



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique
Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences
de la Terre et de l'Univers



Département de Biologie
Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA)

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie
Option : Sciences des aliments

Présenté par
M^{elle} KHEROUA Meriem

Thème

**Étude phytochimique et activité antioxydante des extraits
bruts d'une microalgue (*Encyonema sp.*) récoltée
de la station de filtration d'eau de Bouhlou**

Soutenu le 30 /06/2015 devant le jury composé de :

Mme ATIK-BEKKARA F.	Professeur à l'Université de Tlemcen	Présidente
Mme BENGUEDDA W.	Maître de Conférences à l'Université de Tlemcen	Examinatrice
Mr. BELYAGOUBI L.	Maître de Conférences à l'Université de Tlemcen	Examineur
Mme BELYAGOUBI N.	Maitre de Conférences à l'Université de Tlemcen	Encadreur

Année universitaire : 2014-2015

Remerciements

Avant toutes choses, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience pour faire ce travail.

Ce travail de recherche a été effectué au Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA), du département de Biologie, de l'Université ABOU BEKR BELKAID-TLEMCEM, sous la direction de Mme Belyagoubi née Benhammou N.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive connaissance à Mme Belyagoubi née Benhammou N., Maître de Conférences Classe A à l'Université de Tlemcen, Département de Biologie, pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il m'accordé m'ont permet de réaliser ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à Mme Atik-Bekkara F., Professeur à l'Université de Tlemcen, Département de Biologie, m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

J'exprime mes vifs remerciements à Mme Benguedda W., Maître de Conférences Classe B à l'Université de Tlemcen, Département d'Écologie, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'être membre de jury.

Je tiens également mes vifs remerciements à Mr Belyagoubi L., Maître de Conférences Classe B à l'Université de Tlemcen, Département de Biologie, d'avoir accepté de juger ce modeste travail et participer au jury.

*Je tiens à exprimer également ma profonde reconnaissance aux doctorantes du laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA) pour leur aide et compréhension, je cite ici **Ghania Aissaoui, Khadidja Kanoun et Meriem Benmandjoub.***

Je ne saurais oublier de remercier mes amies Zini M., Radi S., Belhadji A., Bahraoui Y., Azzi R., et toutes les personnes que je n'ai pas pu citer leurs noms ici, et qui ont participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Dédicace

*A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie,
J'ai pu réaliser ce travail que je dédie.*

*A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma
vie ma mère qui ma apporté son appui durant toutes mes années
d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance,
Courage et sécurité.*

*Amon cher père qui ma appris le sens de la persévérance tout au
long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses
encouragements.*

*A ma grand Mère Hadhoum et ma grand Père Moussa
Pour votre présence et votre amour: Que Dieu vous Protège*

*A ma très chère sœur Nassima et son époux Mohammed
je vous souhaite une longue vie et bonne santé.*

*A mes très chers frères Mohammed et Aissa merci pour tout ce que
vous avez fait pour moi.*

A mon neveu Adam

A mes tantes :Nadera ,Amaria ,Fatima ,Saliha ,Zoulikha ,madjida

A mes oncles, cousins et cousines

*À mes chères copines : Nadjat, Liela, Amel, Amina, Hayat, Meryam
pour leur soutient et bonne humeur*

A mes amis(es) : Rabab , Ismahan ,Bouchra ,B.Meriem , et Mohammed Amine

Meriem kheroua

Résumé

Dans cette contribution, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et l'évaluation des activités antioxydantes des extraits méthanolique, acétonique, chloroformique, dichlorométhanique et hexanique de l'algue brune *Encyonema sp.* de la famille des Cymbellaceae, récoltée de la station de filtration des eaux de Bouhlou de la wilaya de Tlemcen pendant les deux mois de février et de mars.

Les rendements les plus élevés sont ceux obtenus dans les mois de février et de mars pour le chloroforme (2.698 %) et dichlorométhane (4.108 %). Alors, le rendement en huile fixe est faible de l'ordre de 0.748%.

Durant le mois de mars, les teneurs en phénol totaux (12.171 ± 1.633 mg EAG/g MS) et en tanins condensés (11.07 ± 2.379 mg EC/g MS) sont élevées dans l'extrait dichlorométhanique. Aussi, le dosage en phénols totaux et en flavonoïdes dans l'huile fixe a présenté des valeurs de 6.401 ± 1.517 mg EAC/g MS et 6.106 ± 0.013 mg EC/g MS, respectivement.

L'algue *Encyonema sp.* a démontré des teneurs en chlorophylles (a) et en chlorophylle total avec des teneurs 1.88 et 2.026 mg/g, respectivement.

L'étude du pouvoir antioxydant a révélé que l'extrait dichlorométhanique a une meilleure capacité antioxydante totale (12.877 ± 0.958 mg EAA/g MS). Les extraits dichlorométhanique et chloroformique ont une bonne activité antiradicalaire vis-à-vis du radical DPPH avec des pourcentages d'inhibition égales à 55.65 et 54.79 %, respectivement à 20 mg/ml, dont les concentrations EC_{50} égalent à 10.659 ± 1.027 et 18.653 ± 0.598 mg/ml pendant le mois de février. En revanche, ces deux extraits ont enregistré des capacités réductrices dont les concentrations EC_{50} égalent à 3.869 ± 0.065 et à 4.050 ± 0.097 mg/ml, respectivement. Alors, l'huile fixe a noté une activité faible du piégeage du DPPH ($EC_{50} = 15.943$ mg/ml).

La corrélation trouvée en utilisant le test de Pearson est positive entre la capacité antioxydante totale et les phénols totaux ($r=0.996$), flavonoïdes ($r=0.976$) et les tanins condensés ($r=0.82$).

Mots clés : Algue brune, *Encyonema sp.*, Eau douce, Étude phytochimique, Activité antioxydante, Corrélation.

Abstract

In this contribution, we sum interested in this work to the phytochemical study and evaluation of antioxidant activities of methanol extracts, acetone, chloroform, dichloromethane and hexane brown seaweed *Encyonema* sp. Family of Cymbellaceae, harvested from the filter station for water Bouhlou of Tlemcen during the two months of February and March.

The highest yields are those obtained in the months of February and March for chloroform (2.698%) and dichloromethane (4.108%). Then, the yield fixed oil is low in the order of 0.748%.

During March, the contents of total phenol (12.171 ± 1.633 mg EAG / g MS) and condensed tannins (11.07 ± 2.379 mg CE / g MS) are high in dichloromethane extract. Also, the dosage of total phenols and flavonoids in the fixed oil showed values of $6.401 \pm$ EAC mg / g ± 6.106 mg MS and EC / g DM, respectively.

The *Encyonema* seaweed sp. demonstrated levels of chlorophylls (a) and in total chlorophyll contents with 1.88 and 2.026 mg / g respectively.

The study of the antioxidant capacity revealed that the dichloromethane extract greater total antioxidant capacity (12,877 0.958 mg EAA / g MS). The dichloromethane extracts and chloroform have a good anti-radical activity vis-à-vis the DPPH radical with inhibition percentages equal to 55.65 and 54.79% respectively at 20 mg / ml, with concentrations EC50 equal to $10,659 \pm 1,027$ and $18,653 \pm 0.598$ mg / ml during the month of February. However, these extracts have registered reducing capabilities EC50 concentrations equal to 3.869 ± 0.065 and 4.050 ± 0.097 in mg / ml, respectively. So the fixed oil noted low activity sequestration DPPH (EC50 = 15,943 mg / ml).

The correlation found by using the Pearson test is positive between total antioxidant capacity and total phenols ($r = 0.996$), flavonoids ($r = 0.976$) and condensed tannins ($r = 0.82$).

Keywords: brown seaweed, *Encyonema* sp, Freshwater, phytochemical study, antioxidant activity, Correlation.

ملخص

في هذه المساهمة نحن مهتمون بدراسة الكيمياء النباتي وتقييم الأنشطة المضادة للأكسدة لمستخلصات الميثانول، والأسيتون، والكلوروفورم، ثنائي كلورو ميثان والهكسان للطحلب البني *Encyonema sp*. من عائلة Cymbellaceae، والتي حصدها من محطة تصفية المياه بوحلو بتلمسان خلال شهرين فبراير و مارس.

المردود الاعلى تم الحصول عليه في شهري فبراير ومارس بقيمة (2.698%) لمستخلص الكلوروفورم و (4.108%) بالنسبة لثنائي كلورو ميثان. و بالنسبة لمردود الزيت الثابت فهو منخفض و ب يقدر 0.748%.

خلال شهر مارس، محتويات الفينول الكلي قدرت ب: (1.633 ± 12.171) ميلي غرام معادل لحمض الغاليك من غرام للمادة الجافة) و التانات المكثفة ب: (2.379 ± 11.07) ملغ معادل للكاتيشين من غرام للمادة الجافة) بالنسبة لمستخلص ثنائي كلورو ميثان. و بالنسبة لزيت الثابت قدرت محتويات الفينولات و الفلافونيدات ب: 6.401 ± 1.517 ميليغرام معادل لحمض الغاليك من غرام للمادة الجافة و 6.106 ± 1.448 ميلي غرام معادل لحمض الكاتيشين غرام للمادة الجافة على التوالي.

أثبتت الدراسة حول الطحلب البني *Encyonema sp*. ان محتويات الكلوروفيل (أ) و محتويات الكلوروفيل الاجمالي قدرت ب: 1.88 و 2.026 ميلي غرام / غرام على التوالي.

كشفت دراسة القدرة المضادة للأكسدة أن مستخلص ثنائي كلورو ميثان اديه قدرة عالية مضادة للأكسدة بقيمة (0.958 12877) ميلي غرام معادل لحمض الاسكوربيك من غرام للمادة الجافة مستخلصات ثنائي كلورو ميثان والكلوروفورم لديها نشاط مضاد للجذري جيد وجها لوجه مع DPPH جذري مع نسبة تثبيط يساوي 55.65 و 54.79% على التوالي في 20 م طيغرام / م طيغ لتر ، مع تركيز 'EC50 يساوي 10.659 ± 1.027 و 18.653 ± 0.598، ميلي غرام / مل خلال شهر فبراير. ومع ذلك فقد سجلت هذه المقتطفات لحد من قدرات EC50 تركيزات تساوي 3.869 ± 0.065 و 4.050 ± 0.097 وفي ميلي غرام / ميلي لتر على التوالي. لذلك لوحظ ان نشاط المضاد للجذري للزيت الثابت EC50 منخفض ب (15943 =) ميلي غرام / ميلي لتر .

العلاقة التي عثرت عليها باستخدام اختبار بيرسون هو إيجابي بين إجمالي القدرة المضادة للأكسدة، ومجموع الفينولات (0.996)، الفلافونويدات (0.976) والتانات المكثفة (0.82)

كلمات : طحلب بني، *Encyonema sp*، المياه العذبة، دراسة الكيمياء النباتي، النشاط المضادة للأكسدة، الارتباط.

Liste des abréviations

AA :	acide ascorbique
AFNOR :	Association Française de normalisation.
[Cl:	Concentration
CAT:	Capacité antioxydante totale
DO:	densité optique
DPPH*:	Radical 2.2 diphényle-1-picrylhydrazyl :
EAA:	Équivalent d'acide ascorbique
EAG:	Équivalents d'acide gallique
EC:	Équivalents de catéchine
EC₅₀ :	Concentration permettant d'inhiber 50 % du radical DPPH où à réduire 50% du fer
FRAP :	Réduction de fer (Ferric Reducing Antioxidant Power)
h:	Heure
m/v :	Masse/Volume
M:	Masse.
min:	Minute

Liste des tableaux

Tableau 01 : Diversité des microalgues eucaryotes et procaryotes, marines et d'eau douce..	04
Tableau 02 : travaux intérieurs des diatomées et des microalgues	15
Tableau 03 : Des principaux radicaux libres.....	17
Tableau 04 : Situation géographique	20
Tableau 05 : Paramètres physicochimiques de l'eau brute (hôte).....	23
Tableau 06 : Corrélation entre les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés et les tests du pouvoir antioxydant durant les deux mois de février et mars.....	49

Liste des figures

Figure 01 : Diversité morphologique des microalgues.....	03
Figure 02 : Reproduction sexuée chez <i>Spirogyra</i> et Autosporulation chez <i>Oedogonium</i>	06
Figure 03 : Diversité du champ d'application des microalgues.....	08
Figure 04: Structure du frustule de la diatomée <i>Luticola ventricosa</i>	10
Figure 05: Clé simplifiée de détermination des genres des diatomées d'eau douce.....	10
Figure 06: Modes de reproduction des diatomées.....	11
Figure 07 : Cycle diphasique (diatomées).....	12
Figure 08 : Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène XO : xanthine oxydase ; P-450 : cytochrome P-450.....	17
Figure 09 : : Aperçu des différentes espèces oxygénées activées et des antioxydants régulateurs de leur production.....	18
Figure 10 : Emplacement géographique du site de récolte des échantillons de l'algue <i>Encyonema sp</i>	21
Figure 11: Carte d'état major : station de filtration des eaux – Bouhlou	22
Figure 12: la station de filtration des eaux «Bouhlou »	24
Figure 13: Étapes de séchage, de broyage et de tamisage de l'algue.....	26
Figure 14: Rendements des extraits obtenus à partir de l'algue <i>Encyonema sp</i> , exprimés en pourcentages durant les deux mois de février et de mars.....	37
Figure 15: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.....	38
Figure 16: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.....	38
Figure 17: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés.....	39
Figure 18: Teneurs en phénol totaux, en flavonoïde et en tanins condensés dans les extraits de l'algue <i>Encyonema sp</i> . durant les deux mois de février et de mars.....	39
Figure 19: Teneurs en chlorophylle (a), en chlorophylle (b), en chlorophylle totale et en caroténoïde (Ca) dans les extraits de l'algue <i>Encyonema sp</i> . durant les deux mois de février et de mars.....	41

Figure 20: Capacité antioxydante totale des extraits étudiés de l'algue <i>Encyonema sp.</i> durant les deux mois de février et de mars.....	42
Figure 21: Pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'acide ascorbique et des extraits de l'algue <i>Encyonema sp.</i> durant les deux mois de février et de mars.....	44
Figure 22: Concentrations EC ₅₀ des extraits et d'huile fixe de l'algue <i>Encyonema sp.</i> durant les deux mois de février et de mars, obtenues par le test du DPPH.....	45
Figure 23: Pouvoir réducteur des extraits de l'algue <i>Encyonema sp.</i> durant le mois de février.....	46
Figure 24: Pouvoir réducteur des extraits de l'algue <i>Encyonema sp.</i> durant le mois de mars.....	47
Figure 25 : Concentrations EC ₅₀ des extraits de l'algue <i>Encyonema sp.</i> durant les deux mois de février et de mars, obtenues par le test de la réduction du fer.....	48

Liste des photos

Photo 01 : <i>Encyonema sp</i> séchée	13
Photo 02 : <i>Encyonema sp</i> flottante sur la surface	13
Photo 03 : Récolte d'algue à l'aide d'un filet.....	24
Photo 04 : Fixation de l'algue sur les parois	25
Photo 05 : Observation microscopique de l'algue <i>Encyonema sp</i>	27
Photo 06 : Evaporateur rotatif de type <i>HAHNSHIN HS-2005 V-N</i>	29
Photo 07 : Photo 07 : l'extracteur «soxhlet».....	30

Tables Des Matières

Remerciements	
Dédicace	
Résumés	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des photos	
Introduction générale.....	01

Partie bibliographique

Chapitre I : Généralité sur les microalgues

1. Introduction.....	03
2. Microalgues.....	03
2.1. Description.....	03
2.2. Diversité et classification.....	04
2.3. Habitats	05
2.4. Reproduction.....	05
2.5. Composition biochimique	07
2.6. Application des microalgues	07

Chapitre II: Présentation de l'algue étudiée

1. Les diatomées.....	09
1.1 Généralité.....	09
1.2 Habitat.....	09
1.3 Morphologie et structure cellulaire.....	09
1.4. Classification des diatomées.....	10
1.5. Cycle de développement	11
1.6.Répartition et modes de vie	12
1.7.L'ordre Cymbellales.....	12
1.8.La famille des Cymbellaceae.....	13
2. <i>Encyonema sp</i>	13
2.1. Le genre <i>Encyonema</i>	13
2.2. Taxonomie du genre <i>Encyonema</i>	14

2.3. Habitat.....	14
2.4/Travaux antérieures.....	14

Chapitre III : Radicaux libres et pouvoir antioxydant

1. Introduction	16
2. Radicaux libres.....	16
2.1. Définition.....	16
2.2. Formes des radicaux libres	16
2.3. Origine des radicaux libres	17
3. Action biologique des radicaux libres.....	18
4. Défenses antioxydantes.....	18
5. Pouvoir antioxydant <i>in vitro</i>	19

Matériel et méthodes

Chapitre I : Matériel végétal

1. Zone d'échantillon	20
2. Echantillonnage	24
3. Préparation de l'échantillon	25
4. Identification.....	26

Chapitre II : Préparation des extraits et dosages phytochimiques

1. Préparation des extraits algaux.....	29
2. Extraction d'huile fixe.....	30
3. Dosage des composés phénoliques, chlorophylles et caroténoïdes.....	31
3.1.Dosage des phénols totaux.....	31
3.2.Dosage des flavonoïdes	31
3.3.Dosage des tanins condensés	32
3.4.Dosage des chlorophylles	32
3.5.Dosage de caroténoïdes	33

Chapitre III : Pouvoir antioxydant

1. Introduction.....	34
2. Capacité antioxydante totale (CAT).....	34
3. Piégeage du radical libre DPPH	34
4. Réduction du fer (FRAP).....	35
5. Analyse statistique.....	36

Résultats et discussion

I. Rendement et dosage des composés phénolique	37
1. Rendement des extraits.....	37
2. Dosage des composés phénoliques.....	38
3. Dosage des chlorophylles et caroténoïdes.....	41
II. pouvoir antioxydant.....	42
1. Test de la capacité antioxydante totale.....	42
2. piégeage du radical libre DPPH	43
3. réduction de fer (FRAP).....	46
4. Corrélation entre les teneurs en composés phénoliques et les tests du pouvoir antioxydant.....	49
Conclusion général.....	51
Références bibliographiques.....	53
Annexes.....	I

Les produits d'origine naturelle occupent une place importante dans la découverte de nouveaux médicaments. On estime que près de 50% des agents thérapeutiques utilisés actuellement proviennent de sources naturelles (animaux, plantes, champignons, algues, etc.). On estime également que moins de 10% des espèces végétales ont été étudiées pour leurs activités biologiques (**Balunas et Kinghorn, 2005; Lioret, 2010**).

Les algues sont des organismes terrestres les plus anciens et les seuls êtres vivants capables de produire de la matière organique par la photosynthèse (**Hervé, 2012**). Elles sont essentiellement aquatiques dans les eaux douces ou marines, et certaines vivent sur la neige ou la glace des régions polaires et des hautes montagnes. D'autres au contraire supportent dans les eaux des sources thermales des températures élevées (algues thermophiles). Elles comprennent 20 000 à 30 000 espèces dans le monde, soit 18% du règne végétal (**Moreiretal., 2002**).

Les algues sont divisées en trois groupes selon leur pigmentation : algues vertes, algues brunes et algues rouges. Chacun de ces groupes est caractérisé par la présence de chlorophylle qui confère la couleur verte aux végétaux. Chez les algues brunes et rouges, les pigments surnuméraires se substituent au vert de la chlorophylle. Il s'agit des xanthophylles et des caroténoïdes (fucoxanthine). Chez les algues rouges, il s'agit des phycoérythrine et phycocyanines (**Floc'h et al., 2006**).

Les phéophytes ou algues brunes qui sont regroupées dans la classe des Fucophycées appelées autrefois les Phéophycées. Leur couleur est due à l'abondance des pigments bruns, la fucoxanthine, qui masque les chlorophylles a et e (**Ainane, 2011**). Ces algues sont une source riche potentiellement de métabolites biologiquement actifs qui peuvent être employés dans plusieurs domaines, tels que : l'alimentation, la cosmétique, le textile, la papeterie, la pharmaceutique et la médecine. Leurs propriétés antitumorales, antimicrobiennes, antivirales et anti-inflammatoires leur confèrent une valeur appréciée en pharmacie et en médecine (**Borowitzka, 1992 ; Febles, 1995 ; Tarlan et al., 2002; Ely, 2004; Cardozo et al., 2006**).

Dans ce contexte, notre choix est basé sur l'algue brune *Encyonema sp.* récoltée de la station de filtration des eaux de Bouhrouf du sud-ouest de la wilaya Tlemcen durant deux mois de février et de mars 2015 pour but de la valoriser en quantifiant les teneurs en composés phénoliques et en pigments et en évaluant le pouvoir antioxydant des extraits obtenus.

La démarche adoptée pour aboutir notre but est la suivante :

La première partie : concernant l'étude bibliographique comprend :

- Généralités sur les algues et les microalgues en appuyant sur la classification, la distribution, la reproduction, et la présentation de l'espèce algale, dans le premier chapitre;
- Un aperçu général sur les radicaux libres et les antioxydants en deuxième chapitre.

La deuxième partie reporte la description du protocole expérimental à savoir :

- L'extraction et fractionnement de l'extrait de l'algue par des solvants de polarité différente : (méthanol, chloroforme, acétone, dichlorométhane et hexane).
- Dosage des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés ;
- Dosage des chlorophylles et caroténoïdes
- L'extraction d'huile fixe de notre algue *Encyonema sp.*
- Évaluation des propriétés antioxydantes des extraits de l'algue *Encyonema sp.*, par trois méthodes : la capacité antioxydante totale, le piégeage du radical libre DPPH et la réduction du fer.

La troisième partie consiste à interpréter et discuter les résultats obtenus.

1. Introduction :

Les algues sont des organismes chlorophylliens se développant dans l'eau ou dans des milieux très humides. Elles sont à la base du cycle biologique existant dans l'eau et constituent donc le point de départ de la chaîne alimentaire qui aboutit aux peuplements piscicoles exploités par l'homme (Iltis, 1980). Du fait de leurs milieux de vie aquatique et parce que microscopiques pour la plupart elles demeurent moins bien connues que les autres végétaux (Gayral, 1975).

On distingue deux grandes catégories d'algues : les microalgues, organismes unicellulaires et les macroalgues, végétaux macroscopiques généralement fixés sur le fond marin.

2. Microalgues :

2.1. Description :

Peuplant les eaux douces comme marines, les microalgues présentent une diversité plus grande que celle de toutes les plantes terrestres. Il existerait sur le globe au moins 200 000 espèces différentes. Ces organismes constituent un groupe polyphylétique, très diversifié avec des procaryotes (les algues bleues ou cyanobactéries) d'une part et les eucaryotes réunissant les algues vertes, rouges et brunes d'autre part.

Le classement en divisions est basé sur diverses propriétés telles que la pigmentation, la nature chimique des produits de stockage issus de la photosynthèse, l'organisation des membranes photosynthétiques et d'autres caractéristiques morphologiques (figure 01) (Person, 2011).

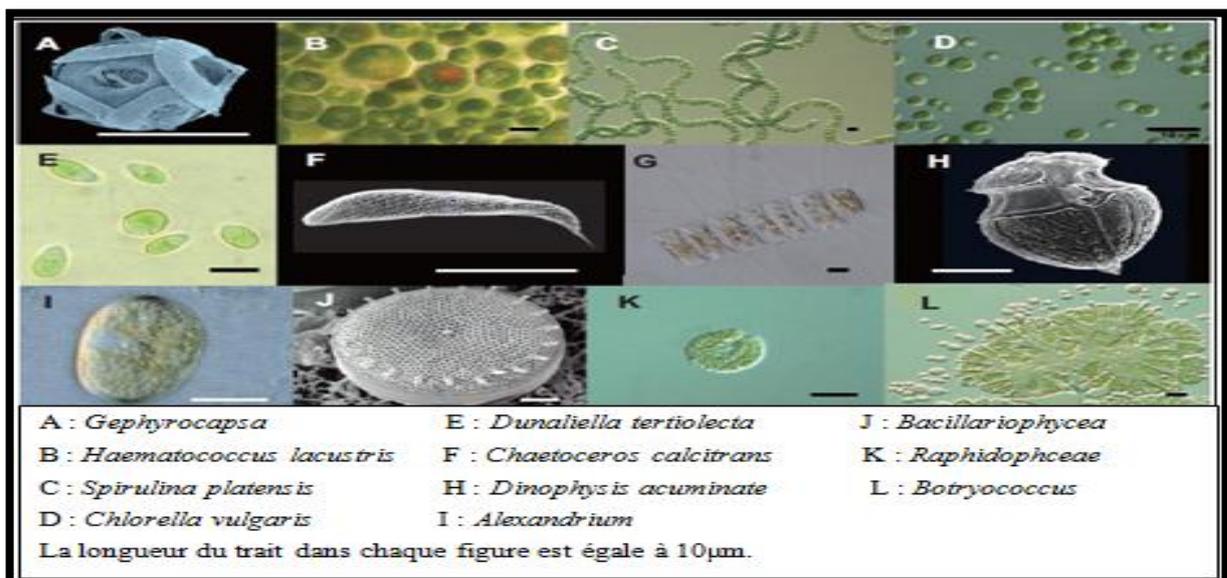


Figure 01 : Diversité morphologique des microalgues (Sumi, 2009)

Les espèces de microalgues les plus cultivées sont: la cyanobactérie *Arthrospira* (la spiruline, qui représenterait 50% de la production mondiale), suivie par les microalgues vertes *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Nannochloropsis* et la diatomée *Odontella* (**Abed et al., 2008**).

2.2.Diversité et classification

Les microalgues constituent un groupe extrêmement hétérogène rassemblé autour d'une cohérence physiologique : la photosynthèse oxygénique (**Andersen, 1992**). Cette famille rassemblerait de plusieurs centaines de milliers à plusieurs millions d'espèces selon les estimations, parmi lesquelles 47000 espèces sont décrites (**Andersen et al., 1997**). Par comparaison, la diversité des plantes supérieures est de l'ordre de 400 000 espèces. La classification (**Tableau 1**) de cette diversité est complexe et la taxonomie est sujette à de fréquents bouleversements du fait notamment de l'utilisation des techniques de phylogénie moléculaire (**Sharma et Rai., 2011**)

Tableau 1 : Diversité des microalgues eucaryotes et procaryotes, marines et d'eau douce (**Jeffrey et al., 1997;Sharma et Rai, 2011**)

Règne	Embranchement/Classe
Procaryotes	Cyanophytes
	Prochlorophytes
Eucaryotes	Bacillariophytes
	Charophytes
	Chlorophytes
	Chrysophytes
	Cryptophytes
	Dinophytes
	Euglenophytes
	Glaucoephytes
	Haptophytes
	Phaeophytes
	Rhodophytes

2.3.Habitats :

Les microalgues occupent la plupart des niches écologiques. Si elles sont surtout présentes dans les environnements aquatiques, elles ont su également coloniser les sols et une vaste gamme de supports comme les rochers, les arbres ou encore les édifices architecturaux (Macedo *et al.*, 2009). Preuve de leur diversité d'habitats, certaines microalgues se développent dans les eaux de fonte de la glace ou de la neige et on les rencontre également dans les déserts arides à semi-arides. L'atmosphère constitue également un environnement dans lequel une diversité notable de microalgues eucaryotes et de cyanobactéries est signalée (Sharma *et al.*, 2007). Enfin, cette capacité à coloniser l'ensemble de la biosphère est une propriété qui, comme pour les bactéries non photosynthétique, leur permet de se développer dans des conditions dites « extrêmes ». C'est grâce à l'absence de structure complexe autre que la cellule et à un métabolisme orienté principalement vers la production d'énergie que les microalgues ont cette capacité à être notablement ubiquistes (Falkowski et Raven, 1997).

2.4.Reproduction :

Deux grands groupes de reproduction chez les microalgues ont été reportés (Michel Cavalla, 2000)

:

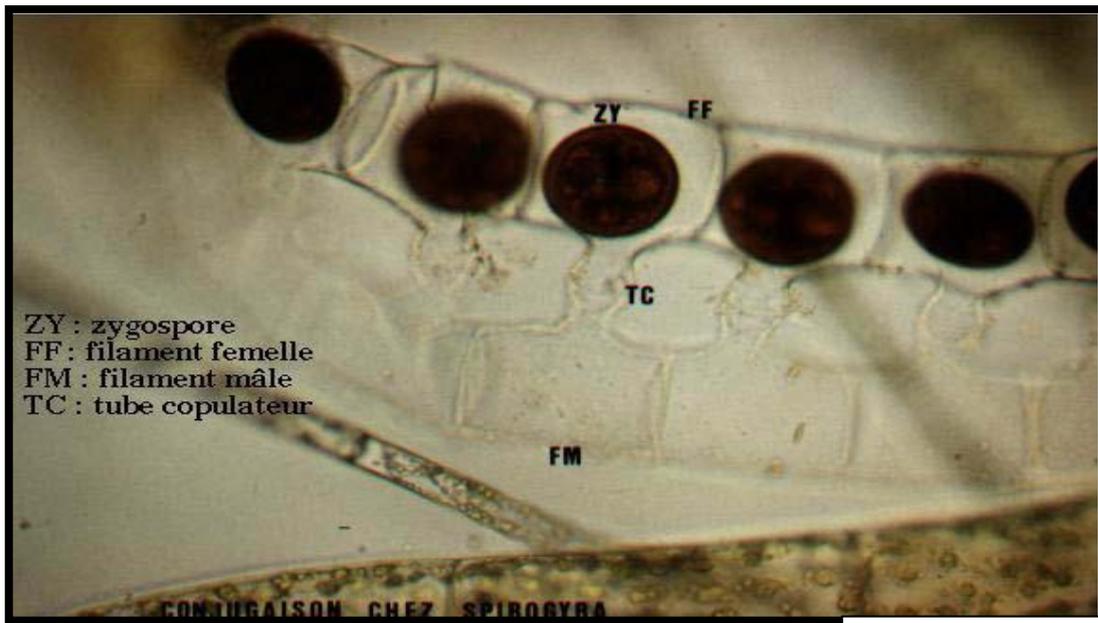
1/ *Reproduction asexuée* :

Elle peut être de 3 types :

- ❖ **Fragmentation** : le thalle se sépare en deux parties qui redonneront chacune un nouveau thalle.
- ❖ **Sporulation** : des spores peuvent être formées dans les cellules végétatives ordinaires ou dans des structures spécialisées appelées sporanges.
- ❖ **Scission binaire** : division du noyau puis du cytoplasme.

2/ *Reproduction sexuée* :

Dans la reproduction sexuée, il y a fusion de gamètes mâle et femelle pour produire un zygote diploïde. Des œufs se forment dans les cellules réceptrices identiques aux cellules somatiques (*Spirogyra*) ou dans des cellules végétatives femelles peu modifiées nommées oogones (*Fucus*). Les spermatozoïdes sont produits dans des structures mâles spécialisées appelées anthéridies.



ZY : zygospore
FM : filament mâle
FF : filament femelle
TC : tube copulateur

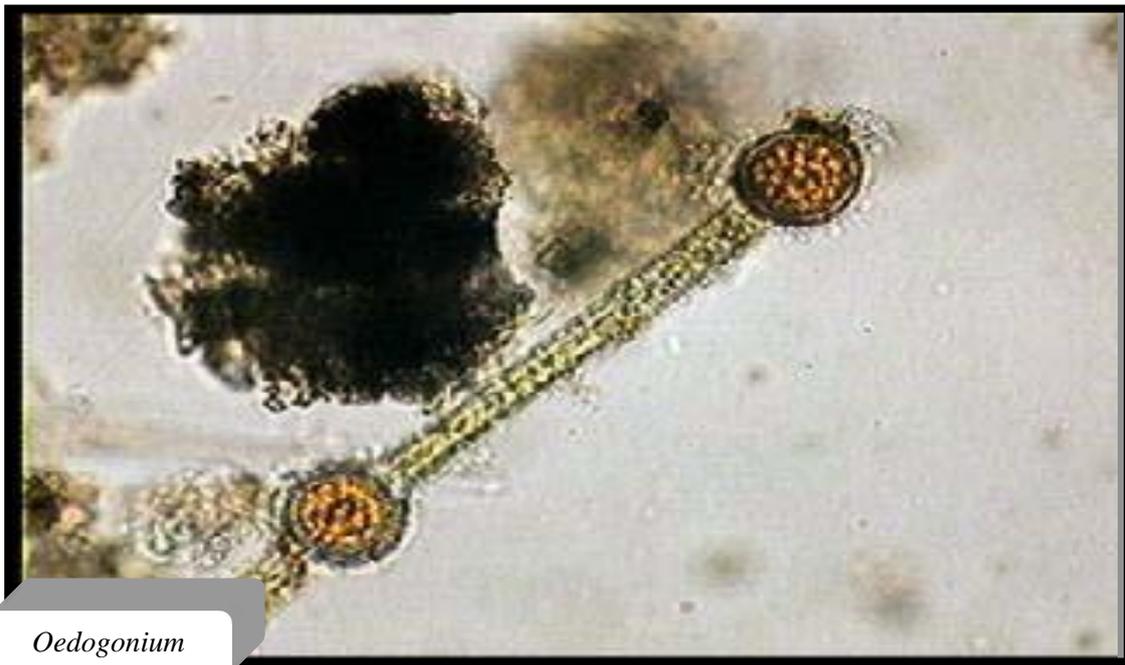


Figure 02 : Reproduction sexuée chez *Spirogyra* et Autosporulation chez *Oedogonium*.

2.5. Composition biochimique :

Les microalgues présentent une très grande diversité de molécules au sein de leurs cellules. Cette biomasse se différencie principalement des autres végétaux par sa richesse en lipides, en protéines, en vitamines, en acides gras, en polysaccharides, en stérols, en phycobilines, en pigments et en antioxydants (**Person, 2011, Dash et al., 2014**).

Elles représentent une source importante de quasi toutes les vitamines essentielles : ***B1, B6, B12, C, E, K1***, et possèdent un large panel de pigments, fluorescents ou non, pouvant aussi avoir un rôle d'antioxydants. En plus de la chlorophylle (0.5 à 1% de la matière sèche) qui est le pigment photosynthétique primaire chez toutes les algues photosynthétiques, on trouve toute une gamme de pigments supplémentaires de type caroténoïdes (0.1 à 0.2% de la matière sèche) et phycobiliprotéines (phycoérythrine et phycocyanine) (**Person, 2011, Dash et al., 2014**).

2.6. Application des microalgues

Les microalgues ont la capacité de produire une large gamme de composés bioactifs de haute valeur comme des pigments, des antioxydants, des bêta-carotènes, des vitamines, des polysaccharides et des acides gras. Ils peuvent être utilisés dans différents secteurs industriels tels que l'industrie pharmaceutique, cosmétique, nutraceutique et celle des aliments fonctionnels (figure 04). Aussi, les hydrocolloïdes de type alginates, agars-agars et carraghénanes, produits à partir d'algues sont largement utilisés comme agents de texture dans les aliments et les produits pharmaceutiques (**Barrow et Shahidi, 2008**). Les espèces d'algues ont également le potentiel d'être issues de la bio-ingénierie, permettant l'amélioration de leurs caractéristiques spécifiques et la production de coproduits de valeur. Cela peut permettre aux biocarburants de rivaliser économiquement avec le pétrole (**Rosenberg et al., 2008**).

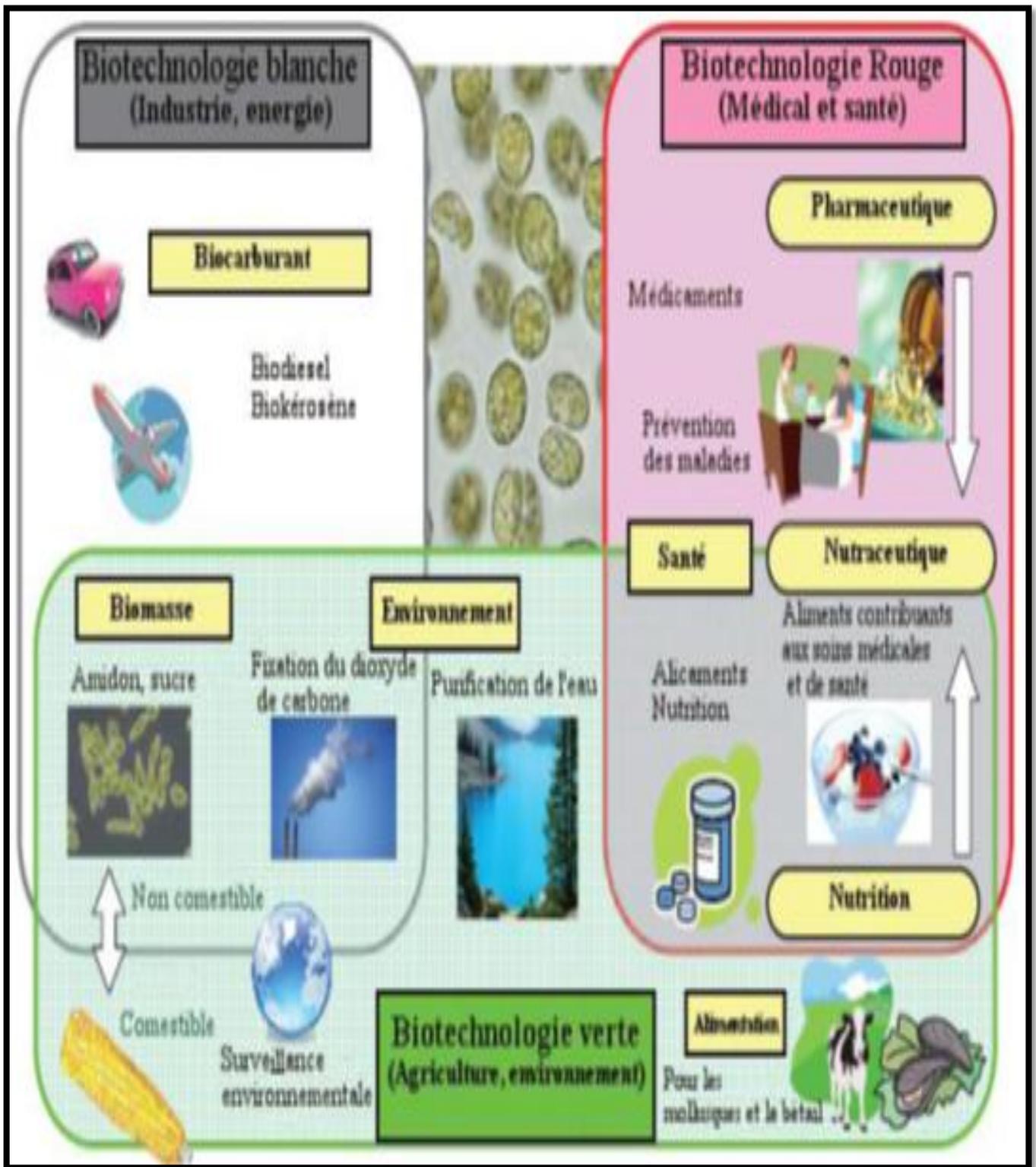


Figure 03 : Diversité du champ d'application des microalgues (Sumi, 2009)

1. Les diatomées

1.1 Généralité

Les diatomées sont des algues brunes microscopiques unicellulaires phytoplancton appartenant à l'embranchement des chromophytes, dont la taille varie de quelques μm à plus de 500 μm pour les plus grandes (**Kooistra et Medlin, 1996**). Il existe 200 000 espèces de diatomées dans les eaux douces ou saumâtres (**Mann et Droop, 1996**).

1.2 Habitat

Les diatomées ont une grande amplitude écologique, elles sont omniprésentes, on les trouve dans tous les types de milieux : aérien, terrestre et aquatique, dans des conditions des plus favorables aux plus rigoureuses. Les habitats aquatiques colonisés peuvent être des lacs, des mares, des rivières et le milieu marin. (**Patrick, 1977**). Les diatomées colonisent tous les milieux humides ; elles se développent en particulier dans les cours d'eau en formant un biofilm sur les surfaces immergées (**Bouchez et al., 2010**).

Les espèces benthiques croissent sur différents types de substrats, ce qui constitue un critère de distinction : les diatomées formant l'épilithon se fixent sur la pierre, celles de l'épiphyton sur les plantes, celles de l'épipélon sur le sédiment (**Patrick, 1977**).

1.3 Morphologie et structure cellulaire

Les diatomées sont caractérisées par un exosquelette siliceux, appelé frustule (**Passarelli, 2013**), elles sont des cellules eucaryotes enchâssées dans une paroi de silice hydratée qui se compose de deux unités imbriquées : l'épivalve et l'hypovalve. Ces deux valves sont reliées par des ceintures connectives constituées de fines bandes siliceuses appelées copulae. Dans le protoplasme des diatomées, les structures propres aux cellules eucaryotes : un noyau relativement homogène et un système membranaire avec plasmalemme, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, mitochondries, dictyosomes, vacuoles, chloroplastes d'une couleur brun-jaune (**Duke et Reimann, 1977**).

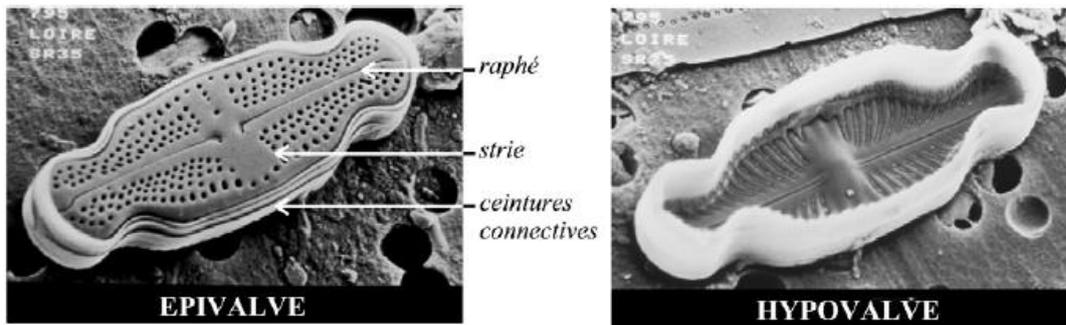


Figure 04: Structure du frustule de la diatomée *Luticola ventricosa* (Güttinger, 1999).

1.4 Classification des diatomées

On distingue deux grandes catégories de diatomées selon la géométrie de leur frustule :

- **Les diatomées centriques** : sont définies par des critères de symétrie axiale des valves, et d'arrangement des ornements
- **Les diatomées pennées** : se distinguent des centriques par une forme allongée des valves et une symétrie des ornements du frustule généralement bilatérale.

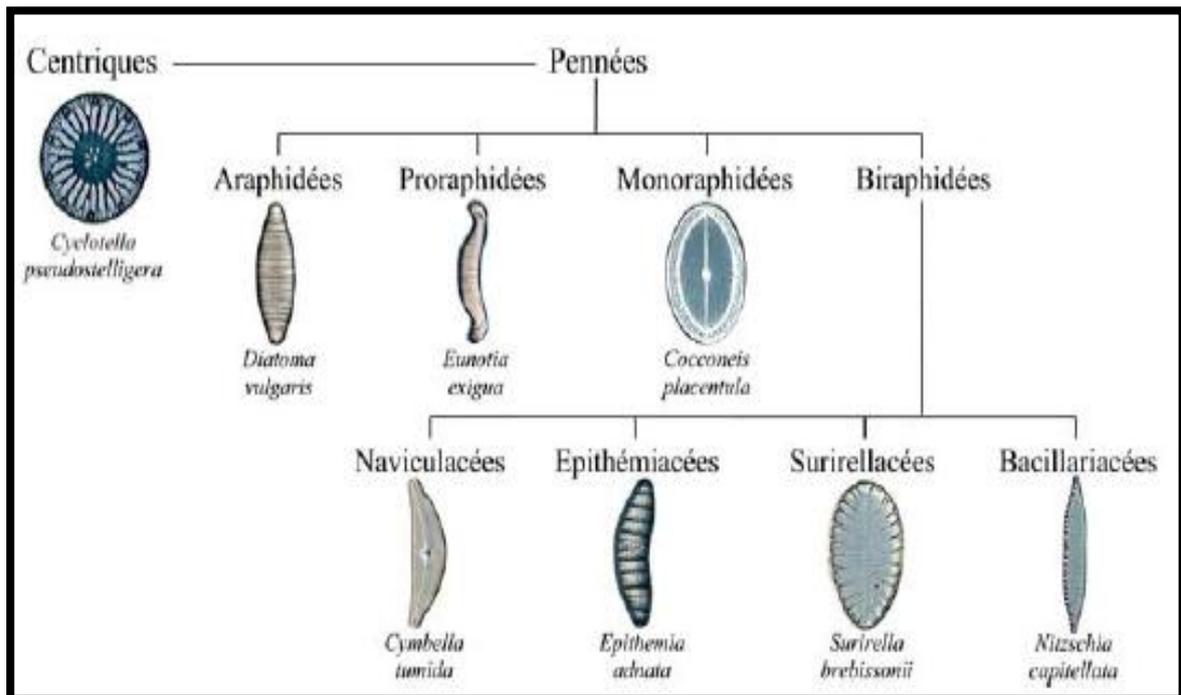


Figure 05: Clé simplifiée de détermination des genres de diatomées d'eau douce (Krammer et Lange-Bertalot 1986 – 1991 ; illustrations de Michel Coste (Coste 1999) in Morin, 2006).

1.5 Cycle de développement

Les diatomées ont un cycle de développement relativement court, allant de quelques heures à quelques jours selon les espèces et les caractéristiques du milieu (**Baars, 1983**). Elles possèdent deux modes de reproduction distincts : multiplication végétative et reproduction sexuée.

- **Reproduction par multiplication végétative**, au cours de laquelle chaque cellule donne naissance à deux cellules filles, par écartement des deux valves et régénération de nouvelles valves de plus petite taille. Ce processus conduit à la réduction progressive de la taille des cellules au fil des générations jusqu'à l'atteinte d'une taille minimale (**Bouchez et al., 2010**)
- **Reproduction sexuée**, induite par la réduction de taille de la cellule mais aussi par les facteurs environnementaux (lumière, température, nature du substrat), permet la restauration d'individus de taille normale. Les modalités de cette reproduction sexuée varient selon les espèces, mais l'auxosporulation toujours observée qui est nécessaire la formation de gamètes mâles et flagellés et de gamètes femelles par méiose et produit une nouvelle cellule, appelée cellule initiale (**Figure 07**) (**Bouchez et al., 2010**)

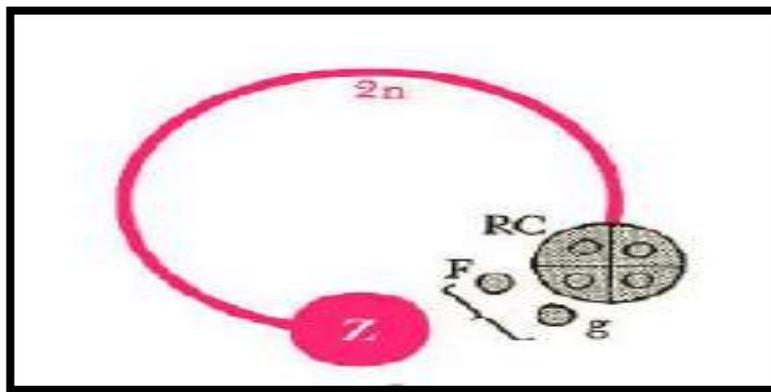


Figure 06: Modes de reproduction des diatomées - seules les valves sont représentées (**Round et al., 1990**).

F : fécondation ; **g** : gamètes ; **RC** : réduction chromatinique ; **s** : spore ; **Z** : zygote

Le cycle diplophasique, ce mode du développement est familier car il est habituel chez les animaux, chez les plantes, et en particulier chez les algues, la méiose se produit à des moments variés et ne précède pas nécessairement la gamétogénèse. (**Roland et al., 2008**)

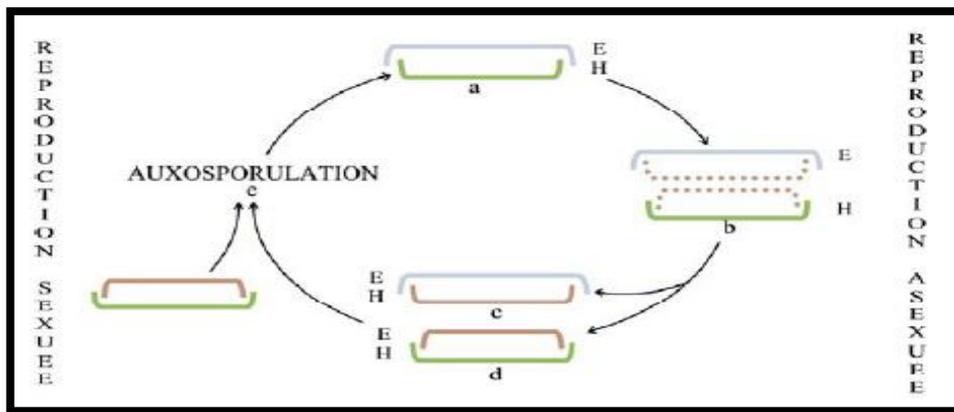


Figure 07: Cycle diphasique (diatomées) (Roland *et al.*, 2008).

1.6 Répartition et modes de vie

Le groupe des diatomées possède une grande amplitude écologique, Il présente deux modes de vie différents, une partie des espèces étant planctonique alors que les autres sont périphytiques (Gold, 2002).

Les diatomées planctoniques, appartenant aux centriques pour la plupart, vivent en suspension dans la colonne d'eau et constituent la majeure partie du phytoplancton lacustre et marin. Elles ont une importance écologique considérable, contribuant à près de 25 % de la production primaire totale de la planète (Werner, 1977)

Les diatomées périphytiques ont un mode de vie benthique, et se développent à la surface des substrats immergés en zone photique. Elles sont constituées principalement d'espèces Pennées, et sont généralement responsables d'une forte proportion de la production primaire au sein des cours d'eau, où le compartiment phytoplanctonique est peu développé, voire absent, en raison du courant (Whitton, 1980).

1.7 L'ordre Cymbellales

Les Cymbellales sont un groupe principalement des diatomées d'eau douce comprenant 28 genres et plus de 1100 espèces (Guiry et Guiry, 2013). L'ordre est un des rares groupes des diatomées avec chloroplastes positionnés contre les valves et les gamétange encapsulés (Jones *et al.*, 2005).

Les Genres appartenant aux Cymbellales varient par rapport à la symétrie de la valve (symétrique, semi-lunaire, massue), l'habitude de croissance (vie libre, traquées, tubicole), et le mode de reproduction (Nakov *et al.*, 2014).

1.8 La famille des *Cymbellaceae*

La famille des *Cymbellaceae* est distribuée dans 14 genres (Fourtanier et Kociolek, 2011). Les membres des *Cymbellaceae* sont asymétriques autour de l'axe apical. Plusieurs genres supplémentaires ont été subdivisés sur *Cymbella* et *Encyonema* (Krammer, 1997). La découverte de convergence évolutive dans l'asymétrie a conduit à des changements dans la classification de certains genres (Kociolek, 2011).

2. *Encyonema sp*

2.1 Le genre *Encyonema sp*

Les algues brunes du genre *Encyonema* sont largement distribuées partout dans le Nord Amérique, principalement dans les habitats benthiques. le genre *Encyonema* est un groupe monophylétique séparé du genre *Cymbella*, elles se trouvent la plupart du temps sur les macrophytes ou divers supports flottants, quelquefois aussi à l'état benthique sur les pierres ou la vase des cours d'eau ou des étangs, certaines formes sont aussi fréquentes sur les rochers suintants (Treytore *et al.*, 2014) .



Photo 01: *Encyonema sp* séchée



Photo 02: *Encyonema sp* flottante sur la surface.

Les espèces de ce genre n'ont pas de pore apical et peuvent former des tubes de mucilage (Round *et al.*, 1990).

Le genre *Encyonema sp* possède des cellules qui vivent en colonie dans des tubes muqueux gélatineux, parfois solitaires, libres voire fixées par un style apical gélatineux dont les tailles sont de 7 à 150 μm du long et de 3 à 30 μm du large.

Le tube muqueux contient une chaîne de cellules disposées les unes à la suite des autres qui présentent un raphé (fisseure) marginal. **Treytore et al., 2014**)

2.1 Taxonomie du genre *Encyonema*

La taxonomie du genre *Encyonema* (Kützing, 1833) est donnée par **Round et al (1990)** sur le lien <http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonPositions.aspx> (Consulté le 29/06/2015).

Règne :	<i>Protoctista</i>
Phylum:	<i>Bacillariophyta</i>
Classe:	<i>Bacillariophyceae</i>
S/classe:	<i>Bacillariophycidae</i>
Ordre :	<i>Cymbellales</i>
Famille :	<i>Cymbellaceae</i>
Genre :	<i>Encyonema</i>

2.3 Habitat :

Le genre *Encyonema* est principalement localisé dans des eaux à pH plus ou moins neutre, bien minéralisées. Il tend à occuper l'amont ou la partie médiane des rivières **Treytore et al., 2014**).

2.4 Travaux antérieurs

D'après nos connaissances, nous n'avons pas trouvé des travaux relatifs à l'étude phytochimique et activité antioxydante du genre *Encyonema*. Pour cela, nous avons résumé ci-dessous, les principaux travaux décrits sur l'étude des microalgues et des diatomées.

Tableau 02: Travaux intérieurs sur les microalgues et les diatomées.

Espèce	Activités biologiques	Auteur
<i>Cymbella spp</i>	-Activité antibactérienne contre <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Escherichia coli</i> .	(Al-Mola, 2009)
- <i>Cosmarium leave</i> - <i>Spirulina platensis</i> (algue d'eau douce)	-Pigment (chlorophylles a) - Caroténoïde	(Abdo et al., 2012)
- <i>Chlorococcum sp</i> - <i>Nannochloropris sp.</i> (microalgue)	-Composition lipidique (7.1%) -Composition lipidique (25%)	(Halim et al., 2011)
<i>Nannochloropris sp</i>	Activité antioxydante de l'extrait dichlorométhane	(Goh et al., 2010)
Diatomée	Composition lipidique : sulfoquinovosyl diglycéride, monogalactosyl diglycéride, digalactosyle diglycérides, lécithine, phosphatidyl glycérol, et le phosphatidylinositol.	(Kates et Volcani, 1965).

1. Introduction

L'oxygène est le premier élément essentiel pour la vie, responsable du fonctionnement normal de tout le système aérobie (Namiki., 1990). Mais l'oxygène peut être également une source d'agression pour les organismes et une origine de toxicité, d'acidité, d'altération, de dégénérescence (Ekoumou, 2003, Koechlin-Ramonatxo, 2006).

2. Radicaux libres

2.1. Définition

Les radicaux libres sont des molécules ou des atomes qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe (Jacques et André, 2004). Ce sont des espèces chimiques, capables d'existence indépendante, qui peuvent être formées par la perte ou le gain d'électrons à partir d'un composé non radical. Ils peuvent aussi apparaître au moment de la rupture symétrique d'une liaison covalente après laquelle chaque atome conserve un électron et devient un radical libre (Haliwell et Gutteridge, 1989). Ce sont des espèces chimiques instables, très réactives et possèdent un temps de demi-vie extrêmement court.

2.2. Formes des radicaux libres

On peut distinguer deux catégories des radicaux libres :

Les radicaux primaires, qui ont un rôle physiologique particulier, tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($\cdot OH$), le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), le radical peroxyde (ROO^{\cdot}) et le radical alkoxyde (RO^{\cdot}).

Les radicaux secondaires, issus de la réaction des radicaux primaires avec des entités biochimiques cellulaires (lipides, protéines, glucides...), tels que l'oxygène singulet (1O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le nitroperoxyde (ONOOH) (Favier, 2003 ; Gardés *et al.*, 2003).

Tableau 03 : des principaux radicaux libres (Bartoz, 2003)

Radical	Formule
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Hydroxyle	$\cdot OH$
Peroxyde	$ROO\cdot$
Hydroperoxydes	$ROOH$
Alcoxydes	$RO\cdot$
Oxygène singulet	1O_2
Oxyde nitrique	$NO\cdot$

2.3. Origine des radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être d'origine exogène et endogène (figure 09):

Origine exogène : ils peuvent être obtenus à partir des produits de radiations (rayons X et lumière UV), des polluants de l'air (N, NO_2), des solvants organiques, d'anesthésiques, des pesticides, des drogues, des xénobiotiques et de l'hyperoxie (Haliwell et gutteridge, 1989)

Origine endogène : ils sont produits, en majorité, au niveau des chaînes respiratoires mitochondriales des cellules des organismes aérobies (Thiebault et Sprumont, 1997).

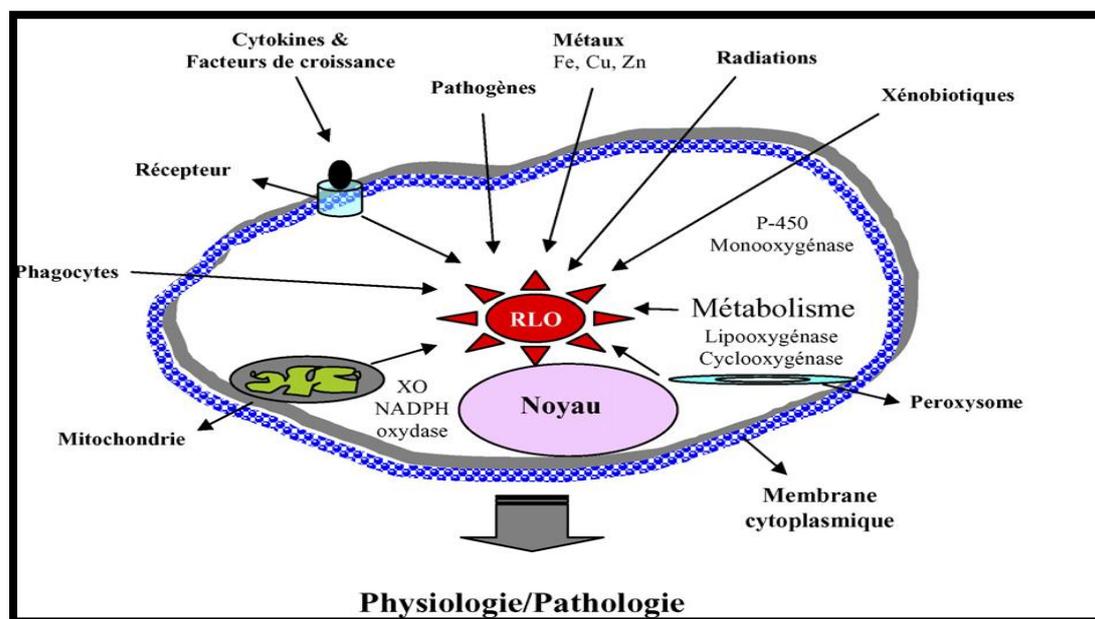


Figure 08 : Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène.

XO : xanthine oxydase ; P-450 : cytochrome P-450 (Afonso *et al.*, 2007).

3. Action biologique des radicaux libres

Les radicaux libres réagissent particulièrement sur les macromolécules lipidiques, protéiques, glucidiques et nucléiques. La réaction initiale stimule d'autres réactions, ce qui accroît la production de radicaux libres. Le résultat de ces perturbations est un dysfonctionnement cellulaire menant à des désordres inflammatoires, à des troubles immunologiques, à des problèmes neurologiques, à des mutations génétiques et au vieillissement (Poortmans et Boisseau, 2003).

4. Défenses antioxydantes

Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. Les antioxydants s'utilisent pour réduire l'oxydation du produit auquel ils sont mélangés.

Pour se protéger des effets délétères des radicaux libres, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes (figure 10) :

Un système de défense primaire composé d'enzymes et de substances antioxydantes. Ces substances auront comme fonction d'empêcher l'initiation ou la propagation des réactions radicalaires (Pincemail *et al.*, 1996 ; Ribeiro *et al.*, 2001).

Un système de défense secondaire composé d'enzymes protéolytiques dont le rôle consiste à empêcher l'accumulation dans la cellule de protéines ou d'ADN oxydés et à dégrader leurs fragments toxiques. Des phospholipases, des ADN endonucléases et ligase, des macroxyprotéinases font partie des enzymes principales de cette dernière ligne de défense contre les espèces oxygénées activées (Pincemail *et al.*, 1996 ; Ribeiro *et al.*, 2001).

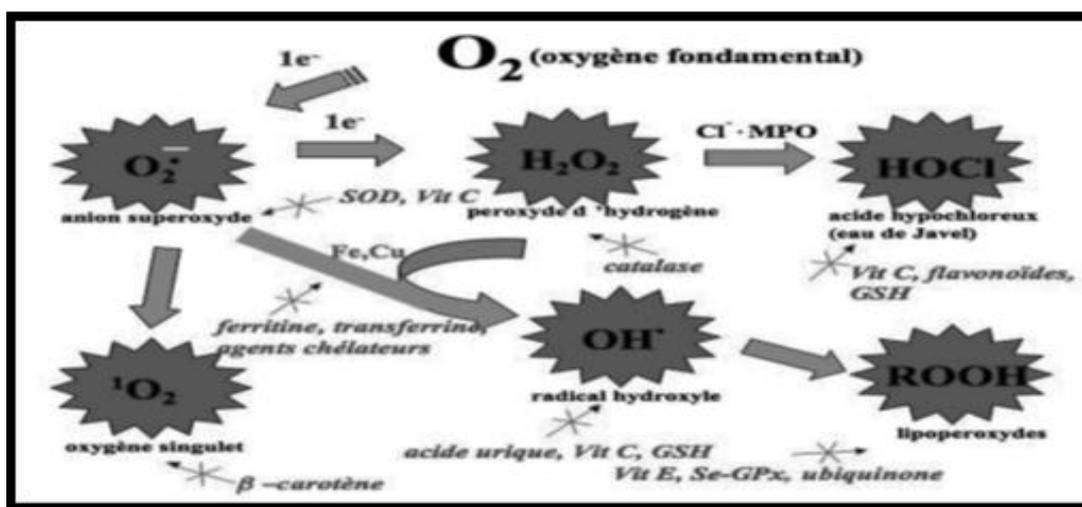


Figure 09 : Aperçu des différentes espèces oxygénées activées et des antioxydants régulateurs de leur production (Haleng *et al.*, 2007).

5. Pouvoir antioxydant *in vitro*

Pour évaluer le pouvoir antioxydant des aliments et des systèmes biologiques, les chercheurs et les scientifiques ont proposé plusieurs techniques tels que :

La méthode FRAP (Capacités réductrices ferriques d'antioxydants) est une méthode directe qui évalue le pouvoir réducteur d'un échantillon (**Benzie et Strain, 1996**) ;

La méthode du radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) mesure la capacité de piégeage du radical stable commercial (DPPH) (**Brand-Williams et al., 1995**) ;

La méthode d'ABTS (2,2-azinobis (3-éthyle-benzothiazoline-6-sulphonate) ou TEAC (Capacité antioxydante équivalente de Trolox) mesure la capacité des antioxydants à piéger le radical cation ABTS (**Miller et al., 1993 ; Pellegrini et al., 2003**) ;

La méthode d'ORAC (Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène) (**Cao et al., 1993**) ;

La méthode de décoloration du bêta-carotène (**Sun et Ho, 2005**) ;

La quantification de la capacité antioxydante totale (**Prieto et al., 1999**)

1. Zone d'échantillonnage

Le matériel végétal qui a fait l'objet de notre travail est l'algue brune *Encyonema sp.* récoltée de la station de filtration des eaux à Bouhlou commune de Sabra wilaya de Tlemcen (Figure 11).

Les paramètres géographiques de cette région sont représentés dans le **tableau 4**.

Tableau 4: Situation géographique (www. Google earth.com)

Station	Altitude (m)	Longitude (O)	Latitude (N)
Station de filtration des eaux - Bouhlou	610 m	1°34'27.84"	34°46'48.95"



Figure 10 : Emplacement géographique du site de récolte des échantillons de l'algue *Encyonema sp.*

↑ : Station de la récolte ([www. Google earth.com](http://www.Google-earth.com))

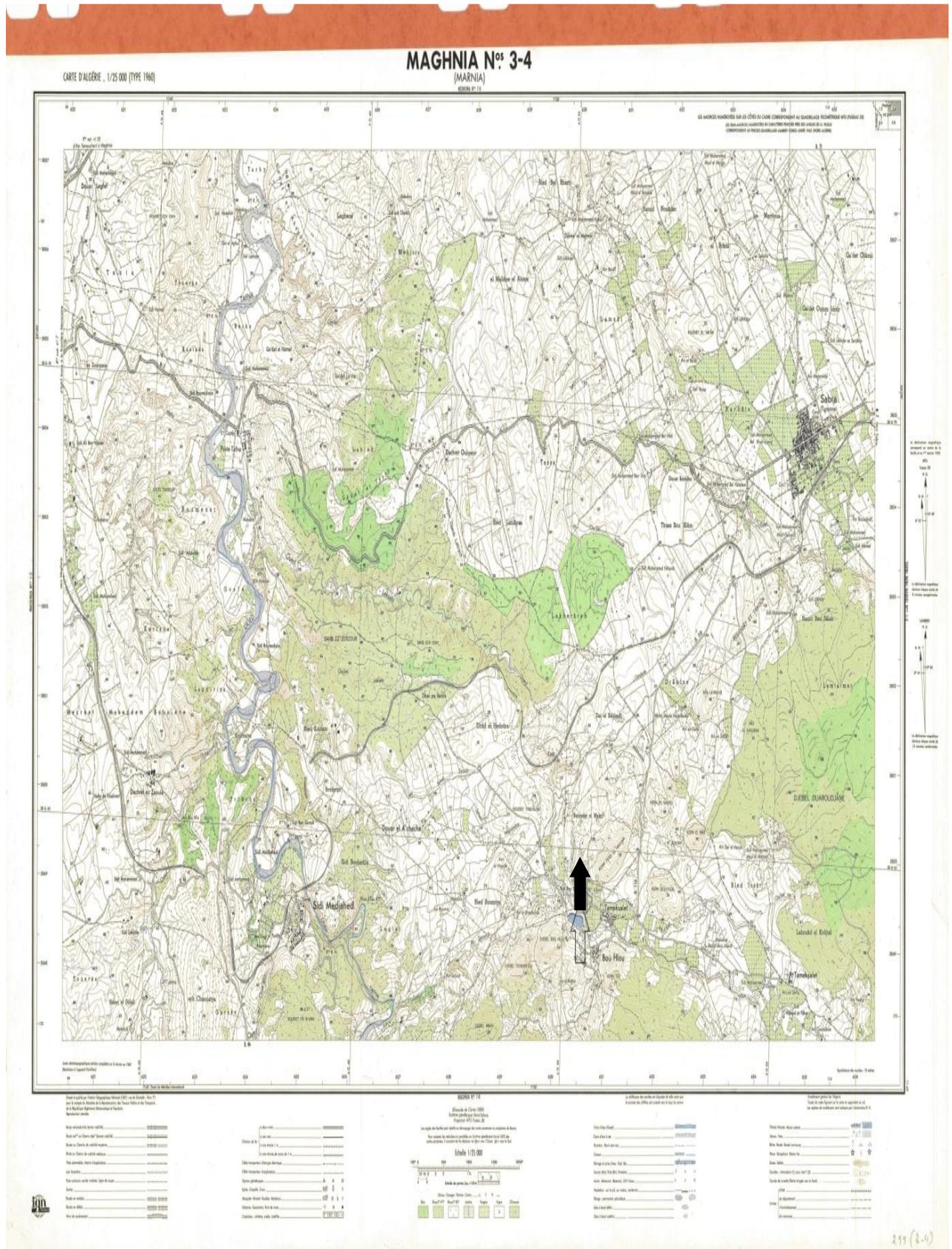


Figure 11 : Carte d'état major : ↑ « Station de filtration des eaux – Bouhlou » (Institut géographique national -France ; 1960).

➤ **Paramètres physicochimiques de l'eau brute :**

Les paramètres physicochimiques de l'eau qui héberge l'échantillon algal ont été analysés au niveau du laboratoire de la station de Bouhlou (**Tableau 5**).

Tableau 05 : Paramètres physicochimiques de l'eau brute (Hôte).

Paramètres	Valeurs/ mois	
	Février	Mars
Température	9.5 °c	11.2
pH	7.45	7.42
Turbidité (NTU)	8.66	3.72
Conductivité (µs/cm)	659	648
O.D (oxygène dissous) %	11.5	12.7
Matière organique	2.1	1.95

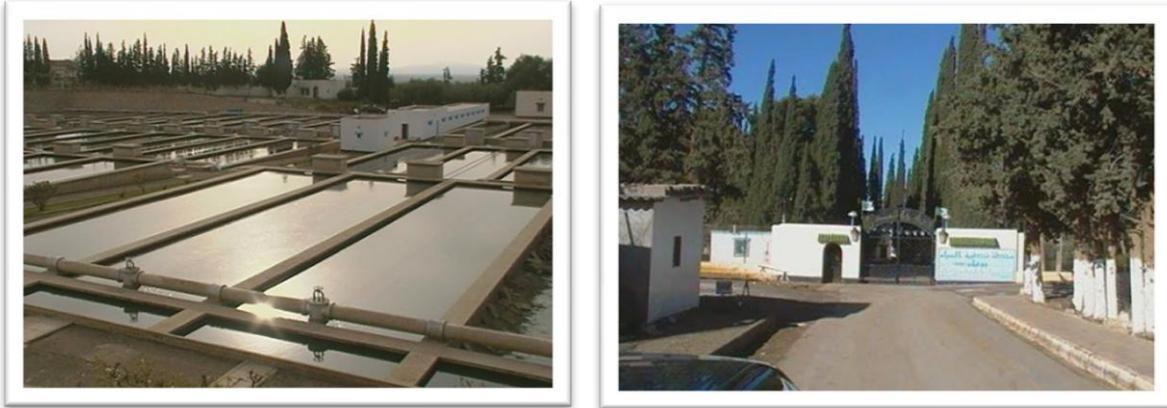


Figure 12 : Photos de la station de filtration des eaux «Bouhlou ».

2. Échantillonnage

L'algue brune *Encyonema sp.* a été récoltée manuellement par l'étudiant **Mr Bahraoui Youcef** et/ou à l'aide d'un filet après grattage, durant les mois de février et de mars (**Photos 03 et 04**).



Photo 03 : Récolte d'algue à l'aide d'un filet.(prise par Bahraoui Y., 2015)



Photo 04: Fixation de l'algue sur les parois. **.(prise par Bahraoui Y., 2015)**

3. Préparation de l'échantillon :

Après la collecte, les échantillons de l'algue ont été rincés à l'eau douce de station pour débarrasser tous les débris adhérents à leurs thalles, puis placés dans des boites en plastique au niveau du laboratoire de la station. Ces échantillons sont à nouveau rincés avec de l'eau de robinet puis avec de l'eau distillée pour éliminer les traces du chlore et tous les épiphytes attachés. Par la suite, ils ont été séchés dans une chambre à température ambiante et à l'obscurité pendant quelques jours (**Vuling, 2011**). Après séchage, les échantillons ont été broyés à l'aide d'un broyeur puis tamisés sur un tamis pour les placer dans des sacs en papier et conserver ensuite à l'abri de la lumière avant l'utilisation (**Gonzalez del Val et al., 2001**).

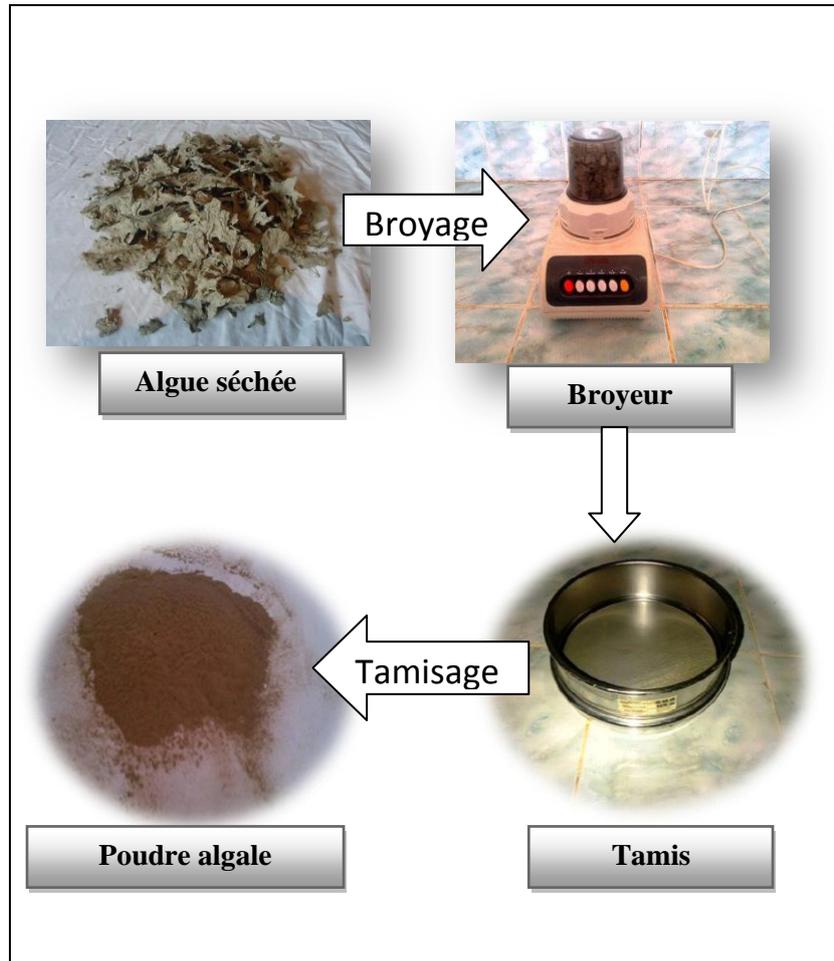


Figure 13 : Étapes de séchage, de broyage et de tamisage de l'algue. **Photos par Bahraoui Y., 2015)**

3. Identification :

Pour préserver l'état naturel de l'algue *Encyonema sp.*, un échantillon frais est conservé en formol à 13 %.

L'identification de l'algue brune a été réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie, Département de Biologie, Faculté de Science de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université de Tlemcen, sous la direction de **Mr Belyagoubi L.** suivant

le guide d'identification des algues d'eau douce : Guide pratique de détermination des algues macroscopique d'eau douce et de quelque organisme hétérotrophe (**Treyture et al., 2014**) .

✚ Préparation des lames microscopiques :

Avant de passer à l'observation microscopique, l'échantillon algal est préparé selon les étapes suivantes :

1. Brasser l'échantillon et prélever.
2. Déposer l'échantillon uniformément sur une lame de microscope (préalablement nettoyée à l'alcool).
3. Déposer une goutte de lugol sur l'échantillon.
4. Déposer la lamelle sur la lame afin de fixer l'échantillon et appliquer une légère pression sur la lamelle afin d'éliminer les bulles.
5. Placer la lame sous microscope puis observer.

NB : cette préparation est répétée trois fois.

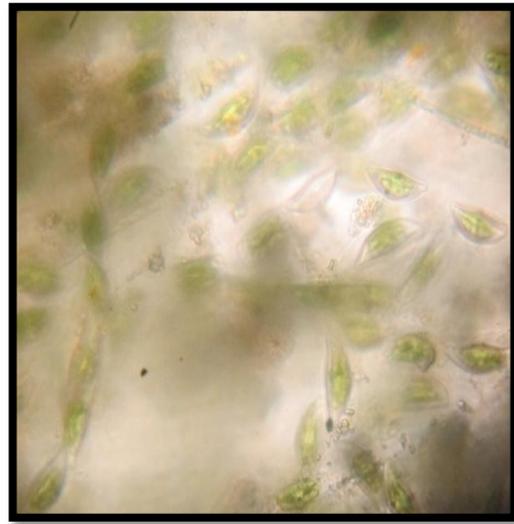


Photo 05: Observation microscopique de l'algue *Encyonema sp.* (Grossissement 10x40)

(Photo prise par Bahraoui Y., 2015).

✚ **Caractères macroscopiques :**

- **Aspect** : masse gélatineuse ferme, non friable.
- **Couleur** : brun, blanc-jaunâtre.
- **Longueur** : quelques centimètres.
- **Odeur** : non caractéristique.
- **Toucher** : soyeux à gluant
- **Coloration** : au Lugol pas de coloration en bleu-noir, donc absence d'amidon.

✚ **Caractère microscopique :**

- **Cellules asymétrique (valve a symétrie dorso-ventrale)**

1. Préparation des extraits algaux :

L'extrait brut est obtenu en ajoutant 5g de la poudre d'algue à 100 ml de cinq solvants (méthanol, acétone, hexane, chloroforme et dichlorométhane). Le mélange (algue/solvant) obtenu est macéré pendant 72 h à l'abri de la lumière et à la température ambiante. Une agitation a été faite de temps en temps. Après filtration sur papier Wattman N°1, le filtrat est évaporé sous pression réduite à 40 °C avec un évaporateur rotatif de type *HAHNSHIN HS-2005 V-N*.

Les extraits bruts méthanolique, acétonique, chloroformique et dichlorométhanique obtenus sont récupérés par le méthanol et les extraits hexaniques sont récupérés par le chloroforme. Tous ces extraits sont conservés à 4°C pour des utilisations ultérieures.



Photo 06 : Evaporateur rotatif de type *HAHNSHIN HS-2005 V-N*

2. Extraction d'huile fixe :

L'huile fixe du *Encyonema sp* a été extraite selon la méthode suivante :

Un poids donné (50 g) de poudre algale de l'échantillon de mars est disposé dans une cartouche, puis introduite dans l'extracteur «soxhlet » équipé à sa base d'un ballon contenant 400 ml d'hexane (**photo 07**).

La durée de l'extraction faite en continu est pendant 6 h. Le recyclage de l'hexane à l'évaporateur rotatif au 40 °C permet de débarrasser de toute trace d'hexane et de récupérer l'huile. Cette dernière refroidie et pesée pour calculer le rendement (**Halim et al.,2011**).



Photo 07 : l'extracteur «soxhlet

✓ Calcul du rendement d'extraction :

Le rendement des extraits bruts est le rapport entre le poids de l'extrait algale et le poids de la biomasse végétale à traiter. Le rendement est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule suivante :

$$R (\%) = P/P_0 \times 100$$

Où :

R : Rendement exprimé en % ;

P : Poids en gramme de l'extrait sec résultant ;

P₀ : Poids en gramme du matériel végétal à traiter.

3. Dosage des composés phénoliques, chlorophylles et caroténoïdes :

3.1. Dosage des phénols totaux :

Le dosage des phénols totaux de différents extraits de *Spirogyra sp.* a été effectué avec le réactif colorimétrique de Folin-Ciocalteu selon la méthode de **Singleton et Rossi (1965)**.

Une quantité de 200 µl de l'extrait brut 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 résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme de la matière algale sèche (mg EAG/g MS).

3.2. Dosage des flavonoïdes :

La teneur en flavonoïdes est déterminée par la méthode colorimétrique en utilisant le trichlorure d'aluminium (**Zhishen et al., 1999**).

Une quantité de 500 µl des extraits algaux convenablement dilués est mélangée avec 1500 µl d'eau distillée, suivi par 150 µl de nitrite de sodium (NaNO₂) à 5 %. Après 5 min, 150 µl de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) à 10 % est ajouté au mélange. Après 6 min d'incubation à la température ambiante, 500 µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4% est additionné. Immédiatement, le mélange est complètement agité afin d'homogénéiser le contenu. L'absorbance est déterminée à 510 nm contre un blanc.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif.

La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme de la matière algale sèche (mg EC/g MS).

3.3. Dosage des tanins condensés :

La quantité des tanins condensés est estimée en utilisant la méthode de vanilline (Julkunen-Titto, 1985).

Un volume de 50 µl de l'extrait brut est ajouté à 1500 µl de la solution vanilline/méthanol (4 %, m/v) puis mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 750 µl de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) est additionné. Le mélange obtenu est laissé réagir à la température ambiante pendant 20 min.

L'absorbance est mesurée à 550 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 la catéchine comme contrôle positif.

Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalents de la catéchine par gramme de la matière algale sèche (mg EC/g MS).

3.4. Dosage des chlorophylles :

✓ *Extraction*

Les teneurs en chlorophylle (a), en chlorophylle (b) et en chlorophylle totale ont été déterminées selon la méthode de **Sadasivam et Manickam (1996)** avec quelques modifications.

Une quantité de 0.5 g de la poudre algale est extraite à l'aide d'un mortier et d'un pilon propre dans un 20 ml d'acétone à 80%. Après centrifugation à 5000 rpm pendant 10 min, le surnageant est recueilli. Cette procédure a été répétée plusieurs fois jusqu'à ce que le surnageant devient clair puis la solution est complétée à 50 ml avec 80% d'acétone. L'absorbance de la solution est lue à 645 nm et à 663 nm contre le blanc qui est formé par l'acétone (80%).

Les quantités en chlorophylle totale, en chlorophylle (a) et en chlorophylle (b) présentes dans l'extrait ont été calculées en utilisant les équations suivantes d'après **Arnon (1949)**:

$$\text{Chlorophylles (a) (mg)/g MS} = \frac{12,7 (A663) - 2,69 (A645)}{1000 \times P} \times V$$

$$\text{Chlorophylles (b) (mg)/g MS} = \frac{22,9 (A645) - 4,68 (A663)}{1000 \times P} \times V$$

$$\text{Chlorophylles totales (mg)/g MS} = \frac{20,2 (A645) + 8,02 (A663)}{1000 \times P} \times V$$

Où : **A :** absorbance à des longueurs d'onde spécifiques ; les constants 12.7, 2.69, 22.9, 4.68, 20.2 et 8.02 sont des coefficients d'absorption molaire. ; **V :** volume final de chlorophylle extraite dans 80% d'acétone ; **P :** poids frais de la poudre algale utilisée ; **MS :** la matière sèche.

2.5. Dosage de caroténoïdes

Le même filtrat obtenu pour déterminer la teneur en chlorophylles a été mesuré avec le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 448 nm contre le blanc.

La quantité totale de caroténoïdes présente dans l'extrait a été calculée en utilisant l'équation suivante d'après **krik et Allen (1965)** :

$$\text{Caroténoïdes (mg)/g MS} = \frac{A480 + (0.114 \times A663) - (0.638 \times A645)}{1000 \times P} \times V$$

Où : **A :** absorbance à des longueurs d'onde spécifiques ; les constants 0.114 et 0.638 : sont des coefficients d'absorption molaire; **V :** volume final de l'extrait dans 80% d'acétone ; **P :** poids frais de la poudre algale utilisée ; **MS :** matière sèche.

1. Introduction :

Parmi tous les tests existants du pouvoir antioxydant, nous avons sélectionné trois méthodes qui ont l'avantage d'être simple et rapide. Il s'agit de : la quantification de la capacité antioxydante totale (CAT), la réduction du fer et le piégeage du radical DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).

2. Capacité antioxydante totale (CAT) :

✓ *Principe :*

La capacité antioxydante totale (CAT) des extraits est évaluée par la méthode de phosphomolybdène de **Prieto et al. (1999)**. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdate Mo (V) MoO_2^+ en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/Mo(V) à pH acide .

✓ *Mode Opératoire :*

Un volume de 0.3 ml de chaque extrait est mélangé avec 3 ml de solution du réactif (acide sulfurique 0.6M, phosphate de sodium 28 mM et molybdate d'ammonium 4 mM). Les tubes sont visés et incubés à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 3 ml de la solution du réactif et 0.3 ml du méthanol et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide ascorbique comme contrôle positif.

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

3. Piégeage du radical libre DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl):

✓ *Principe :*

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH[•]). Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par **Sanchez-Moreno et al (1998)**.

✓ **Mode Opérateur :**

Un volume de 50 µl de différentes concentrations de chaque extrait exprimées en mg/ml est ajouté à 1.950 ml de la solution méthanolique du DPPH (0.025 g/l) fraîchement préparée. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1.950 ml d'une solution méthanolique du DPPH à la même concentration utilisée.

Les pourcentages d'inhibition (%) du radical DPPH sont calculés à partir de la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (I \%)} = [(A_c - A_e) / A_c] \times 100$$

Où : **A_c**: représente l'absorbance du contrôle négatif; **A_e**: représente l'absorbance de l'échantillon.

La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations d'extrait nous a permis de calculer la concentration efficace (Efficient Concentration value : EC₅₀). Cette dernière est définie comme la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration initiale du radical DPPH à 50 %.

4. Réduction du fer (FRAP: ferric reducing antioxidant power):✓ **Principe :**

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en fer ferreux (Fe²⁺).

✓ **Mode opératoire :**

Ce test a été déterminé suivant la méthode préconisée par **Oyaizu (1986)**. Les différentes concentrations des extraits algales dans l'eau distillée (1 ml) sont mélangées avec 2.5 ml de la solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 ml de ferricyanure de potassium [K₃Fe(CN)₆] (1%). Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20 min. Après, 2.5

ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. A la fin, 2.5 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml de FeCl₃ (0.1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm.

L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de fer. L'acide ascorbique est utilisé comme témoin positif.

La concentration EC₅₀, qui est définie comme la concentration des antioxydants nécessaires pour réduire 50 % de la concentration initiale du ferricyanure de potassium, est un indice utilisé pour comparer et exprimer la puissance des capacités réductrices des extraits.

5. Analyse statistique :

Les données expérimentales du dosage et l'évaluation de l'activité antioxydante obtenues ont été exprimées par une moyenne \pm l'écart type. L'analyse du pouvoir antioxydant est faite par le logiciel Microcal Origin 6.

La corrélation entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante est déterminée par le test de Pearson en utilisant l'Excel 2007.

I. Rendements et dosage des composés phénolique

1. Rendements des extraits :

Les extractions par des solvants de polarité croissante (hexane, chloroforme, dichlorométhane, acétone et méthanol) des différents composés les plus abondants dans l'algue *Encyonema sp.* nous ont permis de calculer les rendements de chaque extrait pendant les deux mois de février et de mars. Les résultats obtenus sont illustrés dans la **figure 15**.

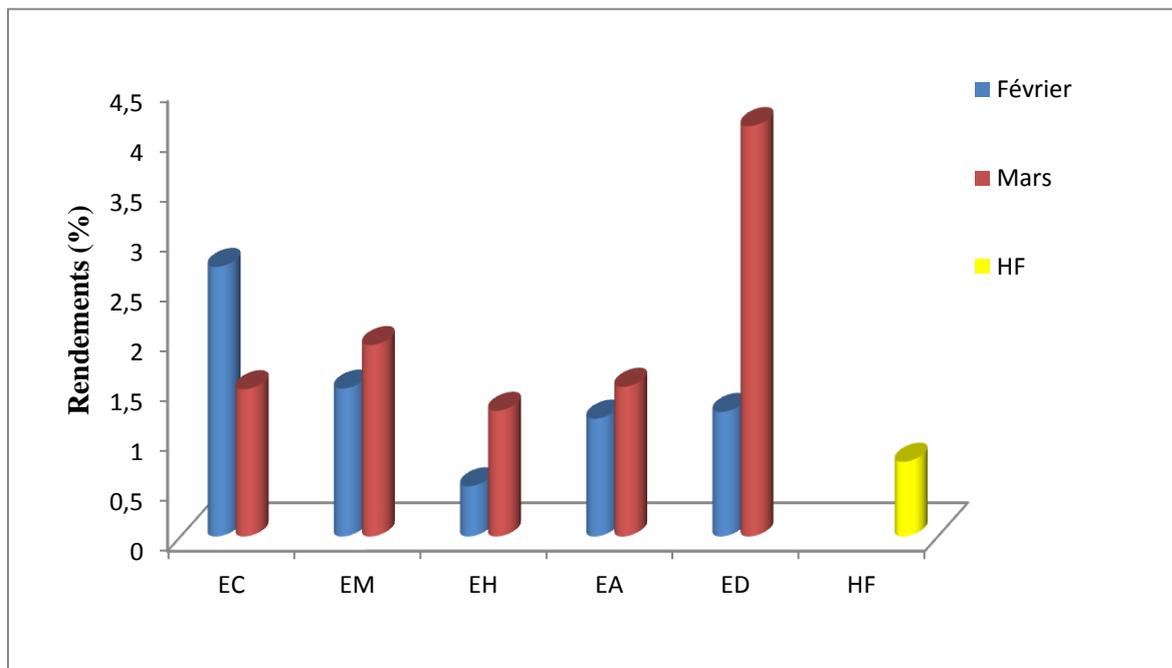


Figure 14: Rendements des extraits obtenus à partir de l'algue *Encyonema sp.*, exprimés en pourcentages durant les deux mois de février et de mars.

EC : Extrait chloroformique ; **EM** : Extrait méthanolique ; **EH** : Extrait hexanique ; **EA** : Extrait acétonique ; **ED** : Extrait dichlorométhane ; **HF** : Huile fixe ; **AA** : Acide ascorbique.

Nous constatons que le meilleur rendement est enregistré dans le mois de mars avec l'extrait dichlorométhane de l'ordre de 4.12 %. Les autres extraits ont des valeurs variées entre 1.26 et 1.92 %.

Durant le mois de février, les rendements sont nettement faibles et sont égales à 2.69, 1.48, 1.25, 1.18 et 0.50 % pour les extrais chloroformique, méthanolique, dichlorométhane, acétonique et hexanique.

acétonique et hexanique, respectivement. Concernant l'huile fixe, le rendement obtenu est aussi faible et égale à 0.74%.

2. Dosage des composés phénoliques

Les résultats obtenus des dosages sont exprimés en mg équivalents d'acide gallique (mg EAG) pour les phénols totaux et mg équivalents de catéchine (mg EC) pour les flavonoïdes et les tanins condensés par gramme de matière algale sèche, en utilisant les équations de la régression linéaire des courbes d'étalonnage (Figure 16, 17, 18).

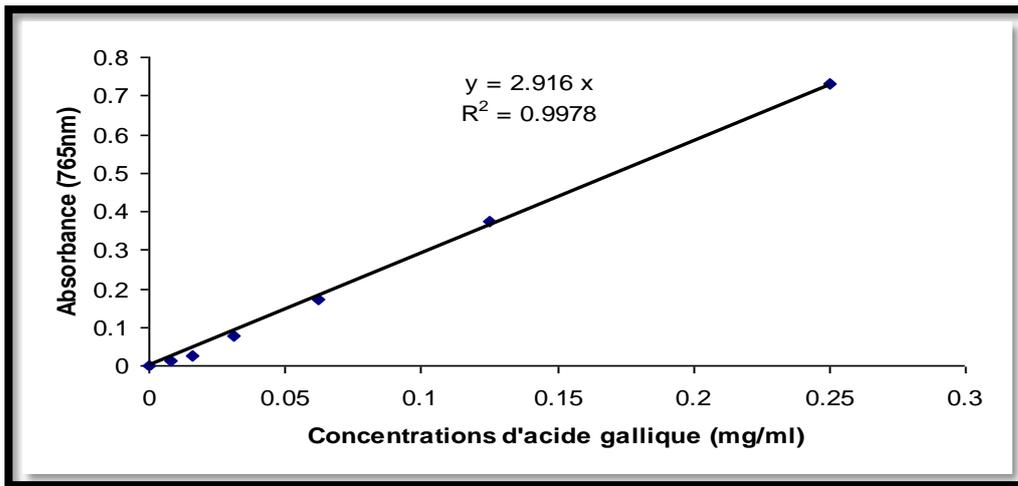


Figure 15 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux (Belyagoubi-Benhammou *et al.*, 2014).

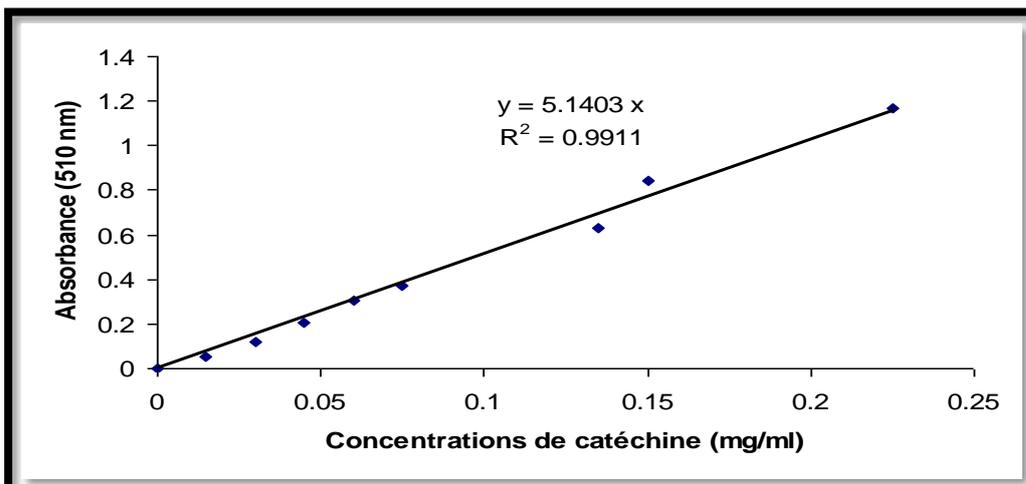


Figure 16: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes (Belyagoubi-Benhammou *et al.*, 2014).

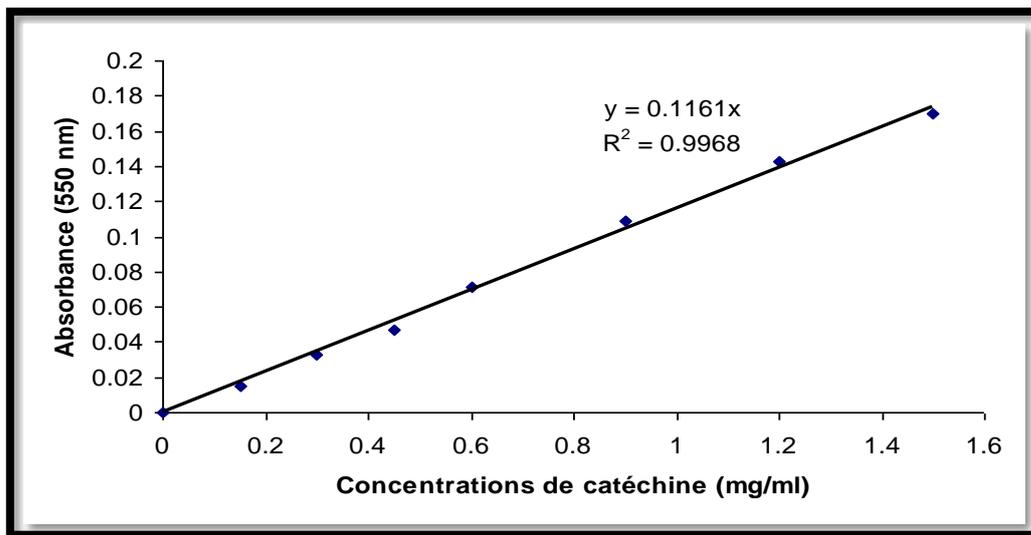


Figure 17 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés (Belyagoubi-Benhammou *et al.*, 2014).

Les résultats obtenus des teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés sont résumés dans la **figure 18**

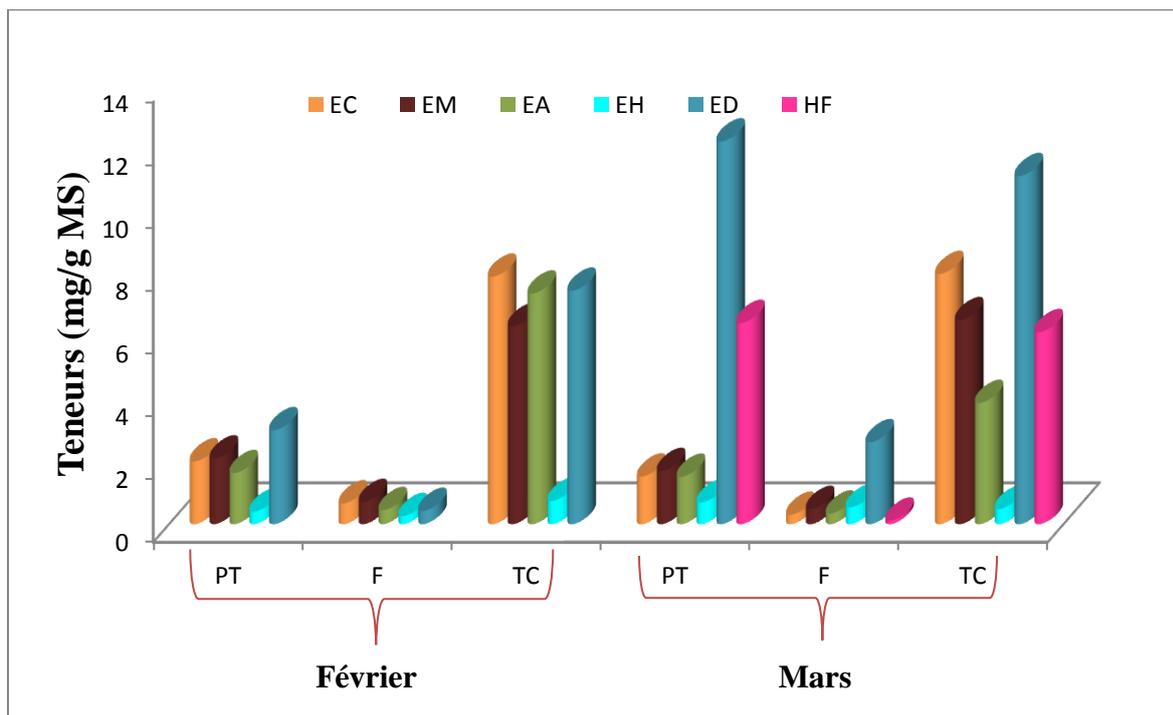


Figure 18: Teneurs en phénol totaux, en flavonoïde et en tanins condensés dans les extraits de l'algue *Encyonema sp.* durant les deux mois de février et de mars.

EC : Extrait chloroformique ; **EM :** Extrait méthanolique ; **EH :** Extrait hexanique ; **EA :** Extrait acétonique ; **ED :** Extrait dichlorométhique ; **HF :** Huile fixe; **PT:** phénol totaux **F :** flavonoïdes **TC :** tanins condensés.

Pendant le mois de mars, nous remarquons que l'extrait ED a révélé des teneurs les plus élevées en phénol totaux et en tanins condensés dont les valeurs sont de 12.171 ± 1.633 mg EAC/g MS et de 11.070 ± 2.379 mg EC/g MS, respectivement. Les autres extraits tels que EM, EC, EA et EH ont révélé des teneurs en phénol totaux de 1.689 ± 0.081 , 1.513 ± 0.017 , 1.507 ± 0.079 et 0.688 ± 0.073 mg EAG/g MS, respectivement durant le mois de mars.

Pour les extraits EC, EM, EA et ED, les teneurs en tanins condensés sont élevées et sont égales à 7.872 ± 1.060 ; 6.293 ± 0.487 ; 7.335 ± 0.094 et 7.424 ± 1.562 mg EC/g MS pendant le mois de février. Par contre, l'EH a montré une teneur faible de 0.742 ± 0.129 mg EC/g MS.

Par ailleurs, les concentrations des flavonoïdes sont nettement faibles pour tous les extraits dont les valeurs varient entre 0.298 ± 0.025 à 2.605 ± 0.333 mg EC/ g MS durant les deux mois.

Nos résultats concernant la teneur en flavonoïde sont faibles comparativement à l'étude de *Azza et al. (2014)* sur l'espèce : *Anabaena sphaerica* (cyanobactérie) où ces auteurs ont reporté des teneurs de l'ordre de 3.54 ± 0.01 mg/g pour l'extrait méthanolique et 4.52 ± 0.09 pour l'extrait acétonique.

Comparativement avec une autre algue d'eau douce *Oscillatoria agardhii* (Cyanobactérie), l'étude d'*Abd al-Aty et al., (2014)* a démontré la présence des teneurs en phénols totaux plus élevées par rapport à notre étude. Ces auteurs ont trouvé des valeurs de 20.91 ± 0.21 mg EAG/g MS dans l'extrait EM, 16.23 ± 0.03 mg EAG/g dans l'extrait EA et 14.81 ± 0.02 mg EAG/g MS dans l'extrait EM.

Pour l'huile fixe, les teneurs en phénol totaux et en tanins condensés sont intéressantes avec des valeurs de 6.401 ± 1.517 mg EAG/g MS et 6.106 ± 1.448 mg EC/g MS, respectivement. Par contre, les flavonoïdes ont présenté une teneur faible de 0.111 ± 0.013 mg EC/ g MS.

En comparant ces deux mois, le mois de mars constitue la période choisie où les phénols totaux et les tanins condensés chez *Encyonema sp* enregistrent ses teneurs élevées en utilisant le dichlorométhane comme solvant préférable pour l'extraction de ces composés.

3. Dosage des chlorophylles et des caroténoïdes :

Les pigments photosynthétiques comme la chlorophylle (a), la chlorophylle (b) et la chlorophylle totale ainsi que la teneur en caroténoïdes sont estimés et présentés dans la **figure 20** sous forme d'histogramme.

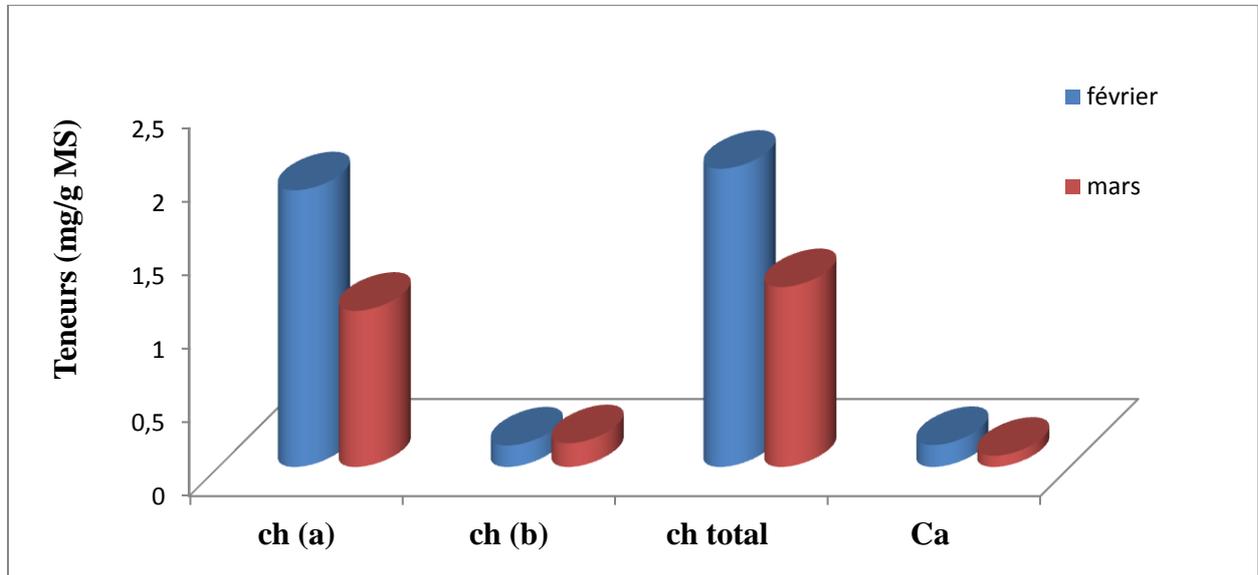


Figure 19 : Teneurs en chlorophylle (a), en chlorophylle (b), en chlorophylle totale et en caroténoïde (Ca) dans les extraits de l’algue *Encyonema sp.* durant les deux mois de février et de mars.

Ch (a): chlorophylle (a) ; **Ch total** : chlorophylle totale ; **Ch (b)** : chlorophylle (b) ; **Ca** : caroténoïdes.

Les meilleures quantités en pigments photosynthétiques sont obtenues durant le mois de février dont les teneurs en chlorophylle total et en chlorophylle (a) sont égales à 2.026 ± 0.021 et 1.88 ± 0.041 mg/g MS, respectivement. Comparativement au mois de mars, les teneurs de ces deux familles sont moins importantes et sont de 1.222 ± 0.116 pour la chlorophylle totale et 1.061 ± 0.085 pour la chlorophylle (a).

Pour la chlorophylle (b) et les caroténoïdes, les teneurs sont nettement faibles de l’ordre de 0.161 ± 0.03 et 0.076 ± 0.000 mg/g MS pendant le mois de mars et de 0.146 ± 0.02 et 0.149 ± 0.001 mg/g MS pendant le mois de février.

D'après nos connaissances, il n'y a pas des travaux qui concernent l'étude phytochimique de cette espèce. Pour ces raisons, nous voulons comparer ces résultats avec d'autres espèces qui appartiennent à des algues d'eau douce.

L'étude d'Abdo et al., (2012) a démontré que les teneurs en caroténoïdes et en chlorophylle (a) chez différentes espèces algales sont de 240 ± 1.4 mg/l et 3162.3 μ g/l pour *Anabaena sphaerica*, 1100 ± 0.001 mg/l et 3981 μ g/l pour *Chroococcus turgidus* et 1400 ± 0.07 mg/l et 2511.9 μ g/l pour *Spirulina platensis*.

II. Pouvoir antioxydant

Les tests employés pour évaluer le pouvoir antioxydant des extraits de l'algue *Encyonema sp.* obtenus par des solvants de différente polarité sont : la capacité antioxydante totale (CAT), le piégeage du radical libre DPPH et la réduction du fer

1. Test de la capacité antioxydante totale (CAT)

La figure 20 résume les capacités antioxydantes totales des extraits des deux mois de février et de mars et de l'huile fixe, exprimées en milligramme équivalents d'acide ascorbique par gramme de matière sèche (mg EAA/g MS).

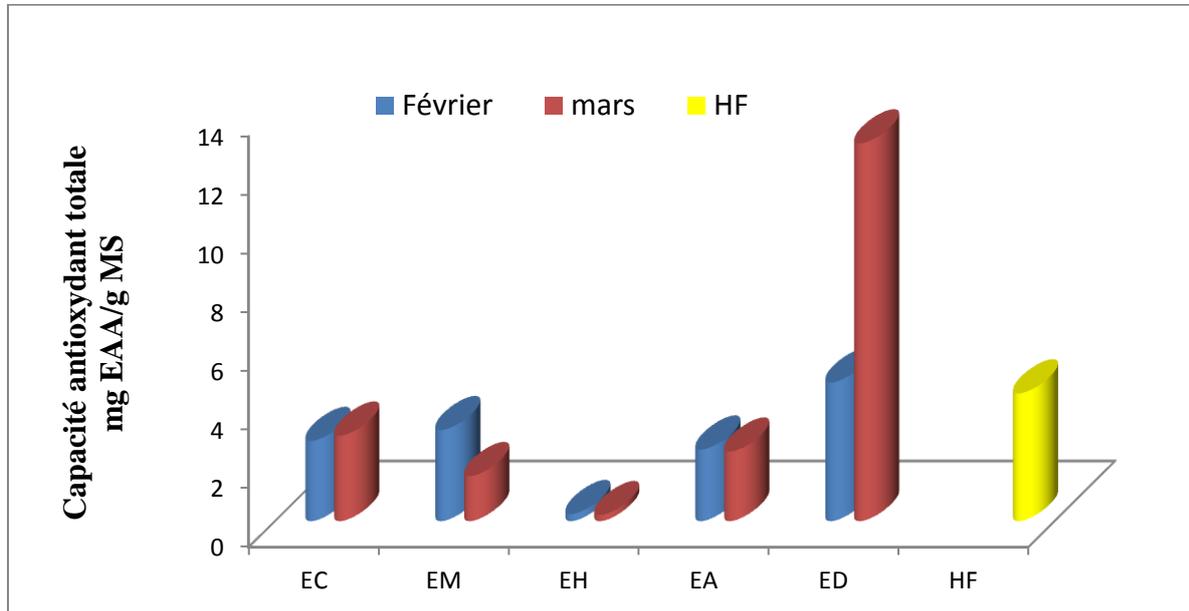


Figure 20 : Capacité antioxydante totale des extraits étudiés de l'algue *Encyonema sp.* durant les deux mois de février et de mars.

EC : Extrait chloroformique ; EM : Extrait méthanolique ; EH : Extrait hexanique ; EA : Extrait acétonique ; ED : Extrait dichlorométhique ; HF : Huile fixe; AA : Acide ascorbique.

Les extraits algaux ont présenté des différents degrés de la CAT, dont la meilleure est obtenue avec l'extrait ED du mois de mars de l'ordre de $12.877 \pm 0,958$ mg EAA/g MS. Les autres extraits ont présenté des valeurs faibles qui varient entre 0.209 ± 0.032 et 2.916 ± 0.321 mg EAA/g MS.

Pour le mois de février, les valeurs enregistrées de cette capacité sont faibles dont la plus élevée est égale à 4.726 mg EAA /g MS dans l'extrait ED.

2. Piégeage du radical libre DPPH :

L'activité antiradicalaire des extraits a été déterminée par la méthode de piégeage du radical DPPH. Ce test nous a permis de déterminer la capacité de nos extraits à neutraliser le radical stable DPPH présent dans le milieu réactionnel (Hamia et al., 2014).

Les résultats obtenus de tests vis-à-vis des extraits algaux testés sont illustrés dans la **figure 21**.

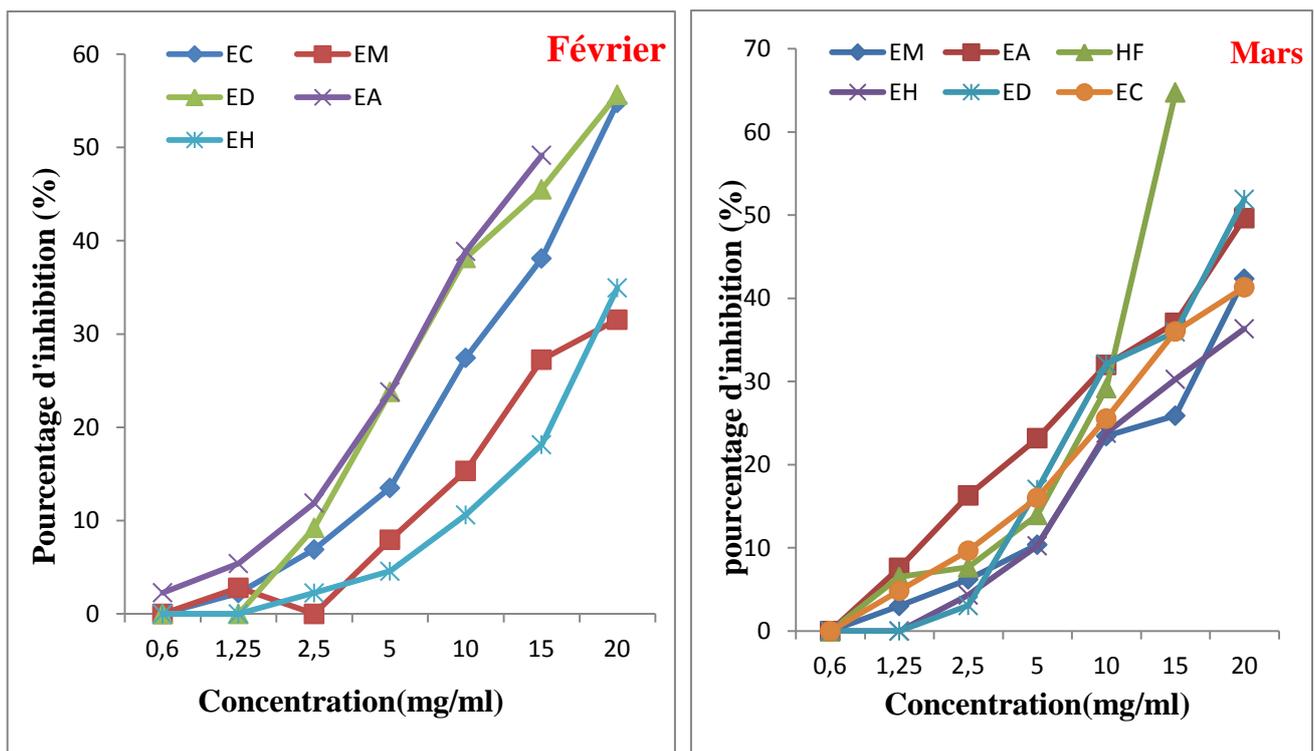


Figure 21 : Pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'acide ascorbique et des extraits de l'algue *Encyonema sp.* durant les deux mois de février et de mars.

EC : Extrait chloroformique ; EM : Extrait méthanolique ; EH : Extrait hexanique ; EA : Extrait acétonique ; ED : Extrait dichlorométhique ; HF : Huile fixe; AA : Acide ascorbique.

Nous apercevons que l'augmentation des pourcentages d'inhibition est proportionnelle à l'augmentation des concentrations des extraits.

A la concentration de 20 mg/ml, l'extrait ED a révélé une activité importante avec un pourcentage d'inhibition de DPPH de 55.655% pendant le mois de février. Les pourcentages d'inhibition pour les extraits EC, EA, EH et EM sont de 54.790, 49.170, 34.953 et 31.545 %, respectivement. Pour le mois de mars, les pourcentages d'inhibition enregistrés sont les suivants : 51.921 ; 49.651 ; 42.368 ; 41.339 et 36.348 % pour les extraits ED, EA, EM, EC et EH, respectivement. Contrairement à ces extraits, l'huile fixe a illustré le meilleur pourcentage d'inhibition à raison de 64.767%.

En comparant avec la bibliographie, une étude faite par *Xia et al. (2014)* sur la diatomée *Odontella aurita* a révélé que le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH égale à $42.455 \pm 4.671\%$ à la concentration 100 mg/ml.

D'après *Karthikeyan et al. (2013)*, les extraits acétoniques des diatomées testés ont dévoilé des pourcentages élevés de 70.04 ± 4.17 , 55.69 ± 2.52 et 49.57 ± 2.74 % pour *Odontella mobiliensis*, *Chaetoceros simplex* et *Pleurosigma angulatum*, respectivement.

Pour comparer la puissance antioxydante de nos extraits, nous avons déterminé expérimentalement, le paramètre EC_{50} . Cette concentration a été présentée récemment pour l'interprétation des résultats de la méthode de DPPH. Elle est définie comme la concentration en extrait nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH dans une période de temps définie. Une valeur faible d' EC_{50} correspond à une activité antioxydante plus élevée de l'extrait.

Les résultats obtenus des concentrations EC_{50} des extraits algaux testés sont illustrés dans la **figure 22**.

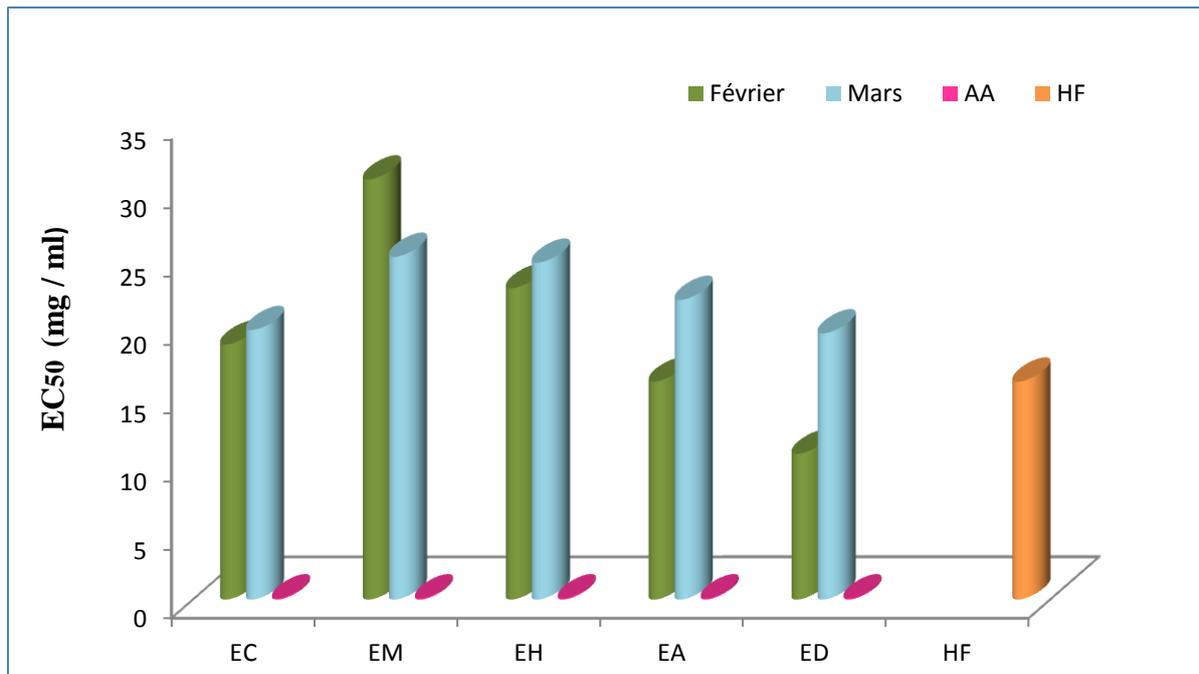


Figure 22 : Concentrations EC_{50} des extraits et d’huile fixe de l’algue *Encyonema sp.* durant les deux mois de février et de mars, obtenues par le test du DPPH.

EC : Extrait chloroformique ; **EM :** Extrait méthanolique ; **EH :** Extrait hexanique ; **EA :** Extrait acétonique ; **ED :** Extrait dichlorométhylique ; **HF :** Huile fixe; **AA :** Acide ascorbique.

Les valeurs EC_{50} de tous les extraits et pendant les deux mois sont très élevées par rapport à celle de l’acide ascorbique (0.0906 ± 0.0023 mg/ml) ceci est signifié par la présence de faible activité antiradicalaire envers du radical DPPH.

En comparant entre les extraits, l’ED du mois de février a enregistré une activité intéressante avec une concentration EC_{50} de 10.659 mg/ml ($R^2 = 0.9849$). Cette activité reste faible devant l’acide ascorbique. Alors, les autres extraits tels que EC, EM, EA et EH ont cédé le proton H avec différents degrés dont les EC_{50} sont de 18.653, 30.740, 15.948 et 22.777 mg/ml, respectivement.

Pour l’huile fixe, son activité antioxydante ($EC_{50} = 15.943$ mg/ml ; $R^2 = 0.996$) est aussi faible par rapport à l’acide ascorbique.

D’après le travail fait par **Xia et al., (2013)**, la concentration EC_{50} d’*Odontella aurita* qui est une diatomée était de 0.14 mg/ml.

3. Réduction du fer :

Les valeurs obtenues de ce test ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. Les résultats représentés dans les **figures 23 et 24** nous ont montré que la capacité réductrice est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos échantillons.

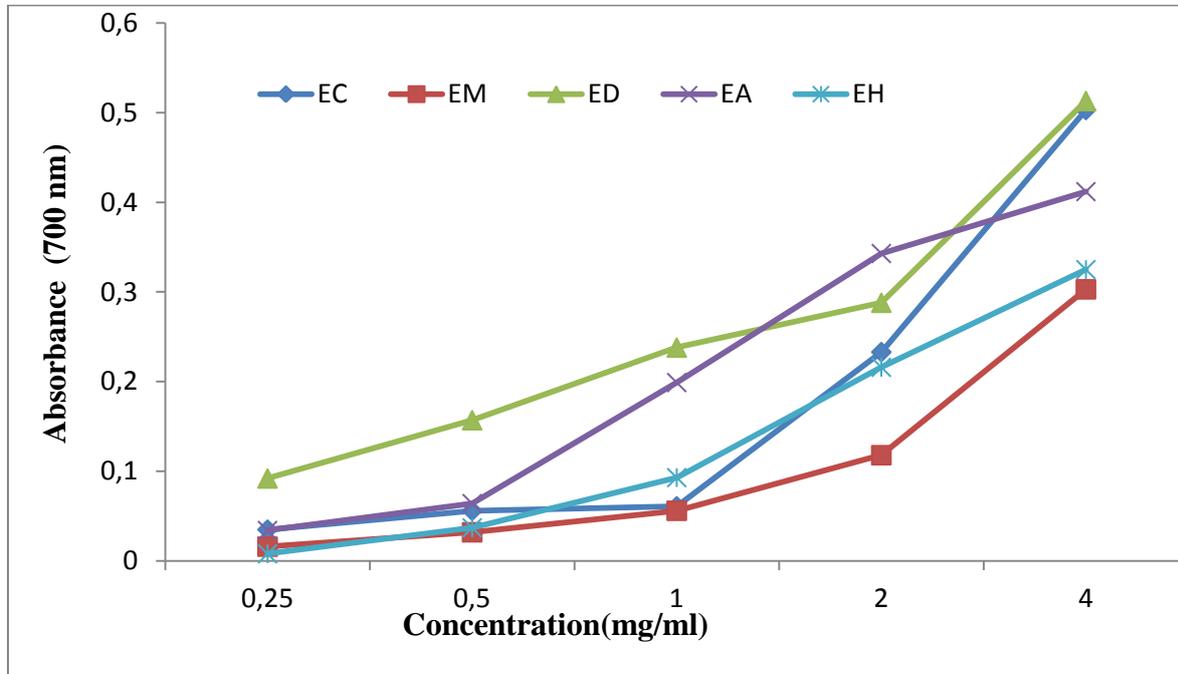


Figure 23 : Pouvoir réducteur des extraits de l'algue *Encyonema sp.* durant le mois de février.

EC : Extrait chloroformique ; **EM** : Extrait méthanolique ; **EH** : Extrait hexanique ; **EA** : Extrait acétonique ; **ED** : Extrait dichlorométhylique .

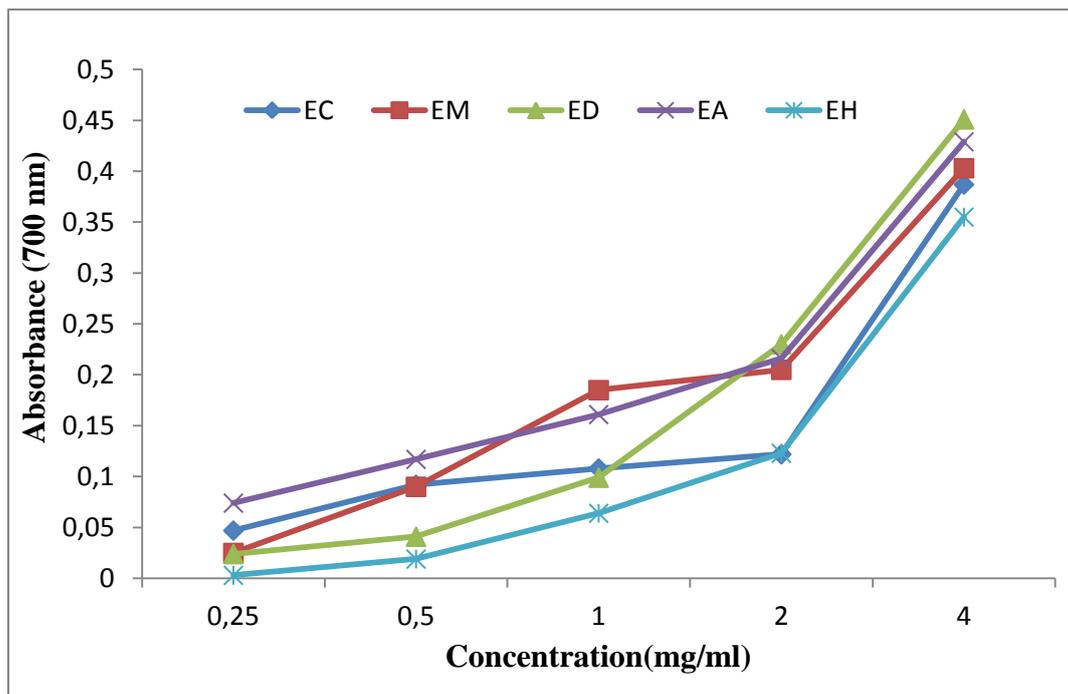


Figure 24: Pouvoir réducteur des extraits de l'algue *Encyonema sp.* durant le mois de mars.

EC : Extrait chloroformique ; **EM** : Extrait méthanolique ; **EH** : Extrait hexanique ; **EA** : Extrait acétonique ; **ED** : Extrait dichlorométhique ; **AA** : Acide ascorbique.

D'après la **figure 23**, et pendant le mois de février, le pouvoir réducteur le plus élevé est enregistré dans les deux extraits ED et EC avec des densités optiques maximales de $0,513 \pm 0,019$ et $0,503 \pm 0,011$, respectivement à la concentration 4 mg/ml. Les autres extraits EM, EA et EH ont présenté les DO suivantes : 0,303 ; 0,412 et 0,325 à la même concentration.

Pour le mois de mars (**Figure 24**), l'extrait ED a révélé une activité réductrice intéressante avec une valeur égale à $0,451 \pm 0,015$, suivi par les extraits EA, EM, EC et EH dont les DO sont égales à $0,429 \pm 0,002$, $0,403 \pm 0,005$, $0,387 \pm 0,018$ et $0,355 \pm 0,017$, respectivement.

Afin de comparer le pouvoir réducteur des extraits d'*Encyonema sp.* nous avons calculé la concentration EC_{50} qui est définie comme la concentration nécessaire pour réduire 50 % du ferricyanure de potassium.

Les concentrations calculées sont résumés dans la **figure 25**.

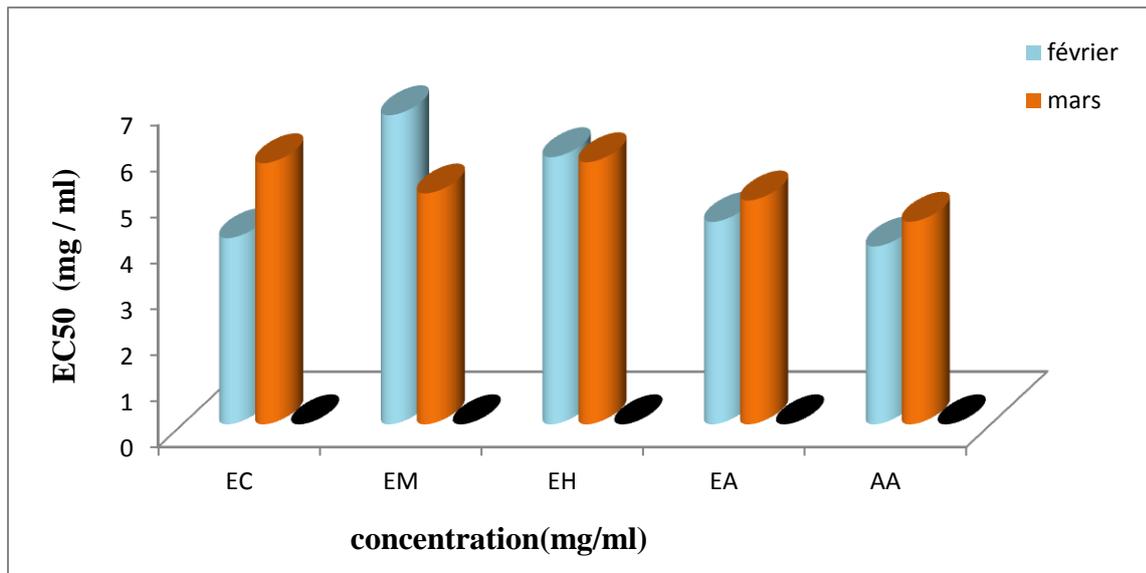


Figure 25 : Concentrations EC₅₀ des extraits de l’algue *Encyonema sp.* durant les deux mois de février et de mars, obtenues par le test de la réduction du fer.

EC : Extrait chloroformique ; **EM :** Extrait méthanolique ; **EH :** Extrait hexanique ; **EA :** Extrait acétonique ; **ED :** Extrait dichlorométhique ; **AA :** Acide ascorbique.

Les concentrations EC₅₀ les plus faibles sont indiquées dans l’ED de l’ordre de 3.869 ± 0.065 mg/ml du mois de février. Cette activité est intéressante en comparant avec tous les extraits mais faible devant l’acide ascorbique (0.063 ± 0.002) mg/ml Par contre, la concentration EC₅₀ la plus élevée est enregistrée pour l’extrait EM du mois février, suivi par EH et EC du mois de mars dont les valeurs sont de 6.724 ± 0.127 , 5.701 ± 0.180 et 5.680 ± 0.243 mg/ ml, respectivement.

L’efficacité de la réduction de fer est inversement proportionnelle à la valeur EC₅₀, elle est de l’ordre croissant selon le classement suivant :

$$EM_{\text{février}} > EH_{\text{février}} > EH_{\text{mars}} > EC_{\text{mars}} > EM_{\text{mars}} > EA_{\text{mars}} > ED_{\text{mars}} > EA_{\text{février}} > EC_{\text{février}} > ED_{\text{février}}$$

2. Corrélation entre les teneurs des composés phénoliques et les tests du pouvoir antioxydant :

Il est intéressant de relier l’activité antioxydante des extraits à leurs teneurs en composés phénoliques, dans le but de connaître lesquels sont responsables de ce pouvoir (**Benhammou, 2011**). Afin d’explorer cette relation, nous avons déterminé la corrélation entre les teneurs en

polyphénols, en flavonoïdes et en tanins condensés et les différentes activités antioxydantes des extraits d'algue *Encyonema sp.* en utilisant le test de Pearson (**Tableau 06**).

Tableau 06: coefficient de Corrélation linéaire entre les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés et les l'activité antioxydant des extraits durant les deux mois de février et mars.

		Phénols totaux	Flavonoïdes	Tanins condensés	DPPH	FRAP	CAT
Février	Phénol totaux	1	0.498	0.835	-0.403	-0.442	0.996
	Flavonoïdes	0.498	1	0.644	0.403	0.132	0.452
	Tanins condensés	0.835	0.644	1	-0.366	-0.541	0.82
	DPPH	-0.403	0.403	-0.366	1	0.933	-0.42
	FRAP	-0.442	0.132	-0.541	0.933	1	-0.434
	CAT	0.996	0.452	0.82	-0.42	-0.434	1
Mars	Phénols totaux	1	0.987	0.754	-0.545	-0.703	0.97
	Flavonoïdes	0.987	1	0.66	-0.541	-0.797	0.976
	Tanins condensés	0.754	0.66	1	-0.494	-0.272	0.719
	DPPH	-0.545	-0.541	-0.494	1	0.301	-0.697
	FRAP	-0.703	-0.797	-0.272	0.301	1	-0.753
	CAT	0.97	0.976	0.719	-0.697	-0.753	1

D'après ce tableau, nous remarquons qu'il y a une meilleure corrélation entre les teneurs en phénols totaux et les tanins condensés ($r = 0.835$) et entre les teneurs en phénols totaux et la capacité antioxydant totale et 0.996) et cela durant le mois de février.

Une forte corrélation a été établie entre les deux tests DPPH et FRAP avec un coefficient de Pearson égale $r = 0.933$. En effet, la CAT a montré une faible corrélation entre les EC_{50} de DPPH ($r = -0.42$) et de FRAP ($r = -0.434$) et les flavonoïdes ($r = 0.452$) pendant le mois de février.

Les corrélations entre les teneurs en tanins condensés et les EC_{50} du DPPH ($r = -0.494$) et entre ces teneurs et les EC_{50} de la réduction de fer ($r = -0.272$) ont été jugées faibles durant le mois de mars .

En effet, les teneurs en phénol totaux et en flavonoïdes ont montré une bonne corrélation avec les différents tests du pouvoir antioxydant pendant le mois de mars. Ces corrélations sont de l'ordre de $r = -0.545$, -0.703 et 0.97 entre les teneurs en phénols totaux et les tests de DPPH, FRAP et CAT, respectivement et de $r = -0.541$, -0.797 et 0.976 entre les teneurs en flavonoïdes et les tests de DPPH, FRAP et CAT, respectivement. Ce résultat est confirmé par certains travaux antérieurs qui ont montré que les teneurs en composés phénoliques sont responsables des activités antioxydantes puissantes (**Liu et al., 2008**; **Turumtay et al., 2014**).

D'autres corrélations entre les propriétés antioxydantes ont été prouvées dans notre étude à savoir entre la CAT et la FRAP ($r = -0.753$) et la CAT et le DPPH ($r = -0.697$) pendant le mois de mars, et entre le DPPH et la FRAP ($r = 0.933$) pendant le mois de février. Ces corrélations potentielles sont confirmées par **Karthikeyan et al. (2013)** sur quelques espèces de diatomées dont les valeurs sont de 0.729 entre FRAP et DPPH, de 0.702 entre FRAP et les phénols totaux et de 0.865 entre DPPH et les phénols totaux.

Conclusion générale

De nos jours, l'utilisation des algues en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et est devenue aussi importante que la chimiothérapie. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les algues représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et, d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce et sans effets secondaires.

Ce travail a pour but de doser les teneurs en composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes, tanins condensés, chlorophylles et caroténoïdes) et d'évaluer le pouvoir antioxydant de l'algue brune *Encyonema sp* récoltée de la station de filtration des eaux de Bouhlou, de la wilaya de Tlemcen pendant les deux mois février et mars

Les résultats obtenus nous ont permis de conclure :

- ✓ Le rendement le plus élevé est celui de l'extrait dichlorométhanique avec une valeur de 4.12 % dans le mois de mars. Par contre, l'extraction d'huile fixe a présenté un rendement faible de l'ordre de 0.74%.
- ✓ La quantification des composés phénoliques révèle une teneur élevée en phénols totaux de 12.171 ± 1.633 mg EAG/g MS dans l'extrait ED durant le mois de mars.
- ✓ Tous les extraits obtenus ont montré des teneurs faibles en flavonoïde durant les deux mois de février et de mars dont la gamme est variée entre 0.298 ± 0.025 à 2.605 ± 0.333 mg EC/ g MS.
- ✓ Le dosage des tanins condensés a exhibé des teneurs élevées dans tous les extraits sauf l'hexane (0.485 mg EC/g MS) dont les fortes concentrations sont de l'ordre 7.424 ± 1.562 mg EC/g MS pendant le mois de février et 11.070 ± 2.379 mg EC/g MS pendant le mois de mars.
- ✓ Pour l'huile fixe, les teneurs en phénol totaux et en tanins condensés ont présenté des concentrations de 6.401 ± 1.517 mg EAG/g MS et 6.106 ± 1.448 mg EC/g MS, respectivement. Par contre, les flavonoïdes ont enregistré une teneur faible (0.111 ± 0.013 mg EC/ g MS).

Conclusion générale

- ✓ La chlorophylle totale la plus importante est obtenue durant le mois de février (2.026 ± 0.021 mg/g MS), suivi par la chlorophylle (a) (1.818 ± 0.041 mg/g MS). Pour les autres pigments, la chlorophylle (b) et les caroténoïdes sont faibles dans les deux mois.
- ✓ La capacité antioxydante totale de l'ordre de 12.877 ± 0.958 mg EAA/g MS pour l'extrait ED est élevée par rapport aux autres extraits. Comparativement à l'huile fixe, ce pouvoir égale à 4.355 mg EAA/g MS.
- ✓ Tous les extraits ont la capacité de réduire le fer dont les concentrations EC_{50} des extraits ED et EC égalent à 3.869 ± 0.065 et à 4.050 ± 0.097 mg/ml, respectivement, pendant le mois de mars. Ces deux extraits ont une activité antiradicalaire contre le DPPH exprimée en pourcentage d'inhibition de 55.65% pour l'extrait ED et 54.79 % pour l'extrait EC à 20 mg/ml. Les EC_{50} de ces extraits sont de 10.659 ± 1.027 mg/ml et 18.653 ± 0.598 mg/ml, respectivement.
- ✓ Pour l'huile fixe, le pourcentage d'inhibition de l'ordre de 64.767% est enregistré dans la concentration à 20 mg/ml.
- ✓ La capacité antioxydante totale est fortement liée à la présence de composés phénoliques, ce qui est confirmé par la corrélation positive entre ce potentiel et les teneurs en phénols totaux, aussi une corrélation forte entre les tests du pouvoir antioxydant (DPPH-FRAP) ($r=0.933$).
- ✓ Le pouvoir antioxydant déterminé *in vitro* est en relation directe avec le contenu en métabolites secondaires de chaque extrait, de leurs natures, de leurs teneurs, de leurs structures et de toutes les interactions moléculaires qui peuvent agir de façon synergique pour faire hausser où diminuer cette activité.

Enfin, les antioxydants naturels de cette espèce algale peuvent être très utiles pour renforcer l'organisme dans le cas de situation du stress oxydatif et de prévenir les différentes pathologies survenues suite à une attaque radicalaire.

Pour plus d'efficacité, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- Élargir le panel des activités antioxydantes *in vitro* et *in vivo* et pourquoi pas d'autres tests biologiques : antibactérien, anti-tumoral, anticancéreux et anti-inflammatoire,
- Caractériser et isoler les principes actifs responsables de ces propriétés pharmacologique

A

- Abd El-Aty, A M., Mohamed, A M., Samhan, F A. (2014).** *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of two fresh water Cyanobacterial species, *Oscillatoria agardhii* and *Anabaena sphaerica*. J of Applied Pharmaceutical Science , 4 : 069-075 .
- Abed R M, Dobretsov S, Sudesh K. (2008).** Applications of cyanobacteria in biotechnology. Journal of Applied Microbiology 106 (1) : 1–12.
- Abdo, S-M., Hett, M-H., Samhan, F.A., El Din, R.A.D., Ali, G.H. (2012).** Photochemical and antibacterial study of five fresh water Algal species. *Asian Journal of plant sciences*, 11(3): (109-116).
- Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A. (2007).** Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*. 74 :636- 643.
- Al-mola.F, Hassan. (2009).**Antibacterial Activity of Crude Extracts and Phlorotannin Isolated from the Diatom *Cymbella* spp.Journal of Pharmacy Research,2:304-307.
- Andersen R. A. (1992).** Diversity of eukaryotic algae. *Biodiversity and Conservation*,
- Andersen et al. (1997).** In **Sialve B. et Steyer J. P. (2013).** Les microalgues, promesses et défis. *Innovations Agronomiques*. 26 :26.1(4) :268.
- Arnon, D. I. (1949).** Copper enzyme in isolated chloroplast and chlorophyll expressed in terms of mg per gram. *Plant Physiology*. 24(1) :15.

B

- Baars, J.W. (1983).** "Autoecological investigations on freshwater diatoms. 1. Generation times of some species." *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 67: 11-18.
- Barrow C., Shahidi F. (2007).** Marine nutraceuticals and functional foods. CRC Press Taylor & Francis Group. :2
- Bartosz, G. (2003).** Generation of reactive oxygen species in biological systems.Comments on toxicology. 9: 5-21.
- Belyagoubi-Benhammou, Larbi Belyagoubi et Fawzia Atik Bekkara. (2014).** Phenolic contents and antioxidant activities in vitro of some selected Algerian plants. Full Length Research Paper.
- Benhammou, N.(2011)** .Activité antioxydante des extraits des composés phénolique de six plants médicinales de l'Ouest et de sud ouest Algérien. Thèse de doctorat. 87.
- Benzie, I. F. F. et Strain, J. J. (1996).** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.

Bouchez A, Dorigo U, Rimet F. 2010. Surveillance des impacts environnementaux d'effluents aqueux de sites industriels par les Diatomées dulçaquicoles. Etude Record, n°071016/1A, 175 p.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food. Sci. Technol*, 28 : 25–30.

C

Cao, G.H., Alessio, H.M., Cutler, R.G. (1993). Oxygen-Radical Absorbency Capacity Assay for antioxidants. *Free Radical Biol Med*, 14: 303-311.

Coste, M. 1999. Atlas des diatomées pour la mise en œuvre de l'Indice Biologique Diatomées (IBD) - Agences de l'Eau - Cemagref QEBX Bordeaux, 130.

D

Duke, E.L., Reimann, B.E.F. 1977. Chapter 3: The ultrastructure of the diatom cell. - In: W erner, D. (ed.) *The Biology of Diatoms. Bot. Monogr. 13.* Blackwell Sci. Publ, 65-109.

E

Ekoumou, C. (2003). Etudes phytochimiques et pharmacologiques de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse pharmacie, Bamako, 145 p.

F

Falkowski P. G. et Raven J. A. (1997). Photosynthesis in continuous light. *Aquatic Photosynthesis.* Blackwell Science, Malden, Massachusetts, :193-227.

Favier, A. (2003) Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. p 108-115.

Fourtanier E et Kociolek J P. 2011. Catalogue of diatom names. *California Academy of Sciences*, Available from: <http://research.calacademy.org/research/diatoms/names/index.asp>

G

Gardès-Albert, M., Abedinzadeh, Z., Jore, D. (2003) *L'actualité chimique.* p 269-270

Gayral P. (1975). Les Algues : Morphologie, Cytologie, reproduction, écologie. Doin Editeur, Paris :166.

Goh, S-H., Yusoff, FM., Loh, S-P. (2010). A comparison of the antioxidant properties and total phenolic content in a diatom, chaetoceros sp. and a green microalgae, *Nannochloropsis* sp. *Journal of agricultural science*, 2: 123-130.

Gold, C. (2002). Etude des effets de la pollution métallique (Cd/Zn) sur la structure des communautés de diatomées périphytiques des cours d'eau. Approches expérimentales in situ et en laboratoire. Thèse de doctorat en Sciences du vivant, Géosciences et Sciences de l'Environnement, Université Bordeaux 1

Guiry MD., Guiry G M. (2013). AlgaBase. world wide electronic publication. National university of Ireland. Galway

Güttinger, W. (1999). Diatoms on CD-ROM. *Cymbella / Encyonema and Navicula*. - Koeltz Scientific.

H

Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C. Et Chapelle J.P. (2007). Le stress oxydant.. (4) : 629- 630.

Halim, R., Gladman, B., Danquah, M-K, Webley., P-A. (2011). Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102: 178–185.

Haliwell B, Gutteridge JMC. (1989). eds. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford, p 543.

Hamia C., Guergab A., Rennane NE., Birache M., Haddad M., Saidi M., Youcef M. (2014). Influence des solvants sur le contenu en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits du *Rhanterium adpressum*. *Annales des sciences et technologie*. 6 :37.

I

Iltis A. (1980). Les Algues. In : **Durand J.R. et Lévêque C. (1980).** Flore et Faune aquatiques de l'Afrique Sahélo-soudanienne. Tome I. Éditions O.R.S.T.O.M. Collection Initiation Documents Techniques n°44, Paris. :9- 54.

J

Jacques B. et André R. (2004). Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris. : 217-219-220-223-225.

Jeffrey, S. W, Brown, M. R, Volkman, J. K., et Dunstan, G. A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151(1), 315-331.

Jones H M, Simpson G E, Strickle A G et Man D G.2005. Life history and systematic of petronis (bacillariophyta) with special reference to British water. *European Journal of Phycology* 40 : 61-87.

Julie Person. (2011). Livre Turquoise – Algues, filières du futur. Édition Adebitech – Romainville. :4- 7

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

J Pincemail, JO Defraigne et R Limet. (1996). Oxidative stress in clinical situations - fact or fancy. *Europ J Anaesthesiol* ; 13: 219-34

K

Karthikeyan, P., Manimaran, K., Sampathkumar, P., Jaikumar, M., Robin, R. S., Saravanakumar, C., et Sureshkumar, C. (2013). In vitro Antioxidant Activity of Marine Diatom. *J of Environmental Science, Toxicology And Food Technology*, 5: 32-37.

Kirk J. T. O., et Allen R. L. (1965). Dependence of chloroplast pigment synthesis on protein synthesis: effect of actidione. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 21(6) :523-530.

Kates, MR., Volcani, E. (1965). Lipid components of diatoms. *Biochimica Et Biophysica Acta*, I 16 (1966): 264-278

Kociolek J P. 2011. Microscopic in size: macroscopic in impact. Diatom–human interactions. In: *All flesh is grass. Plant– animal interrelationships* (Ed. by J. Seckbach & Z. Dubinsky), *Cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology*, 16: 257–283. Springer, Dordrecht

Kooistra, W.H.C.F. et Medlin, L.K. (1996). The evolution of the diatoms (Bacillariophyta): IV. A reconstruction of their age from small subunit rRNA coding regions and the fossil record. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 6: 391-407.

Krammer K., Lange-Bertalot H., 1986 - 1991. Bacillariophyceae 1. Teil: Naviculaceae. 876 p.; 2. Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae, 596 p.; 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae, 576 p.; 4. Teil: Achnanthaceae. *Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolatae) und Gomphonema*. 437 p. Süßwasserflora von Mitteleuropa . Band 2/1-4. G. Fischer Verlag., Stuttgart.

Krammer K. 1997. Die Cymbelloiden Diatomeen. Teil 2. *Encyonema* part, *Encyonopsis* und *Cymbellopsis*. *Bibl. Diatomologica* 37, 1-469.

L

Laplace-Treytore C., Peltre M.C., Lambert E., Rodriguez S., Vergon J.P., Chavin C. (2014). Guide pratique de détermination des algues macroscopiques d'eau douce et de quelques organismes hétérotrophes. Les Editions d'Irstea Bordeaux, Cestas.124-125.

M

- Macedo M. F, Miller A. Z, Dionísio A et Saiz-Jimenez C. (2009).** Biodiversity of cyanobacteria and green algae on monuments in the Mediterranean Basin: an overview. *Microbiology*, 155(11), 3476-3490.
- Mann, D. G. et Droop S. J. M. (1996).** 3. Biodiversity, biogeography and conservation of diatoms *Kristiansen (ed.), Biogeography of Freshwater Algae.* 336: 19-32.
- Michel Cavalla, 2000.** Les Algues- Les Microalgues.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A. (1993).** A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*, 84: 407–412.
- Morin, S. (2006).** Bioindication des effets des pollutions métalliques sur les communautés de diatomées benthiques approches in situ et expérimentales. Thèse de doctorat en Sciences du vivant, Géosciences et Sciences de l'Environnement, Université Bordeaux 1
- M.A. Ribeiro, M.G. Bernardo-Gil et M.M. Esquivel. (2001).** Melissa officinalis, L.: study of antioxidant activity in supercritical residues, *Journal of Supercritical Fluids*, 21 (2001) 51 – 60.

N

- NaKov T, Ruck E.C, Calachyants Y, Spauldin S.A et Theriot EC. (2014):** Molecular phylogeny of the Cymbellales (Bacillariophyceae) with a comparison of models for accommodating rate variation across sites. – *Phycologia* 53(4): 359–373.
- Namiki, M. (1990)** "Antioxidants/Antimutagens in Food." *CRC critical reviews in food science and nutrition*, 29: 273-300.

O

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

P

- Patrick, R. 1977.** Chapter 10: Ecology of freshwater diatoms and diatom communities. – In werner, D. (ed.) *The Biology of Diatoms.* Bot. Monogr. 13. W Blackwell Publ., 284-332.
- Pellegrini N, Del Rio D, Colombi B, Bianchi M, Brighenti F. (2003).** Application of the 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid) radical-cation assay to a flow injection system for the evaluation of antioxidant activity of some pure compounds and beverages. *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 260-264.

Poortmans J., Boisseau N. (2003). Biochimie des activités physiques. Boeck Supérieur. Ed 1. :412-413.

Pouvreau, J.B., Moranc, M., Taran, F., Rosa, P., Dufoss, L., Guerard, F., Pin, S., Fleurence, J., et Pondaven, P. (2008). Antioxidant and Free Radical Scavenging Properties of Marennine, a Blue-Green Polyphenolic Pigment from the Diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen Responsible for the Natural Greening of Cultured Oysters. *J. Agric. Food Chem*, 56: 6278–6286

Pradyuti Dash, Nalini Kanta Tripathy, Padhi SB. (2014). Novel antioxidant production by *Cladophora* sp. and *Spirogyra* sp. *Medical Science*. 7(25) :74-78.

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: 337-341.

R

Roland J C., Bouteau H E M., Bouteau F. (2008). Atlas de biologie végétale. Tome 1. Organisation des plantes sans fleurs, champignons et algues. 7^{ème} édition, Dunod. 35.

Round, F.E., Crawford, R.M., Mann, D.G. (1990) The Diatoms: Biology and Morphology of the Genera. Cambridge University Press, Cambridge, 747pp.

Rosenberg J.N., Oyler G.A., Wilkinson L., Betenbaugh M.J. (2008). Agreeen light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology*. 19(5):430–436.

S

Sadasivam S. and Manickam A. (1996). Biochemical methods, Revised Second Edition. A New Age International, New Delhi, India. :190- 191

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.

Sharma Naveen Kumar et Rai A.K. (2011). Biodiversity and biogeography of microalgae. progress and pitfalls, 19 :1–15.

Sharma N. K, Rai A. K, Singh S et Brown R. M. (2007). Airborne algae: Their present status and relevance. *Journal of Phycology* 43(4) :615-627.

Singleton V. L., Rossi J. R. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphothungstic acid. *Am. J Enol. Vitic*. 16: 144-15.

Sumi, Y. (2009). Microalgae Pioneering the Future -Application and Utilization, Life Science Research Unit, quarterly review No.34 :9- 10.

Sun, T., Ho, C.H. (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chem*, 90: 743-749.

T

Theibauld, C., Sprumont, P. (1997). L'enfant et le sport : Introduction à un traité de médecine du sport chez l'enfant. Edition De Boeck Supérieur. Ed 1.p145.

Turumtay EA, İslamoğlu F, Çavuş D, Şahin H, Turumtay H, Vanholme B, 2014. Correlation between phenolic compounds and antioxidant activity of Anzer tea (*Thymus praecox Opiz* subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*). *Industrial Crops and Products*, 52: 687-694.

W

Werner, D. 1977. The Biology of Diatoms, Blackwell Scientific Publications, Oxford

Whitton, B.A. 1980. River Ecology. Blackwell Scientific Publications, Oxford London Edinburgh Melbourne.

Wolfe KL, Liu RH, 2008. Structure-activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56(18): 8404-8411.

X

Xia, S., Wang, K., Wan, L., Li, A., Hu, Q., et Zhang, C. (2013). Production, Characterization, and Antioxidant Activity of Fucoxanthin from the Marine Diatom *Odontella aurita*. *Marine drugs*, 11 : 2667-2681.

Z

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.

Site internet :

❖ <http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonPositions.aspx>.

Annexes

Annexe 01 : Teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés de *Encyonema sp* pendant deux mois février et de mars.

<i>mois</i>	<i>Extraits</i>	<i>Phénols totaux (mg EAG/g MS)</i>	<i>Flavonoïdes (mg EC/g MS)</i>	<i>Tanins condensé</i>
<i>février</i>	Extrait chloroformique	1.997±0.106	0.664±0.02	7.872±1.060
	Extrait méthanolique	2.088±0.111	0.705±0.026	6.293±0.487
	Extrait hexanique	0.398±0.043	0.259±0.018	0.742±0.129
	Extrait acétonique	1.624±0.080	0.449±0.016	7.335±0.094
	Extrait dichlorométhanique	2.990±0.882	0.422±0.040	7.424±1.562
<i>mars</i>	Extrait chloroformique	1.513±0.017	0.298±0.025	7.958±0.767
	Extrait méthanolique	1.689±0.081	0.482±0.046	6.488±0.241
	Extrait hexanique	0.688±0.073	0.536±0.037	0.485±0.041
	Extrait acétonique	1.507±0.079	0.339±0.004	3.855±0.412
	Extrait dichlorométhanique	12.171±1.633	2.605±0.333	11.070±2.379
	Extrait D'huile fixe	6.401 ±1.517	0.111 ±0.013	6.106 ±1.448

Annexes

Annexes 02 : Résultats de réduction du fer (FRAP: ferric reducing antioxidant power) des extraits algaux de mois de février.

	Concentration (mg /ml)	Absorbance à 700nm	Régression	EC ₅₀
Extrait chloroformique	4.00 2.00 1.00 0.50 0.25	0.503± 0.011 0.233±0.008 0.061±0.001 0.056±0.001 0.035±0.000	y = ax+b R ² = 0,9809	EC₅₀= 4,050± 0,097
Extrais méthanolique	4.00 2.00 1.00 0.50 0.25	0.303±0.007 0.118±0.008 0.056±0.000 0.032±0.002 0.016±0.001	y = ax+b R ² = 0,9854	EC₅₀=6,724± 0,127
Extrait hexanique	4.00 2.00 1.00 0.50 0.25	0.325±0.00 0.216±0.00 0.093±0.00 0.037±0.02 0.008±0.02	y = ax+b R ² = 0,95795	EC₅₀=5,811 ±0,186
Extrait acétonique	4.00 2.00 1.00 0.50 0.25	0.343±0.01 0.412±0.00 0.199±0.08 0.064±0.05 0.034±0.01	y = ax +b R ² = 0,86155	EC₅₀=4,404± 0,040
Extrait dichlorométhanique	4.00 2.00 1.00 0.50 0.25	0.513±0.09 0.288±0.06 0.238±0.06 0.157±0.05 0.092±0.02	y = ax + b R ² = 0,9683	EC₅₀=3,869± 0,065

Annexes

Annexes 03: Résultats de réduction du fer (FRAP: ferric reducing antioxidant power) des extraits algaux de mois de mars.

	Concentration (mg /ml)	Absorbance à 700nm	Régression	EC ₅₀
Extrait chloroformique	4.00	0.387±0.08	y = ax +b	EC₅₀=5,680 ±0,243
	2.00	0.122±0.08	R ² =0,9138	
	1.00	0.108±0.03		
	0.50	0.092±0.01		
	0.25	0.047±0.02		
Extrais méthanolique	4.00	0.403±0.05	y = ax +b	EC₅₀=5,022 ± 0,048
	2.00	0.205±0.00	R ² =0,9432	
	1.00	0.185±0.05		
	0.50	0.090±0.05		
	0.25	0.025±0.04		
Extrait hexanique	4.00	0.355±0.07	y = ax+b	EC₅₀=5,701±0,180
	2.00	0.123±0.07	R ² = 0,9939	
	1.00	0.064±0.03		
	0.50	0.019±0.00		
	0.25	0.003±0.02		
Extrait acétonique	4.00	0.429±0.02	y = ax +b	EC₅₀=4,870±0,101
	2.00	0.216±0.08	R ² =0,984	
	1.00	0.161±0.00		
	0.50	0.117±0.00		
	0.25	0.074±0.06		
Extrait dichlorométhanique	4.00	0.451±0.05	y = ax+b	EC₅₀=4,407±0,3
	2.00	0.230±0.07	R ² =0,9908	
	1.00	0.099±0.02		
	0.50	0.041±0.02		
	0.25	0.024±0.04		

Annexes

Annexe 04 : Résultats des rendements par apport à la matière sèche du l'algue *Encyonema sp*

Extraits	Rendements%	
	Février	Mars
Extrait chloroformique	2.698±1.154	1.474
Extrais méthanolique	1.480±0.073	1.916
Extrait hexanique	0.502±0.131	1.258
Extrait acétonique	1.179±0.143	1.498
Extrait dichlorométhanique	1.246±0.356	4.108

Annexe 05 : Teneurs en capacité antioxydante totale exprimées en mg équivalents d'acide ascorbique (mg EAA) par g de la matière sèche de (g MS) d'*Encyonema sp*

Extraits	Capacité antioxydant totale (mg EAA /g MS)	
	Février	Mars
Extrait chloroformique	2.736±0.404	2.916±0.321
Extrais méthanolique	3.106±0.426	1.536±0.174
Extrait hexanique	0.244±0.033	0.209±0.032
Extrait acétonique	2.441±0.242	2.372±0.032
Extrait dichlorométhanique	4.726 ±0.673	12.877± 0.958

Annexes

Annexe 06 : Teneurs en chlorophylles et en caroténoïdes exprimées en milligramme par gramme de la matière sèche d'*Encyonema sp*

Mois	Chlorophylle totale	Chlorophylle (a)	Chlorophylle (b)	Caroténoïde
Février	2.026±0.021	1.880±0.041	0.146±0.138	0.149±0.001
Mars	1.222±0.116	1.061±0.085	0.161±0.031	0.076±0.000

Annexes

Annexe 07 :Résultats du piégeage du radical libre DPPH^{*} (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) des extraits algaux de mois de février

Extraits	Concentration (mg /ml)	Activité d'inhibition (%)	Régression équation
Extrait chloroformique	20 15 10 05 2.5 1.25	54.790±1.298 38.115±2.396 27.450±3.101 13.507±1.679 6.904±2.239 2.240±0.615	R ² = 0,995 EC₅₀=18,653 ±0,598
Extrais méthanolique	20 15 10 05 2.5 1.25	31,545±2.506 27,258±2.848 15,327±0.905 7,948±2.440 2,795±0.209 2,248 ±2.109	R ² = 0,982 EC₅₀=30,740±3,939
Extrait hexanique	20 15 10 05 2.5	34.953±0.318 18.144±0.599 10.614±0.969 4.572±0.459 2.245±0.102	R ² = 0,9922 EC₅₀=22,777±1,429
Extrait acétonique	15 10 05 2.5 1.25 0.6	49.170±1.481 38.865±1.156 23.805±0.378 11.887±0.670 5.397±1.178 2.278±0.118	R ² = 0,9989 EC₅₀=15,948±1,492
Extrait dichlorométhanique	15 10 05 2.5 1.25	55.655±0.405 45.518±2.735 38.166±0.544 23.802±1.279 9.232±1.317	R ² = 0,9849 EC₅₀=10,659±1,027

Annexes

Annexe 08 : Résultats du piégeage du radical libre DPPH^{*} (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) des extraits algaux de mois de Mars

Extraits	Concentration (mg /ml)	Activité d'inhibition (%)	Régression équation
Extrait chloroformique	15 10 05 2.5 1.25 0.6	41.339±1.009 36.021±1.125 25.551±1.055 16.025±2.274 9.657±1.647 4.857±1.496	R ² = 0,9867 EC₅₀=19,721±0,537
Extrais méthanolique	20 15 10 05 2.5 1.25	42.368±0.155 25.897±0.513 23.447±1.684 10.389±1.875 6.216±0.967 3.023±2.329	R ² = 0,9751 EC₅₀=25,075±1,038
Extrait hexanique	20 15 10 05 2.5	36.348±2.352 30.275±0.552 23.802±0.295 10.255±1.401 4.327±1.015	R ² =0,9857 EC₅₀=24,647±1,752
Extrait acétonique	20 15 10 05 2.5 1.25	49.651±2.749 37.064±3.954 32.005±1.034 23.195±2.007 16.312±4.076 7.605±1.642	R ² = 0,9746 EC₅₀=21,927±0,886
Extrait dichlorométhanique	20 15 10 05 2.5	51,921±1.507 35,958±1.988 32,132±2.913 17,056±1.456 3,063±2.242	R ² =0,969 EC₅₀=19,478±0,751
Extrait d'huile fixe	20 15 10 05 2.5 1.25	64,767 29,217 13,968 7,665 6,507	R ² =0,996 EC₅₀=15.943± 0.334

