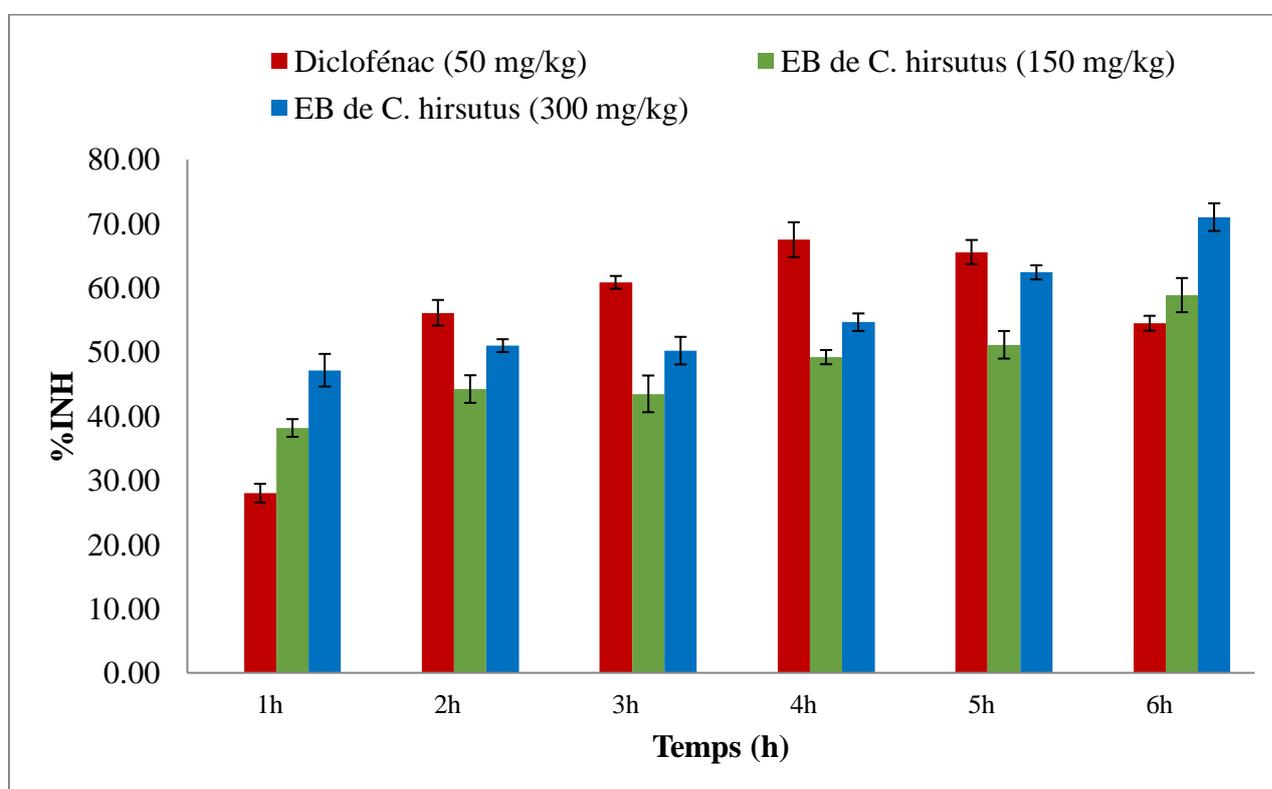


Figure 25 : Pourcentage d'inhibition (% INH) de l'œdème de la patte des souris pendant 6h.

Ces résultats ont été confirmés par une évaluation histologique des tissus de la patte des souris contrôles, standards et traitées avec l'extrait et cela 6 heures après l'injection de la carragénine.

1.3.4.3 Etude histologique

La lecture microscopique de la coupe transversale du tissu de la patte des souris du groupe contrôle (NaCl 0,9%) a montré un infiltrat inflammatoire intense pseudo folliculaire polymorphe associé à l'œdème avec prédominance de polynucléaires neutrophiles (**Figure 26, A**). Le groupe standard traité par le diclofénac sodique à 50 mg/Kg a affiché un nombre modéré d'infiltration de cellules inflammatoires que le contrôle, la persistance de l'œdème a été remarquée (**Figure 26, B**). Alors que moins d'œdème et seulement quelques infiltrations de cellules inflammatoires ont été observés dans les groupes prétraités avec l'extrait d'algue à la dose de 150 mg/kg de P.C (**Figure 26, C**). Les tissus de la patte des souris traitée par la dose de 300 mg/kg ont montré une diminution plus importante de l'infiltrat inflammatoire et une absence presque totale de l'œdème inflammatoire (**Figure 26, D**).

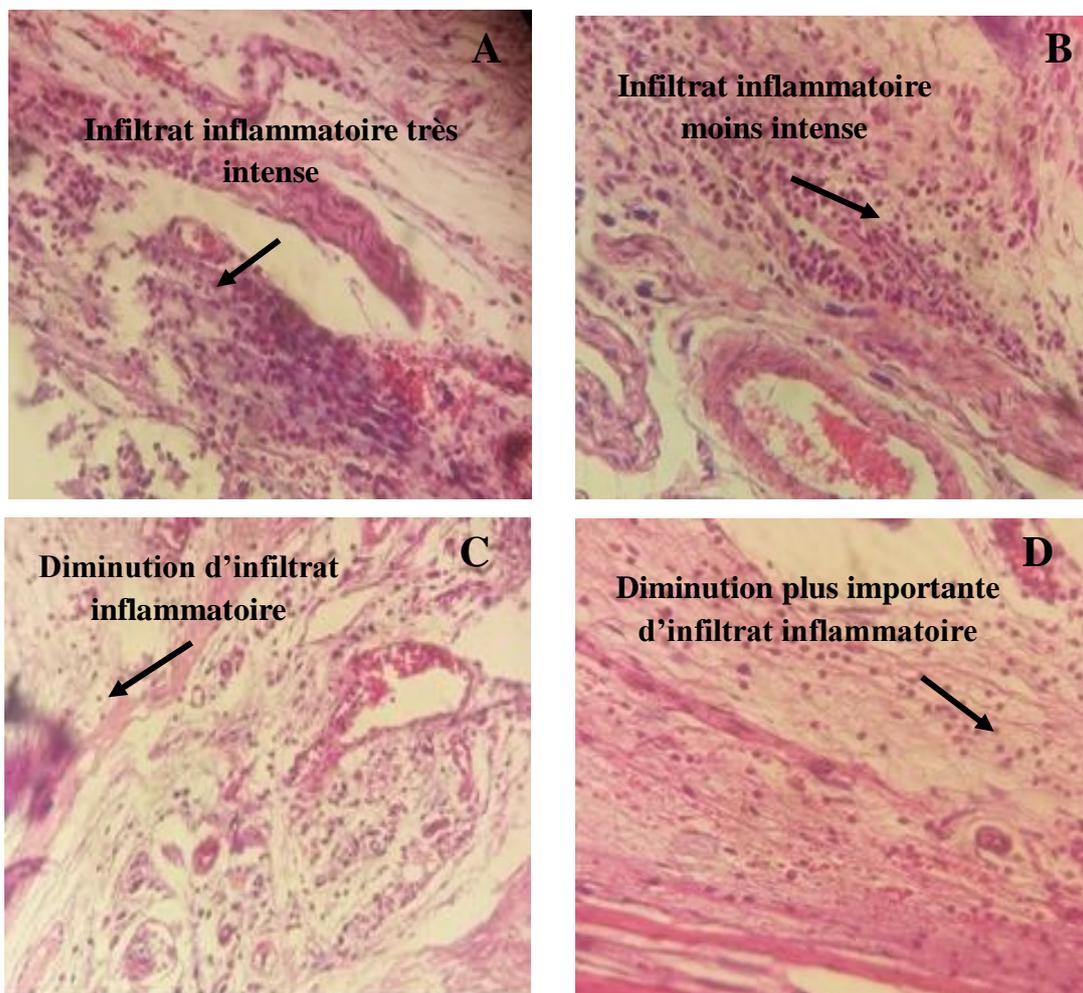


Figure 26. Coupe histologiques des tissus enflammés de la patte des souris. Coloration Hématoxyline Eosine Grossissement X 200. **A:** Groupe contrôle (NaCl 0,9%) ; **B:** Groupe standard (diclofénac 50 mg/kg) ; **C:** Groupe EB 150 mg/Kg de P.C, **D:** Groupe EB 300 mg/Kg de P.C.

Discussion

2 Discussion

Les connaissances actuelles sur les deux espèces algales *Cladostephus hirsutus* et *Rissoella verruculosa* sont très limitées. En effet, aucune publication scientifique sur la teneur en composés phénoliques et le potentiel antioxydant de ces deux espèces, n'a été constatée. Cette étude, constitue une première au niveau de la quantification des composés phénoliques et de l'activité antioxydante de ces deux algues. Nous allons donc comparer nos résultats avec d'autres espèces d'algues brunes et rouges. Pour le cas de *Sargassum vulgare*, plusieurs travaux sur la composition phytochimique et l'activité antioxydante ont été signalés dans la littérature (**Khaled et al., 2012** ; **Shreadah et al., 2018** ; **Arguelles et al., 2019** ; **Karkhane et al., 2020** ; **Kumar et al., 2020**).

Des variations considérables du rendement d'extraction ont été observées chez les différents extraits et espèces d'algues étudiées. Le taux d'extraction le plus élevé est celui de l'extrait brut de *S. vulgare* (3.101%) suivi de *C. hirsutus* (2,483%), puis *R. verruculosa* avec un rendement de 1.953%. Concernant les fractions, les rendements les plus élevés ont été obtenus par les fractions éther de pétrole de *S. vulgare* et de *R. verruculosa* et le résidu aqueux de *C. hirsutus*. Ces résultats indiquent un rendement relativement intéressant pour l'extraction réalisée par l'éther de pétrole, ce qui peut être expliqué par l'extraction des composés apolaires bioactives tel que les acides gras, stérols, caroténoïdes, terpénoïdes..., suivi par la fraction aqueuse qui représente les substances les plus polaires (polysaccharides, protéines,...) (**Duan et al., 2006**). Comparé à notre étude, des rendements plus élevés ont été mesurés dans les extraits bruts d'algues brunes obtenus par la même technique d'extraction. *Sargassum vulgare* (10,1%), *Padina pavonica* (11,9%) (**Khaled et al., 2012**), *Sargassum marginatum* (5,45%), *Padina tetrastomatica* (12,31%) et *Turbinaria conoides* (5,76%) (**Chandini et al., 2008**). Le rendement de l'extrait brut de *R. verruculosa* (1.953%) était comparable à celui de l'algue rouge *Euchema kappaphycus* (2,85%) (**Ganesan et al., 2008**). **Kilic et al. (2021)** ont rapporté un rendement de 13.82% de l'extrait hydroalcoolique de *Cladostephus hirsutus* obtenu par macération, ce qui est nettement supérieur à nos résultats pour la même espèce. **Duan et al., (2006)** ont observé que le rendement d'extraction du résidu aqueux de *Polysiphonia urceolata* est plus élevé par rapport aux autres fractions, tandis que **Khaled et al. (2012)** ont révélé un rendement plus important de la fraction éther de pétrole de *S. vulgare* et de la fraction acétate d'éthyle de *Padina pavonica*. Ces différences considérables dans les

rendements des extraits bruts et des fractions de diverses algues peuvent être dues à des différences spécifiques d'espèces et à la différence des conditions d'extraction, telles que le pH, la polarisation des solvants, ainsi que le temps et la température d'extraction (**Cho et al., 2011; López et al., 2011**).

Des composés phénoliques variés, notamment des acides phénols, des flavonoïdes et des tanins, sont couramment observés dans les algues rouges, brunes et vertes (**Duan et al., 2006, Kuda et al., 2007**). Dans notre étude, il existe une grande variation dans le contenu phénolique total dans les extraits bruts et les fractions d'algues analysés. La teneur en phénols totaux obtenue s'échelonne entre 0.008 et 1.101 mg EAG/g MS. Les fortes teneurs sont observées dans l'extrait brut de *R. verruculosa* suivi de l'extrait brut de *C. hirsutus* et de *S. vulgare*. Le résidu aqueux de l'algue rouge et les fractions acétate d'éthyle des deux algues brunes ont donné les meilleures teneurs par rapport aux autres fractions. Les fractions acétate d'éthyle des trois algues étudiées ont exhibées une teneur très importante en termes de composés phénoliques comparativement aux autres fractions. Cela est peut être expliqué par la fait que les composés phénoliques naturels possèdent une préférence de solubilité aux solvants ayant une polarité intermédiaire tels que l'acétate d'éthyle, plus que les solvants de forte polarité (tel que l'eau) ou des solvants de faible polarité (éther de pétrole) (**Galanakis et al., 2013**). **Shreadah et al., (2018)** ont enregistré des teneurs en composés phénoliques des extraits méthanoliques de *Sargassum vulgare* (10.13±0.166 mg GAE/g) nettement supérieures à celles que nous avons obtenues pour la même espèce. **Chandini et al. (2008)** ont rapporté des teneurs plus basses de 0,29 EAG/g MS et de 0,86 EAG/g MS dans les fractions aqueuses d'algues brunes *S. marginatum* et *Turbinaria conoides*, respectivement. Des teneurs phénoliques plus élevées de 71,6 mg EAG/g MS dans l'extrait brut et de 73,07 mg EAG/g MS dans la fraction acétate d'éthyle de l'algue rouge chinoise *Polysiphonia urceolata* ont été obtenues par **Duan et al. (2006)**.

L'extrait brut de *C. hirsutus* a enregistré la teneur la plus élevée en flavonoïdes (0,427 EC/g MS), suivi de l'extrait brut de *R. verruculosa* et *S. vulgare*. Les fractions acétate d'éthyle des trois algues renferment les plus importantes teneurs en flavonoïdes par rapport aux autres fractions, avec une valeur maximale de 0,278 mg EC/g MS. Les niveaux des flavonoïdes détectés dans notre étude étaient inférieurs à ceux rapportés précédemment pour d'autres espèces d'algues brunes et rouges (**Cox et al., 2010**). **Kokilam et al. (2013)** ont rapporté une teneur allant de 31.60 à 66.3 mg EC/g MS dans les extraits méthanoliques de quelques algues brunes dont une espèce appartenant au genre *Sargassum*. D'autres études ont

montré que la teneur totale en flavonoïdes de l'extrait méthanolique était de l'ordre de 2,02 mg EAG/g chez *Sargassum wightii* (Meenakshi *et al.*, 2009). Les flavonols et les flavonols glycosides, ont été identifiés dans plusieurs extraits d'algues rouges et brunes (Yoshie-Stark, 2003 ; Zolotareva *et al.*, 2019 ; Aminina *et al.*, 2020). Dans cette présente étude, les taux des flavonols se situaient entre 0.002 et 0.640 mg EQ/g MS, l'extrait brut de *S. vulgare* détient la teneur la plus importante.

Concernant les tanins condensés, les extraits bruts et les fractions acétate d'éthyle de *S. vulgare* et *C. hirsutus* ont enregistrées les teneurs les plus importantes. On a constaté que l'algue rouge *R. verruculosa* contient moins de tanins condensés totaux (1.520 mg EC/g MS) que *S. vulgare* (2.636 mg EC/g MS) et *C. hirsutus* (2,783 mg EC/g MS) les deux espèces brunes. Ces résultats sont cohérents avec des travaux menés par Cox *et al.* (2010) sur d'autres macroalgues brunes *Laminaria digitata*, *Laminaria saccharina* et *Himanthalia allongées* et rouges, comme *Palmaria palmate* et *Chondrus crispus*. Les algues rouges ont été décrites comme contenant des teneurs plus faibles de composés phénoliques que les algues brunes qui sont considérées comme étant la source la plus riche en ces composés (Heffernan *et al.*, 2015 ; Jimenez-Lopez *et al.*, 2021). Il existe une variété de composés phénoliques appelés phlorotannins qui n'ont été décrits que dans la composition des algues brunes (Li *et al.*, 2011 ; Steevensz *et al.*, 2012).

La grande variabilité observée dans le contenu phénolique des algues pourrait provenir de facteurs environnementaux externes tels que la lumière, la profondeur, la salinité, les nutriments, la saisonnalité ainsi que des facteurs intrinsèques tels que l'âge, la longueur, le type de tissus. Tous ces facteurs pourraient agir sur la régulation spatio-temporelle de l'expression métabolique phénolique induisant des variations qualitatives et quantitatives marquées chez les individus à très petite échelle, ainsi que des variations intra-individuelles (Connan *et al.*, 2004, Fairhead *et al.*, 2006 ; Graiff *et al.*, 2015; Paiva *et al.*, 2018).

L'analyse de l'ensemble des résultats révèle que les extraits bruts et les fractions des trois algues étudiées sont dotés d'une activité antioxydante, qui varie d'une algue à une autre et, pour une même espèce, d'un extrait à un autre.

Pour la capacité antioxydante totale (CAT), les extraits bruts des trois algues brunes présentent une activité plus élevée que celle des fractions. L'extrait brut de *C. hirsutus* détient la meilleure activité à raison de 1.631 mg EAA/g MS suivi de la fraction acétate d'éthyle. Kokilam *et al.* (2013) ont signalé une capacité antioxydante totale de 20.0 à 34,66 mg d'AAE/g d'extrait) dans l'extrait méthanolique de quatre algues brunes d'Inde dont l'espèce *Sargassum wightii*. Chandini *et al.* (2008) ont observé une activité antioxydante relativement

faible de 0,31, 0,50 et 1,31 mg EAA/g d'extrait) dans les extraits bruts de *Padina tetrastomatica*, *Sargassum marginatum* et de *Turbinaria conoides*, respectivement.

Le pouvoir réducteur d'un extrait peut servir d'indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle. Parmi les extraits bruts et les différentes fractions testés, l'acétate d'éthyle a montré l'activité la plus puissante et a indiqué que les composés avec le pouvoir réducteur le plus important sont de polarité moyenne. L'activité réductrice de fer de cette fraction a été supérieure à celle des autres fractions et de l'extrait brut lui-même et chez les trois algues. Cela est probablement dû aux interactions entre les composés présents dans l'extrait brut qui peuvent exercer un effet antagoniste entre eux (**Khaled et al., 2012**). La fraction acétate d'éthyle de l'algue rouge *R. verruculosa* détient la capacité réductrice la plus importante avec une EC₅₀ de 1,114 mg/mL suivi des fractions acétate des deux algues brunes. **Zhang et al. (2007)** ont signalé une réduction de l'ordre de 0,07 à 11,60 mg EAA/g d'extrait chez 28 espèces d'algues brunes, rouges et vertes, et ils ont constaté que la fraction acétate d'éthyle est plus réductrice par rapport à l'extrait brut et aux fractions d'éther de pétrole, butanolique et au résidu aqueux.

Le DPPH a été largement utilisé comme radical libre pour évaluer les substances réductrices et est un réactif utile pour étudier les activités de piégeage des radicaux libres des composés (**Duan et al., 2006**). D'après nos résultats, L'activité de piégeage des radicaux DPPH était dépendante de la concentration et augmentait avec les concentrations. Les valeurs mesurées de l'activité d'inhibition de DPPH dans les extraits bruts et les différentes fractions variaient de 0,164 à 67,877%. La fraction acétate d'éthyle de *R. verruculosa* présente l'activité maximale (67,877%), suivie des fractions d'acétate d'éthyle de *S. vulgare* et *C. hirsutus*, qui ont approximativement la même valeur (43%). Ces résultats corroborent les travaux de **Souza et al. (2011)** qui ont montré une activité de 60% à la concentration de 5 mg/mL dans l'extrait éthanolique de l'algue rouge *Gracilaria birdiae*. **Duan et al. (2006)** ont noté que la fraction soluble dans l'acétate d'éthyle a montré la plus forte activité à piéger le radical DPPH•. On a observé que l'activité de cette fraction était significativement plus élevée que celle de l'extrait brut. Dans de nombreuses études, l'activité antioxydante des algues entières, de leurs parties, extraits et fractions a été attribuée aux composés phénoliques (**Matanjun et al., 2008 ; Farasat et al., 2014 ; Machu et al., 2015**). Cependant, l'activité observée pourrait être le résultat de la composition complexe des extraits de macroalgues (**Balboa et al., 2013**).

Le calcul des coefficients de Pearson (*r*) a mis en évidence la présence d'une forte corrélation linéaire entre les teneurs des composés phénoliques et la capacité antioxydante totale (CAT). Ces valeurs ont indiqué que l'activité antioxydante chez les trois algues est

justifiée par la présence des phénols totaux, des flavonoïdes totaux, des flavonols et des tanins condensés. Plusieurs études ont démontré une corrélation hautement significative entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante dans différents extraits d'algues (Connan *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2007). Une corrélation négative modérée a été obtenue entre le contenu phénolique et le pouvoir réducteur ($-0,4691 \geq r \geq -0,6740$) dans les algues brunes, cependant cette relation est extrêmement faible dans l'algue rouge ($-0,0110 \geq r \geq -0,1336$). Il a été rapporté par Sabeena Farvin *et al.* (2013) qu'il n'y a pas de corrélation claire entre la teneur en composés phénoliques et l'activité chélatante et que les composés phénoliques semblent donc ne pas être les principaux contributeurs aux propriétés chélatantes des extraits éthanoliques de certaines espèces d'algues marines de la côte danoise. La quantité de polyphénols ne semble donc pas déterminer ces activités comme nous l'avions supposé précédemment. Les différences d'activités seraient probablement le fruit de différences qualitatives dans la nature de ces composés phénoliques.

L'extraction de composés biologiquement actifs à partir de la biomasse algale n'est pas sélective, l'extrait est un mélange de différents composés. L'activité antioxydante des algues marines peut provenir de pigments tels que la chlorophylle et les caroténoïdes, des vitamines et des précurseurs vitaminiques, y compris a-tocophérol, b-carotène, niacine, thiamine et acide ascorbique, des phospholipides, terpénoïdes, des peptides et autres substances antioxydantes, qui contribuent directement ou indirectement à l'inhibition ou la suppression des processus d'oxydation (Shahidi, 2009 ; wang *et al.*, 2009 ; Zubia *et al.*, 2009 ; Luo *et al.*, 2010).

Les facteurs qui influent sur la composition et l'activité des extraits d'algues dépendent de l'espèce, des conditions environnementales, de la saison, de l'âge, de l'emplacement géographique et des technologies de traitement (Kadam *et al.*, 2013), et du stress environnemental auquel les algues sont exposées (température, stress osmotique, ...) (Gupta *et Abu-Ghannam*, 2011).

En raison de la haute résistance des agents antibactériens actuels au traitement des maladies infectieuses et pathogènes, le développement de nouveaux antibiotiques est devenu une priorité pour de nombreuses recherches biomédicales. Plusieurs composés présents dans les algues marines tels que les terpénoïdes, phlorotannins, polyphénols, caroténoïdes, acides aminés,... leurs confèrent un effet bactéricide prometteur (Eom *et al.*, 2012; Cavallo *et al.*, 2013 ; Kim *et al.*, 2013). La présence de ces composés suggère un certain nombre de mécanismes alternatifs pour l'action antimicrobienne (Charway *et al.*, 2018).

Les résultats relatifs aux essais antimicrobiens ont confirmé que les algues étudiées, présentent une activité antibactérienne remarquable, et ce contre deux souches à Gram positif

(*Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*). Ceci est en accord avec la majorité des travaux antérieurs, **Alghazeer et al. (2013)** a rapporté un effet antibactérien plus significatif vis-à-vis des bactéries à Gram positif (*S. aureus* et *Bacillus* spp) pour la plupart des espèces d'algues marines testées. Cependant, les bactéries à Gram négatif étaient plus résistantes (sans zones d'inhibition) ce qui est en accord avec nos résultats. L'extrait aqueux de *Sargassum vulgare* a marqué des zones d'inhibition de 12 et 13 mm envers *S. aureus* et *Bacillus* spp, respectivement (**Alghazeer et al., 2013**). Sur 44 espèces de macroalgues dont *Sargassum desfontainessi* et *Cladostephus spongiosus*, l'activité antimicrobienne la plus importante était également signalée chez 28 espèces contre les bactéries à Gram positif (**Val et al., 2001**). L'étude de **Taskin et al. (2007)** sur l'extrait méthanolique de *Cladostephus spongiosus* f. *verticillatus* de la Mer Égée (Turquie) a révélé la présence d'un effet antimicrobien contre la souche *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de 11.33 mm. L'hypersensibilité des deux souches la *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* peut s'expliquer probablement par la nature des parois des bactéries Gram positif qui est dépourvue de membrane externe et qui semble être sensible aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH et les extraits naturels (**Balentine et al., 2006**). Les fractions d'acétate d'éthyle de *S. vulgare* et *C. hirsutus* détiennent l'activité antibactérienne plus élevée que celle de *R. verruculosa*, ce qui est parallèle avec des enquêtes antérieures (**Lavanya et al., 2011 ; Alghazeer et al., 2013**), ces auteurs ont constaté que les algues brunes possèdent une meilleure activité antimicrobienne que les algues rouges. Plusieurs auteurs ont signalé que l'acétate d'éthyle était le meilleur solvant pour extraire les composés antimicrobiens de certaines espèces d'algues marines (**Patra et al., 2009 ; Salem et al., 2011 ; Raj et al., 2015**). Concernant l'activité envers la levure, tous les extraits et fractions testés se sont montrés inactifs, **Khaled et al. (2012)** a noté l'absence de l'activité antifongique de l'extrait brut et des fractions de *S. vulgare* de la côte méditerranéenne libanaise contre *C. albicans*, ce qui est conforme à nos résultats.

Les concentrations minimales inhibitrices obtenues dans notre étude se situent entre 0.937 mg/mL et 7.5 mg/mL. La Fraction d'acétate d'éthyle de *C. hirsutus* s'est révélée la plus active. Des valeurs CMI de 3,125 à 6,25 mg/mL ont été déterminées dans des extraits de méthanol-chloroforme, d'éther diéthylique, d'acétate d'éthyle et de butanol de l'algue rouge *Gracilaria changii* (**Sasidharan et al., 2009**). Les extraits d'acétate d'éthyle de quelques algues brunes et compris *Sargassum dentifolium*, *S. hystrix* ont enregistré des valeurs allant de 5 à 10 mg/mL (**Salem et al., 2011**). L'activité antimicrobienne des algues dépend de plusieurs facteurs à savoir l'espèce algale, l'habitat, la période de collecte des algues, la

variabilité intraspécifique dans la production de métabolites secondaires parfois liées à des variations saisonnières, la méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne, la capacité des protocoles d'extraction à récupérer les métabolites actifs et, enfin, la différences dans les méthodes d'essai qui entraîneraient des susceptibilités différentes des souches cibles (**Febles et al., 1995, Val et al., 2001 ; Lima-filho et al., 2002 ; Manivannan et al., 2011; Salem et al., 2011**).

Les algues marines vivent dans des habitats complexes exposés à des conditions extrêmes et, en s'adaptant aux nouveaux environnements, elles élaborent une grande variété de substances actives spécifiques et puissantes qui possèdent des caractéristiques structurales qu'on ne peut trouver ailleurs (**Larsen et al., 2005; Eom et al., 2012**). De récentes sources ont indiqué que de nombreuses algues présentent des propriétés antiparasitaires intéressantes (**Orhan et al., 2006 ; Bianco et al., 2013 ; Yamthe et al., 2017 ; Yamthe et al., 2020**). En particulier, les algues brunes et rouges possèdent des composés uniques qui ont un grand potentiel pour être exploiter comme sources de nouveaux traitements des maladies infectieuses humaines (**Vonthron-Sénécheau., 2016**). Le présent travail nous a permis de mettre en évidence l'action antiparasitaire des fractions d'acétate d'éthyle des trois algues investiguées, aussi bien sur *Plasmodium falciparum* que sur *Trypanosoma brucei brucei*. Les résultats obtenus démontrent une bonne activité antitrypanosomale des fractions acétate d'éthyle de *S. vulgare* et de *R. verruculosa* avec des valeurs d'IC₅₀ de 9,3 et 11,0 µg/mL, respectivement, alors que ces trois fractions étaient peu actives contre *Plasmodium falciparum*. Dans la littérature, et à notre connaissance, aucune étude concernant l'activité antiparasitaire de l'algue brune *Cladostephus hirsutus* et de l'algue rouge *Rissoella verruculosa* n'a été publiée à l'exception, de l'espèce *Sargassum vulgare* qui est utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise depuis près de 2000 ans, pour traiter une variété de maladie, y compris les maladies parasitaires (**Liu et al., 2012 ; Torres et al., 2014**). Une étude récente menée par **Yamthe et al. (2020)** sur l'activité antileishmanienne de *Sargassum vulgare* a révélé que l'extrait brut, les fractions et le fucostérol isolé de cette algue ont montré une bonne activité antiparasitaire.

Les résultats précédents rapportés par **Ravikumar et al. (2011)** sur douze espèces d'algues dont l'algue brune *Sargassum wightii* testées, pour l'activité antiplasmodiale *in vitro*, seules *Gracilaria verrucosa* (IC₅₀ 5,55 µg/mL) et *Hypnea espera* (IC₅₀ 8,94 µg/mL) ont montré une bonne activité contre *P. falciparum*. La fraction lipophile de l'extrait méthanol/dichlorométhane de *Sargassum heterophyllum* a exercé une puissante activité antiplasmodiale *in vitro* (IC₅₀ = 2,8 mg/mL) (**Lategan et al., 2009**). Parmi 9 monoterpènes halogénés isolés

de l'algue rouge marine *Plocamium cornutum* et testés *in vitro* sur une souche de *Plasmodium falciparum* sensible à la chloroquine, il a été trouvé que seulement deux composés présentaient une bonne activité antiplasmodiale ($IC_{50} = 16$ et $17 \mu M$) et presque tous les autres composés étaient essentiellement inactifs (Afolayan *et al.*, 2009). L'étude de Gallé *et al.* (2013) concernant l'activité antiparasitaire des extraits hydroalcooliques et à l'acétate d'éthyle de 20 espèces d'algues marines a démontré que seule l'extrait à l'acétate d'éthyle de l'algue brune, *B. bifurcata*, possède une forte activité trypanocide avec une ($IC_{50} = 0,53 \mu g/mL$) et que l'éléganolone, le principal diterpène linéaire isolé de cette espèce n'a montré qu'une activité trypanocide légère ($IC_{50} = 45,0 \mu M$), mais une meilleure activité antiplasmodiale a été mise en évidence ($IC_{50} = 7,9 \mu M$), suggérant que l'activité trypanocide pourrait être due à des composés mineurs ou à la synergie de plusieurs composés séparés pendant le fractionnement.

La variation des activités antiplasmodiales et antitrypanosomales entre les différentes espèces d'algues peut être expliquée par la variation des métabolites secondaires qu'elles contiennent. Compte tenu de la présence de tanins, flavonoïdes, acides phénoliques, caroténoïdes, polysaccharides, protéines, acides carboxyliques et terpènes qui sont liés à l'activité antiparasitaire de certaines algues (Afolayan *et al.*, 2009; Ravikumar *et al.*, 2011; Besednova *et al.*, 2021). Le mécanisme d'action des extraits d'algues est associé à la présence de ces métabolites qui, agissant isolément ou avec synergie peut être liée à l'inhibition parasitaire; cet effet peut s'expliquer par l'inhibition de l'invasion des mérozoïtes dans les érythrocytes ou la perturbation de rosettes par *P. falciparum* ainsi que par d'autres mécanismes que n'ont pas encore été découverts (Dantas *et al.*, 2015). Il est donc nécessaire d'élargir la recherche sur les composés ayant un effet antiparasitaire élevé afin de déterminer la relation entre leur structure et l'activité biologique.

Au cours de ces dernières années, les organismes marins ont fourni un grand nombre de produits naturels anti-inflammatoires (Abad *et al.*, 2008). Il a été démontré, dans plusieurs recherches que de nombreuses espèces d'algues possèdent une activité anti-inflammatoire intéressante (Stirk *et al.*, 2003; Ananthi *et al.*, 2010; Cavalcante-Silva *et al.*, 2012; Bitencourt *et al.*, 2015). À notre connaissance, cette étude est la première recherche sur la toxicité et l'effet anti-inflammatoire de l'extrait de *C. hirsutus*.

La toxicité aigüe est la première étape qui doit être réalisée sur une substance, lorsqu'on ne dispose pas d'information sur sa toxicité. L'enregistrement du comportement général des animaux constitue l'un des paramètres critiques pour l'évaluation des premiers signes de toxicité (Lima *et al.*, 2016). La présente étude révèle que l'administration orale de 150 et 300 mg/kg de l'extrait brut de *C. hirsutus* aux souris n'a provoqué aucune mortalité et

aucun changement dans les paramètres comportementaux pendant la période d'observation, ceci indique que ces deux doses sont considérées comme pas toxiques. Il est important de préciser que peu d'algues sont toxiques pour l'homme, ce sont essentiellement les microalgues qui sont dangereuses (**Krys & Frémy., 2002**).

Pour le criblage de l'activité anti-inflammatoire, nous avons utilisé le test de la carragénine, un mucopolysaccharide sulfaté provenant d'une *Rhodophyceae*. Cet agent phlogogène induit au niveau de la patte de souris un œdème considéré comme un signe caractéristique de l'inflammation aigue et paramètre très important dans l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de différents composés, naturels ou de synthèse (**Morris, 2003; Lee et al., 2018**). Cette inflammation est biphasique. En effet, la carragénine dans une première phase (1-2h) provoque la synthèse de facteurs pro-inflammatoires tels que l'histamine et la sérotonine qui entretiennent l'inflammation (**Di Rosa, 1972**). Dans une seconde phase (4-12h), ces facteurs chimioattractants induisent le recrutement des neutrophiles par chimiotactisme envers le site inflammatoire, où ils libèrent leur arsenal cytotoxique et d'autres médiateurs inflammatoires (**Dawson et al., 1991 ; Carol et al., 1997 ; Cuzzocrea et al., 2000**). Les résultats obtenus à l'issu de ce test montrent que l'extrait brut de l'algue brune *C. hirsutus*, réduisent de façon appréciable l'œdème induit par la carragénine. L'inhibition de l'œdème par l'extrait brut est dose-dépendante, elle est de 58.86% et de 71.01%, plus précisément à la sixième heure et aux doses 150 et 300 mg/Kg PC, respectivement. Le pourcentage d'inhibition de l'extrait à 300 mg/Kg PC est supérieure à celui de diclofénac sodique utilisé comme médicament de référence dont le pourcentage d'inhibition de l'œdème ne dépasse pas 67,49% à la quatrième heure. En effet, la plupart des études effectuées sur l'activité anti-inflammatoire des algues marines est dédié à la classe des algues brunes (**Ananthi et al., 2010; Riahi et al., 2011 ; Islam et al., 2013**). Ceci pourrait être expliqué par leur richesse en polyphénols, polysaccharides sulfatés, acide gras, terpènes et plusieurs autres bioactifs qui s'avèrent être dotées d'activité anti-inflammatoire (**Fernando et al., 2016**).

D'après **Dore et al. (2013)**, les polysaccharides sulfatés de l'algue brune *Sargassum vulgare* présentent une forte action anti-inflammatoire à toutes les concentrations testées (10, 30 and 50 mg/kg) dans le modèle d'œdème de la patte induit par la carragénine avec une réduction de l'œdème et une infiltration cellulaire. Un diterpénoïde tricyclique, le *néorogioltriol* isolé de l'extrait organique de l'algue rouge *Laurencia glandulifera* a montré une activité anti-inflammatoire significative *in vivo* et *in vitro* (**Chatter et al., 2011**). L'injection intra péritonéal des fractions organiques de chloroforme (F-CHCl₃) et d'acétate

d'éthyle (F-AcOEt) de *Cystoceira sedoides* à différentes doses (25 et 50 mg/kg, (P.C)) a montré une réduction de l'œdème des pattes de souris. Le pourcentage d'inhibition de l'œdème, 3 h après injection de carragénine, variait de 67,71% à 73,49% et de 67,74% à 74,58%, respectivement, pour F-CHCl₃ et F-AcOEt (**Mhadhebi et al., 2011**). En accord avec ces rapports, il est possible que de tels composés soient présents dans l'extrait brut de *C. hirsutus* sont capables d'inhiber la synthèse, la libération ou l'action de médiateurs inflammatoires impliqués dans l'inflammation.

Conclusion Générale

La valorisation de trois espèces algales de la cote ouest algérienne, deux algues brunes, *Sargassum vulgare* et *Cladostephus hirsutus* et d'une algue rouge *Rissoella verruculosa* a fait l'objet de cette présente étude. La consultation des données de la littérature a indiqué que l'on ne disposait que de peu d'informations de nature chimique et/ou biologique sur ces espèces, à l'exception de *Sargassum vulgare*, peu d'investigations n'ont été réalisées sur *Cladostephus hirsutus* et *Rissoella verruculosa*. Pour pallier à ce manque d'informations, notre travail s'est focalisé sur, l'étude phytochimique et l'évaluation des activités : antioxydante, antimicrobienne, antiparasitaire et anti-inflammatoire de ces espèces.

L'extraction au soxhlet et les extractions liquide-liquide par des solvants organiques de polarité différente ont permis d'obtenir des rendements variables. Le rendement le plus élevé est celui de l'extrait brut de *S. vulgare*, suivi de l'extrait brut de *C. hirsutus* et de *R. verruculosa*. La fraction d'éther de pétrole de *S. vulgare* détient le meilleur rendement par rapport aux autres fractions.

La teneur la plus élevée en phénols totaux est enregistrée dans l'extrait brut de *R. verruculosa* par rapport aux autres extraits. La teneur la plus élevée en tanins condensés a été révélée dans les extraits bruts et les fractions acétate d'éthyle des algues brunes *S. vulgare* et *C. hirsutus*, comparativement à l'algue rouge *R. verruculosa*. L'extrait brut et les fractions des trois algues ont montré des teneurs faible en flavonoïdes et en flavonols et qui ne dépassent pas 0.427 ± 0.003 mg EC/g MS et 0.640 ± 0.041 mg EQ/g MS, respectivement.

La détermination des propriétés antioxydante révèle que ces trois algues manifestent une activité modérée. Une corrélation positive entre la CAT et la teneur en composés phénoliques a été établie, alors qu'une corrélation négative a été obtenue entre le contenu phénolique et le pouvoir réducteur de fer chez les trois espèces.

Concernant l'évaluation du pouvoir antimicrobien, les extraits testés ont révélé une certaine sensibilité vis-à-vis de *S. aureus* et de *B. cereus*. Alors qu'aucun effet n'a été signalé contre les autres souches. La fraction acétate d'éthyle de *C. hirsutus* détient l'activité antibactérienne la plus élevée (CMI de 0.937 mg/mL). Le pouvoir antiparasitaire *in vitro* a montré que les fractions acétates d'éthyle de *S. vulgare* et de *R. verruculosa* présentent une bonne activité antitrypanosomale avec des IC_{50} de 9,3 et 11,0 μ g/mL, respectivement. Cependant, ces trois fractions étaient peu actives contre *P. falciparum*.

L'étude de la toxicité aigue de l'extrait brut de l'algue brune *C. hirsutus* chez les souris, n'a montré aucun effet toxique aux doses de 150 mg/Kg et de 300 mg/Kg de poids corporel.

Par ailleurs, Le criblage de l'activité anti-inflammatoire réalisé par le test de la carragénine a montré que cet extrait a réduit d'une façon appréciable l'œdème de la patte des souris, ceci a été confirmé par une étude histologique qui a montré une disparition très importante de l'infiltrat inflammatoire.

Pour mieux exploiter les propriétés biologiques de ces trois espèces, une recherche plus poussée des principes actifs doit être investiguée. Pour cela, une série d'investigations complémentaires doit être envisagée. Il serait donc intéressant :

- ✓ De purifier et d'identifier les molécules responsables de ces activités dans les extraits et les fractions par des méthodes spectrales (UV, RMN, SM) et chromatographiques (CCM, CC, HPLC, GC-MS).
- ✓ D'étudier les fractions acétates d'éthyle qui se sont montrées susceptibles de fournir des molécules biologiquement actives.
- ✓ D'évaluer les activités biologiques *in vitro* et *in vivo* des molécules isolées en vue de les utiliser à des fins thérapeutiques.
- ✓ d'associer les propriétés anti-inflammatoires de l'extrait brut de *C. hirsutus* à la présence de composés particuliers. De plus, les mécanismes d'actions de ces composés devraient être définis.

Enfin, au terme de ce travail, il convient de souligner l'importance du thème abordé sur la valorisation de la ressource algale que dispose l'Algérie. Les substances naturelles que fournissent les algues, sont loin d'être totalement exploités et continueront, sans doute, à offrir d'autres applications pharmaceutiques et biologiques très intéressantes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abad, M. J., Bedoya, L. M., & Bermejo, P. (2008). Natural marine anti-inflammatory products. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 8(8), 740-754.

Abhishek, D., Dilip, B., Jadeja, B.A. (2021). Analysis and evaluation of the antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of the seaweeds of *Cystoseira indica* and *Sargassum vulgare* from Gujarat coast, India. *J of the Maharaja Sayajirao University of Baroda ISSN*, 25, 0422.

Afolayan, A.F., Mann, M.G.A., Lategan C.A., Smith P.J., Bolton, J.J., Beukes, D.R. (2009). Antiplasmodial halogenated monoterpenes from the marine red alga *Plocamium cornutum*. *Phytochem*, 70:597–600.

Agardh, C.A. (1820). *Species algarum rite cognitae, cum synonymis, differentiis specificis et descriptionibus succinctis*. Lund, Berling.

Agardh, J. G. (1851). *Species, genera et ordines algarum* (Vol. 2). apud CWK Gleerup, Lund, 289p.

Aknin, M., Dogbevi, K., Samb, A., Kornprobst, J. M., Gaydou, E. M., & Miralles, J. (1992). Fatty acid and sterol compositions of eight brown algae from the Senegalese coast. *Comparative biochem and physio: B: Comparative biochem*, 102(4):841-843

Akremiti, N., Cappoen, D., Anthonissen, R., Verschaeve, L., Bouraoui, A. (2017). Phytochemical and in vitro antimicrobial and genotoxic activity in the brown algae *Dictyopteris membranacea*. *South African Journal of Botany*, 108, 308-314.

Alghazeer, R., Whida, F., Abduelrhman, E., Gammoudi, F., Azwai, S. (2013). Screening of antibacterial activity in marine green, red and brown macroalgae from the western coast of Libya. *Nat sci*, 5: 7–14.

Al-Saif, S. S. A. L., Abdel-Raouf, N., El-Wazanani, H. A., & Aref, I. A. (2014). Antibacterial substances from marine algae isolated from Jeddah coast of Red sea, Saudi Arabia. *Saudi j of biol sci*, 21(1): 57-64.

Alsenani, F., Tupally, K. R., Chua, E. T., Eltanahy, E., Alsufyani, H., Parekh, H. S., Schenk, P. M. (2020). Evaluation of microalgae and cyanobacteria as potential sources of antimicrobial compounds. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 28 (12), 1834-1841.

Alwash, M. S., Ibrahim, N., Ahmad, W. Y. (2013). Identification and mode of action of antibacterial components from *Melastoma malabathricum* Linn leaves. *American journal of infectious diseases*, 9(2), 46-58.

Références bibliographiques

Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., et Weil, J.A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem*, 84: 551–562.

Amico, V., Oriente, G., Piattelli, M., Ruberto, G., Tringali, C. (1982). A quinone-hydroquinone couple from the brown alga *Cystoseira stricta*. *Phytochem*, 21 (2), 421–424.

Aminina, N. M., Karaulova, E. P., Vishnevskaya, T. I., Yakush, E. V. Kim, Y. K., Nam, K. H., Son, K. T. (2020). Characteristics of polyphenolic content in brown algae of the Pacific Coast of Russia. *Molec*, 25(17): 3909.

Ananthi, S., Raghavendran, H. R. B., Sunil, A. G., Gayathri, V., Ramakrishnan, G., Vasanthi, H. R. (2010). *In vitro* antioxidant and *in vivo* anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (Marine Brown Alga). *Food and chemical toxicology*, 48(1): 187-192.

Aniszewski, T. (2007). *Alkaloids-Secrets of Life:: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role*. Elsevier.

Anupama, A. S., Kishor, N. R., Rahul, D. K., et Kanchan, S. M. (2012). Evaluation of antiinflammatory and analgesic activities of *Tamarindus indica* seeds. *Int J Pharm Sci Drug Res*, 4(3): 213-217

Arguelles, E. D. L. R., Monsalud, R. G., Sapin, A. B. (2019). Chemical composition and *in vitro* antioxidant and antibacterial activities of *Sargassum vulgare* C. Agardh from Lobo, Batangas, Philippines. *J of the Inter Society for Southeast Asian Agri Sci (ISSAAS)*, 25(1): 112-122.

Azmir, J., Zaidula, I.S.M., Rahmana M.M., Sharifa K.M., Mohameda A., Sahenab F., Jahurulb M.H.A., Ghafoorc K., Norulainid N.A.N., Omar A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J of food engineering*, 117(4): 426–436.

B

Balboa, E.M., Conde, E., Moure, A., Falque, E., and Dominguez, H. (2013). *In vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chem*, 138: 1764-1785.

Références bibliographiques

Balentine C.W., Crandall P.G., O'Bryan, C.A., Duong, D.Q., Pohlman, F.W.(2006). The pre and post grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Sci*, 73: 413–421.

Barreiro, F., Gómez, M., Lastra, M., López, J., & De la Huz, R. (2011). Annual cycle of wrack supply to sandy beaches: effect of the physical environment. *Marine Ecology Progress Series*, 433, 65-74.

Bedjou, F., Maiza-Benabdesselam, F., Saidani, K., & Touati, N. (2011). Antibacterial activity of four species of Algerian algae. *Nat Prod Ind J*, 7(2): 66-70.

Benzie, I.F.F., John, J.S. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1): 70–76.

Bergogne-Bérézin, E., Brogard, J.M. (1999). Bases biologiques de l'antibiothérapie. *Masson*, p 27.

Bero, J. (2012). " *Evaluation de l'activité antiparasitaire de plantes utilisées en médecine traditionnelle au Bénin et identification de principes actifs* (Doctoral dissertation, UCL-Université Catholique de Louvain).

Besednova, N.N., Zaporozhets, T.S., Andryukov, B. G., Kryzhanovsky, S.P., Ermakova, S.P., Kuznetsova, T.A., Voronova, A.N., Shchelkanov, M.Y. (2021). Antiparasitic Effects of Sulfated Polysaccharides from Marine Hydrobionts. *Marine Drugs*, 19(11): 637.

Bianchi, C. N., Morri, C. (2000). Marine biodiversity of the Mediterranean Sea: situation, problems and prospects for future research. *Marine pollution bulletin*, 40(5): 367-376.

Bianco, E.M., de Oliveira, S.Q., Rigotto, C., Tonini, M.L., Guimaraes, T.R., Bittencourt, F., Gouvea, L.P., Aresi, C., Rojo de Almeida, M.T., Goularte Moritz, M.I., Leal Martins, C.D., Scherner, F., Carraro, J.L., Horta, P.A., Reginatto, F.H., Steindel, M., Oliveira Simoes, C.M., Schenkel, E.P. (2013). Anti-infective potential of marine invertebrates and seaweeds from the Brazilian coast. *Molecules*, 18; 5761–5778.

Bittencourt, M. A., Silva, H., Abílio, G. M., Miranda, G. E., Moura, A., Araújo-Júnior, J. X. D., Souto, J. T. (2015). Anti-inflammatory effects of methanolic extract of green algae *Caulerpa mexicana* in a murine model of ulcerative colitis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25: 677-682.

Blunt, J.W., Copp, B.R., Hu, W.P., Munro, M.H.G., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. (2009). Marine natural products. *Nat Prod Rep*, 26, 170–244.

Références bibliographiques

Boudouresque, C., Perret-Boudouresque, M., Knoepffler-Peguy, M. (1984). Inventaire des algues marines benthiques dans les pyrénées-orientales (méditerranée, FRANCE). *Vie et Milieu/Life & Environment*, 41-59.

Boulekbache-Makhlouf, L., Slimani, S., Madani, K. (2013). Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. *Ind Crops Prod*, 41: 85–89.

Boonchum, W., Peerapornpisal, Y., Kanjanapothi, D., Pekkoh, J., Amornlerdpison, D., Pumas, C. H. A. Y. A. K. O. R. N., Vacharapiyasophon, P. (2011). Antimicrobial and anti-inflammatory properties of various seaweeds from the Gulf of Thailand. *International Journal of agriculture and biology*, 13(1).

Bortolomeazzi, R., Sebastianutto, N., Toniolo, R., Pizzariello, A. (2007). Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. *Food Chem*, 100: 1481-1489.

Bosc, D., Lethu, S., Mouray, E., Grellier, P., Dubois, J. (2012). Improvement of the trypanocide activity of 3-arylthiophene farnesyltransferase inhibitors by modulation of their 3-aryl group. *Med Chem Comm*, 3:1512–1517.

Bounhoure, J. P., Bouvenot, G., Montastruc, J. L. (2015). Risques cardiovasculaires des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) chez la personne âgée et pour des traitements longs. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 199(6), 949-957.

Bouzidi, N., Daghbouche, Y., El Hattab, M., Aliche, Z., Culioli, G., Piovetti, L., de la Guardia, M. (2008). Determination of total sterols in brown algae by Fourier transform infrared spectroscopy. *Analytica chimica acta*, 616(2): 185-189.

Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Bogavac, M., Suvajdzic, L. J., Simin, N., Samojlik, I., Couladis, M. (2008). Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of *Achillea collina* Bekker ex Heimerls. l. and *A. pannonicascheele* essential oils. *Molecules*, 13(9):2058–2068.

C

Cabrita, M. T., Vale, C., & Rauter, A. P. (2010). Halogenated compounds from marine algae. *Marine drugs*, 8(8), 2301-2317.

Camacho, M. D. R., Croft, S. L., Phillipson, J. D. (2000). Natural products as sources of antiprotozoal drugs. *Current Opinion in Anti-infective Investigational Drugs*, 2(1), 47-62.

Références bibliographiques

- Carol AF., Timothy M., Wright .MD. (1997) .Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Bioscience* , 2 : 2-26.
- Catarino, M. D., Silva, A., Cardoso, S. M. (2017). Fucaceae: A source of bioactive phlorotannins. *Inter J of molec sci*, 18(6): 1327.
- Cattand, P. (2001). L'épidémiologie de la trypanosomiase humaine africaine: une histoire multifactorielle complexe. *Med Trop*, 61(4-5), 313-22.
- Cavalcante-Silva, L. H. A., Barbosa Brito da Matta, C., De Araújo, M. V., Barbosa-Filho, J. M., Pereira de Lira, D., de Oliveira Santos, B. V., Alexandre-Moreira, M. S. (2012). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of crude methanolic extract of red alga *Bryothamnion triquetrum*. *Mar dru*, 10(9): 1977-1992.
- Cavalier-Smith, T. (1981). Eukaryote kingdoms: seven or nine?. *Biosystems*, 14(3-4): 461-481.
- Cavalier-Smith, T., Chao, E. E. (1995). The opalozoan Apusomonas is related to the common ancestor of animals, fungi, and choanoflagellates. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biol Sci*, 261(1360), 1-6.
- Cavallo, R.A., Acquaviva, M.I., Stabili, L., Cecere, E., Petrocelli, A., Narracci, M. (2013). Antibacterial activity of marine macroalgae against fish pathogenic *Vibrio* species. *Cent Eur J Biol*, 8: 646
- Chandini, S.K., Ganesan, P., Bhaskar, N., (2008). In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. *Food Chem*, 107(2): 707–713.
- Charway, G. N., Yenumula, P., Kim, Y. M. (2018). Marine Algae and Their Potential Application as Antimicrobial Agents. *J Food Hygiene and Safety*, 33(3): 151-156.
- Chatter, R., Othman, R. B., Rabhi, S., Kladi, M., Tarhouni, S., Vagias, C., Kharrat, R. (2011). *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of neorogioltriol, a new diterpene extracted from the red algae *Laurencia glandulifera*. *Mar Dru*, 9(7): 1293-1306.
- Chapman, V.J., Chapman, D.J., 1980. Seaweeds and Their Uses. Chapman and Hall, London, p. 334
- Cho, M., Lee, H.S., Kang, I.J., Won, M.H., and You, S. (2011). Antioxidant properties of extract and fractions from *Enteromorpha prolifera*, a type of green seaweed. *Food Chem*, 127: 999-1006.
- Chung, H. Y., Sung, B., Jung, K. J., Zou, Y., & Yu, B. P. (2006). The molecular inflammatory process in aging. *Antioxidants & redox signaling*, 8(3-4), 572-581.

Références bibliographiques

Connan, S., Goulard, F., Stiger, V., Deslandes, E., and Ar Gall, E. (2004). Interspecific and temporal variation in phlorotannin levels in an assemblage of brown algae. *Bot Mar*, 47:410-416.

Coppejans, E. (1972). Résultats d'une étude systématique et écologique de la population algale des côtes rocheuses du Dramont, St. Raphaël (Var, France). *Biologisch Jaarboek (Dodonaea)*.

Corley, D.A., Kerlikowske, K., Verma, R., Buffler, P. (2003). Protective association of aspirin/NSAIDS and esophageal cancer: A systemic review and meta analysis. *Gastroenterology*, 124:47–56.

Coura, C. O., Souza, R. B., Rodrigues, J. A. G., Vanderlei, E. D. S. O., de Araújo, I. W. F., Ribeiro, N. A., Benevides, N. M. B. (2015). Mechanisms involved in the anti-inflammatory action of a polysulfated fraction from *Gracilaria cornea* in rats. *PloS one*, 10(3), e0119319.

Cox, S., Abu-Ghannam, N., Gupta, S. (2010). An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. *Inter food research J*, 17(1): 205-220.

Crozier, A., Clifford, M. N., & Ashihara, H. (2006). Plant secondary metabolites. *Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, Blackwell-Publishers.

Cruces, E., Rojas-Lillo, Y., Ramirez-Kushel, E., Atala, E., López-Alarcón, C., Lissi, E., & Gómez, I. (2016). Comparison of different techniques for the preservation and extraction of phlorotannins in the kelp *Lessonia spicata* (Phaeophyceae): assays of DPPH, ORAC-PGR, and ORAC-FL as testing methods. *Journal of applied phycology*, 28, 573-580.

D

Dahanukar, S. A., Kulkarni, R. A., Rege, N. N. (2000). Pharmacology of medicinal plants and natural products. *Indian journal of pharmacology*, 32(4), S81-S118.

Dantas, G.R., Rocha, H.A., Amorim, R.C., Silva, L.F., Pohlit, A.M., Andrade-Neto, V.F. (2015). Antimalarial Activities of Seaweeds *Spatoglossumschroederi*, *Gracilariabirdiae* and *Udotea flabellum* from Rio Grande do Norte Coast, Brazil.

de Reviers, B., (2002). Biologie et phylogénie des algues, tome 1 : cours. In: Belin (Eds.). France, Paris, Belin Sup. *Sci*, 351 p.

Références bibliographiques

Dere, S., Güneş, T., & Sivaci, R. (1998). Spectrophotometric determination of chlorophyll-A, B and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. *Turkish J of Botany*, 22(1): 13-18.

de Saint-Vincent, B. (1824). *Dictionnaire classique d'histoire naturelle* (Vol. 5). Rey et Gravier, p 182

Desjardins, R.E., Graig, J.C., David, H., Jeffrey, D.C. (1976). Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated micro-dilution technique. *Antimicrob Agents Chemother*, 16:710–718.

De Sousa, A. P. A., Torres, M. R., Pessoa, C., De Moraes, M. O., Rocha Filho, F. D., Alves, A. P. N. N., & Costa-Lotufo, L. V. (2007). *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 tumor by alginates from brown seaweed *Sargassum vulgare*. *Carbohydrate polymers*, 69(1): 7-13.

Di Rosa, M. (1972). Biological properties of carrageenan. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 24(2), 89-102.

Dore, C. M. P. G., Alves, M. G. D. C. F., Will, L. S. E. P., Costa, T. G., Sabry, D. A., de Souza Rêgo, L. A. R., Leite, E. L. (2013). A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. *Carbohydrate Polymers*, 91(1): 467-475.

Duan, X.J., Zhang, W.W., Li, X.M., Wang, B.G. (2006). Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphoniaurceolata*. *Food Chem*, 95:37–43.

E

Ejebe, D.E., Siminialayi, I.M., Emudainowho, J.O.T., Ofesi, U., Morka, L. (2010). Analgesic and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of the leaves of *Helianthus Annus* in Wistar rats. *AsianPac J Trop*, 3(5): 341–347.

Elangovan, M., Noorjahan, A., Anantharaman, P. (2019). Extraction of metabolites and screening their antioxidant potential from marine macro algae. *Int. J. Sci. Technol. Res*, 8, 1059-1064.

El Gamal, A. A. (2010). Biological importance of marine algae. *Saudi pharmaceutical journal*, 18(1), 1-25

Références bibliographiques

El Hattab, M., Culioli, G., Valls, R., Richou, M., & Piovetti, L. (2008). Apofucoxanthinoids and loliolide from the brown alga *Cladostephus spongiosus* f. *verticillatus* (Heterokonta, Sphacelariales). *Biochem Systematics and Ecology*, 36(5-6): 447-451.

Eom, S.H., Kim, Y.M., Kim, S.K. (2012). Antimicrobial effect of phlorotannins from marine brown algae. *Food Chem Toxicol*, 50: 3251–3255.

Ermakova S, Sokolova R, Kim SM, Um BH, Isakov V, Zvyagintseva T. (2011). Fucoidans from brown seaweeds *Sargassum hornery*, *Eclonia cava*, *Costaria costata*: structural characteristics and anticancer activity. *Appl Biochem Biotechnol*, 164(6):841–850.

F

Fairhead, V. A., Amsler, C. D., McClintock, J. B., & Baker, B. J. (2006). Lack of defense or phlorotannin induction by uv radiation or mesograzers in *Desmarestia anceps* and *d. Menziesii* (phaeophyceae). *J of Phycology*, 42(6): 1174-1183.

Farasat, M., Khavari-Nejad, R.A., Nabavi, S.M.B., Namjooyan, F. (2014). Antioxidant activity, total phenolics and flavonoid contents of some edible green seaweeds from northern coasts of the Persian Gulf. *Iran J Pharm Res*, 13, 163-170.

Farokhi, F., Grellier, F., Clément, M., Roussakis, C., Loiseau, P.M., Genin-Seward, E., Kornprobst, M., Barnathan, G., Wielgosz-Collin, G. (2013). Antimalarial Activity of Axidjiferosides, New β -Galactosylceramides from the African Sponge *Axinyssadjiferi*. *Mar Drugs*, 11:1304–1315

Febles, C.I., Arias, A., Hardisson, A., Lopez, A.S. (1995) Antimicrobial activity of extracts from Canary species of Phaeophyta and Chlorophyta. *Phytothera Res*, 9: 385–387.

Feldmann, J. (1937). *Recherches sur la végétation marine de la Méditerranée: la Côte des Albères: première thèse*. Wolf.

Feng Yu, D., Xiao Ming, L., Ji Ying, S., Chun Shun, L., Bin Gui, W. (2014). Anthraquinone Derivatives and an Orsellinic Acid Ester from the Marine Alga-Derived Endophytic Fungus *Eurotium cristatum* EN-220. *Helvetica Chimica Acta*, 97(7), 973–978.

Fernando, I. S., Nah, J. W., & Jeon, Y. J. (2016). Potential anti-inflammatory natural products from marine algae. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 48, 22-30.

Fink HH, Mikesky AE. Practical applications in sports nutrition. 2nd ed. USA: Jones & Bartlett Publishers; 2013. p. 105.

Références bibliographiques

Fischer, W. (1987). Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. (Rev 1). Méditerranée et mer Noire. Zone de Peche 37. *Vertebres*, 2.

Flores-Moya, A., Gomez, I., Vinegla, B., Altamirano, M., Pérez-Rodríguez, E., Maestre, C., Figueroa, F. L. (1998). Effects of solar radiation on the endemic Mediterranean red alga *Rissoella verruculosa*: photosynthetic performance, pigment content and the activities of enzymes related to nutrient uptake. *New phytologist*, 139(4): 673-683.

G

Galanakis, C.M., Goulas, V., Tsakona, S., Manganaris, G.A. & Gekas, V. (2013). A knowledge base for the recovery of natural phenols with different solvents. *Inter J of Food Properties*, 16: 382–396

Gallé, J.B., Attioua, B., Kaiser, M., Rusig, A.M., Lobstein, A., Vonthron-Sénécheau, C. (2013). Eleganolone, a diterpene from the French marine alga *Bifurcaria bifurcata* inhibits growth of the human pathogens *Trypanosoma brucei* and *Plasmodium falciparum*. *Marine drugs*, 11(3): 599–610.

Ganesan, P., Kumar, C.S., and Bhaskar, N. (2008). Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresour Technol.* 99:2717-2723.

García-Casal, M. N., Ramírez, J., Leets, I., Pereira, A. C., & Quiroga, M. F. (2008). Antioxidant capacity, polyphenol content and iron bioavailability from algae (*Ulva* sp., *Sargassum* sp. and *Porphyra* sp.) in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 101(1), 79-85.

Garon-Lardiere S. (2004). Thèse : Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales). Université de Bretagne Occidentale.

Gattuso, J.P., Duarte, C. (2021). Erosion de la biodiversité marine : Quelles solutions ?. *Questions internationales*.

Gautam, R., Jachak, S. M. (2009). Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Medicinal research reviews*, 29(5), 767-820.

Gonzalez del Val, A.G., Platas, G., Basilio, A., Cabello, A., Gorrochategui, J., Suay, I., Vicente, F., Portillo, E., Jiménez del Río, M., Reina, G.G., Peláez, F. (2001). Screening of

Références bibliographiques

antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *Internat Microbiol*, 4(1): 35–40.

Govindasamy, C., Arulpriya, M., & Ruban, P. (2012). Nuclear magnetic resonance analysis for antimicrobial compounds from the red seaweed *Gracilaria corticata*. *Asian Pacific J of Tropical Biomed*, 2(1): S329-S333.

Graiff, A., Bartsch, I., Ruth, W., Wahl, M., Karsten, U. (2015). Season exerts differential effects of ocean acidification and warming on growth and carbon metabolism of the seaweed *fucusfocus vesiculosus* in the western Baltic Sea. *Front Microbiol*, 2: 112.

Grotewold E. The science of flavonoids. USA: Springer Science & Business Media; 2007. p. 1e4

Guedes, É. A., Silva, T. G. D., Aguiar, J. S., Barros, L. D. D., Pinotti, L. M., & Sant'Ana, A. E. (2013). Cytotoxic activity of marine algae against cancerous cells. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23: 668-673.

Guillaume, P. (2011). Caractérisation biochimique d'exopolymères d'origine algale du bassin de Marennes-Oléron et étude des propriétés physico-chimiques de surface de micro-organismes impliquées dans leur adhésion. Thèse de doctorat, Université de La Rochelle.

Guiry, M.D. (2012). How many species of algae are there?. *J Phycol*, 48(5): 1057-1063.

Guiry, M. D. & Guiry, G. M. (2019). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Available from: <http://www.algaebase.org>. Accessed Oct 31, 2019.

Gupta, V. K., & Sharma, S. K. (2006). Plants as natural antioxidants.

Gupta, S., Abu-Ghannam, N. (2011). Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. *Innovative Food Sci&Emerging Tech*, 12(4), 600-609.

Güven, K. C., Percot, A., & Sezik, E. (2010). Alkaloids in marine algae. *Marine Drugs*, 8(2), 269-284.

H

Références bibliographiques

Haminiuk, C. W., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S., & Peralta, R. M. (2012). Phenolic compounds in fruits—an overview. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(10), 2023-2044.

Hariot, P. (1892). *Atlas des algues marines les plus répandues des côtes de France*. P. Klincksieck. p10.

Heesch, S., Rindi, F., Guiry, M. D., & Nelson, W. A. (2020). Molecular phylogeny and taxonomic reassessment of the genus *Cladostephus* (Sphacelariales, Phaeophyceae). *Euro J of Phycology*, 55(4): 426-443.

Heffernan, N., Brunton, N.P., Fitz Gerald, R.J., Smyth, T.J. (2015). Profiling of the molecular weight and structural isomer abundance of macroalgae-derived phlorotannins. *Mar Drugs*, 13: 509-528.

Henderson, B., Poole, S., Wilson, M. (1996). Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiological reviews*, 60(2), 316-341.

Hopkins, W.G., (2003). Physiologie végétale. In: Hopkins, W.G. (Eds.). Belgique, Bruxelles, De Boeck Université, 512 p.

Hortense, F. (2011). Les applications et la toxicité des algues marines. Thèse de doctorat, Université de Limoges (France).

I

Iatrides, M. C., Artaud, J., & Vicente, N. (1983). Composition en stérols de végétaux marins méditerranéens. *Oceanologica Acta*, 6(1): 73-77.

Ibrahim, M., Salman, M., Kamal, S., Rehman, S., Razzaq, A., & Akash, S. H. (2017). Algae-based biologically active compounds. In *Algae Based Polymers, Blends, and Composites* (pp. 155-271). Elsevier

Ibrahim, R. Y., Hammad, H. B., Gaafar, A. A., Saber, A. A. (2022). The possible role of the seaweed *Sargassum vulgare* as a promising functional food ingredient minimizing aspartame-associated toxicity in rats. *Inter J of Environmental Health Res*, 32(4): 752-771.

Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry*, 126(4), 1821-1835.

Références bibliographiques

Islam, M. N., Ishita, I. J., Jin, S. E., Choi, R. J., Lee, C. M., Kim, Y. S., Choi, J. S. (2013). Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Saccharina japonica* and its constituents pheophorbide a and pheophytin a in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells. *Food and chem toxicology*, 55: 541-548.

Iwamoto, C., Yamada, T., Ito, Y., Minoura, K., & Numata, A. (2001). Cytotoxic cytochalasans from a *Penicillium* species separated from a marine alga. *Tetrahedron*, 57(15), 2997-3004.

J

Ji, M., Gong, X., Li, X., Wang, C., Li, M. (2020). Advanced research on the antioxidant activity and mechanism of polyphenols from *Hippophae* species A review. *Molecules*, 25(4), 917.

Jimenez-Lopez, C., Pereira, A. G., Lourenço-Lopes, C., Garcia-Oliveira, P., Cassani, L., Fraga-Corral, M., Simal-Gandara, J. (2021). Main bioactive phenolic compounds in marine algae and their mechanisms of action supporting potential health benefits. *Food Chem*, 341, 128262.

Julkunen-Titto, R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J Agric Food Chem*, 33: 213–217.

Jung, H. A., Jin, S. E., Ahn, B. R., Lee, C. M., Choi, J. S. (2013). Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Eisenia bicyclis* and its constituents fucosterol and phlorotannins in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophages. *Food and chemical toxicology*, 59, 199-206.

K

Kadam, S.U., Tiwari, B.K., O'Donnell, C. P. (2013). Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. *J of agric and food chem*, 61(20): 4667-4675.

Kang, Y., Khan, M.N., Park, N.H., Cho, J.Y., Lee, M.C., Fujii, H., Hong, Y.K. (2008). Anti- pyretic, analgesic, and anti-inflammatory activities of the seaweed *Sargassum fulvellum* and *Sargassum thunbergii* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 28, 187-190.

Karkhane, M., Lashgarian, H. E., Mirzaei, S. Z., Ghaffarizadeh, A., Sepahvand, A., &Marzban, A. (2020). Antifungal, antioxidant and photocatalytic activities of zinc

Références bibliographiques

nanoparticles synthesized by *Sargassum vulgare* extract. *Biocatalysis and Agricultural Biotech*, 29: 101791.

Kelman, D., Posner, E. K., McDermid, K. J., Tabandera, N. K., Wright, P. R., & Wright, A. D. (2012). Antioxidant activity of Hawaiian marine algae. *Marine drugs*, 10(2), 403-416.

Khaled, N., Hiba, M., Asma, C. (2012). Antioxidant and antifungal activities of *Padina pavonica* and *Sargassum vulgare* from the Lebanese Mediterranean Coast. *Adv Environ Biol*, 6(1): 42-48.

Kilic, M., Orhan, I. E., Eren, G., Okudan, E. S., Estep, A. S., Bencel, J. J., & Tabanca, N. (2021). Insecticidal activity of forty-seven marine algae species from the Mediterranean, Aegean, and Sea of Marmara in connection with their cholinesterase and tyrosinase inhibitory activity. *South Afr J of Botany*, 143: 435-442.

Kim, Y.H., Kim, J.H., Jin, H.J., Lee, S.Y. (2013). Antimicrobial activity of ethanol extracts of *Laminaria japonica* against oral microorganisms. *Anaerobe*, 21:34–38.

Kokilam, G., S. Vasuki, and N. Sajitha. (2013). Biochemical composition, alginic acid yield and antioxidant activity of brown seaweeds from Mandapam region, Gulf of Mannar. *J of App Pharm Sci*, 3 (11), pp. 099-104.

Krys, S., & Frémy, J. M. (2002). Phycotoxines et produits de la mer: risques sanitaires associés et mesures de prévention. *Revue Francaise des Laboratoires*, 2002(348), 29-38.

Kuda, T., Kunii, T., Goto, H., Suzuki, T., and Yano, T. (2007). Varieties of antioxidant and antibacterial properties of *Eckloniastolonifera* and *Eckloniakurome* products harvested and processed in the Noto peninsula. *Japan Food Chem*, 103:900-905.

Kumar, A., Buia, M. C., Palumbo, A., Mohany, M., Wadaan, M. A., Hozzein, W. N., AbdElgawad, H. (2020). Ocean acidification affects biological activities of seaweeds: A case study of *Sargassum vulgare* from Ischia volcanic CO₂ vents. *Enviro Pollution*, 259, 113765.

Kumaran, S.P., Kutty, B.C., Chatterji, A., Subrayan, P.P., Mishra, K.P. (2007). Radioprotection against DNA damage by an extract of Indian green mussel, *Pernaviridis*(L). *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 26:263–272.

L

Références bibliographiques

Labaiied, M., Dagan, A., Dellinger, M., Geze, M., Egee, S., Thomas, S.L., Wang, C., Gatt, S.,Grellier,P.(2004). Anti-*Plasmodium* activity of ceramide analogs. *Malar J*, 3:49–59.

la Guardia, M. (2008). Determination of total sterols in brown algae by Fourier transform infrared spectroscopy. *Analytica chimica acta*, 616(2): 185-189.

Lamparczyk, H. (1992). CRC Handbook of Chromatography: Analysis and Characterization of Steroids.

Laphookhieo, S., Syers, J. K., Kiattansakul, R., Chantrapromma, K. (2006). Cytotoxic and antimalarial prenylated xanthenes from *Cratoxylum cochinchinense*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 54(5), 745-747.

Larsen, T.O., Smedsgaard, J., Nielsen, K.F., Hansen, M.E., Frisvad, J.C. (2005). Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Nat Prod Rep*, 22:672–695.

Lategan, C., Kellerman, T., Afolayan, A.F., Mann, M.G., Antunes, E.M., Smith, P.J., Bolton, J.J., Beukes, D.R., 2009. Antiplasmodial and antimicrobial activities of South African marine algal extracts. *Pharm Biol*, 47, 408–413.

Lavanya, R., Veerappan, N. (2011) Antibacterial potential of six seaweeds collected from gulf of mannar of southeast coast of India. *Advances in BiolRes*, 5: 38–44.

Lee, R.E. (2008). Basic characteristics of the algae. In *Phycology*. Fourth ed. Cambridge University Press: Cambridge, pp. 3–29.

Lee, R.E. (2008). *Phycology*, 4th Edition. Cambridge University Press, New York.

Lee, J. C., Hou, M. F., Huang, H. W., Chang, F. R., Yeh, C. C., Tang, J. Y., Chang, H. W. (2013). Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. *Cancer cell international*, 13, 1-7.

Le Lann, K. (2009). *Etude de la biodiversité des Sargassaceae (Fucales, Phaeophyceae) en milieux tempéré et tropical: écologie, chimiotaxonomie et source de composés bioactifs* (Doctoral dissertation, Université de Bretagne occidentale-Brest).

Lever, J., Brkljača, R., Kraft, G., & Urban, S. (2020). Natural products of marine macroalgae from south eastern australia, with emphasis on the port phillip bay and heads regions of victoria. *Marine Drugs*, 18(3), 142.

Références bibliographiques

Li, Y.X., Wijesekara, I., Li, Y., Kim, S.K. (2011). Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochem*, 46, 2219-2224.

Lima-Filho, J. V. M., Carvalho, A. F., Freitas, S. M., & Melo, V. M. (2002). Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern Brazilian coast. *Braz J Microbio*, 33: 311–314.

Lima A.L.A, Alves A.F, Xavier A.L, Mozzini-Monteiro T, Oliveira T.R.R, Leite F.C, Matias W.N, Branco M.V.S.C, Souza M.F.V, Piuvezam M.R, (2016). Anti-inflammatory activity and acute toxicity studies of hydroalcoholic extract of *Herissantia tiubae*. *Rev Bras Farmacogn*, 26: 225-232.

Lins, K. O., Vale, M. L., Ribeiro, R. A., Costa-Lotufo, L. V. (2013). Proinflammatory activity of an alginate isolated from *Sargassum vulgare*. *Carbohydrate polymers*, 92(1), 414-420.

Liu, L., Heinrich, M., Myers, S., & Dworjanyn, S. A. (2012). Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in Traditional Chinese Medicine: A phytochemical and pharmacological review. *J of ethnopharma*, 142(3): 591-619.

López, A., Rico, M., Rivero, A., Suárez de Tangil, M. (2011). The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chem*, 125:1104-1109.

Luo, H. Y., Wang, B., Yu, C. G., Su, C. L. (2010). Evaluation of antioxidant activities of five selected brown seaweeds from China. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(23), 2557-2565

M

Machu, L., Misurcova, L., Vavra Ambrozova, J., Orsavova, J., Mlcek, J., Sochor, J., Jurikova, T. (2015). Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. *Molecules*, 20, 1118-1133.

Magez, S., Truyens, C., Merimi, M., Radwanska, M., Stijlemans, B., Brouckaert, P., Brombacher, F., Pays, E. et de Baetselier, P., 2004. P75 tumor necrosis factor-receptor shedding occurs as a protective host response during African trypanosomiasis. *Journal of Infectious Diseases*, 189 (3): 527-539.

Références bibliographiques

- Manivannan, K., Karthikai,devi, G., Anantharaman P., Balasubramanian T. (2011). Antimicrobial potential of selected brown seaweeds from Vedalai coastal waters, Gulf of Mannar. *Asian Pac J Trop Biomed*, 1:114–120.
- Martins, C. D. L., Ramlov, F., Nocchi Carneiro, N. P., Gestinari, L. M., dos Santos, B. F., Bento, L. M., Soares, A. R. (2013). Antioxidant properties and total phenolic contents of some tropical seaweeds of the Brazilian coast. *J of appl phyco*, 25(4), 1179-1187.
- Martínez, I. H., & Torres Castañeda, H. G. (2013). Preparation and chromatographic analysis of phlorotannins. *Journal of Chromatographic Science*, 51(8), 825-838.
- Matanjan, P., Muhamed, S., Mustapha, N.M., Muhammad, K. (2008). ,Antioxidant activities and phenolics content of eight species of sea weeds from north Borneo. *J ApplPhycol*, 20, 367-373.
- Mattio, L., & Payri, C. E. (2011). 190 years of *Sargassum* taxonomy, facing the advent of DNA phylogenies. *The Botanical Review*, 77(1): 31-70.
- Mattio, L., (2013). Corrigendum to “Taxonomic revision of *Sargassum* sect. *Acanthocarpicae* (Fucales, Phaeophyceae)” [Taxon 59: 896–904. 2010]. *Taxon* 62, 847.
- Meenakshi, S., Gnanambigai, D. M., Mozhi, S. T., Arumugam, M., Balasubramanian, T. (2009). Total flavanoid and *in vitro* antioxidant activity of two seaweeds of Rameshwaram coast. *Global J of Pharmaco*, 3(2): 59-62.
- Metidji, H., Dob, T., Toumi, M., Krimat, S., Ksouri, A., & Nouasri, A. (2015). *In vitro* screening of secondary metabolites and evaluationof antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of *Gelidium sesquipedale* Thuret et Bornet red seaweed from Algeria. *J. Mater. Environ Sci*, 6(11), 3184-3196.
- Mezouar, D., Lahfa, F. B., Abdelouahid, D. E., Adida, H., Rahmoun, N. M., Boucherit-Otmani, Z. (2014). Activité antimicrobienne d’extraits d’écorce de racines de *Berberis vulgaris*. *Phytothérapie*, 6(12), 380-385.
- Mhadhebi, L., Laroche-Clary, A., Robert, J., & Bouraoui, A. (2011). Antioxidant, anti-inflammatory, and antiproliferative activities of organic fractions from the Mediterranean brown seaweed *Cystoseira sedoides*. *Canadian J of physiology and pharmaco*, 89(12), 911-921.
- Mikami, K., & Hosokawa, M. (2013). Biosynthetic pathway and health benefits of fucoxanthin, an algae-specific xanthophyll in brown seaweeds. *International journal of molecular sciences*, 14(7), 13763-13781.

Références bibliographiques

Mollion, J., Moreau, S., & Christiaen, D. (1986). Isolation of a new type of carrageenan from *Rissoella verruculosa* (Bert.) J. Ag.(Rhodophyta, Gigartinales). *Bot Mar*, 29: 549-552.

Mollion, J., Morvan, H., Bellanger, F., & Moreau, S. (1988). ¹³CNMR Study of heterogeneity in the carrageenan system from *Rissoella verruculosa*. *Phytochem*, 27(7), 2023-2026.

Morère, J.L., Pujol, R. (2002). ‘‘Dictionnaire raisonné de biologie’’, Editions Frison-Roche, pp 1222.

Morris, C. J. (2003). Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Inflammation protocols*, 115-121.

Moo-Puc, R., Robledo, D., & Freile-Pelegri, Y. (2008). Evaluation of selected tropical seaweeds for in vitro anti-trichomonal activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(1): 92-97.

Murugan, A., Santhana, R. M. (2003). Biofouling deterrent natural product from the ascidian *Distaplia nathensis*. *Indian J of Marine Sci*, (32): 162–164.

N

Naegelé, E., et Naegelé, A. (1967). *Les Algues*, Presses universitaires de France, deuxième édition, pp 7, 47.

Naja, K., Mawlawi, H., Chbani, A. (2012). Antioxidant and Antifungal activities of *Padinapavonica* and *Sargassum vulgare* from the Lebanese Mediterranean Coast. *Adv Environ Biol*, 6:42–48.

Nara, T., Kamei, Y., Tsubouchi, A., Annoura, T., Hirota, K., Iizumi, K., Aoki, T. (2005). Inhibitory action of marine algae extracts on the *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase activity and on the protozoan growth in mammalian cells. *Parasitology International*, 54(1), 59-64.

NCCLS ‘‘National Committee for Clinical Laboratory Standards’’. 2001. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement, M100-S11, Wayne, PA, USA.

Ndiaye, M., Sy, G., Dièye, A.M., Touré, M.T., Faye, B. (2006). Evaluation de l’activité anti-inflammatoire de feuilles d’*Annona reticulata* (Annonaceae) sur l’œdème aigu de la patte de rat induit par la carragénine. *PharmMédTradAfr*, 15: 179–186.

Références bibliographiques

Nesslany, F., Brugier, S., Mouriès, M. A., Le Curieux, F., & Marzin, D. (2004). In vitro and in vivo chromosomal aberrations induced by megazol. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 560(2), 147-158.

Nitta, I., Watase, H., Tomiie, Y., 1958. Structure of kainic acid and its isomer, allokainic acid. *Nature*, 181, 761–762

O

Ogni, C. A., Kpodekon, M. T., Dassou, H. G., Boko, C. K., Koutinhoun, B. G., Dougnon, J. T., ... & Akoegninou, A. (2014). Inventaire ethno-pharmacologique des plantes utilisées dans le traitement des pathologies parasitaires dans les élevages extensifs et semi-intensifs du Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 8(3), 1089.

Okusa, P.N., Penge, O., Devleeschouwer, M. and Duez, P. (2007). Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordiagilletii* De Wild (Boraginaceae). *J Ethnopharmacol*, 112, 476–481.

Ollivier, G., & Legros, D. (2001). Trypanosomiase humaine africaine: historique de la thérapeutique et de ses échecs. *Tropical Medicine & International Health*, 6(11), 855-863.

Oltmanns, F. (1904). Morphologie und Biologie der Algen, I. 1922. Ibidem, ed. 2.

Orhan, I., Sener, B., Atici, T., Brun, R., Perozzo, R., Tasmemir, D. (2006). Turkish freshwater and marine macrophyte extracts show *in vitro* antiprotozoal activity and inhibit FabI, a key enzyme of *Plasmodium falciparum* fatty acid biosynthesis. *Phytomed*, 13: 388–393.

Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J Nutr*, 44, 307–315.

P

Paivak, L., Lima, E., Neto, A., Baptista, J., (2018). Seasonal variability of the biochemical composition and antioxidant properties of *Fucus spiralis* at two Azorean Islands. *Mar Drugs*, 16: 248.

Références bibliographiques

Parys, S., Rosenbaum, A., Kehraus, S., Reher, G., Glombitza, K. W., & König, G. M. (2007). Evaluation of quantitative methods for the determination of polyphenols in algal extracts. *Journal of natural products*, 70(12), 1865-1870.

Paschapur, S.M., Patil, M.B., Kumar, R., Sachin, R.P. (2009). Evaluation of aqueous extract of leaves of *Ocimumkilimandscharicum* wound healing activity in albino wistar rats. *Int J Pharm Tech Res*, 1(3): 544–550.

Patra, J.K., Patra A.P., Mahapatra, N.K., Thatoi, H.N., Das, S., Sahu, R.K., Swain, G.C. (2009). Antimicrobial activity of organic solvent extracts of three marinemacroalgae from Chilika Lake, Orissa, India. *Malaysian J of Microbiol*, 5 (2): 128-131.

Pereira, L.P., da Silva, R. O., Bringel, P. H. D. S. F., da Silva, K. E. S., Assreuy, A. M. S., Pereira, M. G. (2012). Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: potential anti-inflammatory usage. *Journal of ethnopharmacology*, 139(2), 642-648.

Pérez, R., (1997). Ces algues qui nous entourent. In: Arbault, S., Barbaroux, O., Phliponeau, P., Rouxel, C. (Eds.). France, Plouzané, Editions IFREMER, 272 p.

Pérez, M. J., Falqué, E., Domínguez, H. (2016). Antimicrobial action of compounds from marine seaweed. *Marine drugs*, 14(3), 52.

Person, J. Algues, filières du futur. Livre turquoise. (2011). Algues, filière du futur. Éditions Adebitech, p58-59.

Plouguerné, E., Hellio, C., Cesconetto, C., Thabard, M., Mason, K., Véron, B., daGama, B. A. (2010). Antifouling activity as a function of population variation in *Sargassum vulgare* from the littoral of Rio de Janeiro (Brazil). *J of AppPhyco*. 22(6): 717-724.

Plouguerné, E., De Souza, L. M., Sasaki, G. L., Cavalcanti, J. F., Villela Romanos, M. T., Da Gama, B. A., Barreto-Bergter, E. (2013). Antiviral sulfoquinovosyldiacylglycerols (SQDGs) from the Brazilian brown seaweed *Sargassum vulgare*. *Marine drugs*, 11(11): 4628-4640.

Plouguerné, E., De Souza, L. M., Sasaki, G. L., Hellio, C., Trepos, R., Da Gama, B. A., Barreto-Bergter, E. (2020). Glycoglycerolipids from *Sargassum vulgare* as potential antifouling agents. *Frontiers in Marine Sci*, 7: 116.

Preiser, J. C. (2012). Oxidative stress. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 36(2), 147-154.

Price, J. A., Sanny, C. G., & Shevlin, D. (2006). Application of manual assessment of oxygen radical absorbent capacity (ORAC) for use in high throughput assay of “total”

Références bibliographiques

antioxidant activity of drugs and natural products. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 54(1), 56-61.

Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*, 269(2), 337–341.

Prud'Homme van Reine, W. F. (1982). A taxonomic revision of the European *Sphacelariaceae* (*Sphacelariales*, *Phaeophyceae*). *Leiden Botanical Series*, 6(1), 3-293.

Q

R

Raj, G.A., Chandrasekaran, M., Krishnamoorthy, S., Venkatesalu, V. (2015). Antibacterial activity of different solvent extracts of *Caulerpacehmnitzia* (Esper) JV Lamououx, from Mandapam, Gulf of Mannar Southeast Coast, Tamil Nadu, India. *J of Medl Herbs and Ethnomed*, 1(1): 24–31.

Rastian, Z., Mehranian, M., Vahabzadeh, F., & Sartavi, K. (2007). Antioxidant activity of brown algae *Sargassum vulgar* and *Sargassum angustrifolium*. *J of Aqua Food Prod Tech*, 16(2): 17-26.

Ravikumar, S., Jacob Inbaneson, S.J., Suganthi, P. (2011). Seaweeds as a source of lead compounds for the development of new antiplasmodial drugs from South East coast of India. *ParasitolRes*, 109:47–52.

Remya, R. R., Samrot, A. V., Kumar, S. S., Mohanavel, V., Karthick, A., Chinnaiyan, V. K., Muhibbullah, M. (2022). Bioactive potential of brown algae. *Adsorption Science & Technology*, 2022, 1-13.

Riahi, R. C., Tarhouni, S., & Kharrat, R. (2011). Criblage de l'effet anti-inflammatoire et analgésique des algues marines de la mer méditerranée. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 88(1-4), 19.

Roca, I., Akova, M., Baquero, F., Carlet, J., Cavaleri, M., Coenen, S., ... Vila, J. (2015). The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New microbes and new infections*, 6, 22-29.

Références bibliographiques

Rodriguez, C., Alaswad, A., Mooney, J., Prescott, T., & Olabi, A. G. (2015). Pre-treatment techniques used for anaerobic digestion of algae. *Fuel processing technology*, 138, 765-779.

Romanik, G., Gilgenast, E., Przyjazny, A., Kamiński, M. (2007). Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. *J biochembiophymethods*, 70(2): 253–261.

S

Sabeena Farvin, K.H., Jacobsen, C. (2013). Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chem*, 138: 1670-1681.

Sahnouni, F., Benattouche, Z., Matallah-Boutiba, A., Benchohra, M., Moumen Chentouf, W., Bouhadi, D., & Boutiba, Z. (2016). Antimicrobial activity of two marine algae *Ulva rigida* and *Ulva intestinalis* collected from Arzew gulf (Western Algeria). *J. Appl. Environ Biol Sci*, 6(1): 242-248.

Salem, W.M., Galal, H., Nasr El-deen, F. (2011). Screening for antibacterial activities in some marine algae from the red sea. *Afr J Microbiol Res*, 5:2160–2167.

Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric*, 76, 270–276.

Sari-Chmayssem, N., Taha, S., Mawlawi, H., Guégan, J. P., Jeftić, J., & Benvegna, T. (2016). Extracted and depolymerized alginates from brown algae *Sargassum vulgare* of Lebanese origin: Chemical, rheological, and antioxidant properties. *J of Applied Phyco*, 28(3): 1915-1929.

Sarithakumari, C.H., Renju, G.L., Kurup, G.M. (2012). Anti-inflammatory and antioxidant potential of alginic acid isolated from the marine algae, *Sargassum wightii* on adjuvant-induced arthritic rats. *Inflammopharmacology*, 21(3):261-8.

Sasidharan, S., Darah, I., Noordin, M.K.M.J. (2009). Screening antimicrobial activity of various extracts of *Gracilariachangii*. *Pharm Biol*, 47:72–76.

Saunders, G. W., Chiovitti, A., & Kraft, G. T. (2004). Small-subunit rDNA sequences from representatives of selected families of the Gigartinales and Rhodymeniales

Références bibliographiques

(Rhodophyta). 3. Delineating the Gigartinales sensu stricto. *Canadian J of botany*, 82(1): 43-74.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), 287-306.

Séridi, H., (2007). Etude de la flore algale de l'Algérie. Etude phytosociologique des peuplements algaux photophyles de l'infralittoral superficiel de substrat dur, thèse de doctorat en sciences de la nature. USTHB .174p.

Shibata T, Ishimaru K, Kawaguchi S, Yoshikawa H, Hama Y. (2008). Antioxidant activities of phlorotannins isolated from Japanese *Laminariaceae*. *J Appl Phycol*, 20(5):705–711.

Shreadah, M. A., El Moneam, N. M. A., Al-Assar, S. A., & Nabil-Adam, A. (2018). Phytochemical and pharmacological screening of *Sargassum vulgare* from Suez Canal, Egypt. *Food sci and biotech*, 27(4): 963-979.

Shahidi, F. (2009). Nutraceuticals and functional foods: whole versus processed foods. *Trends in Food Sci Tech*, 20(9): 376-387.

Shahin, A., Nabil-Adam, A., Elnagar, K., Osman, H., Shreadah, M. A. (2022). Bioactivity and metabolomics fingerprinting characterization of different organic solvents extracts of *Padina pavonica* collected from Abu Qir Bay, Egypt. *Egyptian Journal of Chemistry*, 65(12), 207-225.

Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*, 86, 715-748.

Silva, G., Pereira, R. B., Valentão, P., Andrade, P. B., Sousa, C. (2013). Distinct fatty acid profile of ten brown macroalgae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(4): 608-613.

Singh, B., Sung, L. K., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, S. S. G., Cox-Singh, J., Thomas, A. & Conway, D. J. (2004). A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. *The Lancet* 363(9414): 1017-1024.

Singh, M., Kumar, V., Singh, I., Gauttam, V., Kalia, A. N. (2010). Anti-inflammatory activity of aqueous extract of *Mirabilis jalapa* Linn. leaves. *Pharmacognosy research*, 2(6), 364.

Steevensz, A.J., MacKinnon, S.L., Hankinson, R., Craft, C., Connan, S., Stengel, D.B., Melanson, J.E. (2012). Profiling phlorotannins in brown macroalgae by liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *Phytochem Anal*, 23: 547-553.

Références bibliographiques

Stirk, W. A., Schwalb, A. N., Light, M. E., Medková, J., Lenobel, R., Strnad, M., & Van Staden, J. (2003). Potential medicinal value of some South African seaweeds. *South African journal of botany*, 69(4), 462-468.

Singleton, V. L., Rossi, J. R. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic –phosphothungstic acid. *Am J Enol Vitic*, 16, 144–158.

Souza, B.W.S., Cerqueira, M.A., Martins, J.T., Quintas, M.A.C., Ferreira, A.C.S., Teixeira, J.A., et al. (2011). Antioxidant potential of two red seaweeds from the Brazilian coasts. *J Agric Food Chem*, 59:5589-5594.

Stiger-Pouvreau, V., Jegou, C., Cerantola, S., Guérard, F., & Le Lann, K. (2014). Phlorotannins in Sargassaceae species from Brittany (France): Interesting molecules for ecophysiological and valorisation purposes. In *Advances in botanical research*, 71, 379-411

Sugiura, Y., Tanaka, R., Katsuzaki, H., Imai, K., & Matsushita, T. (2013). The anti-inflammatory effects of phlorotannins from *Eisenia arborea* on mouse ear edema by inflammatory inducers. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 2019-2023.

Sugiura, Y., Usui, M., Katsuzaki, H., Imai, K., & Miyata, M. (2017). Anti-inflammatory effects of 6, 6'-bieckol and 6, 8'-bieckol from *Eisenia arborea* on mouse ear swelling. *Food Science and Technology Research*, 23(3), 475-480.

Sun, B., Ricardo-da-Silva, J.M., Spranger, I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Jagri food chemy*, 46(10): 4267–4274.

T

Takaichi, S. (2011). Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. *Marine drugs*, 9(6), 1101-1118.

Talhouk, R. S., Karam, C., Fostok, S., El-Jouni, W., & Barbour, E. K. (2007). Anti-inflammatory bioactivities in plant extracts. *Journal of medicinal food*, 10(1), 1-10.

Taskin, E., Ozturk, M., Kurt, O. (2007). Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). *African J of Biotech*, 6.24: 2746–2751.

Terasaki, M., Hirose, A., Narayan, B., Baba, Y., Kawagoe, C., Yasui, H., Saga, N., Hosokawa, M., Miyashita, K. (2009). Evaluation of recoverable functional lipid components of several brown seaweeds of Japan with special reference to fucoxanthin and fucosterol contents. *J Phycol*, 45, 974–980.

Références bibliographiques

Thinakaran, T., Sivakumar, K. (2013). Antifungal activity of certain seaweeds from Puthumadam coast. *Int J Res Rev Pharm Appl Sci*, 3(3), 341-350.

Torres, F. A., Passalacqua, T. G., Velásquez, A., Souza, R. A. D., Colepicolo, P., Graminha, M. A. (2014). New drugs with antiprotozoal activity from marine algae: a review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24, 265–276.

Trager, W., Jensen, J. B. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193(4254): 673-675.

Tremblin, G. (2016). Les algues, une ressource aux applications multiples: Nutrition, Santé, Cosmétologie, Bioénergie, Environnement [The algae, a resource with multiple applications: Nutrition, Health, Cosmetics, Bioenergy, Environment]. *Nutrition & Santé*

U

V

Vairappan, C. S., Suzuki, M., Ishii, T., Okino, T., Abe, T., Masuda, M. (2008). Antibacterial activity of halogenated sesquiterpenes from Malaysian *Laurencia* spp. *Phytochemistry*, 69:2490–2494.

Van Bogaert, L. (1958). La trypanosomiase africaine. *Nervensystem: Erkrankungen des Zentralen Nervensystems II*, 1086-1099.

Véliz, K., Chandía, N., Karsten, U., Lara, C., Thiel, M., (2019). Geographic variation in biochemical and physiological traits of the red seaweeds *Chondracanthus chamissoi* and *Gelidium lingulatum* from the south east Pacific coast. *J Appl Phycol*, 31: 665-682.

Venkatesan, J., Keekan, K. K., Anil, S., Bhatnagar, I., Kim, S. K. (2019). Phlorotannins. *Encyclopedia of food chemistry*, 515.

Von Elbe, J.H., Schwartz, S.J. (1996). Colorants. *Food Chem*, 651-722.

Vonthron-Sénécheau, C. (2016). Medicinal properties: Antibiotic, tonic, and antiparasitic properties. *Seaweed in health and disease prevention. Academic Press*, 369-388.

W

Références bibliographiques

Wang, T., Jonsdottir, R., & Ólafsdóttir, G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food chem*, 116(1),

White, M. (1999). Mediators of inflammation and the inflammatory process. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103(3), S378-S381.

Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W. (1962). Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*, 111: 544–547.

X

Xu, D. P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., ... Li, H. B. (2017). Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 96.

Y

Yamthe, L.R.T., Appiah-Opong, R., Fokou, P.V.T., Tsabang, N., Boyom, F.F., Nyarko, A.K., Wilson, M.D. (2017). Marine algae as source of novel antileishmanial drugs: A review. *Mar Drugs*, 15: 323.

Yamthe, L.R.T., Philips, T.J., Osei-Safo, D., Djouonzo, P.T., Agyapong, O., Dotse, E., TsouhFokou, P.V., Kwofie, S. K., Boyom, F. F., Nyarko, A.K., Appiah-Opong, R., Wilson, M.D. (2020). Antileishmanial effects of *Sargassum vulgare* products and prediction of trypanothione reductase inhibition by fucosterol. *Future Drug Discovery*, 2(3).

Yoshie-Stark, Y. (2003). Distribution of flavonoids and related compounds from seaweeds in Japan. *J Tokyo Univ Fish*, 89, 1–6.

Z

Zhang, Q., Zhang, J., Shen, J., Silva, A., A. Dennis, D., J. Barrow, C. (2006). A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *J Appl Phycol*, 18: 445-450.

Zhang, W.W., Duan, X.J., Huang, H.L., Zhang, Y., and Wang, B.G. (2007). Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao coast for antioxidative capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions and subfractions derived from *Symphyclocladia latiuscula* (Rhodomelaceae). *J Appl Phycol*, 19:97-108.

Références bibliographiques

Zhang, C. H., Wu, W. H., Wang, J., & Lan, M. B. (2012). Antioxidant Properties of Polysaccharide from the Brown Seaweed *Sargassum graminifolium* (Turn.), and Its Effects on Calcium Oxalate Crystallization. *Marine drugs*, 10(1), 119-130.

Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 64 (4), 555–559.

Zitouni, H. (2015). Valorisation nutritionnelle d'algues marines du littoral Algérien chez le ruminant via des méthodes chimiques, biologiques et moléculaires (Doctoral dissertation, Thèse de 3ème cycle LMD en biotechnologie microbienne. Université des Frères Mentouri, Constantine).1p.

Zolotariova, Ye. K., Mokrosnop, V. M., &Stepanov, S. S. (2019). Polyphenol compounds of macroscopic and microscopic algae. *Inter J on Algae*, 21(1).

Zubia, M., Fabre, M. S., Kerjean, V., Le Lann, K., Stiger-Pouvreau, V., Fauchon, M., & Deslandes, E. (2009). Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food chemistry*, 116(3), 693-701.

Zwenger, S. (2008). Plant terpenoids: applications et future potentials. *Biotechnology et Molecular Biology Reviews*, 3(1), 1-7.

Annexes

Annexe 1

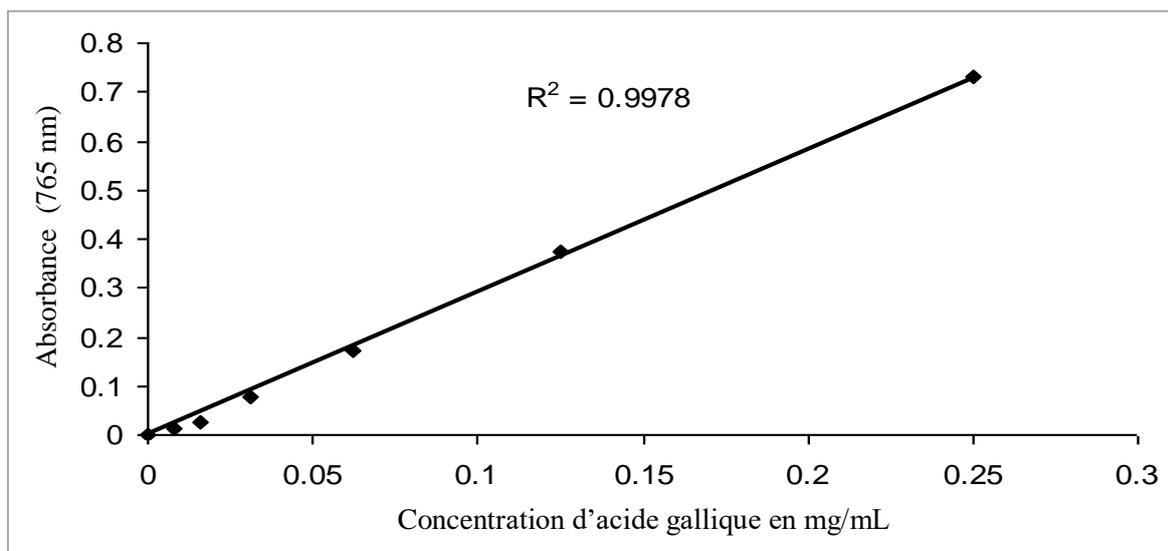


Figure A.1. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols.

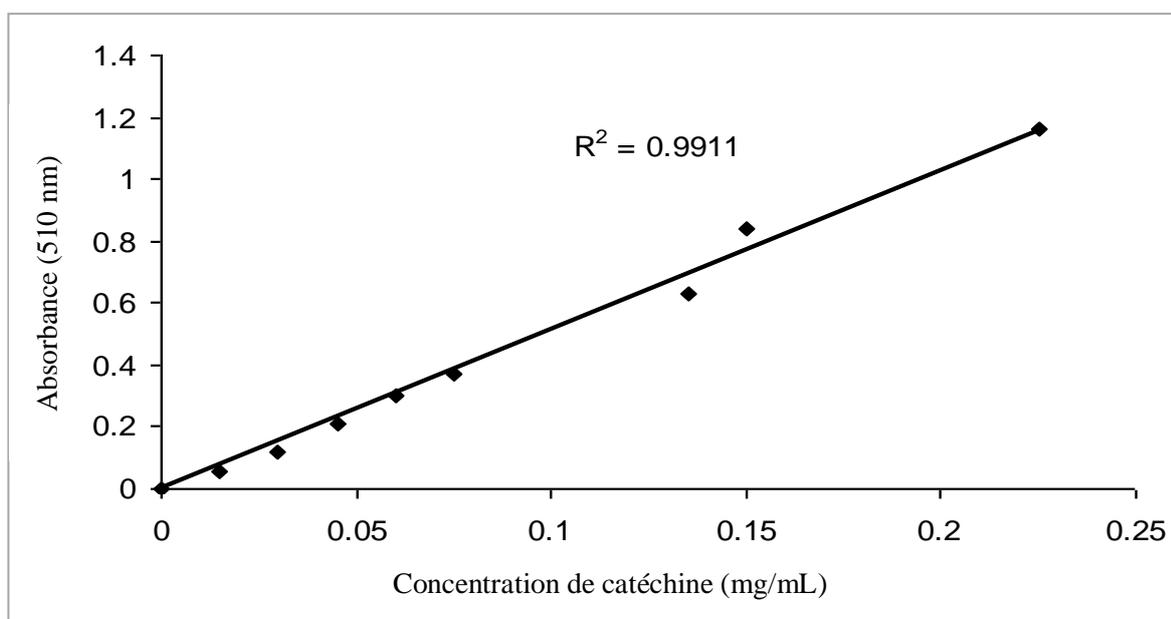


Figure A.2. Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

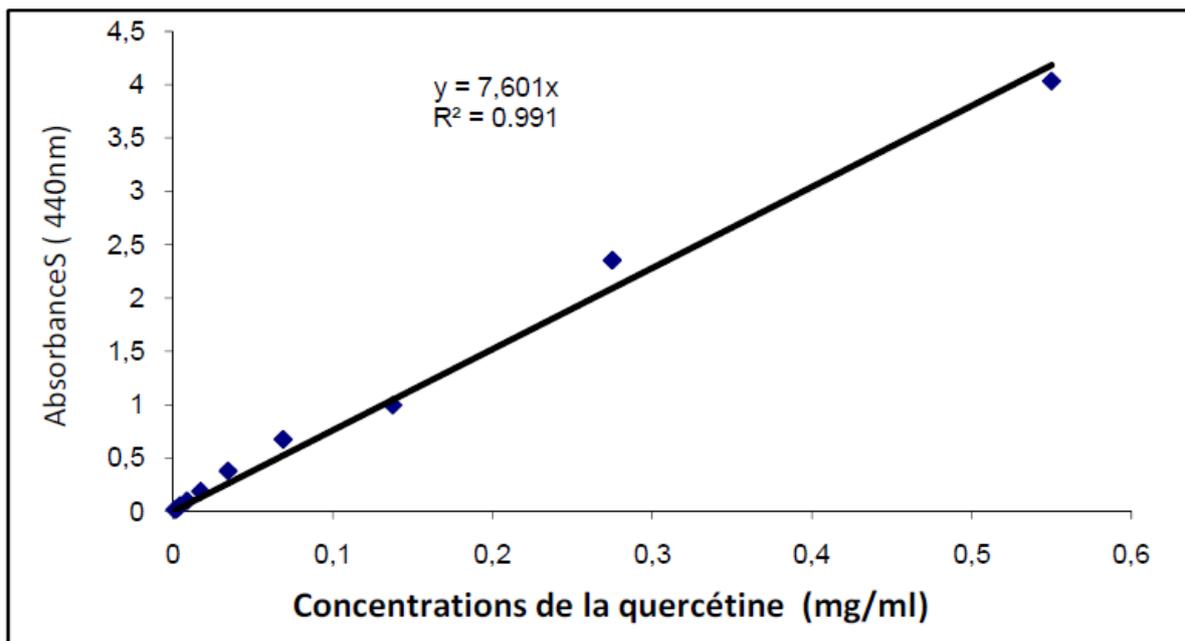


Figure A.3. Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonols.

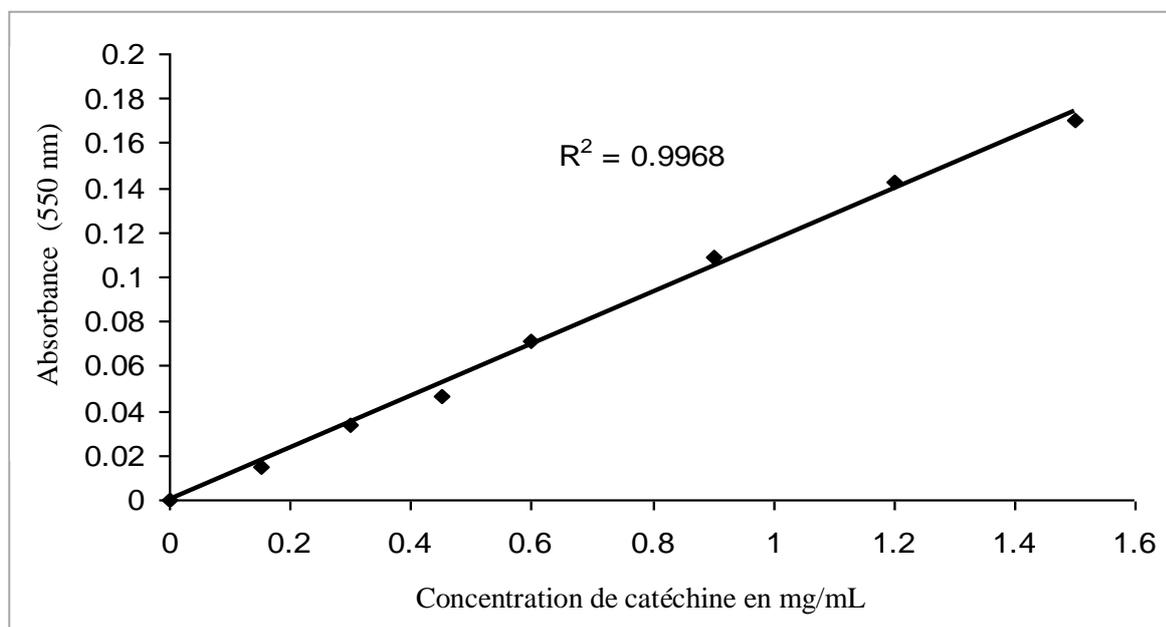


Figure A.4. Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés.

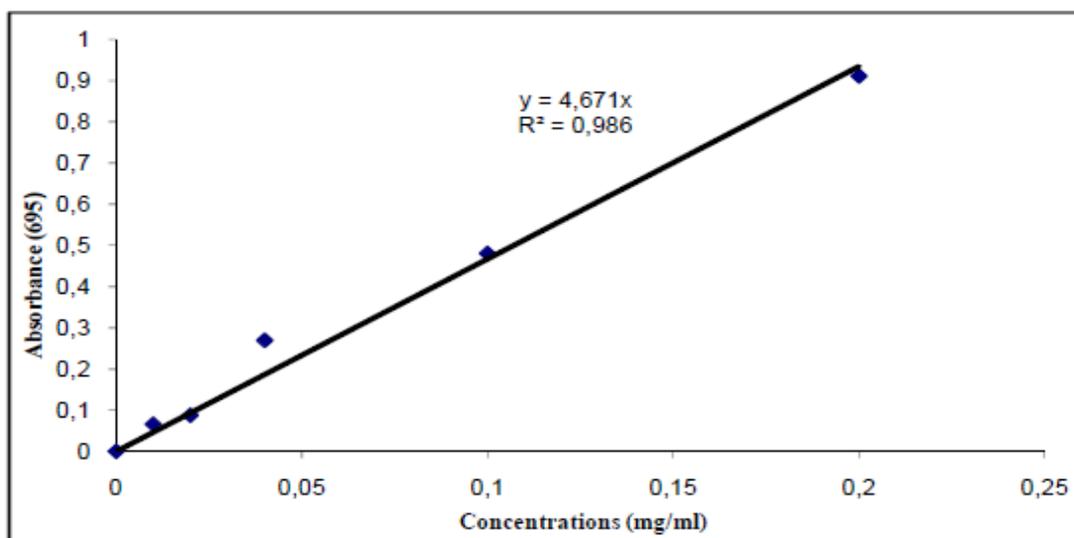


Figure A.5. Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour la mesure de la capacité antioxydante totale.

Tableau A.1. Capacité antioxydante totale des extraits bruts et des fractions de *Sargassum vulgare*, *Cladostephus hirsutus* et *Rissoella verruculosa* (mg EAA / g MS).

Extrait brut et fractions	mg EAA/g MS ^a		
	<i>S. vulgare</i>	<i>C. hirsutus</i>	<i>R. verruculosa</i>
EB	1,583±0,042	1,631±0,008	1,272±0,009
FEP	0,575±0,001	0,465±0,0053	0,142±0,001
FAE	0,897±0,002	1,383±0,008	0,3657±0,003
FDCM	0,078±0,001	0,332±0,002	0,0125±0,000
FBOH	0,165±0,000	0,206±0,001	0,103±0,000
FA	0,085±0,002	0,237±0,001	0,325±0,010

EB: Extrait brut; FEP: fraction d'éther de pétrole; FAE: fraction d'acétate d'éthyle; FDCM: fraction dichlorométhane; FBOH: fraction butanolique; FA: fraction aqueuse ; ^a: mg équivalent d'acide ascorbique / g de la matière sèche.

Tableau A. 2. Pouvoir réducteur de Fe³⁺ (test de FRAP) des extraits bruts et des fractions de *Sargassum vulgare*, *Cladostephus hirsutus* et *Rissoella verruculosa* (EC₅₀:mg /mL).

Extrait brut et fractions	EC ₅₀ mg/mL		
	<i>S. vulgare</i>	<i>C. hirsutus</i>	<i>R. verruculosa</i>
EB	3,171±0,005	2,656±0,008	3,718±0,009
FEP	2,241±0,013	1,996±0,000	10,194±0,242
FAE	1,276±0,001	1,281±0,006	1,114±0,000
DCM	3,251±0,000	12,826±0,059	2,8506±0,137
BOH	15,638±0,005	10,7±0,518	2,7911±0,017
FA	24,205±0,738	18,369±2,503	5,4217±0,018

EB: Extrait brut; FEP: fraction d'éther de pétrole; FAE: fraction d'acétate d'éthyle; FDCM: fraction dichlorométhane; FBOH: fraction butanolique; FA: Fraction aqueuse

Tableau A. 3. Pouvoir antiradicalaire par le test de DPPH' des extraits bruts et des fractions de *Sargassum vulgare* (en % d'inhibition).

Extrait brut et fractions	Concentration mg/mL						
	0,5	1	2	3	4	5	6
EB	1,78±0,069	2,28±0,069	4,07±0,436	6,89±0,357	12,602±0,525	14,794±0,347	16,763±0,357
FEP	0,23±0,021	0,78±0,029	1,94±0,649	3,37±0,649	4,656±0,309	6,366±0,369	8,599±0,069
FAE	3,37±0,084	8,98±0,374	16,56±0,263	21,74±0,101	32,298±0,182	32,298±0,131	43,233±0,06
FDCM	3,50±0,153	5,67±0,344	7,36±0,258	8,55±0,89	11,545±0,622	11,545±0,488	16,874±0,325
FBOH	0,54±0,273	1,99±0,243	3,73±0,111	4,32±0,395	7,47±0,668	7,47±0,425	10,165±0,03
FA	1,27±0,058	1,51±0,164	1,89±0,067	2,54±0,126	3,476±0,378	3,476±0,174	6,316±0,223

EB: Extrait brut; FEP: fraction d'éther de pétrole; FAE: fraction d'acétate d'éthyle; FDCM: fraction dichlorométhane; FBOH: fraction butanolique; FA: Fraction aqueuse.

Tableau A. 4. Pouvoir antiradicalaire par le test de DPPH' des extraits bruts et des fractions de *Cladostephus hirsutus* (en % d'inhibition).

Extrait brut et fractions	Concentration mg/mL						
	0,5	1	2	3	4	5	6
EB	0,245±0,043	2,15±0,043	5,467±0,521	10,221±0,575	11,296±0,228	14,79±0,217	17,001±0,021
FEP	1,503±0,088	1,871±0,117	3,783±0,235	5,654±1,489	8,316±0,058	11,947±0,058	12,286±0,441
FAE	5,347±0,279	10,908±0,212	19,186±0,234	25,3712±0,402	30,608±0,927	33,988±1,128	43,933±0,424
FDCM	0,875±0,44	1,557±0,272	2,781±0,178	5,651±0,776	8,654±0,094	9,151±0,083	9,344±0,083
FBOH	2,538±0,301	3,054±0,194	8,228±0,064	8,449±0,642	11,325±0,35	14,042±0,184	16,382±0,223
FA	0,844±0,199	3,073±0,062	4,488±0,052	8,885±0,785	10,362±0,9	14,05±0,435	16,435±0,649

EB: Extrait brut; FEP: fraction d'éther de pétrole; FAE: fraction d'acétate d'éthyle; FDCM: fraction dichlorométhane; FBOH: fraction butanolique; FA: fraction aqueuse.

Tableau A. 5. Pouvoir antiradicalaire par le test de DPPH' des extraits bruts et des fractions de *Rissoella verruculosa* (en % d'inhibition).

Extrait brut et fractions	Concentration mg/mL						
	0,5	1	2	3	4	5	6
EB	1,629±1,179	3,726±0,928	6,979±0,655	10,566±0,043	13,113±0,415	13,884±0,054	18,121±0,906
FEP	0,892±0,592	1,73±0,373	3,996±0,197	5,51±1,284	7,504±0,482	7,59±0,647	10,818±0,603
FAE	6,707±0,882	12,973±0,791	24,277±1,518	36,884±0,506	43,077±1,012	58,748±0,415	67,877±0,454
FDCM	0,164±0,179	2,782±0,37	5,025±2,802	7,935±1,121	11,15±2,411	14,055±1,449	16,206±1,776
FBOH	6,747±1,435	10,176±1,076	16,713±1,547	21,787±0,891	30,339±0,891	37,861±1,099	39,356±0,215
FA	2,62±0,888	5,695±0,541	8,294±0,173	12,041±1,653	15,254±3,828	20,1054±0,132	20,921±0,163

EB: Extrait brut; FEP: fraction d'éther de pétrole; FAE: fraction d'acétate d'éthyle; FDCM: fraction dichlorométhane; FBOH: fraction butanolique; FA: Fraction aqueuse.

Valorisation des travaux de recherche

Valorisation des travaux de thèse

Les résultats de mes travaux de thèse ont été publiés en deux parties : l'une dans un journal scientifique internationale à facteur d'impact (**FI : 2.861**), et l'autre dans une revue nationale à comité de lecture. De plus, ces travaux ont été présentés dans des congrès nationaux et internationaux.

➤ *Publication scientifique dans une revue internationale à comité de lecture*

1. Natural Product Research. DOI:10.1080/14786419.2017.1405403; 2017. Antimicrobial and antiparasitic activities of three algae from the northwest coast of Algeria.

Aissaoui Ghania, Belyagoubi-Benhammou Nabila, Belyagoubi Larbi, Mouray Elisabeth, Grellier Philippe, Benmahdjoub Mariem, Kerzabi-Kanoun Khadidja, Benguedda-Rahal Wacila & Atik-Bekkara Fawzia.

➤ *Publication scientifique dans une revue nationale à comité de lecture*

2. Journal of Natural Product Research and Applications. DOI: 10.46325/jnpra.v2i1.40. 2022 Assessment of *in vitro* antioxidant and *in vivo* anti-inflammatory activities of marine algae from Algerian coast.

Aissaoui Ghania, Belyagoubi-Benhammou Nabila, Belyagoubi Larbi, Mansour Sadia, Djebli Nouredine, Benmahdjoub Mariem, Kerzabi-Kanoun Khadidja, Bouakline Houssam, Benguedda-Rahal Wacila, Atik-Bekkara Fawzia.

➤ *Communication scientifiques nationales*

1. **Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante de l'algue verte *Ulva lactuca* de la côte ouest d'Algérie.** Aissaoui Ghania, Belyagoubi-Benhammou Nabila, Belyagoubi Larbi, Benmahdjoub Mariem, Kerzabi-Kanoun Khadidja, Benguedda-Rahal Wacila & Atik-Bekkara Fawzia. *La 1^{ère} journée scientifique des sciences de l'agriculture, Environnement et santé*, 03 juin 2014. Université de Tlemcen (Algérie).
2. **Propriétés antioxydantes des extraits bruts de trois algues du littoral ouest d'Algérie.** Aissaoui Ghania, Belyagoubi-Benhammou Nabila, Belyagoubi Larbi, Benmahdjoub Mariem, Kerzabi-Kanoun Khadidja, Benguedda-Rahal Wacila & Atik-Bekkara Fawzia. *La 4^{ème} journée des doctorants, association nationale des enseignants et chercheurs Algériens*, 07 mars 2016. Université d'Oran (Algérie).

➤ *Communication scientifiques internationales*

1. **Impact du solvant d'extraction sur le profil polyphénolique d'*Ulva lactuca* de la côte ouest d'Algérie.** Aissaoui Ghania, Belyagoubi-Benhammou Nabila, Belyagoubi Larbi, Benmahdjoub Mariem, Kerzabi-Kanoun Khadidja, Benguedda-Rahal Wacila & Atik-Bekkara Fawzia. *II^{ème} Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources*. Du 18 au 20 Mars 2014, Tabarka (Tunisie).
2. **Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait brut de *Rissoella verruculosa* de la côte ouest d'Algérie.** Aissaoui Ghania, Belyagoubi-Benhammou Nabila, Belyagoubi Larbi, Benmahdjoub Mariem, Kerzabi-Kanoun Khadidja, Benguedda-Rahal Wacila & Atik-Bekkara Fawzia. *La 2^{ème} journée internationale sur les sciences de l'Agriculture, Environnement et Santé*. 15 avril 2015. Université de Tlemcen (Algérie).
3. **Etude phytochimique et évaluation du pouvoir antioxydant de l'extrait méthanolique de l'algue rouge (*Porphyra* sp.) du littoral ouest algérien.** Aissaoui Ghania, Belyagoubi-Benhammou Nabila, Belyagoubi Larbi, Benmahdjoub Mariem, Kerzabi-Kanoun Khadidja, Benguedda-Rahal Wacila & Atik-Bekkara Fawzia. *The first international congress of nutrition and food science "From Bench to Bedside"*. 20-22 novembre 2015. Université de Tlemcen (Algérie).
4. **Propriétés antioxydantes de l'extrait brut et des fractions de l'algue brune *Sargassum vulgare* du littoral ouest algérien.** Aissaoui Ghania, Belyagoubi-

Benhammou Nabila, Belyagoubi Larbi, Benmahdjoub Mariem, Kerzabi-Kanoun Khadidja, Benguedda-Rahal Wacila & Atik-Bekkara Fawzia. *Le 4^{ème} congrès international de nutrition*. 22-24 avril 2016, Hammamet (Tunisie).

➤ **Articles en collaboration**

1. Algerian Journal of Environmental Science and Technology; 2021. Seasonal variation in polyphenol content and antioxidant activity of the Brown Alga *Cystoseiraamentaceae* var. *stricta* (*sargassaceae*) from Northwest coast of Algeria
Benmahdjoub Mariem, Belyagoubi-Benhammou Nabila, Belyagoubi Larbi, **Aissaoui Ghania**, El ZereyBelaskri Asma, Kerzabi-Kanoun Khadidja, Benguedda-Rahal Wacila & Atik-Bekkara Fawzia.
2. Natural Product Research and applications; 2021. Antioxidant Activity of Brown Seaweed (*Padina pavonica* (L.) Extracts From the Algerian Mediterranean Coast.
Kerzabi-Kanoun Khadidja, Belyagoubi-Benhammou Nabila, Belyagoubi Larbi, Benmahdjoub Mariem, **Aissaoui Ghania**, Benguedda-Rahal Wacila & Atik-Bekkara Fawzia.



Natural Product Research

Formerly Natural Product Letters

ISSN: 1478-6419 (Print) 1478-6427 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>

Antimicrobial and antiparasitic activities of three algae from the northwest coast of Algeria

Aissaoui Ghania, Belyagoubi-Benhammou Nabila, Belyagoubi Larbi, Mouray Elisabeth, Grellier Philippe, Benmahdjoub Mariem, Kerzabi-Kanoun Khadidja, Benguedda-Rahal Wacila & Atik-Bekkara Fawzia

To cite this article: Aissaoui Ghania, Belyagoubi-Benhammou Nabila, Belyagoubi Larbi, Mouray Elisabeth, Grellier Philippe, Benmahdjoub Mariem, Kerzabi-Kanoun Khadidja, Benguedda-Rahal Wacila & Atik-Bekkara Fawzia (2017): Antimicrobial and antiparasitic activities of three algae from the northwest coast of Algeria, *Natural Product Research*, DOI: [10.1080/14786419.2017.1405403](https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1405403)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1405403>

 View supplementary material 

 Published online: 22 Nov 2017.

 Submit your article to this journal 

 View related articles 

 View Crossmark data 

SHORT COMMUNICATION



Antimicrobial and antiparasitic activities of three algae from the northwest coast of Algeria

Aissaoui Ghania^a, Belyagoubi-Benhammou Nabila^a, Belyagoubi Larbi^a, Mouray Elisabeth^b, Grellier Philippe^b, Benmahdjoub Mariem^a, Kerzabi-Kanoun Khadidja^a, Benguedda-Rahal Wacila^c and Atik-Bekkara Fawzia^a

^aLaboratoire des Produits Naturels (LAPRONA), Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algérie; ^bUMR 7245 CNRS MCAM, Muséum National d'Histoire Naturelle, Sorbonne-Universités, Paris, France; ^cValorisation des actions de l'homme pour la protection de l'environnement et application en santé publique, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algérie

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the biological activities of Algerian algae, *Sargassum vulgare*, *Cladostephus hirsutus* and *Rissoella verruculosa*. Antimicrobial activity of the crude extracts and their fractions was assessed using the disc diffusion assay, the minimum inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration. Antiparasitic activity was studied *in vitro* against the blood stream forms of *Trypanosoma brucei brucei* and the intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. Ethyl acetate (EA) fractions of the three tested algae showed more potent antimicrobial activity against *S. aureus* (7–14.5 mm) and *B. cereus* (7–10.75 mm), MIC values ranged from 0.9375 to 7.5 mg mL⁻¹ and MBC values > 15 mg mL⁻¹. Concerning the antiparasitic activity, EA fractions of *S. vulgare* (IC₅₀ = 9.3 µg mL⁻¹) and *R. verruculosa* (IC₅₀ = 11.0 µg mL⁻¹) were found to be more effective against *T. brucei brucei*, whereas the three EA fractions were little active against *P. falciparum*.

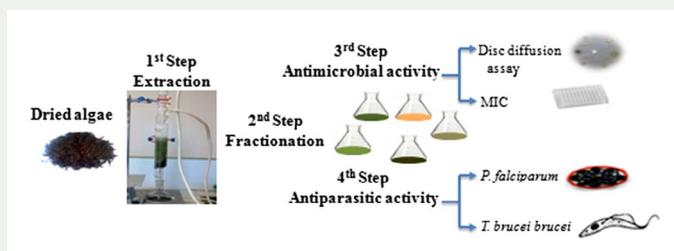
ARTICLE HISTORY

Received 25 July 2017

Accepted 3 November 2017

KEYWORDS

Sargassum vulgare;
Cladostephus hirsutus;
Rissoella verruculosa;
antimicrobial activity;
antiparasitic activity



1. Introduction

Marine algae are valuable reservoir of structurally diverse bioactive compounds, such as carotenoids, terpenoids, xanthophylls, chlorophylls, phlorotannins, alkaloids, vitamins, amino acids, polysaccharides and lipids (Cabrita et al. 2010; Govindasamy et al. 2012). Compounds

CONTACT Belyagoubi-Benhammou Nabila ✉ nabila.benhammou79@yahoo.fr

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1405403>.

with antimicrobial, antioxidant, antiviral, antihelminthic, cytotoxic, anti-inflammatory and antimitotic activities have been detected in green, red and brown algae (Demirel et al. 2009; Govindasamy et al. 2012). The continuous research for new antimicrobial and new natural antiprotozoal secondary metabolites from marine algae is considered as an alternative to combat emergence of multi-drug resistance organisms and higher risk of infectious diseases caused by these organisms (Charneau et al. 2015; Darah and Sheh-Hong 2015).

Algeria is a country with a littoral stretching over 1200 km that constitutes a rich reservoir of biodiversity still not well explored. In fact, there is paucity of data on algae biological activities. The present work aimed to study the antimicrobial and the antiparasitic activities of two brown algae *Sargassum vulgare* and *Cladostephus hirsutus*, and the red alga *Rissoella verruculosa* from the north-west coast of Algeria.

2. Results and discussion

2.1. Antimicrobial activity test, MIC and MBC

Antimicrobial activity of crude extracts and fractions of *S. vulgare*, *C. hirsutus* and *R. verruculosa* by agar disc diffusion was summarised in Table S1. All the Gram negative strains (*E. coli*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*), one Gram positive strain (*M. luteus*) and the yeast strain (*C. albicans*), did not respond to most of crude extracts and fractions of the three tested algae, whereas antibacterial activity was observed on the other Gram positive strains, *S. aureus* and *B. cereus*. Among the three tested algae, *C. hirsutus* was observed to be the most effective. The inhibition zone measured ranged between 7 and 14.5 mm against *S. aureus* and varied between 7 and 10.75 mm against *B. cereus*. This activity increased linearly with the concentration of crude extracts and fractions (mg mL^{-1}) of all algal species.

Most of bacteria tested were resistant to Ampicillin and sensitive to Cefotaxime and Tetracycline. Numerous studies demonstrate the antibacterial activities of extracts from several species of algae against bacterial pathogens (Kim et al. 2013). Alghazeer et al. (2013) reported a significant antibacterial effect of aqueous and methanolic crude extracts of 19 species of marine algae from the western coast of Libya, against Gram-positive as well as Gram-negative pathogenic bacteria. Naja et al. (2012) noted the absence of antifungal activity in crude extract and fractions of *S. vulgare* from the Lebanese Mediterranean Coast against *C. albicans*, which was in accordance with our results.

MIC and MBC values of EA fractions are shown in Table S2. EA fraction of *C. hirsutus* showed the strongest inhibition against *S. aureus* and *B. cereus* with a minimum inhibitory concentration of 0.937 and 1.875 mg mL^{-1} , respectively, followed by EA fraction of *S. vulgare* (MIC: 1.875, 3.75 mg mL^{-1}) and EA fraction of *R. verruculosa* (MIC: 3.75, 7.5 mg mL^{-1}). The MBC values for the three tested fractions were superior to 15 mg mL^{-1} . The present results are supported by previous investigations; it was reported by Salem et al. (2011) and Adaikala Raj et al. (2015) that ethyl acetate was the best solvent for isolation of antimicrobial compounds from some species of marine algae. MIC values of 3.125 to 6.25 mg mL^{-1} were determined in methanol–chloroform, diethyl ether, ethyl acetate and butanol extracts of the red alga *Gracilaria changii* (Sasidharan et al. 2009). Antibacterial activity depends on algal species, the habitat and the season of algal collection, different growth stages of alga, the capability of the extraction protocols to recover the active metabolites and finally, differences in the

assay methods that would result in different susceptibilities of the target strains (Manivannan et al. 2011; Salem et al. 2011).

2.2. Antiparasitic activity

The results of the *in vitro* antitrypanosomal activity of EA fractions of the three algae are summarised in Table S3. *S. vulgare* and *R. verruculosa* displayed the most significant activity against *Trypanosoma brucei brucei* with IC_{50} values of 9.3 ± 4.9 and $11.0 \pm 1.1 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. While, *C. hirsutus* showed a low antitrypanosomal activity with an IC_{50} value of $27.2 \pm 5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$. The positive control pentamidine showed an IC_{50} value of $5.4 \pm 0.4 \text{ nM}$. EA fractions show a weak antiplasmodial activity with 95.5, 89.7 and 91.2% of parasite growth inhibition at the concentration of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ for *S. vulgare*, *C. hirsutus* and *R. verruculosa*, respectively, but no significant antiplasmodial activity was observed at $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Chloroquine used as antimalarial drug control showed an IC_{50} value of $0.1 \mu\text{M}$. The previous results reported by Ravikumar et al. (2011), found that among twelve algae species tested for *in vitro* antiplasmodial activity, only *Gracilaria verrucosa* (IC_{50} $5.55 \mu\text{g mL}^{-1}$) and *Hypnea espera* (IC_{50} $8.94 \mu\text{g mL}^{-1}$) showed good activity against *Plasmodium falciparum*. Fucosterol isolated from marine brown alga *Sargassum linearifolium* showed an excellent antiplasmodial effect against *P. falciparum* strain (IC_{50} $7.48 \mu\text{g mL}^{-1}$) as compared to Chloroquine (IC_{50} $12.81 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Perumal et al. 2017). The variation in the antiplasmodial and antitrypanosomal activities shown by the different species of algae may account for the variation in secondary metabolites (Afolayan et al. 2009; Ravikumar et al. 2011).

3. Conclusion

In light of these results, it can be demonstrated that tested crude extracts and fractions of the three algae *S. vulgare*, *C. hirsutus* and *R. verruculosa* showed a certain levels of antimicrobial and antiparasitic activities *in vitro*. Further work is now in progress in our laboratory to investigate and characterise the pure compounds in EA fractions which had remarkably higher biological activities than crude extracts and other fractions.

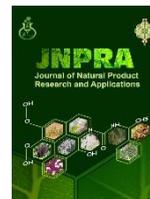
Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

References

- Adaikala Raj G, Chandrasekaran M, Krishnamoorthy S, Venkatesa V. 2015. Antibacterial activity of different solvent extracts of *Caulerpa chemnitzia* (Esper) J.V. Lamououx, from Mandapam, Gulf of Mannar Southeast Coast, Tamil Nadu. India J Med Herbs Ethnomed. 1:24–31.
- Afolayan AF, Mann MGA, Lategan CA, Smith PJ, Bolton JJ, Beukes DR. 2009. Antiplasmodial halogenated monoterpenes from the marine red alga *Plocamium cornutum*. Phytochemistry. 70:597–600.
- Alghazeer R, Whida F, Abduelrhman E, Gammoudi F, Azwai S. 2013. Screening of antibacterial activity in marine green, red and brown macroalgae from the western coast of Libya. Nat Sci. 5:7–14.
- Cabrita M, Vale C, Rauter A. 2010. Halogenated compounds from marine algae. Mar Drugs. 8:2301–2317.
- Charneau S, de Mesquita M, Bastos IMD, Santana JM, de Paula JI, Grellier P, Espindola LS. 2015. *In vitro* investigation of Brazilian Cerrado plant extract activity against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei gambiense*. Nat Pro Res. 29:1–7.

- Darah I, Sheh-Hong L. 2015. *In vitro* antimicrobial activities of methanolic extract from marine alga *Enteromorpha intestinalis*. Asian Pac J Trop Biomed. 5:785–788.
- Demirel Z, Yilmaz-Koz FF, Karabay-Yavasoglu UN, Ozdemir G, Sukatar A. 2009. Antimicrobial and antioxidant activity of brown algae from the Aegean sea. J Serb Chem Soc. 74:619–628.
- Govindasamy C, Arulpriya M, Ruban P. 2012. Nuclear magnetic resonance analysis for antimicrobial compounds from the red seaweed *Gracilaria corticata*. Asian Pac J Trop Biomed. 2:S329–S333.
- Kim YH, Kim JH, Jin HJ, Lee SY. 2013. Antimicrobial activity of ethanol extracts of *Laminaria japonica* against oral microorganisms. Anaerobe. 21:34–38.
- Manivannan K, Karthikai devi G, Anantharaman P, Balasubramanian T. 2011. Antimicrobial potential of selected brown seaweeds from Vedalai coastal waters, Gulf of Mannar. Asian Pac J Trop Biomed. 1:114–120.
- Naja K, Mawlawi H, Chbani A. 2012. Antioxidant and Antifungal activities of *Padina pavonica* and *Sargassum vulgare* from the Lebanese Mediterranean Coast. Adv Environ Biol. 6:42–48.
- Perumal P, Sowmiya R, Kumar SP, Ravikumar S, Deepak P, Balasubramani G. 2017. Isolation, structural elucidation and antiplasmodial activity of fucosterol compound from brown seaweed, *Sargassum linearifolium* against malarial parasite *Plasmodium falciparum*. Nat Pro Res. 1478–6419. doi:10.1080/14786419.2017.1342081.
- Ravikumar S, Jacob Inbaneson SJ, Suganthi P. 2011. Seaweeds as a source of lead compounds for the development of new antiplasmodial drugs from South East coast of India. Parasitol Res. 109:47–52.
- Salem WM, Galal H, Nasr El-deen F. 2011. Screening for antibacterial activities in some marine algae from the red sea. Afr J Microbiol Res. 5:2160–2167.
- Sasidharan S, Darah I, Noordin MKMJ. 2009. Screening antimicrobial activity of various extracts of *Gracilaria changii*. Pharm Biol. 47:72–76.



Assessment of *in vitro* antioxidant and *in vivo* anti-inflammatory activities of marine algae from Algerian coast

Ghania AISSAOUI^{a*}, Nabila BELYAGOUBI-BENHAMMOU^{a*}, Larbi BELYAGOUBI^a, Sadia MANSOUR^b, Nouredine DJEBLI^b, Mariem BENMAHDJOUR^a, Khadidja KERZABI-KANOUN^a, Houssam BOUAKLINE^c, Wacila BENGUEDDA-RAHAL^d, Fawzia ATIK-BEKKARA^a

^aLaboratory of Natural Products, Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, Earth and Universe Sciences, University Abou- Bekr Belkaïd, BP 119, Imama, Tlemcen, Algeria

^bLaboratoire de pharmacognosie et api-phytothérapie, Département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Mostaganem, Algérie

^cLaboratoire d'anatomie pathologie, hôpital militaire régional universitaire d'Oran, Algérie

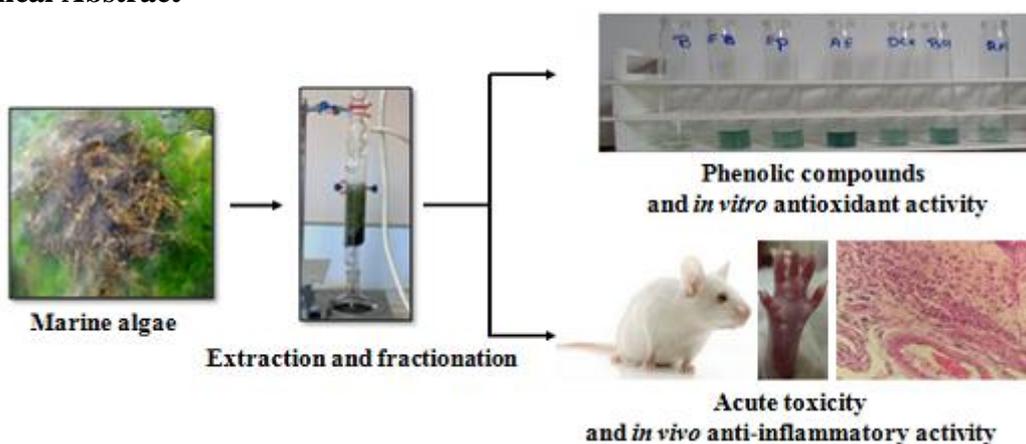
^dValorisation des actions de l'homme pour la protection de l'environnement et application en santé publique, Université Abou Bekr Belkaïd, BP 119, Imama, Tlemcen, Algérie

*Corresponding authors. E-mail: aissaouigh@yahoo.fr; Tel: (+213552494425); nabila.benhammou79@yahoo.fr.

Highlights

- Crude extracts and fractions from three algal species *Sargassum vulgare*, *Cladostephus hirsutus* and *Rissoella verruculosa* were prepared.
- Total phenolic, flavonoid, flavonol and total condensed tannin contents were determined.
- The antioxidant activity of crude extracts and all fractions, using three assays, were evaluated.
- *In vivo* toxicological study and anti-inflammatory activity of crude extract of *Cladostephus hirsutus* were tested in Swiss albino mice.

Graphical Abstract



Abstract

The search for natural compounds with pharmaceutical activity indicated marine macroalgae as promising sources to supply novel compounds with potential bioactivities. In this study, three algae from the northwest coast of Algeria *Sargassum vulgare*, *Cladostephus hirsutus* and *Rissoella verruculosa* were investigated for their *in vitro* antioxidant activity and for their *in vivo* anti-inflammatory activity. Total phenolic, total flavonoid and flavonol, and condensed tannin contents were determined in crude extracts and petroleum ether, ethyl acetate (EA), dichloromethane and butanol fractions, and aqueous residues. Antioxidant activity was evaluated using several *in vitro* assays: Total Antioxidant Capacity, Ferric Reducing Antioxidant Power and diphenyl picryl hydrazyl radical scavenging activity. Acute toxicity of the crude extract of *C. hirsutus* was studied in Swiss albino mice and anti-inflammatory activity was evaluated using carrageenan-induced paw edema. Crude extracts revealed high total antioxidant activity ranging from 1.27 to 1.63 mg ascorbic acid equivalent/gram of dry matter for *R. verruculosa* and *C. hirsutus*, respectively. For the three algae, EA fractions showed the highest antioxidant activity by the three assays tested, with up to 67% of DPPH radical scavenging activity and an EC₅₀ of 1.114 mg ml⁻¹ by the ferric reducing power assay for the EA fraction of *R. verruculosa*. No signs of acute toxicity were observed in the crude extract of *C. hirsutus* at 150 and 300 mg/kg. Significant and dose-dependent activity was shown against acute inflammation with edema reduction of 58.86% and 71.01% at 150 and 300 mg/kg, respectively, after 6 hours of carrageenan administration.

Keywords: *Sargassum vulgare*, *Cladostephus hirsutus*, *Rissoella verruculosa*, Antioxidant activity, acute toxicity, anti-inflammatory activity.

Introduction

Marine organisms live in complex habitats exposed to extreme conditions, and in adapting to new environment surroundings, they produce a wide variety of specific and potent active substances that possess unique structural features that cannot be found elsewhere (Larsen et al., 2005; Eom et al., 2012). Marine algae, in particular, provide for an extraordinary reservoir of structurally diverse bioactive compounds (Zhang et al., 2012) such as carotenoid pigments (astaxanthin, zeaxanthin, β -carotene and fucoxanthin), polysaccharides (fucoidan, laminarins and alginic acid) and a series of polyphenolic compounds like catechins, phlorotannins, flavonoids, flavonols and flavonols glycosides (Rajauria et al., 2016). Many of these compounds have been demonstrated to possess a variety of biological activities, including antioxidant, antimicrobial, anticancer, anti diabetic, antiviral, cytotoxic, anti-thrombotic and anti-inflammatory effects (Lee et al., 2004; Demirel et al., 2009; Govindasamy et al., 2012). Among the most relevant compounds found in algae, antioxidants are the products that have attracted major interest (Zubia et al., 2009). Antioxidants play an important role in inhibiting and scavenging free radicals and thus providing protection to humans against inflammatory and neurodegenerative diseases (Butterfield et al., 2002; Khairy et al., 2015). Therefore, new interest has developed in searching for natural and safe antioxidative agents from marine algae. Reports on the biological activities of algal extracts from Algeria are very limited. Thus, the purpose of this work was to study the phytochemical composition and the *in vitro* antioxidant activity of crude extracts and several fractions of three selected algae, including two brown algae *Sargassum vulgare* and *Cladostephus hirsutus* and the red alga *Rissoella verruculosa*. The *in vivo* anti-inflammatory activity and acute toxicity of the crude extract of *Cladostephus hirsutus* were also investigated.

Materials and methods

Algal materials

Algae used in this study were *S. vulgare*, *C. hirsutus* and *R. verruculosa*. They were collected by handpicking from Ain Timouchent region situated in the Northwest Coast of Algeria (Latitude 35°18' N, Longitude 1°28' O) during June 2013. Samples collected were initially washed thoroughly with sea water to remove epiphytes and other dirt particles and transported to the laboratory immediately in plastic bags containing water, then rinsed with tap water followed by distilled water to remove salts, and shade dried at room temperature. Dried algae were ground in an electric mixer and stored at 4 °C for further experiments. Algal species were identified by Dr. Benguedda Wacila from the University of Tlemcen, Algeria and voucher specimens are deposited in the herbarium of our Laboratory of Natural Products.

Preparation of algal crude extracts and fractionation

Powdered samples (100 g) were extracted by using a Soxhlet apparatus with 500 mL methanol:chloroform (2:1 V/V) for 6 h, according to [Duan et al. \(2006\)](#). Extraction was repeated twice and the combined organic solution was evaporated under vacuum to obtain a crude extract, which was dissolved in 100 mL of 90% aqueous methanol. First fractionation was carried out with 3 × 100 mL petroleum ether. The aqueous methanol solution was evaporated under reduced pressure to give a semisolid, which was further dissolved in 200 mL distilled water and then extracted successively with 3 × 100 mL of ethyl acetate, 3 × 100 mL of dichloromethane and 3 × 100 mL of n-butanol, respectively. Resulting fractions were evaporated to dryness, to yield the petroleum ether (PE), ethyl acetate (EA), dichloromethane (DCM), butanol (BOH) fractions, and aqueous residue (AR).

1.1. Determination of phenolic compounds

Total phenolic content

Total phenol content (TPC) was determined by the spectrophotometric method based on the procedure described by [Singleton and Rossi, \(1965\)](#) using Folin-Ciocalteu reagent, with gallic acid as standard. 200 µL of sample were mixed with 1000 µL of Folin-Ciocalteu reagent (diluted with distilled water 1:9), and 800 µL of 7.5% sodium carbonate solution (Na₂CO₃). The mixtures were then incubated in the dark at room temperature for 30 min, absorbance was measured at 765 nm using a Specord 200 plus UV/VIS spectrophotometer. Estimation of the phenolic content was carried out in triplicate and results were expressed as milligrams of Gallic Acid Equivalents per Gram of Dry Matter (mg GAE/g DM).

Total flavonoids

Total flavonoid content (TFC) was determined using the colorimetric assay described by [Zhishen et al. \(1999\)](#). Briefly, 500 µL of samples were mixed with 1500 µL of distilled water and 150 µL of 5% sodium nitrate (NaNO₂) solution. After 5 min, 150 µL of 10% aluminum chloride (AlCl₃) was added. After 6 min of incubation, at room temperature, 500 µL of 1 M sodium hydroxide (NaOH) were added. The mixture was homogenized immediately and absorbance was measured at 510 nm against a blank. A calibration curve was prepared with catechin as standard and the results were expressed as milligram Catechin Equivalents per Gram of Dry Matter (mg CE/ g DM).

Total flavonols

Total flavonol content (TF) was determined according to [Kumaran et al. \(2007\)](#). Sample (250 µL) was mixed with 250 µL of AlCl₃ (2 mg/mL) and 1500 µL of sodium acetate (50 mg/ mL). The mixture was allowed to stand for 2.5 h at room temperature and absorbance was then read

at 440 nm. Quercetin was used as standard. Flavonol content was expressed as mg of Quercetin Equivalents per Gram of Dry Matter (mg QE/ g DM).

Condensed tannins

Condensed tannin content (CTC) was estimated using the vanillin assay described by [Julkunen-Titto \(1985\)](#). Briefly, 50 μ L of sample were mixed with 1500 μ L of 4% vanillin (prepared with methanol). After homogenization, 750 μ L of concentrated HCl were added. The solution was shaken vigorously and left to stand at room temperature for 20 min in the dark. Absorbance was measured at 550 nm against blank. Catechin was used as standard. The amount of condensed tannins was expressed as milligram of Catechin Equivalents per Gram of Dry Matter (mg CE/ g DM).

In vitro antioxidant activity

Determination of total antioxidant capacity

Total antioxidant capacity (TAC) of crude extracts and fractions was determined according to [Prieto et al. \(1999\)](#). Briefly, 0.3 mL of sample was mixed with 3 mL of standard reagent (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate) and incubated at 95 °C for 90 min. The sample was cooled down to room temperature and absorbance was measured at 695 nm against a blank. Ascorbic acid was used as standard. TAC of samples was expressed as milligrams of Ascorbic Acid Equivalents per Gram of Dry Matter (mg AAE/ g DM).

Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

Reducing power of extracts was determined following the method of [Oyaizu \(1986\)](#). A 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6) (2.5 mL) and 1% of potassium ferricyanide water solution (2.5 mL, $K_3[Fe(CN)_6]$) were mixed with 1 mL of extract at varying concentrations and incubated at 50 °C for 20 min. A 2.5 mL trichloroacetic acid (10%) was added to the mixture, which was then centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The upper layer of the solution (2.5 mL) was mixed with distilled water (2.5 mL) and a freshly prepared $FeCl_3$ solution (0.5 mL, 0.1%) and absorbance measured at 700 nm against a blank. An increased absorbance of the reaction mixture was taken to mean an increased reducing power. Ascorbic acid was used as positive control.

DPPH radical scavenging activity

Radical scavenging capacity of samples was evaluated as the ability to scavenge the free radical DPPH (diphenylpicrylhydrazyl). DPPH assay was realized according to [Sanchez-Moreno et al. \(1998\)](#). 50 μ L of sample at different concentrations (0.5 to 6 mg/mL) was added to 1.950 mL of a 0.025 g/L DPPH methanolic solution. The mixture was vortexed and then left to stand at room temperature for 30 min in the dark. Absorbance was read at 515 nm against a blank, and the percentage of scavenging activity was calculated using the following formula:

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{blank}}) \times 100$$

Where: A_{blank} is the value of DPPH alone; A_{sample} is the value of DPPH mixed with the sample.

In vivo anti-inflammatory activity

Animals

Male Swiss albino mice (19-30g) were procured from the Pasteur Institute (Alger, Algeria). The animals were acclimated to laboratory condition for 10 days prior to the experiment and were allowed free access to a commercial pellet diet and water *ad libitum*. Before the day of assay, Swiss albino mice were deprived of food overnight and divided into six groups with six animals in each group.

Acute toxicity study

Acute oral toxicity test for the crude extract of *C. hirsutus* was conducted in accordance with OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) guidelines. Doses of 150 mg/kg and 300 mg/kg were orally administered to the two groups of animals. Behavioral parameters (increase in activity, salivation, coma and convulsion) and mortality were observed closely for 24 h after extract administration (Paschapur et al., 2009).

Carrageenan-induced Paw Edema

The anti-inflammatory activity of crude extract of *C. hirsutus* against acute inflammation was examined by carrageenan-induced paw edema according to the method of Trovato et al. (2001). Each of the four animal groups was given orally either NaCl 0.9% (control), Diclofenac sodium, a nonsteroidal, anti-inflammatory drug, (50 mg/kg), or the crude extract of *C. hirsutus* (150 mg/kg and 300 mg/kg). One hour after oral administration of different drugs, acute inflammation is induced by injection of 0.1 ml of 0.5% carrageenan into the footpad of the hind paws of each mouse. The paw volume of mice was measured by plethysmometer, before and after injection of carrageenan at different time intervals (1, 2, 3, 4, 5 and 6h). The percentage inhibition (INH %) of the inflammation for each animal group was calculated by the following formula

$$\text{INH \%} = (D - D_t) / D_0 \times 100$$

where D is the diameter of injected paw, D₀ is the average inflammation (hind paw edema) of the control group of mice at a given time 0; and D_t is the average of diameters of hind paw edema of the drug treated (i.e. extract or reference diclofenac) mice at the same time (Marzocco et al., 2004).

Histopathological Examination

After 6 h, the animals were sacrificed and the carrageenan-induced edema feet were removed and fixed in a solution of 10% formalin. The material was embedded in paraffin, cut into sections, stained with hematoxylin eosin and viewed under the light microscope. Histological analysis was based on the edema and inflammatory cell infiltrate observed in epithelial and connective tissues.

Statistical analysis

Three replications of all assays were used to calculate means and standard deviations (SD). Data was evaluated using Pearson's correlation coefficient (*r*) to explore the relationship between phenolic compounds (total phenolic, flavonoid, flavonol and condensed tannin contents), and also between phenolic compounds and the antioxidant activities (total antioxidant capacity and ferric reducing antioxidant power).

Results and discussion

Crude extracts, fraction yields and phenolic compounds

Yields of the three algae extractions are given in Table 1. The yields of *S. vulgare*, *C. hirsutus* and *R. verruculosa* were 3.101 ± 0.556 , 2.483 ± 0.164 and $1.953 \pm 0.379\%$, respectively. The highest yields of the liquid-liquid extractions were obtained from PE fractions of *S. vulgare* ($41.825 \pm 0.004\%$) and *R. verruculosa* ($27.803 \pm 0.070\%$) and from AR of *C. hirsutus* ($33.145 \pm 0.156\%$), while the lowest yields were obtained from DCM fractions of all the three species. Considerable variations in extraction yield were found among different algae species. When compared to our study, the yield of the crude extract from *R. verruculosa* was comparable to the yield from the red alga *Eucheuma kappaphycus* (2.85%) (Ganesan et al., 2008). Whereas, higher yields are reported from the crude extracts of brown algae including *S. vulgare* (10.1%),

Padina pavonica (11.9%) (Khaled *et al.*, 2012), *S. marginatum* (5.45%), *P. tetrastomatica* (12.31%) and *Turbinaria conoides* (5.76%) (Chandini *et al.*, 2008). These considerable differences in the yields of the total extracts and fractions from various algae may be due to species-specific differences and varied extraction conditions, such as pH, varying solvent polarities, extraction time and temperature as well as the chemical compositions of the sample (Cho *et al.*, 2011; López *et al.*, 2011).

Table 1. Yield of the algae crude extracts and fractions.

	Yield (%)					
	CE	PE	EA	DCM	BOH	AR
<i>S. vulgare</i>	3.101±0.556	41.825±0.004	20.670±0.441	0.783±0.006	4.385±0.0146	17.865±0.157
<i>C. hirsutus</i>	2.483±0.164	23.278±0.093	18.082±0.003	1.044±0.013	7.652±0.037	33.145±0.156
<i>R. verruculosa</i>	1.953±0.379	27.803±0.070	10.599±0.077	1.075±0.011	10.266±0.031	27.619±0.240

CE: Crude extract; PE: Petroleum ether fraction; EA: Ethyl acetate fraction; DCM: Dichloromethane fraction; BOH: n-butanol fraction; AR: Aqueous residue.

Total phenolic, flavonoid, flavonol and condensed tannin contents of the three algae were given in Table 2. Various phenolic compounds including phenolic acids, flavonoids and tannins are commonly found in red, brown and green algae (Duan *et al.*, 2006; Kuda *et al.*, 2007). The highest TPC was observed in the crude extract of *R. verruculosa* (1.101 ± 0.007 mg GAE/g DM) followed by the crude extracts of *C. hirsutus* (1.042 ± 0.003 mg/g) and *S. vulgare* (0.662 ± 0.011 mg/g). EA fractions showed the highest amount in both brown algae while AR fraction was found to contain the highest TPC (0.686 ± 0.005 mg/g) in the red alga. Duan *et al.* (2006) observed higher phenolic contents (71.6 ± 0.00 mg GAE/g DM, 73.07 ± 0.00 mg GAE/g DM) in crude extract and EA fraction of Chinese red alga *Polysiphonia urceolata*. Chandini *et al.* (2008) reported the phenolic content of 0.29 GAE/g DM and 0.86 GAE/g DM in aqueous fraction of brown algae *S. marginatum* and *T. conoides*, respectively.

Crude extracts from all tested algae showed higher flavonoids content than fractions. TFC of *S. vulgare* is ranged from 0.021 ± 0.001 to 0.340 ± 0.005 mg CE/g DM. For *C. hirsutus*, it is ranged between 0.006 ± 0.000 and 0.427 ± 0.003 mg CE/g DM) and varied from 0.005 ± 0.001 to 0.399 ± 0.003 mg CE/g DM for *R. verruculosa*.

Crude extracts of *S. vulgare* and *C. hirsutus* exhibited higher TF (0.640 ± 0.041 mg QE/g DM and 0.559 ± 0.026 mg QE/g DM, respectively), compared to the crude extract of *R. verruculosa* and all the other fractions. TCT were higher in crude extracts of *S. vulgare* (2.636 ± 0.285 mg CE/g DM) and *C. hirsutus* (2.738 ± 0.008 mg CE/g DM), comparatively to *R. verruculosa* crude extract (1.520 ± 0.005 mg CE/g DM). In EA fractions of the two brown algae investigated, TCT were also significant with values of 2.164 ± 0.055 mg/g for *S. vulgare* and 2.783 ± 0.034 mg/g for *C. hirsutus*. The great variability observed in the phenolic contents in the algae could originate from external environmental factors such as herbivory, light, depth, salinity, nutrients, seasonality as well as intrinsic ones such as age, length, type of the tissues. All these factors could act on the spatio-temporal regulation of the phenolic metabolic expression inducing marked qualitative and quantitative variations among individuals at a very small scale, together with intra-individual variations (Connan *et al.*, 2004).

Table 2. Phenolic compounds of crude extracts and fractions of *S. vulgare*, *C. hirsutus* and *R. verruculosa*.

Crude extracts and fractions	TPC	TFC	TF	TCT
------------------------------	-----	-----	----	-----

<i>S. vulgare</i>	CE	0.662±0.011	0.340±0.005	0.640±0.041	2.636±0.285
	PE	0.182±0.004	0.087±0.002	0.287±0.005	0.800±0.025
	EA	0.280±0.009	0.140±0.001	0.248±0.012	2.164±0.055
	DCM	0.027±0.240	0.021±0.035	0.026±0.001	0.052±0.000
	BOH	0.029±0.310	0.022±0.003	0.074±0.001	0.060±0.001
	AR	0.104±0.003	0.021±0.001	0.002±0.000	0.009±0.000
<i>C. hirsutus</i>	CE	1.042±0.003	0.4277±0.003	0.5594±0.026	2.738±0.008
	PE	0.157±0.002	0.0943±0.001	0.205±0.004	0.814±0.003
	EA	0.525±0.001	0.278±0.004	0.286±0.009	2.783±0.034
	DCM	0.070±0.085	0.024±0.001	0.058±0.000	0.158±0.001
	BOH	0.096±0.012	0.006±0.004	0.063±0.004	0.068±0.003
	AR	0.144±0.006	0.017±0.006	0.006±0.000	0.049±0.001
<i>R. verruculosa</i>	CE	1.101±0.007	0.399±0.003	0.273±0.010	1.520±0.005
	PE	0.080±0.001	0.091±0.000	0.145±0.004	0.235±0.022
	EA	0.144±0.002	0.125±0.001	0.171±0.006	0.285±0.005
	DCM	0.008±0.002	0.005±0.001	0.005±0.000	0.027±0.007
	BOH	0.072±0.001	0.016±0.000	0.034±0.001	0.052±0.036
	AR	0.686±0.005	0.020±0.000	0.011±0.000	0.041±0.001

CE: Crude extract; PE: Petroleum ether fraction; EA: Ethyl acetate fraction; DCM: Dichloromethane fraction; BOH: n-butanol fraction; AR: Aqueous residue; TPC: Total Phenolic Content was expressed as mg of gallic acid equivalents per gram of dry matter (mg GAE/g DM); TFC: Total Flavonoid Content was expressed as milligram of catechin equivalents per gram of dry matter (mg CE/ g DM); TF: Total Flavonol content was expressed as mg of quercetin equivalents per gram of dry matter (mg QE/ g DM); TCT: Total Condensed Tannin content was expressed as milligrams of catechin equivalents per gram of dry matter (mg CE/g DM).

In vitro antioxidant activity

Total antioxidant capacity

TAC of the algae species is represented in [Figure 1](#). Higher activities were observed in the crude extracts of *C. hirsutus* (1.63 ± 0.008 mg AAE/g DM) and *S. vulgare* (1.583 ± 0.042 mg/g), and to a less extent in the crude extract of *R. verruculosa* (1.272 ± 0.009 mg/g). EA fractions of three algae have the strongest TAC compared to all the other fractions. [Chandini et al. \(2008\)](#) noticed lower antioxidant activity (0.31, 0.08 and 0.17 mg AAE/g of seaweed on dry weight basis) in EA fraction of *S. marginatum*, DCM fraction of *P. tetrastomatica* and aqueous fraction of *T. conoides*, respectively.

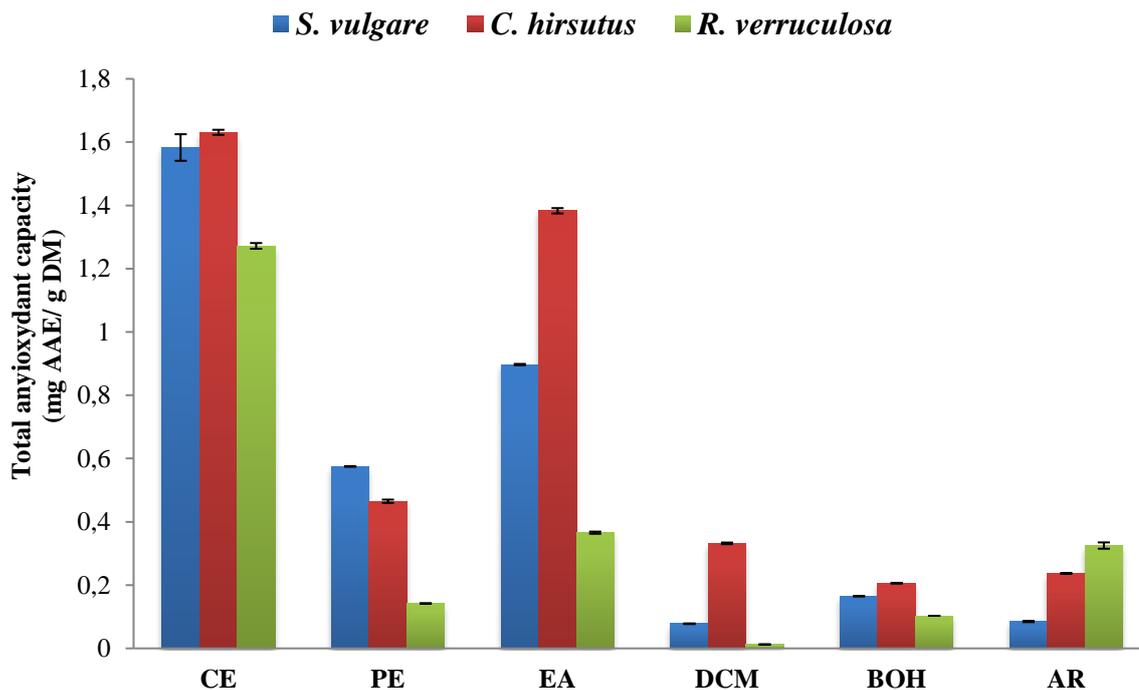


Figure 1. Total antioxidant capacity of crude extracts and fractions of *S. vulgare*, *C. hirsutus* and *R. verruculosa*.

CE: Crude extract; PE: Petroleum ether fraction; EA: Ethyl acetate fraction; DCM: Dichloromethane fraction; BOH: n-butanol fraction; AR: Aqueous residue; Total antioxidant activity was expressed as milligrams of ascorbic acid equivalents per gram of dry matter (mg AAE/ g DM).

Ferric reducing antioxidant power

Evaluation of the antioxidant activity by using FRAP assay is shown in [Figure 2](#). Higher reducing power was observed in EA fractions of all tested algae as compared to crude extracts and other fractions. EA fraction of *R. verruculosa* showed the highest ability for reducing Fe^{+3} ($\text{EC}_{50} = 1.114 \pm 0.000$ mg/mL) followed by EA fractions of *C. hirsutus* ($\text{EC}_{50} = 1.276 \pm 0.001$ mg/mL) and *S. vulgare* ($\text{EC}_{50} = 1.281 \pm 0.006$ mg/mL). The lowest activity was observed in PE fraction of *R. verruculosa* (10.195 ± 0.001 mg/mL) and AR of both brown algae. The reducing capacity of a compound may serve as a significant indicator of its potential antioxidant activity. [Zhang et al. \(2007\)](#) reported reducing power in the range of 0.07 to 11.60 mg AAE/g DM in 28 species of brown, red and green algae.

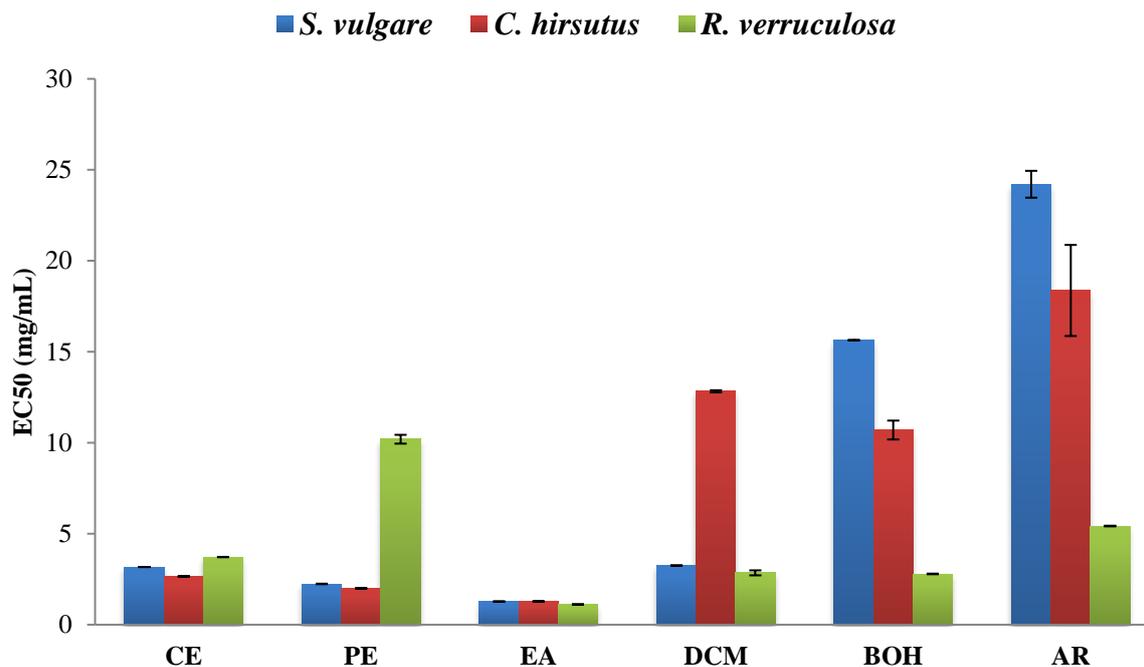


Figure 2. EC₅₀ (mg/mL) concentrations of reducing power of crude extracts and fractions of *S. vulgare*, *C. hirsutus* and *R. verruculosa*.

CE: Crude extract; PE: Petroleum ether fraction; EA: Ethyl acetate fraction; DCM: Dichloromethane fraction; BOH: n-butanol fraction; AR: Aqueous residue.

DPPH radical scavenging activity

Free scavenging ability of the studied algae were expressed in percentage % and presented in Figure 3. DPPH radical scavenging activity was concentration dependent and increased with concentrations. Measured values of DPPH inhibition activity in the crude extracts and different fractions varied from 0.164 ± 0.179 to $67.877 \pm 0.454\%$. EA fraction of *R. verruculosa* was found to have the maximum activity (67.8%) followed by EA fractions of *S. vulgare* and *C. hirsutus*, which had approximately the same value (43%). DPPH has been used extensively as a free radical to evaluate reducing substances and is a useful reagent for investigating the free radical scavenging activities of compounds (Duan et al., 2006). From the present findings, EA fraction of *R. verruculosa* has strong antioxidant activity $67.877 \pm 0.454\%$, which were similar to those reported by Souza et al. (2011) who showed activity of 60% at the concentration of 5 mg/mL in the ethanolic extract of the red alga *Gracilaria birdiae*. On the other hand, Duan et al. (2006) noticed higher DPPH scavenging in crude extract, fractions and sub-fractions derived from *Polysiphonia urceolata*. Our findings are in agreement with those found by Duan et al. (2006) where the ethyl acetate-soluble fraction showed strongest activity. The activity of this fraction was observed to be significantly higher than that of crude extract itself. Indeed this is probably due to interactions between the compounds present in the extract that can exert an antagonistic effect between them (Khaled et al., 2012). In many studies, the antioxidant activity of whole algae, their parts, extracts and fractions has been attributed to the phenolic compounds. However, the observed activity could be a result of the complex composition of the macroalgal extracts (Balboa et al., 2013).

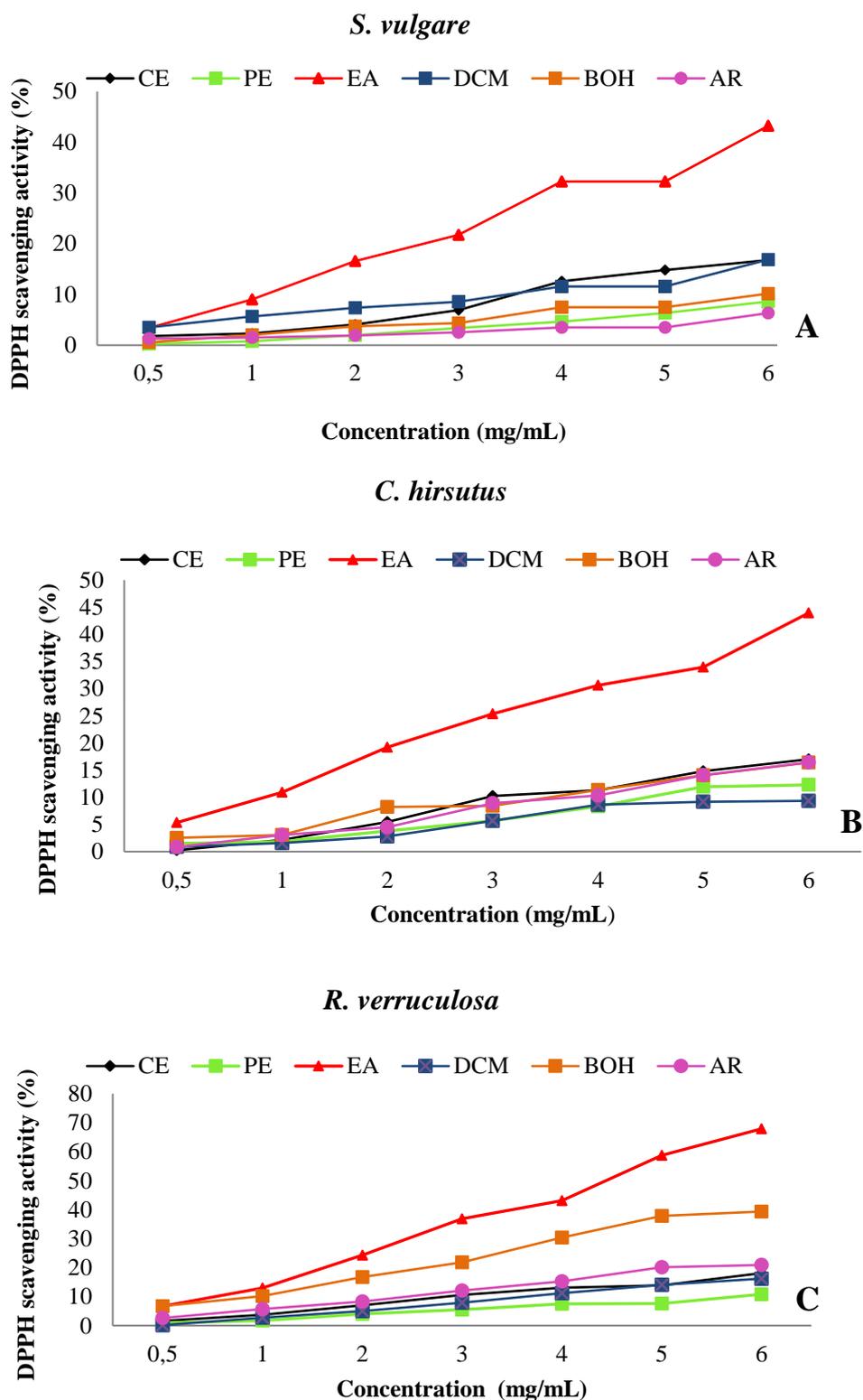


Figure 3. DPPH inhibition activity (%) of crude extracts and fractions at different concentrations; (A): *S. vulgare*; (B): *C. hirsutus*; (C): *R. verruculosa*.

Correlation between phenolic compounds and antioxidant activities

A Pearson's correlation between phenolic compounds and antioxidant assays are presented in Table 3. As shown in the table, there were strong positive correlations between total phenolic, flavonoid, flavonol and condensed tannin contents ($0.990 \geq r \geq 0.519$), and a high positive correlation between total antioxidant capacity and phenolic compounds ($r \geq 0.808$) in the three tested algae. Several studies have demonstrated a highly significant correlation between phenolic content and different antioxidant activity in algae extracts (Connan et al., 2006; Duan et al., 2006; Zhang et al., 2006; Zhang et al., 2007). A moderate negative correlation was obtained between phenolic content and ferric reducing antioxidant power ($-0.469 \geq r \geq -0.674$) in the brown algae, but no linear relationship was found between these compounds, total antioxidant capacity and ferric reducing antioxidant power ($0.042 \geq r \geq -0.062$) in the red alga. It was reported by Sabeena Farvin et al. (2013) that no clear correlation exists between TPC and Fe^{2+} chelating activity and thus phenolic compounds do not appear to be the major contributors to the metal chelating properties of the ethanolic extracts of some selected species of marine algae from Danish coast.

Table 3. Pearson correlation coefficient calculated among measured antioxidant activities and quantified chemical compounds.

	<i>S. vulgare and C. hirsutus</i>						<i>R. verruculosa</i>					
	TPC	TFC	TF	TCT	TAC	FRAP	TPC	TFC	TF	TCT	TAC	FRAP
TPC	1	0.977	0.883	0.874	0.933	-0.469	1	0.753	0.519	0.788	0.898	-0.011
TFC		1	0.929	0.936	0.976	-0.574		1	0.922	0.990	0.958	-0.055
TF			1	0.875	0.931	-0.638			1	0.866	0.808	0.042
TCT				1	0.975	-0.674				1	0.965	-0.062
TAC					1	-0.620					1	-0.133
FRAP						1						1

TPC: Total Phenolic Content; TFC: Total Flavonoid Content; TF: Total Flavonol content; TCT: Total Condensed Tannin Content; TAC: Total Antioxidant Capacity; FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power.

In vivo anti-inflammatory activity

Acute toxicity

Within the 24-hour observation period, no mortality or changes in behavioral parameters such as increased activity, salivation, coma, or convulsions were observed after oral administration of CE of *C. hirsutus* at doses of 150 mg/kg and 300 mg/kg.

Carrageenan-induced Paw Edema

The effect of CE of *C. hirsutus* on carrageenan-induced paw edema in mice has been established. As illustrated in Figure 4, injection of 0.1 mL carrageenan (0.5%) produced a progressive increase in paw edema to a maximum volume at 6 h in the control group, the AUG % for the reference group declined at 2 and 4 h and gradually increased after the fourth hour. However, groups pretreated with CE (150 and 300 mg/kg) showed a significant reduction in AUG % as compared with the control and reference groups.

Percentage inhibition (INH %) of paw edema volume at different time intervals is shown in Figure 5. Edema was reduced by crude extract of *C. hirsutus* in a dose dependent manner till the end of sixth hour. Significant INH% of paw edema was observed with both doses tested (150 mg/kg and 300 mg/kg) with maximum INH% of 58.86% and 71.01%, respectively, at 6 hour while, Diclofenac sodium (50 mg/kg) prevented carrageenan-induced paw edema with a low INH% of 67.49% and 54.48% at 4 and 6 hour, respectively.

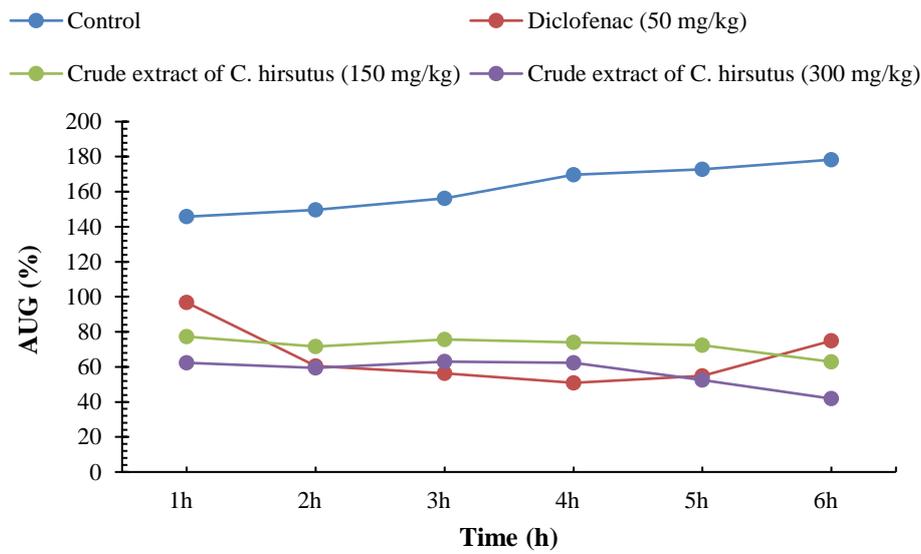


Figure 4. Percentage augmentation (AUG %) of edema after injection of carrageenan at different time intervals.

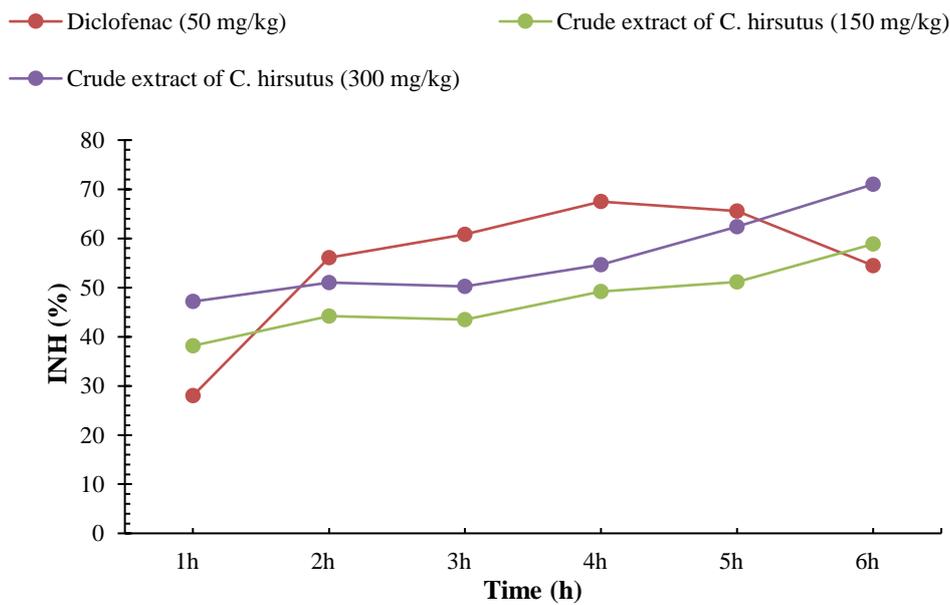


Figure 5. Percentage inhibition (INH %) of edema by crude extract of *C. hirsutus* (150 mg/kg and 300 mg/kg) at different time intervals determined with diclofenac sodium (50 mg/kg) as reference.

Histopathology Analysis

The histopathological results of edema paws 6 h after injection of carrageenan are illustrated in Figure 6. Control group showed massive accumulation of infiltrated inflammatory cells with predominance of polymorphonuclear neutrophils and edema formation (Figure 6A), reference group displayed moderate number of inflammatory cell infiltration (Figure 6B). While, less edema and only few inflammatory cell infiltration were observed in groups pretreated with CE (150 and 300 mg/kg) (Figure 6C, 6D).

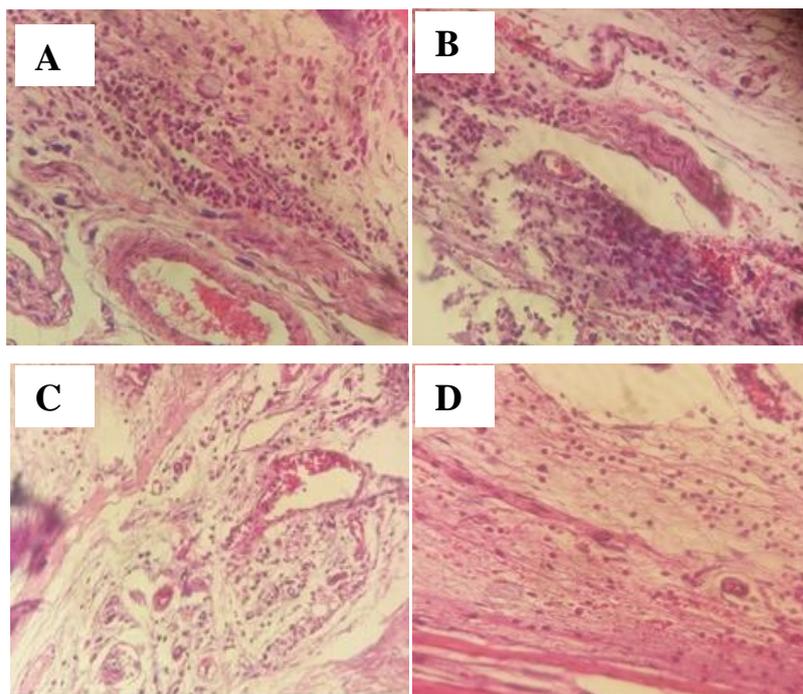


Figure 6. Histological evaluation of anti-inflammatory effect of crude extract of *C. hirsutus*. (A): control (NaCl 0.9%), (B): reference (diclofenac sodium 50 mg/kg), (C): CE of *C. hirsutus* at 150 mg/kg, (D): CE of *C. hirsutus* at 300 mg/kg. Each group was assessed at 200× magnification.

According to several works, different types of marine algae possess anti-inflammatory properties. (Ananthi et al., 2010; Cavalcante-Silva et al., 2012; Islam et al., 2013; Bitencourt et al., 2015). Unique compounds with anti-inflammatory activity have been identified in red, green and brown algae. These include polyphenols, sulfated polysaccharides, terpenes, fatty acids, proteins and several other bioactives (Fernando et al., 2016). To our knowledge, this is the first research into the toxicity and the anti-inflammatory effect of the extract of *C. hirsutus*. The data indicated that the crude extract of *C. hirsutus* produced a dose-dependent anti-inflammatory effect on carrageenan induced inflammatory paw edema in the mice and this effect was higher than that of the diclofenac sodium which is used as a reference drug. According to Dore et al. (2013), Fucan (SV1) sulfated polysaccharides from the brown algae *Sargassum vulgare* displays strong anti-inflammatory action at all concentrations tested in the carrageenan induced paw edema model, demonstrated by reduced edema and cellular infiltration; a tricyclic brominated diterpenoid isolated from the organic extract of the red algae *Laurencia glandulifera* shown a significant *in vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity (Chatter et al., 2011). Intraperitoneally injection of organic fractions chloroform (F-CHCl₃) and ethyl acetate (F-AcOEt) of *C. sedoides* at different doses (25 and 50 mg/kg, (i.p)), exhibited a dose-dependent reduction of rat paw edema. The percentage of inhibition of edema, 3 h after carrageenan injection, ranged from 67.71% to 73.49% and from 67.74% to 74.58%, for F-CHCl₃ and F-AcOEt, respectively (Mhadhebi et al., 2011).

Conclusion

The results of the current study indicated that crude extracts and several fractions of the three algae *Sargassum vulgare*, *Cladostephus hirsutus* and *Rissoella verruculosa* contained phenolic compounds in various proportions and showed certain levels of *in vitro* antioxidant activity and *in vivo* anti-inflammatory activity without toxicity. Finally, we suggest that algae from the

Algerian coast could be a potential source of promising bioactive compounds and might be useful for developing natural antioxidants to combat oxidative stress and inflammatory diseases.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Author Contribution Statement

G. Aissaoui: Carried out the experiment and wrote the manuscript; N. Belyagoubi-Benhammou and L. Belyagoubi: analysed the data and corrected the manuscript; M. Benmahdjoub and K. Kerzabi-Kanoun: Contributed in experiment and discussion of antioxidant activity results; S. Mansour, N. Djebli and H. Bouakline: Contributed in experiment and discussion of anti-inflammatory activity results. W. Rahal-Benghedda: identified the algal species; F. Atik-Bekkara: Designed and supervised this research.

ORCID

 Nabila BELYAGOUBI-BENHAMMOU: 0000-0001-5624-4627.

References

- Ananthi, S., Raghavendran, H. R. B., Sunil, A. G., Gayathri, V., Ramakrishnan, G., & Vasanthi, H. R. (2010). *In vitro* antioxidant and *in vivo* anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (Marine Brown Alga). *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 187-192.
- Balboa, E.M., Conde, E., Moure, A., Falque, E., & Dominguez, H. (2013). *In vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1764-1785.
- Butterfield, D.A., Castenga, A., Pocernich, C.B., Drake, J., Scapagnini, G., & Calabrese, V., (2002). Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's diseases. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(8), 444-461.
- Chandini, S.K., Ganesan, P., & Bhaskar, N. (2008). *In vitro* antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. *Food Chemistry*, 107(2), 707-713.
- Chatter, R., Othman, R.B., Rabhi, S., Kladi, M., Tarhouni, S., Vagias, C., Roussis, V., Guizani-Tabbane, L., Kharrat, R. (2011). *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of neorogioltriol, a new diterpene extracted from the red algae *Laurencia glandulifera*. *Marine Drugs*, 9(7), 1293-1306.
- Cho, M., Lee, H.S., Kang, I.J., Won, M.H., & You, S. (2011). Antioxidant properties of extract and fractions from *Enteromorpha prolifera*, a type of green seaweed. *Food Chemistry*, 127(3), 999-1006.
- Connan, S., Goulard, F., Stiger, V., Deslandes, E., & Ar Gall, E. (2004). Interspecific and temporal variation in phlorotannin levels in an assemblage of brown algae. *Botanica Marina*, 47, 410-416.
- Connan, S., Delisle, F., Deslandes, E., & Ar Gall, E. (2006). Intra-thallus phlorotannin content and antioxidant activity in *Phaeophyceae* of temperate waters. *Botanica Marina*, 49, 39-46.
- Darah, I., & Sheh-Hong, L. (2015). *In vitro* antimicrobial activities of methanolic extract from marine alga *Enteromorpha intestinalis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(9), 785-788.

- Demirel, Z., Yilmaz-Koz, F.F., Karabay-Yavasoglu, U.N., Ozdemir, G., & Sukatar, A. (2009). Antimicrobial and antioxidant activity of brown algae from the Aegean Sea. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 74(6), 619-628.
- Dore, C.M., das C Faustino Alves, M.G., Will, L.S., Costa, T.G., Sabry, D.A., de Souza Rêgo, L.A., Accardo, C.M., Rocha, H.A., Filgueira, L.G., Leite, EL. (2013). A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. *Carbohydrate Polymers*, 91(1), 467-475.
- Duan, X.J., Zhang, W.W., Li, X.M., & Wang, B.G. (2006). Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chemistry*, 95(1), 37-43.
- Eom, S. H., Kim Y. M., & Kim, S. K. (2012). Antimicrobial effect of phlorotannins from marine brown algae. *Food and Chemical Toxicology*, 50(9), 3251-3255.
- Fernando, I. S., Nah, J. W., & Jeon, Y. J. (2016). Potential anti-inflammatory natural products from marine algae. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 48, 22-30.
- Ganesan, P., Kumar, C.S., & Bhaskar, N. (2008). Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresource Technology*, 99(8), 2717-2723.
- Govindasamy, C., Arulpriya, M., & Ruban, P. (2012). Nuclear magnetic resonance analysis for antimicrobial compounds from the red seaweed *Gracilaria corticata*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(1), S329-S333.
- Islam, M.N., Ishita, I.J., Jin, S.E., Choi, R.J., Lee, C.M., Kim, Y.S., Jung, H.A., Choi, J.S. (2013). Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Saccharina japonica* and its constituents pheophorbide a and pheophytin a in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 541-548.
- Julkunen-Titto, R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern Willows methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(2), 213-217.
- Khaled, N., Hiba, M., & Asma, C. (2012). Antioxidant and antifungal activities of *Padina pavonica* and *Sargassum vulgare* from the Lebanese Mediterranean Coast. *Advances in Environmental Biology*, 6(1), 42-48.
- Khairy, H.M., & El-Sheikh, M.A. 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.
- Kuda, T., Kunii, T., Goto, H., Suzuki, T., & Yano, T. 2007. Varieties of antioxidant and antibacterial properties of *Ecklonia stolonifera* and *Ecklonia kurome* products harvested and processed in the Noto peninsula, Japan. *Food Chemistry*, 103(3), 900-905.
- Kumaran, S.P., Kutty, B.C., Chatterji, A., Subrayan, P.P., & Mishra, K.P. (2007). Radioprotection against DNA damage by an extract of Indian green mussel, *Perna viridis* (L). *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 26(4), 263-272.
- Larsen, T.O., Smedsgaard, J., Nielsen, K.F., Hansen, M.E., & Frisvad, J.C. (2005). Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Natural Product Reports*, 22(6), 672-695.
- Lee, Y.S., Shin, K.H., Kim, B.K., & Lee, S. (2004). Anti-diabetic activities of fucosterol from *Pelvetia siliquosa*. *Archives of Pharmacal Research*, 27(11), 1120-1122.
- López, A., Rico, M., Rivero, A., & Suárez de Tangil, M. (2011). The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chemistry*, 125(3), 1104-1109.
- Marzocco, S., Di Paola, R., Serraino, I., Sorrentino, R., Meli, R., Mattaceraso, G., Cuzzocrea, S., Pinto, A., Autore, G. (2004). Effect of methylguanidine in carrageenan-induced

- acute inflammation in the rats. *European Journal of Pharmacology*, 484(2-3), 341-350.
- Mhadhebi, L., Laroche-Clary, A., Robert, J., & Bouraoui, A. (2011). Antioxidant, anti-inflammatory, and antiproliferative activities of organic fractions from the Mediterranean brown seaweed *Cystoseira sedoides*. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 89(12), 911-921.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44(6), 307-315.
- 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. *International Journal of PharmTech Research*. 1, 544-550.
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337-341.
- Rajauria, G., Foley, B., & Abu-Ghannama, N. (2016). Identification and characterization of phenolic antioxidant compounds from brown Irish seaweed *Himanthalia elongata* using LC-DAD-ESI-MS/MS. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 261-268.
- Sabeena Farvin, K.H., & Jacobsen, C. (2013). Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1670-1681.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., & Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), 270-276.
- Singleton, V.L., & Rossi, J.A.Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Souza, B.W., Cerqueira, M.A., Martins, J.T., Quintas, M.A., Ferreira, A.C., Teixeira, J.A., & Vicente, A.A. (2011). Antioxidant potential of two red seaweeds from the Brazilian coasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5589-5594.
- Trovato, A., Raneri, E., Kouladis, M., Tzakou, O., Taviano, M.F., & Galati, E.M. (2001). Anti-inflammatory and analgesic activity of *Hypericum empetrifolium* Willd. (Guttiferae). *Il Farmaco*, 56(5-7), 455-457.
- Zhang, Q., Zhang, J., Shen, J., Silva, A., Dennis, D. A., Barrow, C. J. (2006). A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 18(3), 445-450.
- Zhang, W.W., Duan, X.J., Huang, H.L., Zhang, Y., & Wang, B.G. (2007). Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao coast for antioxidative capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions and subfractions derived from *Symphocladia latiuscula* (Rhodomelaceae). *Journal of Applied Phycology*, 19(2), 97-108.
- Zhang, C. H., Wu, W. H., Wang, J., & Lan, M. B. (2012). Antioxidant Properties of Polysaccharide from the Brown Seaweed *Sargassum graminifolium* (Turn.), and Its Effects on Calcium Oxalate Crystallization. *Marine drugs*, 10(1), 119-130.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559.
- Zubia, M., Fabre, M. S., Kerjean, V., Le Lann, K., Stiger-Pouvreau, V., Fauchon, M., & Deslandes, E. (2009). Antioxidant and antitumoural activities of some *Phaeophyta* from Brittany coasts. *Food Chemistry*, 116(3), 693-701.

ملخص: توصلت البحوث العلمية عن المركبات الطبيعية ذات الخصائص الدوائية إلى أن الطحالب البحرية تعد مصدرا مهما لمركبات جديدة ذات نشاط حيوي متنوع. أجريت هذه الدراسة بهدف البحث عن الأنشطة البيولوجية لثلاث طحالب من الغرب الجزائري، *Sargassum vulgare*، *Cladostephus hirsutus* و *Rissoella verruculosa*. تم تحديد المحتوى الفينولي الكلي، الفلافونويد الكلي، الفلافونول الكلي ومجموع العفص المكتف في المستخلصات الخام وإثير البنزول، و أسيتات الإيثيل، ثنائي كلورو ميثان، بيوتانول والمترسبات المائية. تم تحديد النشاط المضاد للأكسدة عن طريق عدة تحاليل في المختبر. إجمالي القدرة المضادة للأكسدة، قوة إرجاع و تثبيط الحديد، الطاقة المضادة للأكسدة و تثبيط الجذر الحر DPPH. كما تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات من المستخلصات الخام والمستخلصات الجزئية ضد البكتيريا إيجابية الجرام والسالبة الجرام والخميرة باستخدام اختبارات مختلفة مثل اختبار الانتشار عبر الأفراس، والحد الأدنى من التركيز المثبط والحد الأدنى من التركيز المبيد للجراثيم. تم دراسة النشاط المضاد للطفيليات في المختبر ضد أشكال مجرى الدم من *Trypanosoma brucei brucei* والمراحل داخل كريات الدم الحمراء لـ *Plasmodium falciparum*. كما تمت دراسة السمية الحادة للمستخلص الخام من *C. hirsutus* و النشاط الحيوي المضاد للالتهابات. كشفت المستخلصات الخام عن قدرة عالية مضادة للأكسدة الكلية تتراوح بين 1.272 إلى 1.630 ملغ مكافئ حمض الإسكوربيك/غ من المادة الجافة. بالنسبة للطحالب الثلاثة، أظهرت المستخلصات الجزئية لخلات الإيثيل أعلى نشاط مضاد للأكسدة من خلال المقاييسات الثلاث التي تم اختبارها، مع ما يصل إلى 67% من نشاط الكسح الجذري و EC₅₀ من 1.114 مل/م بواسطة مقاييس الحد من قدرة الحديد لجزء إي من *R. verruculosa* وأظهرت المستخلصات الجزئية لأسيتات الإيثيل من الطحالب الثلاثة اختبار أكثر فعالية في النشاط المضاد للميكروبات ضد *S. aureus* (7-14.5) و *B. cereus* (7-10.75) (ملم)، وتراوح قيم CMI من 0.937 إلى 7.5 مل/م و قيم MBC >15 مل/م. وفيما يتعلق بالنشاط المضاد للطفيليات، وجد أن المستخلصات أسيتات الإيثيل لكل من *S. vulgare* و *R. verruculosa* تكون أكثر فعالية ضد *T. b. brucei* مع قيم IC₅₀ من 9.3 و 11.0 ميكروغرام/مل على التوالي، في حين أن المستخلصات الجزئية الثلاثة كانت ضئيلة النشاط ضد *Plasmodium falciparum* لم يلاحظ أي علامات للسمية الحادة في مستخلص الخام من *C. hirsutus* في 150 و 300 ملغ / كغ. وأظهرت نتائج النشاط ضد انخفاض التهاب أرجل الفئران بقيمة تعادل 58.86% و 71.01% في 150 و 300 ملغ/كغ، على التوالي، في الساعة السادسة.

الكلمات المفتاحية: *Rissoella verruculosa*، *Cladostephus hirsutus*، *Sargassum vulgare*، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للميكروبات، نشاط مضاد للطفيليات، السمية الحادة، نشاط مضاد للالتهابات.

Résumé: Les algues marines constituent une source prometteuse de nouveaux composés bioactifs doués de diverses activités pharmacologiques. L'objectif visé dans ce présent travail est l'évaluation des activités biologiques de trois algues marines de la côte ouest d'Algérie, il s'agit de *Sargassum vulgare*, *Cladostephus hirsutus* et *Rissoella verruculosa*. Les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes, flavonols et en tanins condensés ont été déterminées dans les extraits bruts et leurs fractions: éther de pétrole, acétate d'éthyle, dichlorométhane, butanol et dans la fraction aqueuse. L'activité antioxydante *in vitro* a été réalisée par le biais de trois tests, à savoir la capacité antioxydante totale, la réduction du fer et le piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl DPPH. L'activité antimicrobienne des extraits bruts et de leurs fractions contre des bactéries Gram-positives, bactéries Gram-négatives et une levure ont été évaluées en utilisant divers tests tels que le test de diffusion du disque, la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB). L'activité antiparasitaire a été étudiée *in vitro* contre les formes sanguines de *Trypanosoma brucei brucei* et les stades intra-érythrocytaires de *Plasmodium falciparum*. La toxicité aiguë et l'activité anti-inflammatoire *in vivo* de l'extrait brut de *Cladostephus hirsutus* ont également été étudiées. Les extraits bruts ont révélé une capacité antioxydante totale élevée allant de 1,272 à 1,630 mg d'équivalent acide ascorbique/g de matière sèche. La meilleure activité réductrice du fer est obtenue avec la fraction acétate d'éthyle de *R. verruculosa* avec une concentration de EC₅₀ égale à 1.114±0.001 mg/mL, et une activité considérable à piéger le radical DPPH 67,877%. Les fractions acétate d'éthyle des trois algues testées ont montré une activité antimicrobienne plus intéressante contre *S. aureus* (7-14,5 mm) et *B. cereus* (7-10,75 mm), des valeurs de CMI allant de 0,937 à 7,5 mg/mL et des valeurs MBC >15 mg/mL. En ce qui concerne l'activité antiparasitaire, les fractions acétate d'éthyle de *S. vulgare* et *R. verruculosa* se sont révélées plus efficaces contre *T. b. brucei* avec des valeurs de IC₅₀ de 9,3 et 11,0 µg/mL, respectivement, alors que les trois fractions étaient peu actives contre *P. falciparum*. Aucun signe de toxicité aiguë n'a été observé dans l'extrait brut de *C. hirsutus* à 150 et 300 mg/kg. Une réduction de l'œdème de la patte des souris de 58.86% et de 71.01% à 150 et 300 mg/kg, respectivement, a été enregistrée à la sixième heure.

Mots clés: *Sargassum vulgare*, *Cladostephus hirsutus*, *Rissoella verruculosa*, activité antioxydante, capacité antimicrobienne, activité antiparasitaire, toxicité aiguë, activité anti-inflammatoire.

Abstract: The search for natural compounds with pharmaceutical activity indicated marine macroalgae as promising source to supply novel compounds with varying bioactivities. This study was carried out the biological activities of three Algerian algae, *Sargassum vulgare*, *Cladostephus hirsutus* and *Rissoella verruculosa*. The total phenolic contents, Total flavonoids, total flavonols and total condensed tannins were determined in the crude extracts and their fractions petroleum ether, ethyl acetate, dichloromethane, butanol and aqueous fraction. The antioxidant activity was performed via several *in vitro* assays: Total Antioxidant Capacity, Ferric Reducing Antioxidant Power and DPPH radical scavenging activity. Antimicrobial activity of the crude extracts and their fractions against Gram-positive, Gram-negative bacteria, and yeast was assessed using various tests such as the disc diffusion assay, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Antiparasitic activity was studied *in vitro* against the blood stream forms of *Trypanosoma brucei brucei* and the intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. The *in vivo* anti-inflammatory activity and acute toxicity of the crude extract of *Cladostephus hirsutus* were also investigated. Crude extracts revealed high total antioxidant capacity ranging from 1.272 to 1.630 mg ascorbic acid equivalent/g of dry matter. For the three algae, ethyl acetate fraction showed the highest antioxidant activity by the three assays tested, with up to 67,877% of DPPH radical scavenging activity and an EC₅₀ of 1.114 mg/mL by ferric reducing power assay for the ethyl acetate fraction of *R. verruculosa*. ethyl acetate fractions of the three tested algae showed more interesting antimicrobial activity against *S. aureus* (7-14.5 mm) and *B. cereus* (7-10.75 mm), MIC values ranged from 0.937 to 7.5 mg/mL and MBC values >15 mg/mL. Concerning the antiparasitic activity, ethyl acetate fractions of *S. vulgare* and *R. verruculosa* were found to be more effective against *T.b. brucei* with IC₅₀ values of 9.3 and 11.0 µg/mL, respectively, whereas the three ethyl acetate fractions were little active against *Plasmodium falciparum*. No signs of acute toxicity were observed in the crude extract of *C. hirsutus* at 150 and 300 mg/kg. Significant and dose-dependent activity was showed against acute inflammation with edema reduction of 58.86% and 71.01% at 150 and 300 mg/kg, respectively, at 6 hour.

Keywords: *Sargassum vulgare*, *Cladostephus hirsutus*, *Rissoella verruculosa*, Antioxidant activity, antimicrobial activity; antiparasitic activity, acute toxicity, anti-inflammatory.