



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la recherche Scientifique



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

Département de Biologie

Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique

## Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

Master en Biologie

Option : Biochimie Appliquée

Thème:

**Contribution à l'étude phytochimique et à l'effet  
antioxydant des extraits d'algue verte: *Ulva linza***

Présenté Par : M<sup>elle</sup> TEFIANI Ikram

Soutenu le : 14/ 06 /2015

Devant le jury composé de :

- |                                      |            |              |
|--------------------------------------|------------|--------------|
| ❖ M <sup>r</sup> DJAZIRI R.          | Professeur | Président    |
| ❖ M <sup>me</sup> BENMANSOUR M.M.A.A |            | Examinatrice |
| ❖ M <sup>me</sup> MERGHACHE D.       | M.A.A      | Examinatrice |
| ❖ M <sup>elle</sup> BENARIBA N.      | M.C.B      | Promotrice   |

Année Universitaire : 2014- 2015

## Résumé

L'objectif de cette étude est porté sur l'étude phytochimique de différents extraits d'*Ulva linza* : extrait méthanolique, eau-méthanolique, n-butanolique, méthanol 1 (EM1) et acétate d'éthyle ainsi que l'évaluation de l'activité antiradicalaire de ces extraits sur le radical libre le DPPH.

Le screening phytochimique a révélé la présence d'alcaloïdes et sucres réducteurs dans les extraits méthanoliques et eau-méthanol. Les résultats du dosage de polyphénols et de flavonoïdes totaux montrent que l'extrait eau-méthanol est plus riche par rapport aux autres extraits en composés polyphénoliques et en flavonoïdes avec un taux de 38,84 µg.Eq acide gallique par mg d'extrait et 23,83 µg.Eq catéchine par mg d'extrait, respectivement.

En ce qui concerne l'activité antioxydante, les extraits eau-méthanol (EEM) et méthanolique (EM1) ont pu réduire 50% et 12% du DPPH à une concentration de 0,9 et 0,675 mg/ml respectivement. 0,00185 mg/ml de l'acide ascorbique réduit 50% du DPPH.

Ce pouvoir antioxydant peut être dû à la présence de polyphénols et de flavonoïdes dans *Ulva linza*, ce qui incite l'étude *in vivo* de l'effet des extraits de cette algue sur le stress oxydatif.

**Mots clés** : *Ulva linza*, activité antiradicalaire, polyphénols.

## Table de matière

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Synthèse bibliographique</b> .....	3
<b>Matériels et méthodes</b>	
1. Matériel végétal.....	33
2. Préparation des extraits.....	33
2.1.Préparation de l'extrait méthanolique 1 et n-butanolique 1.....	33
2.2.Préparation de l'extrait méthanolique 2.....	34
2.3.Préparation de l'extrait acétate d'éthyle et n-butanolique 2.....	34
2.4.Préparation de l'extrait eau-méthanol.....	35
3. Tests phytochimiques.....	37
4. Dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux.....	38
4.1. Préparation des extraits.....	38
4.2.Dosage des polyphénols totaux.....	39
4.3.Dosage de flavonoïdes totaux.....	41
5. Le pouvoir antioxydant des extraits d' <i>Ulva linza</i> .....	43
5.1.Principe de la méthode DPPH.....	43
5.2.Mode opératoire.....	43
5.3.Expression des résultats.....	45
5.3.1. Pourcentage de réduction du DPPH.....	45
5.3.2. Détermination IC50.....	45
<b>Résultats et interprétation</b>	
1. Les rendements des extraits d' <i>Ulva linza</i> .....	46
2. Tests phytochimiques.....	47
3. Dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux.....	48
4. Activité antiradicalaire des extraits d' <i>Ulva linza</i> .....	49
<b>Discussion</b> .....	54
<b>Conclusion</b> .....	57
<b>Références bibliographiques</b> .....	58

## ***Remerciements***

Je remercie DIEU tout puissant, maître des cieux et de la terre, qui m'a permis de mener à bien ce travail.

Tout d'abord je tiens surtout à adresser mes plus vifs remerciements à **M<sup>elle</sup> Benariba N.**, maître de conférences au Département de Biologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie, qui m'a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, pour sa grande patience, pour sa disponibilité et ses conseils judicieux.

J'adresse mes remerciements à **Mr Djaziri R.**, professeur au Département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen, d'avoir accepté de présider le jury.

Je tiens à remercier **M<sup>me</sup> Merghache D.**, maître assistante au Département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen, qui m'a fait l'honneur d'examiner ce travail.

Mes profonds remerciements vont à **M<sup>me</sup> Benmansour M.**, maître assistante chargée de cours, au Département de Biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen, qui m'a fait l'honneur d'examiner ce travail.

Merci au jury, **Mr Lahfa F, Mr Azzi R et Mr Rahmoun N** d'avoir accepté d'évaluer ma synthèse bibliographique.

Mes remerciements s'adressent à **M<sup>me</sup> Boucherit Z.** Professeur au Département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen, et directrice du Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimiques, Synthèse et activité biologique, pour son accueil au laboratoire et sa disponibilité.

Je tiens à remercier tous les enseignants du Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen, qui ont veillé sur notre formation.

Mes remerciements s'adressent également à tous membres du Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimiques, Synthèse et activité biologique, qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

J'adresse, enfin et surtout, ma plus profonde gratitude et tout mon amour à ma famille, qui a su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances, ainsi qu'à tous mes proches amis qui m'ont toujours soutenu et encouragé même dans les périodes les plus difficiles.

Un grand merci à tous.

## *Dédicaces*

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 mes chers parents ♥

♥A ma famille ♥

♥A mes professeurs ♥

♥A mes amis ♥

♥A vous ♥...

Ikram

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)-TPTZ et un antioxydant (AH).....	11
<b>Figure 02</b> : Structure du radical-cation ABTS <sup>+°</sup> .....	13
<b>Figure 03</b> : Mécanisme réactionnel entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH).....	14
<b>Figure 04</b> : Algue verte.....	25
<b>Figure 05</b> : Algue bleu.....	25
<b>Figure 06</b> : Algue rouge.....	26
<b>Figure 07</b> : Algue brune.....	26
<b>Figure 08</b> : <i>Ulva linza</i> .....	28
<b>Figure 09</b> : Les thalles d' <i>Ulva linza</i> .....	33
<b>Figure 10</b> : Schéma explicatif de la préparation de différents extraits organiques à partir d'algue verte, <i>Ulva linza</i> .....	34
<b>Figure 11</b> : Forme libre et réduite du DPPH.....	48
<b>Figure 12</b> : Courbe étalon de l'acide gallique.....	48
<b>Figure 13</b> : Courbe étalon de la catéchine.....	48
<b>Figure 14</b> : réduction du DPPH par l'acide ascorbique.....	50
<b>Figure 15</b> : réduction du DPPH par l'extrait méthanol 2.....	52
<b>Figure 16</b> : réduction du DPPH par l'extrait méthanol 1.....	52
<b>Figure 17</b> : réduction du DPPH par l'extrait n-butanol 1.....	52
<b>Figure 18</b> : réduction du DPPH par l'extrait eau-méthanol.....	52

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01:</b> Caractéristiques importantes des groupes d'algues.....	23
<b>Tableau02 :</b> composition chimique et biochimique d' <i>ulva linza</i> .....	29
<b>Tableau 03:</b> Dosage de polyphénols totaux dans les extraits d' <i>Ulva linza</i> .....	40
<b>Tableau 04:</b> Dosage de flavonoïdes totaux dans les extraits d' <i>Ulva linza</i> .....	42
<b>Tableau 05:</b> Mode opératoire pour mesurer l'activité antiradicalaire des extraits d' <i>Ulva linza</i> par la méthode du DPPH.....	44
<b>Tableau 06:</b> Les rendements des extraits d' <i>Ulva linza</i> .....	46
<b>Tableau 07:</b> Screening phytochimique des extraits d' <i>Ulva linza</i> .....	47
<b>Tableau 08 :</b> Taux de polyphénols et de flavonoïdes totaux dans les extraits d' <i>Ulva linza</i> .....	49
<b>Tableau 09:</b> Pourcentages de réduction du DPPH par la vitamine C.....	50
<b>Tableau 10:</b> Pourcentages de réduction du DPPH par les extraits d' <i>Ulva linza</i> .....	51
<b>Tableau 11:</b> IC <sub>50</sub> d'extrait eau-méthanol d' <i>Ulva linza</i> et de la vitamine C.....	53

## Liste des abréviations

- AAPH:** 2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) dichlorhydrate
- ABTS:** Acide 2,2' - azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique
- ADN:** acide désoxyribonucléique.
- AGPI:** Acide gras polyinsaturé
- AH:** Antioxydant
- BAP:** 2,2-azo-bis (2-amidinopropane) chlorhydrate
- Cu<sup>2+</sup>:** Cuivre
- CUPRAC:** Capacité antioxydante par réduction de cuivre
- DEPG:** N, N-dimethyl-p-phenylene diaminedihydrochloride
- DPPH:** Diphenyl-picrylhydrazyle
- ERO:** Espèces réactives de l'oxygène
- EAC:** Extrait acetate d'éthyle
- EEM:** Extrait eau-méthanol
- EM1:** Extrait méthanolique 1
- EM2:** Extrait méthanolique 2
- FRAP:** Ferric ion Reducing Antioxydant Parameter
- FTC:** Thiocyanate ferrique
- GP<sub>x</sub>:** Glutathion peroxydase
- GSH:** Glutathion réduit
- GSSG:** Glutathion oxydé
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peroxyde d'hydrogène
- HPTLC:** Chromatographie liquide à haute performance



**LAPSAB:** Laboratoire, antibiotique, antifongique: Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique.

**LDL:** Low density lipoproteins

**M:** Cation métallique

**MDA:** Malondialdéhyde

**MPO:** Myéloperoxydase

**n-B1:** Extrait n-butanol 1

**n-B2:** Extrait n-B2

**NADP:** Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

**NBT2<sup>+</sup>:** Nitro-Blue Tétrazolium

**Nc:** Néocuproïne

**NO:** Oxyde nitrique

**NO<sub>2</sub>:** Dioxyde de l'azote

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Nitrate

**N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:** Anhydride nitreux

**NOS:** NO synthase

**NOSmt:** NO synthase mitochondriale

**NO<sub>3</sub>:** Nitrate

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Anion superoxyde

**O<sub>2</sub><sup>1</sup>:** Oxygène singulet

**OH:** Radical hydroxyle

**OMS:** Organisation mondiale de santé

**ONOO<sup>-</sup>:** Peroxynitrite

**ORAC:** Oxygène Radical Absorbance Capacity

**PIXE:** Emission de particules induite par rayons X

**PMNs:** Polymorphonucléaires

**ppm:** partie par million

**PS:** poids sec

**ROO:** radical peroxyde

**ROOH:** Peroxydes lipidiques

**RPO:** Résonance paramagnétique électronique

**SOD:** Superoxyde dismutase

**TBA:** Acide thiobarbiturique

**TBARS:** Substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique

**TEAC:** Trolox equivalent antioxidant capacity

**TRAP:** Total Radical -Trapping Antoxydant Parameter

**UI:** unité internationale

**UV:** Ultraviolet

**XO:** Xanthine oxidase

**4-HNE:** 4- hydroxynonanal

**8-OH-dG:** 8-hydroxy-2' déoxyguanosine

**β-PE:** β phycoérythrine

# *Introduction*

Radicaux libres, espèces réactives de l'oxygène (ERO), stress oxydant et antioxydants sont devenus des termes familiers tant dans le monde médical que dans le grand public. Au début des années 2000, ces notions n'étaient généralement évoquées que dans les congrès scientifiques. Mais ces dernières années, l'industrie pharmaceutique, les laboratoires d'analyses médicales et la presse grand public ont massivement diffusé des informations relatives aux antioxydants (**Haleng et al., 2007**).

Le stress oxydant peut être défini comme un déséquilibre prononcé entre les prooxydants et les antioxydants (**Barouki, 2006**). Lorsque un des systèmes projectifs de l'organisme contre la toxicité des radicaux libres montre un échec, l'action des radicaux libres devient incontrôlable, ce qui conduit à des dommages au niveau des molécules, des cellules, des organes et potentiellement à la mort de l'organisme (**Durackova et al., 2008**).

Le stress oxydant est impliqué dans de nombreuses pathologies, incluant l'obésité, le diabète, l'athérosclérose, le vieillissement, le cancer, la cataracte, la sclérose latérale amyotrophique, le syndrome de détresse respiratoire aigu, l'œdème pulmonaire, Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Mohammedi, 2013**).

Pour se protéger des effets délétères des ERO, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes. On distingue deux sources d'antioxydants: l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque; l'autre est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathionperoxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes (**Haleng et al., 2007**).

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

L'étude chimique à partir de sources naturelles permet non seulement de découvrir de nouveaux médicaments, mais aussi, et surtout, de rechercher des outils en chimie, biochimie et biologie moléculaire indispensables à la compréhension de nouvelles voies biosynthétiques et de

modèles pharmacologiques. Les produits marins sont utilisés en médecine depuis l'Antiquité, leur étude par les chimistes et les pharmacologues a permis de mettre en évidence leurs activités biologiques variées: antibiotiques, antitumorales, anti-inflammatoires, analgésiques, anti-allergiques, anti-virales.... Parmi les organismes marins producteurs de métabolites intéressants figurent les spongiaires et les algues. Ils fournissent à eux seuls plus du tiers des molécules isolées du milieu marin (**Munoz, 2011**).

Dans ce contexte, l'objectif de notre étude s'intéresse à l'évaluation du potentiel antiradicalaire d'une algue verte: *Ulva linza* récoltée sur les côtes de la région de Ghazaouet-Tlemcen.

# *Synthèse bibliographique*

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisque, vers les années 50, Gerschman et Hartman avaient déjà évoqué la toxicité de l'oxygène et la «free radical theory» pour expliquer le processus de vieillissement. En 1969, les Américains McCord et Fridovich isolent à partir de globules rouges humains, un système enzymatique antioxydant, le superoxyde dismutase (SOD), capable d'éliminer l'anion superoxyde, démontrant ainsi pour la première fois, que notre organisme produit des ERO. Cette découverte sera le point de départ, dans le monde entier, de nombreuses recherches sur le stress oxydant et les antioxydants.

Le stress oxydant peut être défini comme un déséquilibre prononcé entre les prooxydants et les antioxydants (**Barouki, 2006**). Lorsque un des systèmes projectifs de l'organisme contre la toxicité des radicaux libres montre un échec, l'action des radicaux libres devient incontrôlable, ce qui conduit à des dommages au niveau des molécules, des cellules, des organes et potentiellement à la mort de l'organisme (**Durackova et al., 2008**).

Le stress oxydant est impliqué dans de nombreuses pathologies, incluant l'obésité, le diabète, l'athérosclérose, le vieillissement, cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Mohammedi, 2013**).

Le stress oxydant peut avoir diverses origines, tels que la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, une défaillance nutritionnelle ou de la carence en un ou plusieurs antioxydants apportés par la nutrition comme les vitamines ou les oligo-éléments (**Favier, 2006**), ou même une exposition environnementale à des facteurs prooxydants (Tabac, alcool, médicaments, rayons ultraviolets, pesticides, ozone, amiante, métaux toxiques) (**Magder, 2006**).

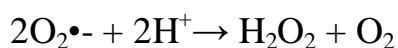
Les radicaux libres sont des espèces chimiques, atomes, ou des molécules dont une orbitale contient un ou plusieurs électrons non appariés. Extrêmement instables et s'accouplent de force avec le premier électron compatible rencontré, soit en arrachant un électron (se comportant comme un oxydant), soit céder l'électron (agissant alors comme un réducteur). L'électron chassé devient à son tour un radical libre et on assiste à la destruction de longues chaînes de molécules assortie de dégradation cellulaire en cascade, c'est ce qu'on appelle le stress oxydatif (**Goto et al., 2008**).

Dans les phénomènes de stress oxydant prenant place dans les milieux biologiques, les radicaux libres qui interviennent, partagent pour caractéristique celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène ou d'azote, ceci leur confère la dénomination d'espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS) ou de l'azote (EAR ou RNS)(**Rezaire, 2012**).

Parmi les EROs, on peut distinguer quatre espèces principales : l'oxygène singulet( $O_2^1$ ), l'anion superoxyde( $O_2^{\bullet-}$ ), le peroxyde d'hydrogène( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyle( $OH^{\bullet}$ ). La réduction partielle de l' $O_2$  à un, deux ou trois électrons génère les différentes espèces citées ci-dessus au lieu des quatre électrons nécessaires pour réduire  $O_2$  en  $H_2O$ .

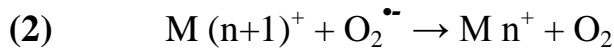
L'oxygène singulet, qui est la forme diamagnétique de l'oxygène est produit en présence de rayonnement UV ou par les leucocytes. Bien qu'il ne soit pas un radical, il joue un rôle dans le vieillissement cutané et certaines maladies liées à l'âge (**Choe et Min, 2005 ; Hennebelle, 2006**). L' $O_2^1$  est le résultat de l'apport d'un électron supplémentaire à la structure initiale de l'oxygène (**Rezaire, 2012**). De plus, il peut être produit dans la membrane plasmique de cellules immunitaires comme les globules blancs et participer ainsi à la phagocytose (lors des réactions inflammatoires). Toutefois, comme  $O_2^{\bullet-}$  est un radical anionique, il est susceptible de réagir avec des molécules environnantes; sa réactivité est variable selon que l'on trouve dans un milieu aqueux ou non. Dans l'environnement des membranes biologiques, il se comportera comme une base ou un agent réducteur; il peut aussi se dismuter pour donner spontanément du  $H_2O$  et d l' $O_2$ . En présence de composés tels que la vitamine E, l'ascorbate ou le catéchol, il se comportera d'avantage comme un nucléophile ou un agent oxydant. Lorsqu'il se trouve en milieux aqueux, il réagit comme un réducteur de radicaux peroxydes par exemple (**Badouard, 2006**).

Le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  (appelé également eau oxygénée) est formé par l'addition d'un second électron sur  $O_2^{\bullet-}$  donnant comme intermédiaire l'anion peroxyde  $O_2^{2-}$  qui se protone facilement pour donner  $H_2O_2$ . Toutefois, la principale production de  $H_2O_2$  résulte de la dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$  selon la réaction suivante :



Sous sa forme moléculaire, le  $H_2O_2$  est également toxique, en particulier à cause de sa transformation en radical hydroxyle en présence de cations métalliques  $Fe^{2+}$  et  $Cu^{2+}$  lors de réactions de type « Fenton » (1) et (2)(**Wardman et Candeias, 1996**).





(Où M présente un cation métallique au degré d'oxydation n ou n+1).

La réduction monoélectronique du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  donne naissance au radical hydroxyle  $\cdot OH$  (**Rezaire, 2012**), qui est l'oxydant le plus puissant de l'organisme (**Badouard, 2006**), et joue un rôle majeur dans la peroxydation lipidique et la destruction du matériel génétique. La durée de vie d' $\cdot OH$  est très courte (moins de 1 nanoseconde) ce qui fait qu'il réagira avec les molécules environnantes et non pas à distance. L' $\cdot OH$  peut-être généré de plusieurs manières différentes: coupure homolytique de  $H_2O_2$  sous l'influence de rayonnements UV, réactions de l'acide hypochloreux avec  $O_2^{\bullet -}$ , décomposition des ions peroxynitrites ( $ONOO^-$ ) (**Hennebelle, 2006**).

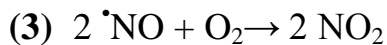
Le rôle des ERO est très complexe car elles peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration. Dans des conditions normales, elles sont générées en faible quantité et jouent un rôle de messagers secondaires capables, notamment, de réguler le phénomène de l'apoptose ou d'activer des facteurs de transcription. Formés en trop grande quantité, les ERO deviennent « pathologiques » en activant l'expression des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires ou des protéines d'adhésion (**Haleng et al., 2007**).

Dans la cellule, les ERO ont différentes origines. La mitochondrie est la source majeure des ERO cellulaires (respiration mitochondriale). Des réactions enzymatiques sont aussi capables de produire des anions superoxydes (NADPH oxydases, xanthine oxydase) (**Valko et al., 2007**). Dans des conditions physiologiques le peroxysome produit  $H_2O_2$ , les neutrophiles produisent les anions superoxydes via la NADPH oxydase pour accomplir la bactéricidie (**Valko et al., 2004; Valko et al., 2007**). Les mono-oxygénases du réticulum endoplasmique (cytochrome P450) contribuent à la production de  $H_2O_2$  et d' $O_2^{\bullet -}$  (**Zangar et al., 2004**). Au niveau du SNC, système nerveux central, le  $\cdot NO$  est un neurotransmetteur qui agit aussi sur la plasticité synaptique (**Gao, 2010**).

Les espèces réactives de l'azote issues du métabolisme de l'azote (via les NO synthases) sont représentées principalement par l'oxyde nitrique ( $NO\cdot$ ), les oxydes de l'azote, comme l'anhydride nitreux  $N_2O_3$  et l'ion peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) (**Guertens et al., 2002**).

l'oxyde nitrique ( $\cdot\text{NO}$ ) est impliqué dans différents processus physiologiques comme la transmission neuronale, la régulation de la pression sanguine, les mécanismes de défense, la relaxation musculaire et l'immunité (**Archer, 1993; Forstermann et al., 1998; Bergendi et al., 1999; Alderton et al., 2001**).  $\cdot\text{NO}$  provient notamment de la réaction catalysée par la NO synthase mitochondriale (NOSmt) (**Masuda et al., 2001**) entre l'atome d'azote appartenant à la L-Arginine et une molécule d'oxygène. Il est peu réactif et diffusible dans les milieux biologiques. Sa durée de vie est de l'ordre de quelques secondes en système aérobie et de plus de 15 secondes lorsqu'il se trouve dans un milieu pauvre en  $\text{O}_2$ . De plus,  $\cdot\text{NO}$  peut être produit par la NOS endothéliale et possède dans ce cas des capacités vasodilatatrices au niveau cardiovasculaire (**Badouard, 2006**).

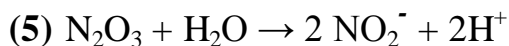
Cependant, le  $\cdot\text{NO}$  n'est pas dénué de toxicité car il peut aisément réagir avec la plupart des espèces oxygénées et se transformer en dioxyde de l'azote ( $\text{NO}_2$ ) :



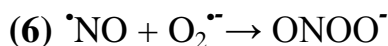
Lequel peut donner du trioxyde d'azote ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) :



Pour enfin aboutir à un ion nitrate stable ( $\text{NO}_2^-$ ) (**Rezaire, 2012**).



De plus, le monoxyde d'azote forme avec l'ion superoxyde le peroxynitrite  $\text{ONOO}^-$  :



Composé extrêmement réactif et toxique,  $\text{NO}$  et  $\text{ONOO}^-$  interagissent avec des protéines et peuvent altérer leurs propriétés (**Barouki, 2006**).

La production excessive de radicaux libres provoque des dommages au niveau des molécules biologiques comme l'ADN, les protéines et les lipides. Des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés lors de l'oxydation des lipides peuvent également se produire (**Favier, 2003**).

Les premières cibles des ERO sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés

(AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation (**Pamplona et al., 2000; Hulbert, 2005**). L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. La peroxydation des lipides induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes (**Hang et al., 2004**). Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), les substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE) sont étudiés comme marqueurs de la peroxydation (**Garait, 2006**). Cependant, le 4-HNE peut activer directement le découplage mitochondrial et pourrait ainsi réduire la production mitochondriale de ROS, ce mécanisme pourrait être un moyen de réguler la production de ROS (**Echtayet al., 2003**).

Le MDA peut réagir avec les bases de l'ADN (**Valko et al., 2006; Cadet et al., 2010**). En effet, les atomes de carbone des deux liaisons carbonyles du MDA sont électrophiles de la guanine, de l'adénine et de la cytosine (**Valko et al., 2006; Cadet et al., 2010**). Le 4-HNE forme plusieurs type d'adduits, le 1, N2-propano-2'-désoxyguanosine est l'adduit prépondérant de la réaction du 4-HNE avec l'ADN isolé ou cellulaire (transversions GC vers TA) (**Feng et al., 2003; Douki et al., 2004**).

De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ERO (**Peng et al., 2000; Levine, 2002**), principalement au niveau des résidus cystéine, méthionine, tyrosine, tryptophane, phénylalanine, valine, leucine, histidine, glutamine, proline, thréonine, arginine et lysine (**Stadtman, 1992; Stadtman et al., 1992**). Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus avec, pour conséquences, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra-et inter-chaînes (**Haleng, 2007**). Les carbonyles sont utilisés comme des marqueurs de l'oxydation des protéines et de façon générale comme des marqueurs de stress oxydant (**Nakamura et al., 2010**). Les produits de la peroxydation lipidique, 4-HNE et MDA, peuvent contribuer à l'oxydation des protéines, en particulier au niveau des résidus histidine, cystéine et lysine (**Maier et al., 2010**). Les changements structuraux des protéines oxydées altèrent l'intégrité des membranes cellulaires, ainsi que les propriétés fonctionnelles et antigéniques des protéines membranaires (**Gruber et al., 2006; Jacob et al., 2006**).

L'oxydation des protéines est liée à l'âge et à plusieurs maladies, le processus de vieillissement est le plus souvent lié à une accumulation de protéines oxydées, liée à une augmentation du taux ERO/ERN dans l'organisme, à une défaillance du système anti-oxydant et

à une diminution de la capacité du système de dégradation des protéines oxydées (**Valko et al., 2006**).

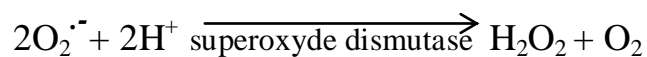
L'ADN est aussi une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux oxygénés (**Dizdaroglu et al., 2002**), les ERO peuvent réagir avec la guanine, base constitutive de l'ADN pour former la 8-hydroxy-2'désoxyguanosine(8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et vieillissement. Les ERO peuvent aussi attaquer la liaison entre la base et le sucre créant un site abasique, et peuvent également attaquer le sucre lui-même créant une coupure de chaîne simple brin. L'accumulation de dommages oxydatifs à l'ADN risque de développer un cancer au cours de la vie (**Haleng et al., 2007**).

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydants et augmente la production mitochondriale de radicaux (**Mohammedi, 2013**).

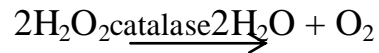
Les effets du stress oxydatif sont contrôlés par l'action d'un système complexe d'antioxydants non enzymatiques et enzymatiques. Les enzymes antioxydantes les plus efficaces sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathione peroxydase (GP<sub>x</sub>) (**Mates et al., 1999**). Les antioxydants non enzymatiques incluent la vitamine C (ascorbate), la vitamine E (tocophérol), les caroténoïdes, les thiols (glutathion, thiorédoxine et acide lipoïque) et les polyphénols (**McCall et Frei, 1999**).

Les antioxydants enzymatiques sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ERO principalement SOD, la catalase et la glutathion (**Garait, 2006**).

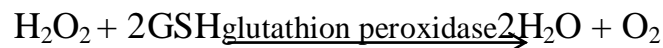
Superoxyde dismutase (SOD), assure l'élimination de l'anion superoxyde par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène. Chez l'homme, la SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique: une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD) (**Garait, 2006; Haleng, 2007**).



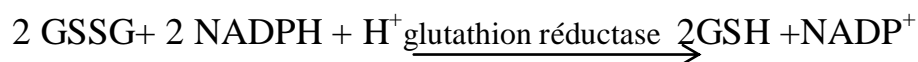
La catalase est une enzyme tétramérique, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Elle catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire. L'affinité de la catalase pour l' $\text{H}_2\text{O}_2$  est élevée seulement lorsque les teneurs en peroxyde d'hydrogène sont accrues. Présente dans les peroxysomes de nombreuses cellules, elle assure la protection vis-à-vis d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans le cytosol et les mitochondries (**Garait, 2006**).



La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{O}_2$ . Lors de cette réaction, deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure.



La glutathion réductase, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électron. Ces deux enzymes sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries (**Garait, 2006**).



Contrairement aux enzymes antioxydants, la plupart des antioxydants non enzymatiques ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie, nous retrouvons les oligoéléments (le cuivre, le fer, le manganèse, le sélénium et le zinc), le glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone (CoQ10), l'acide ascorbique (vitamine C),  $\alpha$  tocophérol (vitamine E) et les caroténoïdes (**Vertuani et al., 2004**).

Le coenzyme Q10, appelé ubiquinone en raison de son ubiquité dans les cellules, est un dérivé benzoquinolique avec une longue chaîne latérale isoprénique. Cette chaîne latérale confère à la molécule un caractère lipophile qui lui permet de s'insérer dans les membranes et les lipoprotéines. Il joue un rôle essentiel dans la chaîne mitochondriale de transport d'électrons et est un puissant inhibiteur de peroxydation lipidique (**Haleng et al., 2007**).

La vitamine A connue par son effet antioxydant, est une molécule liposoluble présente dans les membranes biologiques. Sa structure chimique hautement insaturée la fait réagir adéquatement avec les radicaux peroxydes, créant ainsi des produits non radicalaires, ce qui a pour effet d'arrêter la chaîne de réaction radicalaire (**Rissanen et al., 2003**).

La vitamine C ou acide ascorbique n'est pas synthétisée par l'organisme. Sa concentration plasmatique dépend fortement de l'alimentation et des modifications du flux hépatique. C'est un excellent piègeur des ERO qui peut protéger divers substrats biologiques (protéines, acides gras, ADN) de l'oxydation. Aux concentrations physiologiques, la vitamine C est capable d'empêcher l'oxydation des LDL produite par divers systèmes générateurs d'ERO (**Will et Byers, 1996**).

Sous le terme de la vitamine E est regroupée la famille des tocophérols ( $\alpha$ ,  $\beta$ , gamma, delta). Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines où elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par un stress oxydant (**El-Sohemy et al., 2002**).

Le glutathion est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine) qui sous la forme réduite agit comme antioxydant. Les fonctions du GSH incluent le maintien des thiols des protéines, ainsi que le maintien de certains composés sous leur forme réduite comme les vitamines C ou E. Dans des conditions physiologiques, sa forme oxydée (GSSG) est en concentration très faible. Le rapport GSH/GSSG est considéré comme un excellent marqueur de la peroxydation lipidique et permet d'objectiver l'importance du stress. (**Souchard et al., 2002; Haleng et al., 2007**).

Oligoéléments ou les métaux de transition peuvent aussi jouer un rôle protecteur vis-à-vis du stress oxydant comme composés essentiels des enzymes antioxydantes. Ainsi, le cuivre, le zinc et le manganèse entrent dans la composition du site actif des différents superoxydes dismutases (Cu/ZnSOD et MnSOD). Le sélénium n'est pas un antioxydant en tant que tel, car il ne peut piéger les radicaux libres, mais il joue un rôle primordial comme cofacteur de la glutathion peroxydase (**Arteel et Sies, 2001; Haleng et al., 2007**). Certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action prooxydante (réaction de Fenton, d'Haber-Weiss) (**Garait, 2006**).

Depuis le début des années 90, diverses méthodes ont été mises au point afin d'évaluer la capacité antioxydante. Puisque les composés antioxydants se trouvent dans des mélanges ou des

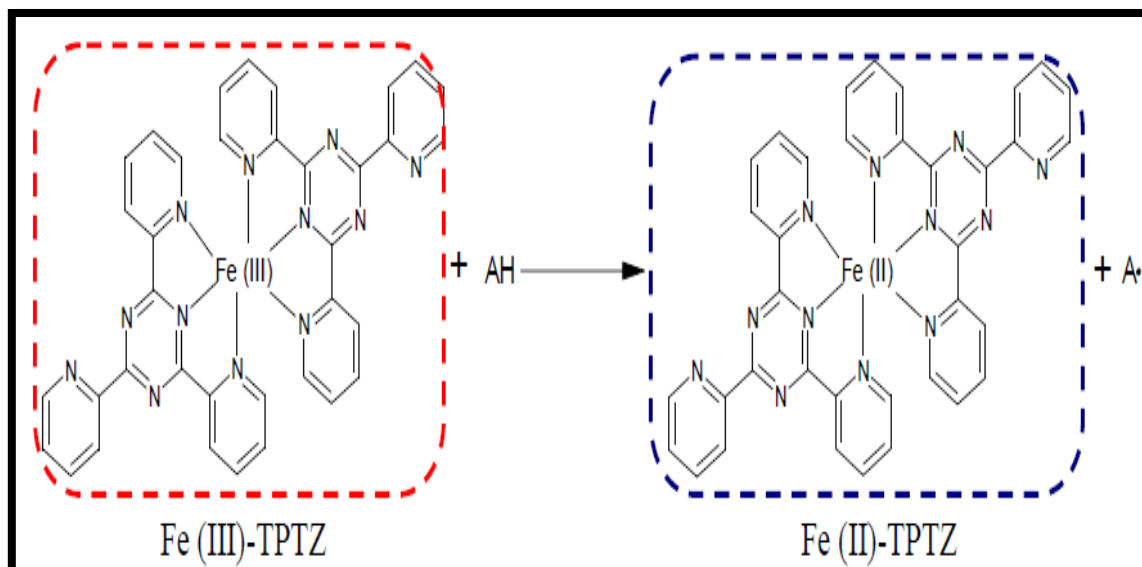
systèmes complexes et agissent à plusieurs niveaux à la fois, ils sont soumis à une multitude de variables qui sont susceptibles d'influencer leur action (**Antolovich et al., 2002**). Au début des années 2000 plusieurs auteurs s'entendaient pour dire qu'il est nécessaire d'utiliser plus d'une méthode afin de déterminer l'activité antioxydante dans la nourriture et les systèmes biologiques (**Frankel et Meyer, 2000; Antolovich et al., 2002; Marc et al., 2004**).

Les tests qui mesurent le potentiel antioxydant peuvent être divisés en deux catégories: ceux qui mesurent les réactions de transfert de l'atome d'hydrogène et ceux qui mesurent le transfert d'électrons (**Marc et al., 2004; Wu et al., 2004**).

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage de différents radicaux, comme les peroxydes ROO• par les méthodes ORAC (Oxygène Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter); les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) ou les radicaux ABTS• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique), ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH• (diphenyl-picrylhydrazyle). Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent, il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (**Cristina et al., 2009**).

### **Réduction de fer par test de FRAP: Ferric Reducing Antioxydant Power**

cette technique correspond à la réduction d'un complexe tripyridyltriazine ferrique [(Fe(III)-TPTZ)<sub>2</sub>] en un complexe tripyridyltriazine ferreux [(Fe(II)-TPTZ)<sub>2</sub>] par un antioxydant (AH), à un pH de 3.6 pour maintenir la solubilité du fer (**figure01**).



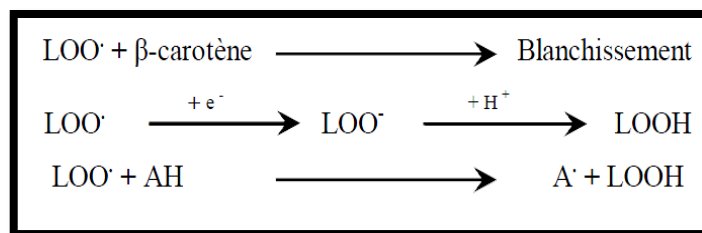
**Figure 01:** Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)-TPTZ et un antioxydant (AH) (Thomas, 2011).

Lors de la réduction du complexe ferrique en complexe ferreux une coloration bleue intense apparaît très rapidement avec un maximum d'absorption à 593 nm (Thomas, 2011). Ainsi, la formation de ce complexe indiquera un pouvoir réducteur qui détermine la capacité d'un composé à se comporter comme un antioxydant. Les valeurs obtenues sont comparées avec l'absorbance d'un témoin qui est usuellement l'acide ascorbique (Benzie et Strain, 1996; Pulido et al., 2000).

### Blanchissement de la bêta-carotène: $\beta$ -carotene bleaching method

Cette technique spectrophotométrique consiste à mesurer la décoloration du  $\beta$ -carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. L'oxydation de ce dernier génère des radicaux peroxydes, ces radicaux libres vont par la suite oxyder le  $\beta$ -carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie par spectrométrie à 470 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du  $\beta$ -carotène (Tepe et al., 2006).



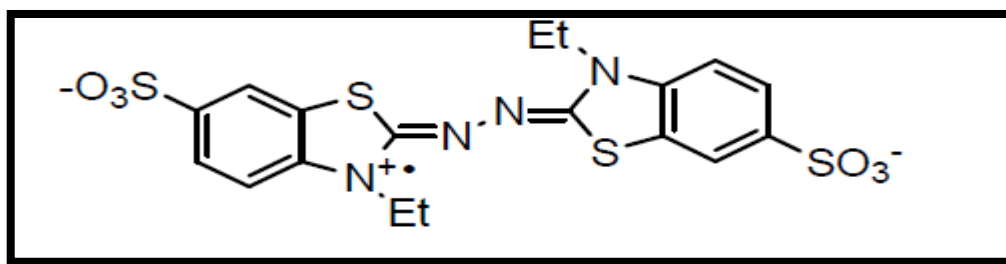


Cette méthode est sensible, rapide et simple. Elle présente également l'avantage de pouvoir être couplée à la chromatographie sur couche mince (Atti, 2014). Après séparation chromatographique, un mélange de  $\beta$ -carotène et d'acide linoléique est pulvérisé sur la plaque, celle-ci étant alors exposée plusieurs heures à la lumière du jour ou aux UV jusqu'à décoloration du fond jaune. Les bandes où la couleur jaune persiste, indiquent la présence de substances antioxydantes. Cependant, l'oxydation induite par voie thermique est non contrôlée et donc non spécifique, ce qui conduit bien souvent à une variabilité des résultats. Pour contourner ce problème, certains auteurs ont remplacé la chaleur par des agents oxydants conduisant à des résultats plus reproductibles, comme l'AAPH [2,2'-azo -bis (2-amidinopropane) dichlorhydrate] (Parejo et al., 2003) ou la lipoxygénase de soja (Chaillou et Nazareno, 2006).

Frankel, (1998) a également critiqué l'utilisation d'acides gras libres qui ne représentent pas des modèles lipidiques réalistes. Enfin, l'interprétation des données n'est pas aisée car le  $\beta$ -carotène est lui-même un antioxydant, sensible à l'oxygène.

### La méthode TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity

La méthode TEAC est un test de décoloration basé sur la capacité d'un antioxydant à réduire le radical-cation  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  de couleur bleu (figure 02), comparativement à un antioxydant de référence, le Trolox (l'analogue hydrophile de la vitamine E) (Pellegrini et al., 2003). La décoloration de l'ABTS est mesurée à 734 nm (Wang et al., 2004). La valeur TEAC correspond à la concentration (mmol/l ou mg/l) de Trolox ayant la même activité que la concentration unitaire du composé à tester (Marc et al., 2004; USDA, 2007; CQVB, 2008). Cette méthode a été employée dans de nombreux laboratoires en raison de sa simplicité, sa rapidité et sa corrélation avec l'activité biologique des antioxydants. Les principaux inconvénients de la méthode TEAC sont les suivants: le radical-cation  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  doit être généré à partir des sels ABTS, les radicaux libres générés ne sont pas stables durant de longues périodes et il est difficile de comparer les valeurs à d'autres études parce que la technique n'est pas standardisée (Sánchez-Moreno, 2002).



**Figure 02:** Structure du radical-cation  $ABTS^{+\bullet}$  (Miller et Evans, 1997).

### La méthode TRAP: total radical trapping antioxidant potential

La méthode TRAP est basée sur la capacité d'un antioxydant à inhiber l'action des radicaux peroxydes. Les radicaux sont générés par les sondes fluorescentes telles que le BAP [2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) chlorhydrate] ou AAPH [2,2'-azo -bis (2-amidinopropane) dichlorhydrate]. L'AAPH est solubilisé en milieu aqueux avec l'antioxydant et un indicateur qui devient luminescent lorsqu'il est oxydé à 37°C, comme le luminol. La capacité des antioxydants à bloquer l'oxydation de l'indicateur est comparée à celle du Trolox (témoin) (Schlesier et al., 2002). Les avantages de cette méthode sont que les antioxydants non enzymatiques (glutathion, acide ascorbique,  $\alpha$ -tocophérol et le  $\beta$ -carotène) peuvent être quantifiés et la capacité antioxydante du plasma et du sérum sanguin peut être mesurée (Sharpe et al., 1996; Phipps et al., 2007; CQVB, 2008). Le principal inconvénient est que les temps de latence ne sont pas toujours respectés; il est alors difficile de comparer les résultats avec d'autres études. Les antioxydants n'ont pas tous une phase de latence détectable cependant, l'utilisation de cette technique est basée sur l'hypothèse que tous les antioxydants démontrent une phase de latence et que la durée de cette phase est proportionnelle à la capacité antioxydante (Prior, 2005).

### Piègeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure activité antioxydante des composés phénoliques (Medjoujda et Benlifa, 2014). La réduction du radical DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517nm provoquée par la présence des composés phénoliques. Le DPPH est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie (figure 03). Cette décoloration est représentative de la capacité des composés phénoliques à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de différentes substances phénoliques (Molyneux, 2004).

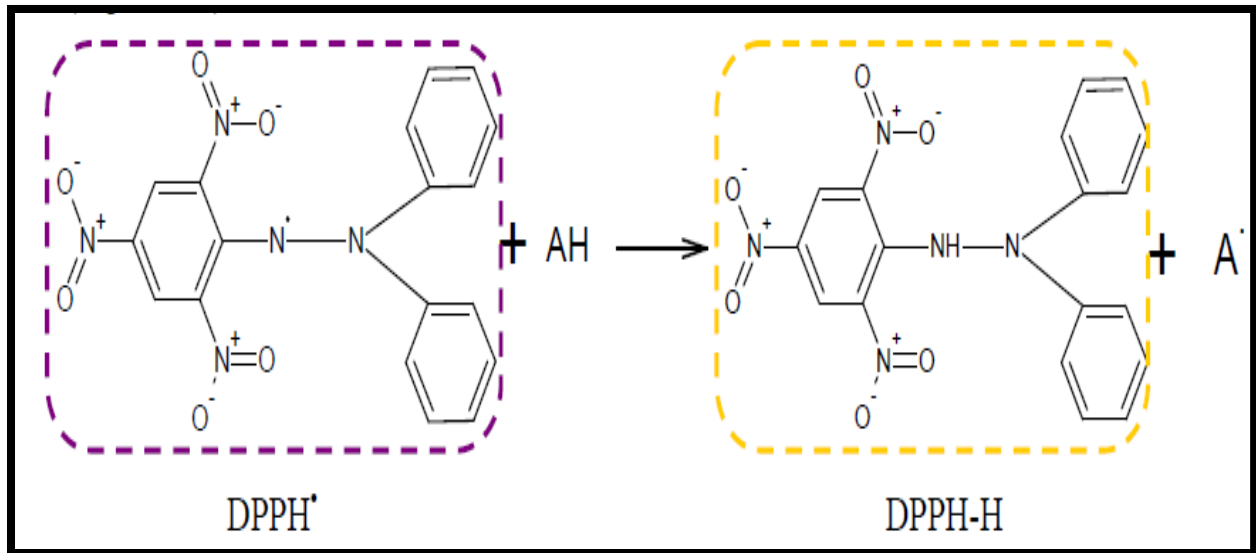


Figure 03: Mécanisme réactionnel entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH)(Thomas, 2011).

### Piégeage du radical peroxyde (ROO•) par la méthode ORAC: Oxygen-Radical Absorbance Capacity

La méthode ORAC a été développée par l'équipe de **Cao et al. (1993)**. Elle consiste à mesurer l'effet inhibiteur des antioxydants sur un radical libre couplé à une protéine fluorescente, La  $\beta$ -PE ( $\beta$  Phycoérythrine) est une protéine fluorescente extrêmement sensible au stress oxydatif. En présence d'AAPH, qui est un donneur du radical peroxy, la structure tétramérique de la  $\beta$ -PE est modifiée, elle se dimérise. Cette dimérisation dépendante de la concentration en radicaux peroxydes du milieu réactionnel. Et peut être suivie en mesurant la décroissance de la fluorescence de la  $\beta$ -PE en fonction du temps. Cette cinétique de décroissance de la fluorescence, est directement reliée à la concentration de radicaux libres présents dans le volume réactionnel. Cependant, la  $\beta$ -PE n'étant pas constante d'un lot à l'autre, la méthode fût améliorée en 2001 grâce à l'utilisation de la fluorescéine (**Ou et al., 2001**). À l'origine, la méthode était limitée à l'évaluation des composés hydrophiles seulement. A priori, cela ne semblait pas poser de problèmes puisque les antioxydants hydrophiles comptent pour plus de 85% de la capacité antioxydante chez les fruits et légumes, (**Prior, 2003; Pellegrini et al., 2007**). Cependant, comme les composés lipophiles jouent un rôle important contre l'oxydation lipidique, la méthode a été adaptée afin de les prendre en considération (**Huang et al., 2002; Wu et al., 2004**). Cette méthode utilise le Trolox comme standard, dont la capacité antioxydante est bien connue. La méthode ORAC a pour avantage d'être relativement simple, requiert peu d'instrumentation et

prend en considération les composés hydrophiles et lipophiles (**Prior et al., 2005**). Cette méthode a largement été utilisée pour évaluer la capacité antioxydante des aliments (**Cao et al., 1996; Wang et al., 1996; Wu et al., 2004**).

### **Piégeage du radical superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ )**

Cet essai évalue la capacité d'un produit à capter un radical libre, l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot -}$ , ce radical est généré *in vitro* par le système hypoxanthine/xanthine oxydase. Dans cette méthode, le radical réduit le  $NBT2^+$  (Nitro-Blue Tétrazolium) de couleur jaune, en bleu de formazan de couleur pourpre qui absorbe à 560 nm. Ainsi un composé antioxydant capable de capter l'anion superoxyde empêchera la formation du bleu de formazan et la solution restera jaune. Les absorbances obtenues permettent de calculer un pourcentage d'inhibition de la réduction du  $NBT2^+$  par rapport à un témoin constitué du milieu réactionnel dépourvu de composé antioxydant. On peut ensuite tracer une courbe représentant le logarithme du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de composé testé, et déterminer la  $IC_{50}$  (concentration inhibant 50% de l'activité) du composé (**Parejo et al., 2002**).

### **Piégeage du peroxyde d'hydrogène: $H_2O_2$ scavenging activity**

Une des méthodes les plus communes pour évaluer la capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène est basée sur l'absorption de cette molécule dans le domaine de l'UV. Comme la concentration de  $H_2O_2$  diminue par les composés piégeurs, la valeur d'absorbance de ce dernier à 230nm diminue également. Néanmoins il est tout à fait normal que les échantillons absorbent également à cette longueur d'onde, exigeant ainsi l'exécution d'une mesure du blanc (**Malgalhae et al., 2008**).

### **Piégeage du radical hydroxyle ( $HO\cdot$ )**

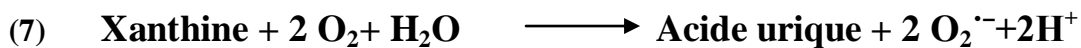
La capacité des substances à piéger le radical hydroxyle est souvent évaluée par le pourcentage d'inhibition de la réaction du radical  $OH\cdot$  avec une molécule détectrice. Les molécules détectrices utilisées dans la littérature, sont nombreuses. On peut citer le désoxyribose, la dopamine, la thymine, la 4- nitrosodiméthylaniline (**Atti, 2014**).

Le radical hydroxyle est produit par réaction entre le fer ( $Fe^{2+}/EDTA$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en présence d'acide ascorbique. Le désoxyribose, par action du radical hydroxyle, va être dégradé en malon-dialdéhyde (MDA) dont l'apparition est suivie par réaction

avec l'acide thiobarbiturique (TBA). Le produit ainsi formé est détectable par une mesure d'absorbance à 532 nm. La capture du radical (HO•) par la substance à étudier, se fait par compétition avec le désoxyribose, ainsi une diminution de la quantité du chromogène formé est observée se traduisant par une diminution de l'absorbance (**Kanoun, 2011**).

### Méthode de la xanthine oxydase

Cette méthode est basée sur l'inhibition de XO (xanthine oxydase) qui conduit une diminution de la production d'acide urique, qui a été déterminée par spectrophotométrie (**Oskoueian et al., 2011**). La xanthine oxydase est une métalloflavoprotéine qui intervient dans la formation de l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet -}$  et du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) par réduction de l'oxygène moléculaire (**Yeh et al., 2003**) selon la réaction suivante :



La xanthine oxydase peut catalyser l'oxydation d'une grande gamme de substrats y compris les purines, les pyrimidines et les aldéhydes. Par ailleurs, la xanthine oxydase peut produire du superoxyde lors de la métabolisation de l'hypoxanthine en xanthine et en acide urique. L'anion superoxyde est ensuite à l'origine de la formation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) par l'action du superoxyde dismutase. En présence du fer, la coexistence du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène peut générer le radical hydroxyle (OH•), qui est un puissant inducteur de la peroxydation des phospholipides membranaires (**Takano et al., 2005**). L'accumulation de l'acide urique produit, conduit à une hyperuricémie et à la maladie de la goutte (un trouble du métabolisme des purines). Cette molécule est caractérisée par un maximum d'absorption à 290 nm (**Da Silva et al., 2004; Takano et al., 2005**). Un inhibiteur de la xanthine oxydase dans le milieu réactionnel aura pour effet de diminuer la concentration en acide urique. La capacité de l'antioxydant à inhiber la xanthine oxydase est alors évaluée en mesurant la quantité d'acide urique formée. Cette mesure est effectuée par spectrophotométrie à 295 nm (**Cimanga et al., 1999; Nguyen et al., 2004**).

### Méthode de DEPG: N, N-dimethyl-p-phenylene diaminedihydrochloride

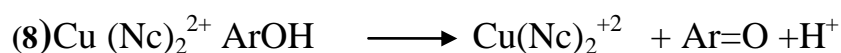
Cette méthode est basée sur la réduction de couleur de la solution tamponnée de DEPG dans un tampon acétate et le chlorure ferrique. La procédure implique la mesure de la diminution de l'absorbance de DEPG en présence d'accepteurs avec maximum d'absorption de 505 nm. L'activité a été exprimée en pourcentage de réduction de DEPG (Nur-Alam et al., 2012).

### Méthode de thiocyanate ferrique (FTC)

La capacité antioxydante a été déterminée par la mesure de l'absorbance d'un complexe coloré généré par la réaction entre le peroxyde et le chlorure ferreux qui forment les ions ferriques. Les ions ferriques réagissent avec le thiocyanate d'ammonium et produisent le thiocyanate ferrique qui donne une couleur rouge (Medjoujda et Benlifa, 2014).

### Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

La méthode CUPRAC (Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) est basée sur le suivi de la diminution de l'absorbance accrue du complexe Néocuproïne (Nc), cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) [ $\text{Nc}_2\text{Cu}^{2+}$ ]. En effet, en présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre–néocuproïne est réduit et cette réaction est quantifiée spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 450 nm (Apak et al., 2004).



La détection des ERO est très longtemps restée difficile *in vivo*. En effet, les radicaux libres ont une demi-vie très courte de l'ordre de 10-11 secondes, et il est difficile de les détecter de manière directe. La résonance paramagnétique électronique (RPE), méthode qui détecte la présence d'électrons non appariés, assure une mesure directe et sensible des radicaux libres, et la détection des radicaux libres à des concentrations de l'ordre de 10mol/L tant qu'ils sont stables. Pour les radicaux très instables, un certain nombre d'approches complémentaires sont disponibles. Celle proposée par Knowles et al. (1969) pour la mesure du radical superoxyde est appelée "rapid-freezing". Elle consiste à congeler les échantillons afin de réduire la réactivité de l'espèce. Une autre approche repose sur l'utilisation des piègeurs radicalaires qui réagissent

rapidement avec les radicaux libres pour donner des produits radicalaires de durée de vie plus longue que les espèces d'origine. Cette technique est largement employée pour détecter la présence des radicaux hydroxyles et superoxydes mais également des radicaux organiques pendant la peroxydation lipidique (**Pietri et al., 1998**).

En raison de leur très courte durée de vie, la plupart des techniques d'évaluation des ERO sont donc indirectes. Ces méthodes reposent sur la mesure des sous-produits de réaction des ERO avec les substrats biologiques. Les produits d'oxydations biologiques sont à ce jour les meilleurs marqueurs du stress oxydant (**Sekli-Belaidi, 2011**).

### Dérivés de la peroxydation des lipides

Les acides gras polyinsaturés comme l'acide linoléique ou arachidonique sont les cibles privilégiées des EOA et plus particulièrement des radicaux libres. Dans une première étape, ils se transforment en peroxydes lipidiques (ROOH) qui peuvent être mesurés au niveau plasmatique avec un kit commercial. Sous l'action de métaux de transition (fer, cuivre), les peroxydes lipidiques se décomposent ensuite en toute une série de sous-produits dont font partie les aldéhydes (**Pincemail et al., 1999**).

Le malondialdéhyde (MDA) est un produit terminal de la peroxydation lipidique. La réactivité du MDA avec l'acide thiobarbiturique (TBA) reste un test classique de dépistage de la peroxydation lipidique encore très utilisé (**Sekli-Belaidi, 2011**). Si cette méthode relativement simple présente une très bonne sensibilité, elle manque de spécificité en raison de la présence d'interférents (molécules ne relevant pas du stress oxydant et pouvant réagir avec le TBA) et des conditions opératoires nécessaires à la formation du complexe MDA-TBA (chauffage en milieu acide) (**Lefèvre et al., 1998**). Plus sensible et beaucoup plus spécifique est la mesure d'un autre aldéhyde, le 4-hydroxynonéal (HNE) provenant de la dégradation des peroxydes d'acides gras de la famille  $\omega$ -6. Tout comme la MDA, le HNE se mesure en routine par une méthode HPLC. Très récemment, de nouveaux marqueurs stables et spécifiques de la peroxydation lipidique ont été proposés, les F2-isoprostanes (**Roberts et Morrow, 2000; Cracowski et al., 2000**) qui sont formés lors de l'attaque de l'acide arachidonique par les ERO. La détermination de ces produits dans le sang et les urines impose l'utilisation de techniques complexes, comme la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (**Sekli-Belaidi, 2011**).

Le dommage oxydatif provoque des changements dans la structure des lipoprotéines de faible densité ("*low density lipoprotéines*" ou LDL) qui sont riches en acides gras polyinsaturés.

La peroxydation induite dans les LDL par les EOA provoque *in situ* la formation d'aldéhydes (MDA et HNE) qui peuvent à leur tour oxyder les LDL. Ces LDL modifiées sont reconnues par les macrophages au sein desquels elles s'accumulent en formant des cellules spumeuses ("foam cells"). En s'accumulant dans l'espace interstitiel, ces cellules contribuent au développement de l'athérosclérose (**Pincemail et al., 1999**).

### Dérivés de l'oxydation des protéines

Les modifications des structures primaires, secondaires et tertiaires des protéines par les EOA sont à la base de la formation de dérivés protéiques carbonylés via plusieurs mécanismes incluant la fragmentation et l'oxydation des acides aminés. Cette méthode, essentiellement utilisée sur des prélèvements cellulaires et tissulaires, est applicable au plasma. Cependant, elle est délicate à mettre en œuvre et requiert des quantités importantes de protéines (**Bonnefont-Rousselot et al., 2001**), par technique HPLC ou via des anticorps mono-et polyclonaux. Récemment, une méthode ELISA quantitative, sensible et applicable en routine dont les résultats se corrèlent parfaitement avec ceux obtenus par méthode spectrophotométrique, a été mise au point (**Pincemail et al., 1999**).

### Dérivés de l'oxydation de l'ADN

De nombreux produits d'oxydation radicalaire de l'ADN ont été identifiés mais seulement deux d'entre eux (thymidine glycol et 8-OH-2-desoxyguanosine) sont des marqueurs intéressants qui peuvent être dosés dans des cellules isolées, dans l'urine et à partir de biopsies. Cependant, les méthodes de mesure sont lourdes (spectrométrie de masse, HPLC couplée à une détection électrochimique). En outre, des précautions drastiques doivent être prises lors de l'extraction de l'ADN, ce qui limite leur utilisation aux laboratoires spécialisés (**Sekli-Belaidi, 2011**).

Le plasma humain est riche en antioxydants de petite taille de types hydrophiles (acide urique, acide ascorbique (Vit C), glutathion, bilirubine) et lipophiles ( $\alpha$ -tocophérol (Vit E), rétinol (Vit A),  $\beta$ -carotène, ubiquinone). Les globules rouges sont par contre très riches en enzymes antioxydantes comme le superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx). De très nombreuses études chez l'animal ont montré que les antioxydants de petite taille sont généralement consommés lors d'un stress oxydatif tandis que le taux d'enzymes antioxydantes est soit augmenté par expression moléculaire en cas de faible stress oxydatif (adaptation), soit diminué lorsque l'intensité du stress oxydatif est trop importante (**Pincemail et al., 1999**).



Le dosage des SOD est préconisé dans les globules rouges, après acheminement rapide du sang total sur glace. Des kits sont commercialisés pour le dosage des activités enzymatiques. La GSH-Px peut être dosée dans différents milieux biologiques; des kits dérivant de la méthode de Paglia basée sur la mesure spectrométrique à 340 nm de l'oxydation du NADPH en présence de glutathion et de la GSH-Px sont disponibles. Le dosage de la catalase dans les érythrocytes est basé sur la variation de la densité optique à 240 nm liée à la dismutation du peroxyde (**Sekli-Belaidi, 2011**).

Le dosage des molécules antioxydantes a beaucoup progressé au cours des dix dernières années. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à une détection électrochimique est proposée pour le dosage simultané du tocophérol, du rétinol, des caroténoïdes, de l'acide ascorbique et du couple GSSG/GSH (**Gazdik et al., 2008**). Les techniques spectrométriques ainsi que les méthodes enzymatiques sont aussi largement utilisées (**Feng et al., 2005; Zhao et al., 2009**).

Le sélénium est un élément essentiel à l'état de trace (oligoélément) qui participe à la constitution et à la régulation de la GPx, enzyme qui participe à la destruction des peroxydes lipidiques. Le sélénium se dose dans le sérum ou le plasma par diverses techniques comme la fluorescence par rayons X, l'émission de particules induite par rayons X (PIXE), la chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse et l'absorption atomique avec correction Zeeman, cette dernière technique ayant l'avantage de pouvoir être utilisée en routine (**Pincemail et al., 1999**).

Le fer est indispensable à la vie, il joue un rôle important dans le transport de l'oxygène, le transfert des électrons et la catalyse enzymatique. A l'état libre, le  $Fe_2^+$  est un puissant donneur d'électrons, réagissant notamment avec l'eau oxygénée, pour générer des radicaux hydroxyles hautement réactifs (réaction de Fenton). Dans des conditions physiologiques, la transferrine possède une capacité de fixation importante en fer puisqu'elle est saturée avec ce métal de transition de sorte qu'il n'est pas possible de trouver du fer libre (à l'état actif) dans le sang de sujets en bonne santé. A ce titre, la transferrine est considérée comme un antioxydant important. En situations pathologiques, le fer peut toutefois être libéré de ses protéines de transport (ferritine, lactoferrine) sous l'action des ERO et se retrouver dans le sang sous forme libre capable d'initier des réactions radicalaires. Le dosage du fer, de la transferrine et de sa saturation donnera une indication sur l'état de stress oxydant du patient (**Haleng et al., 2007**).

Les polymorphonucléaires (PMNs) ou neutrophiles jouent un rôle important dans la défense de l'organisme puisqu'ils assurent la phagocytose et la destruction de microorganismes étrangers. La cytotoxicité de ces cellules s'expliquent par leur capacité à générer intracellulairement de grandes quantités d'ERO mais aussi à libérer à partir de leurs granules des enzymes protéolytiques (élastase, collagénase) et de la myéloperoxydase (MPO) (**Pincemail et al., 1999**). Des études récentes ont montré que la MPO serait un marqueur potentiel de l'athérosclérose. Les individus déficitaires en MPO présenteraient moins de maladies cardiovasculaires alors qu'une élévation des taux de MPO serait associée avec un risque plus élevé de maladie coronarienne (**Baldus et al., 2003**).

Actuellement de nouvelles recherches se sont orientées vers la recherche de nouvelles ressources de molécules antioxydantes d'origine animale, végétale, marine ou microbienne dont le règne végétal est prédominant.

Il est aujourd'hui largement reconnu que le monde végétal avec ses 350000 espèces répertoriées représente un réservoir unique de molécules aux vertus thérapeutique. Les plantes forment une source inépuisable de substances biochimiques qui procurent des propriétés curatives appréciables et qu'aucune chimie ne peut nous offrir. Ainsi, plus de 252 médicaments considérés comme essentiels par l'OMS, 11% sont exclusivement produits à partir des plantes médicinales. Malgré le développement de la médecine moderne, les plantes médicinales trouvent encore leurs indications thérapeutiques dans le traitement d'une multitude d'affections. Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) en 2008, plus de 80% de la population mondiale dépend de la médecine traditionnelle pour leurs besoins en matière de soins et de santé primaires **(Eddouks et al., 2007; Boulanouar et al., 2013)**.

L'importance des plantes médicinales est focalisée sur sa richesse en métabolites secondaires qui ont fait l'objet de plusieurs recherches scientifiques dans le domaine pharmaceutique afin de déterminer leurs effets thérapeutiques, comme agents antimicrobiens, antidiabétiques, antihypertenseurs, antimitotiques, immuno-modulateurs, antioxydants....

Une autre source des métabolites secondaires est actuellement déviée au monde des produits marins notamment les algues marines.

La diversité d'espèces en algues et leur richesse en métabolites permet un vaste panel d'applications. Il est possible de valoriser la biomasse brute, ou bien de l'utiliser comme vecteur pour la production de molécules d'intérêt. Les composés d'intérêt essentiellement identifiés sont les lipides, les vitamines, les polysaccharides, les protéines, les pigments, les antioxydants et d'autres composants cellulaires. Ces produits issus des algues sont commercialisés pour les secteurs de la santé et la pharmaceutique (actif biologiques et thérapeutiques). Les alginates sont largement utilisés dans l'industrie pharmaceutique en raison de leur capacité de chélation et de leur capacité à former une solution très visqueuse. On les retrouve dans les pâtes pour empreintes dentaires, comme antiacides pour les brûlures d'estomac ou les reflux gastriques. Dans le secteur médical, ils interviennent au niveau du traitement des plaies dans les compresses hémostatiques, les pansements hydro-colloïdes pour brûlures. On les retrouve également dans la composition de foies artificiels **(Person, 2011)**. Les agars interviennent dans le domaine médical et

pharmaceutique pour produire des agents gonflants, des laxatifs, des suppositoires, des gélules, des comprimés et des anticoagulants. Ils sont également utilisés dans la fabrication des milieux de culture biologique, et en biologie moléculaire plus spécifiquement utilisés pour les méthodes de séparation. Les carraghénanes présentent plusieurs possibilités d'utilisation comme produits pharmaceutiques: anti tumoraux, antiviraux, anticoagulants (**Person, 2011**).

Il existe plusieurs classifications différentes, mais les algues peuvent être réparties dans sept embranchements (**tableau 01**)(**Cavalla, 2000**).

**Tableau 01:** Caractéristiques importantes des groupes d'algues (**Cavalla, 2000**).

Embranchement (Règne)	Nom commun	Nombre d'espèces	Représentants	Pigments	Réserves	Paroi	Habitat
<b>Chlorophytes</b> (Protistes)	Algues vertes	7500	Chlorella, Scenedesmus, Sptrogyra, Ulva	Chloro. a,b Xanthophylles Carotènes	Sucres, Amidon, fructane	Cellulose, Mannanes, protéines, CaCO <sub>3</sub>	Eau douce, saumâtre, salée et terrestre
<b>Charophytes</b> (Protistes)		250	Chara, Nitella	Chloro. a,b Xanthophylles Carotènes	amidon	Cellulose, CaCO <sub>3</sub>	Eau douce et saumâtre
<b>Euglenophytes</b> (Protistes)	Euglènes	700	Euglena, Phacus	Chloro. a,b Xanthophylles Carotènes	Paramylon, huiles, sucres	absente	Eau douce, saumâtre, salée et terrestre
<b>Chrysophytes</b> (Protistes)	Algues brun-jaune, vert-jaune et diatomées	6000	Dinobryon, Surirella	Chloro. a, C1, C2 Carotènes Fucoxanthine, xanthophylles	Chrysolaminarine, huiles	Cellulose, silice, CaCO <sub>3</sub>	Eau douce, saumâtre, salée et terrestre
<b>Phaeophytes</b> (Plantes)	Algues brunes	1500	Laminaria, Fucus	Chloro. a,b Xanthophylles Carotènes	Laminarine, mannitol, huiles	Cellulose, alginate, fucoidan	Eau salée et saumâtre
<b>Rhodophytes</b> (Plantes)	Algues rouges	3900	Gracilaria, Gelidium, Chondrus	Chloro. a Rarement d Xanthophylles Carotènes, Zéaxanthine, Phycocyanine C, phycérythrine	Amidon floridéen	Cellulose, Xylanes, Galactanes, CaCO <sub>3</sub>	Eau douce, Saumâtre et salée
<b>Pyrrhophytes</b> (Protistes)	Dinoflagellés, dinophytes	1100	Gymnodinium, Ceratum, Alexandrium	Chloro. a, C1, C2 Carotènes Fucoxanthine, Péridinine, dinoxanthine	Amidon, Glycanes, huiles	Cellulose ou absente	Eau douce, Saumâtre et salée

Les algues sont des végétaux appartenant au groupe des *thallophytes*. Elles sont donc dépourvues de racines, de tige, feuilles ou fleurs. L'ensemble du végétal porte le nom de thalle. A la différence des champignons, qui sont aussi des thallophytes, les algues possèdent des pigments chlorophylliens leur permettant d'effectuer la *photosynthèse*. Cette caractéristique explique leur abondance uniquement dans les couches superficielles de la mer. L'éclairement

diminuant avec la profondeur, les algues se raréfient dès 15-20 m (surtout les grandes espèces), pour disparaître à peu près complètement vers 40 m (**Splingart, 2013**).

Les algues sont des organismes chlorophylliens se développant dans l'eau ou dans des milieux très humides. Bien que surtout abondantes dans les eaux des mers, des lacs, des marées, des eaux courantes et des eaux thermales, on en trouve également sur les rochers humides et sur la terre. Exceptionnellement, elles peuvent être endophytes de tissus animaux ou végétaux. L'air, la lumière et des sels dissous sont, en plus de l'eau, nécessaires à leur développement (**Iltis, 2001**).

Groupées avec les champignons dans la division des Thallophytes, « les algues constituent en réalité un vaste ensemble hétérogène d'embranchements très distincts les uns des autres et n'ayant entre eux que peu de caractères communs ». La distinction entre ces différents embranchements d'algues est faite selon des caractères d'ordre cytologique et biochimique ainsi que des différences de structure et du mode de reproduction. En dehors de nombreuses formes unicellulaires, on trouve des algues pluricellulaires formant des thalles sans feuilles, ni tiges, ni racines, ni vaisseaux conducteurs (**Iltis, 2001**).

Les algues sont le premier maillon de la chaîne alimentaire. Elles sont des pompes à absorber le CO<sub>2</sub> et fournir de l'O<sub>2</sub> par photosynthèse. Elles constituent un lieu de vie pour de nombreux animaux sous-marins (invertébrés et vertébrés) (**Splingart, 2013**). Elles sont de quelques millimètres à plus de cinquante mètres de longueur. Leurs formes sont très variées, filamenteuses, vésiculeuses, ramifiées ou non, arbustives, foliacées, rubanées ou en cordon. La consistance est généralement souple, mais peut être dure comme de la pierre (algues calcaires) ou simplement ferme (**Splingart, 2013**).

Ce sont les pigments, chlorophylliens ou non, présents dans leurs tissus qui permettent de classer les algues en groupes;

**Les Chlorophytes ou algues vertes (*chlorophycées*):** avec plus de 6500 espèces, elles présentent une grande diversité de forme, depuis le type unicellulaire jusqu'au type en colonie ou filaments. Certaines espèces ont un crampon qui leur permet de se fixer. Elles sont le plus souvent présentes dans des aquariums où l'éclairage est excessif. Cependant, leur présence peut aussi être le signe d'un déséquilibre biologique à cause d'une montée de nitrates (NO<sub>3</sub>). Ceux-ci se forment après décomposition de la matière organique par les bactéries. Elles contiennent des chlorophylles A et B et d'autres pigments. Elles sont présentes dans les eaux douces et les eaux

salées. Si certaines atteignent un mètre de long, d'autres sont microscopiques (**figure 04**)(Cavalla, 2000).



**Figure 04:** Algue verte (Splingart, 2013)

**Algues bleues (cyanophycées):** Ce ne sont pas des algues, mais des bactéries (elles ne possèdent pas de véritable noyau). On en dénombre environ 15000 espèces mais leur durée de vie n'est que de quelques semaines (Géraldine et al., 2009). Au fait, leur nom vient d'un pigment bleu qu'elles possèdent. Lorsque les conditions leur sont favorables (eau riche en minéraux, surtout le phosphore) elles se développent massivement. Malgré leur taille microscopique, elles forment alors de véritables colonies qui colorent l'eau. Suivant l'espèce, la couleur peut être verte ou rouge (Cavalla, 2000).

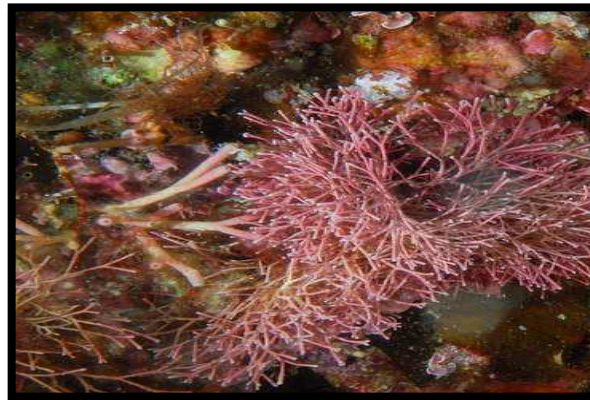
Certaines algues bleues produisent des toxines qui peuvent provoquer plusieurs types de maux au niveau de la peau, des voies respiratoires et digestives. Il faut donc éviter tout contact avec cette eau (**figure 05**) (Cavalla, 2000).



**Figure 05:** Algue bleu (Géraldine et al., 2009)

**Algues rouges (rhodophycées):** sont des algues annuelles de 3500 espèces, dont les plus consommées sont les algues dulse, nori ou carraghénanes (Géraldine et al., 2009). Elles se développent souvent le long des tiges et des feuilles des plantes. Elles ne contiennent que de la

chlorophylle et d'autres pigments. Elles sont principalement marines et pour la plupart pluricellulaires (**figure 06**) (Cavalla, 2000).



**Figure 06:** Algue rouge (Splingart, 2013)

**Algues brunes (*phéophycées*):** sont des algues annuelles dont on dénombre 1500 espèces. Ce sont des algues qui peuvent atteindre 50 mètres de long et dont les plus connues sont les algues wakamé, kombu, aramé ou spaghetti de mer (Géraldine et al., 2009). Ces algues ont une couleur brune due à un pigment. Elles contiennent des chlorophylles A, B et autres pigments. La plupart sont marines et elles atteignent parfois des tailles impressionnantes (plusieurs mètres) (**figure 07**) (Cavalla, 2000).



**Figure 07:** Algue brune (Bengueda-Rahal, 2011)

Les algues se composent généralement de protéines, d'une faible quantité de lipides comparée au fort pourcentage de glucides, qui sont essentiellement sous forme de polysaccharides tels que les alginates, les carraghénanes et les ulvanes. Les algues contiennent de fortes teneurs en minéraux: Potassium, Chlore, Sodium, Calcium, Magnésium, Soufre,

Phosphore, Iode, Fer, Cuivre, Manganèse et de nombreux autres oligo-éléments. Elles contiennent aussi des vitamines (A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C, D<sub>3</sub>, E, K); ainsi que des phytohormones et des pigments (**Hervé-Balusson, 2012**).

Les algues sont consommées depuis au moins le XVII<sup>e</sup> siècle, et surtout dans certains pays d'Asie comme le Japon. Mais avec l'arrivée de l'industrialisation, certaines algues (carrageen et laminaires) sont aujourd'hui très exploitées pour en extraire des substances qu'elles seules renferment. Ces substances possèdent un pouvoir gélifiant, épaississant ou stabilisateur. Elles sont énormément utilisées par l'industrie agroalimentaire et elles rentrent dans la composition des glaces, confitures, yaourts, bonbons, gâteaux, nourritures pour bébés et animaux. Mais leurs multiples propriétés les voient utilisées aussi bien dans d'autres domaines et pour d'autres objectifs: couches des bébés, appareils dentaires, vernis, colles, dentifrices... Et chaque année, de nouvelles découvertes apparaissent pour de nouveaux usages. D'autres algues sont aussi utilisées en médecine, cosmétique, thalassothérapie et bien sûr en agriculture. Les goémons (en fait les fucus et l'ascophylle) sont depuis toujours utilisés comme engrais sur les côtes bretonnes. Le maërl, une algue rouge calcifiée, était également utilisé pour l'amendement des sols (pour réduire l'acidité des terres agricoles). Pour protéger la ressource en forte régression, sa récolte est aujourd'hui interdite. Autrefois, on récoltait le fucus vésiculeux dont on extrayait la soude; celle-ci était utilisée pour la fabrication du verre (**Cavalla, 2000**).



*Ulva linza* est une espèce d'algues vertes de la famille des Ulvaceae (précédemment *Enteromorpha linza*). Selon certains auteurs, le genre *Enteromorpha* est non valide et a été intégré au genre *Ulva*. Le terme « enteromorpha » signifie en grec ancien : « en forme d'intestin » (**Julien, 2007**). La taxonomie de cette espèce est comme suit ;

S. Règne: Thallophytes

Phylum: Chlorophytes

Classe : Chlorophycées

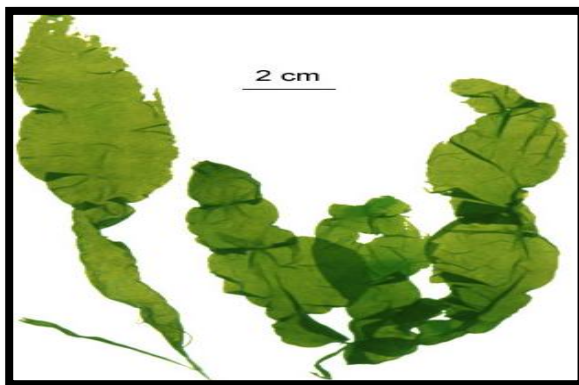
S. classe: Ulothricophycées

Ordre : Ulothricales

Famille: Ulothricacées (ulvacées)

Genre espèce: *Ulva linza*. L

Reclassés parmi les Ulves, les entéromorphes sont des algues annuelles très communes qui se développent généralement en quantité très importantes, sur les rochers, et dans les cuvettes au niveau des étages médio- et infra -littoral. Leurs frondes de couleur vert pâle à vert foncé peuvent atteindre de 25 à 30 cm ou plus selon les espèces. Elles sont formées par un tube aplati plus ou moins ramifié alternant des segments gonflés et des étranglements. Elles sont fixées au substrat par un simili stipe étroit (**figure 08**)(**Julien, 2007**).



**Figure 08:** *Ulva linza*(**Benguedda-Rahal, 2011**).

Ce sont des algues à structure palissadique, ayant la forme d'un tube dont le diamètre est assez constant chez un même individu, mais variable selon les espèces. Ce tube peut parfois être aplati, ou ramifié alternant des segments gonflés et des étranglements. La paroi du tube est formée d'une couche unique de cellules. Chaque cellule végétative possède un seul noyau et un seul chloroplaste (**Julien, 2007**).

Les enteromorphes supportent très bien un ensoleillement important, ce qui peut entraîner une dessiccation temporaire lorsqu'elles sont présentes dans des zones découvertes par la marée. Espèces cosmopolites, supportant assez bien une faible salinité, elles sont communes dans les baies saumâtres (**Benguedda-Rahal, 2011**).

Les enteromorphes jouent un rôle primordial dans le milieu, car elles constituent le premier maillon de la chaîne alimentaire qui conditionne l'équilibre biologique (**Gayral, 1975**). D'après **Goyer, (1998)** l'enteromorphe est une algue annuelle que l'on rencontre toute l'année avec un maximum au printemps, et présente une caractéristique remarquable qui est sa résistance au dessèchement. Enfin, les enteromorphes se trouvent dans toutes les latitudes et dans toutes les mers du globe, elles sont particulièrement tolérantes, s'adaptent à une grande variété de conditions écologiques (**Augier in BELHADJ, 2008**). L'enteromorphe présente une utilisation potentielle en médecine en raison de la présence des vitamines A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> et des substances antimicrobiennes (**Benguedda-Rahal, 2011**). Le **tableau 02** résume la composition biochimique d'*Ulva linza*.

**Tableau02:** composition chimique et biochimique d'*Ulva linza* (**Biotecmar, 2011**):

<b>vitamines</b>	<b>A (UI)</b>	<b>B1 (ppm)</b>	<b>B2 (ppm)</b>	<b>Niacine (ppm)</b>	<b>C (ppm)</b>	
	<i>13000</i>	<i>6.0</i>	<i>20.5</i>	<i>65</i>	<i>432</i>	
<b>Glucides (%)</b>	<i>64.9</i>					
<b>Lipides(%)</b>	<i>0.3</i>					
<b>Protéines (%)</b>	<i>19.5</i>					
<b>Oligo-éléments</b>	<b>Ca (PS%)</b>	<b>P (P%)</b>	<b>Fe (ppm)</b>	<b>Na (%)</b>	<b>K (%)</b>	<b>Cendres (PS%)</b>
	<i>0.91</i>	<i>0.80</i>	<i>350</i>	<i>0.57</i>	<i>3.50</i>	<i>15.2</i>

*Ulva linza* a été récemment étudiée; les études de **Ganesan et al., (2011)** et celle de **Narasimhan et al., (2013)** ont montré que l'extrait aqueux, acétate d'éthyle, acétone, méthanol et propanol de cette algue présente un effet antioxydant avec toutefois différents niveaux d'intensité. Chaque solvant extrait différentes familles de molécules. Ensuite, l'étude de **Farid et al., (2009)** a montré que l'extrait dichlorométhane-méthanol d'*Ulva linza* présente une activité antibactérienne avec un diamètre d'inhibition supérieur à 10 mm.

Au laboratoire, antibiotiques, antifongiques: physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique(LAPSAB), l'objectif principal de notre étude est basé sur l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante d'*Ulva linza*.

Pour ce faire, nous envisageons de réaliser la partie expérimentale comme suit;

- Une préparation des extraits organiques à partir de l'algue verte *Ulva linza*;
- Une analyse phytochimique des extraits préparés: extrait méthanol, n-butanol, eau-méthanol et acétate d'éthyle;
- Dosage de polyphénols et de flavonoïdes totaux;
- Une étude de l'activité antioxydante des extraits de cette plante par la méthode de piégeage du radical libre DPPH•.

# *Matériel et méthodes*

## 1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé au cours de cette étude est une algue verte: *Ulva linza*, récoltée en mois de Novembre 2014 sur les rochers de la côte de la région de Ghazaouet, wilaya de Tlemcen. Au laboratoire, le matériel végétal est lavé puis séché à l'abri de la lumière pendant quelques mois. Après séchage, l'algue verte est conservée au laboratoire jusqu'au jour de l'extraction (**Figure 09**).



**Figure 09:** Les thalles d'*Ulva linza*

(Photo prise au laboratoire)

## 2. Préparation des extraits à partir d'*Ulva linza*

*Ulva linza* a servi à la préparation de différents extraits organiques par différentes méthodes d'extraction, la **figure 10** résume le protocole d'extraction.

### 2.1 Extrait méthanolique EM1 et butanolique n-B1

La préparation de ces extraits a été réalisée comme suit :

- 10g du matériel végétal est mise en macération (température ambiante) dans 350 ml de méthanol pendant 3 jours. Dont l'extraction a été réalisée trois fois, les solvants récupérés sont mélangés en une seule solution.
- Filtration de la solution obtenue,
- Évaporation à sec du filtrat,

Après évaporation à sec du filtrat ; nous avons procédé à le solubiliser dans l'hexane et l'eau chaude pour effectuer une extraction liquide-liquide par l'hexane (V/V).

La phase hexanique récupérée est extraite par le méthanol (V/V), dont l'évaporation à sec de la phase organique permet de récupérer l'extrait méthanolique 1 (EM1).

La phase aqueuse récupérée est extraite par l'en-butanol (V/V). L'évaporation à sec de la phase organique a permis de récupérer dans le ballon d'évaporation l'extrait butanolique (n-B1).

## 2.2 Extrait méthanolique EM2

Un autre extrait méthanolique a été préparé par macération à température ambiante dont nous avons prolongé le temps d'extraction. La préparation de cet extrait a été réalisée comme suit :

- 10g du matériel végétal est mise en macération dans 350 ml de méthanol pendant 2 semaines;
- Filtration de la solution obtenue,
- Evaporation à sec du filtrat,
- Récupération de l'extrait méthanolique (EM2).

## 2.3 Extrait acétate d'éthyle (EAC) et n-butanol 2 (n-B1)

La préparation de ces extraits a été réalisée comme suit :

- 10g d'algue est mise en macération dans 350 ml du mélange chloroforme- méthanol (V-2V) pendant 24 heures;
- Filtration de la solution obtenue,
- concentration du filtrat,

La solution récupérée est utilisée pour une extraction liquide-liquide par ;

- L'eau distillée (V/V) pour séparer le chloroforme du méthanol ;

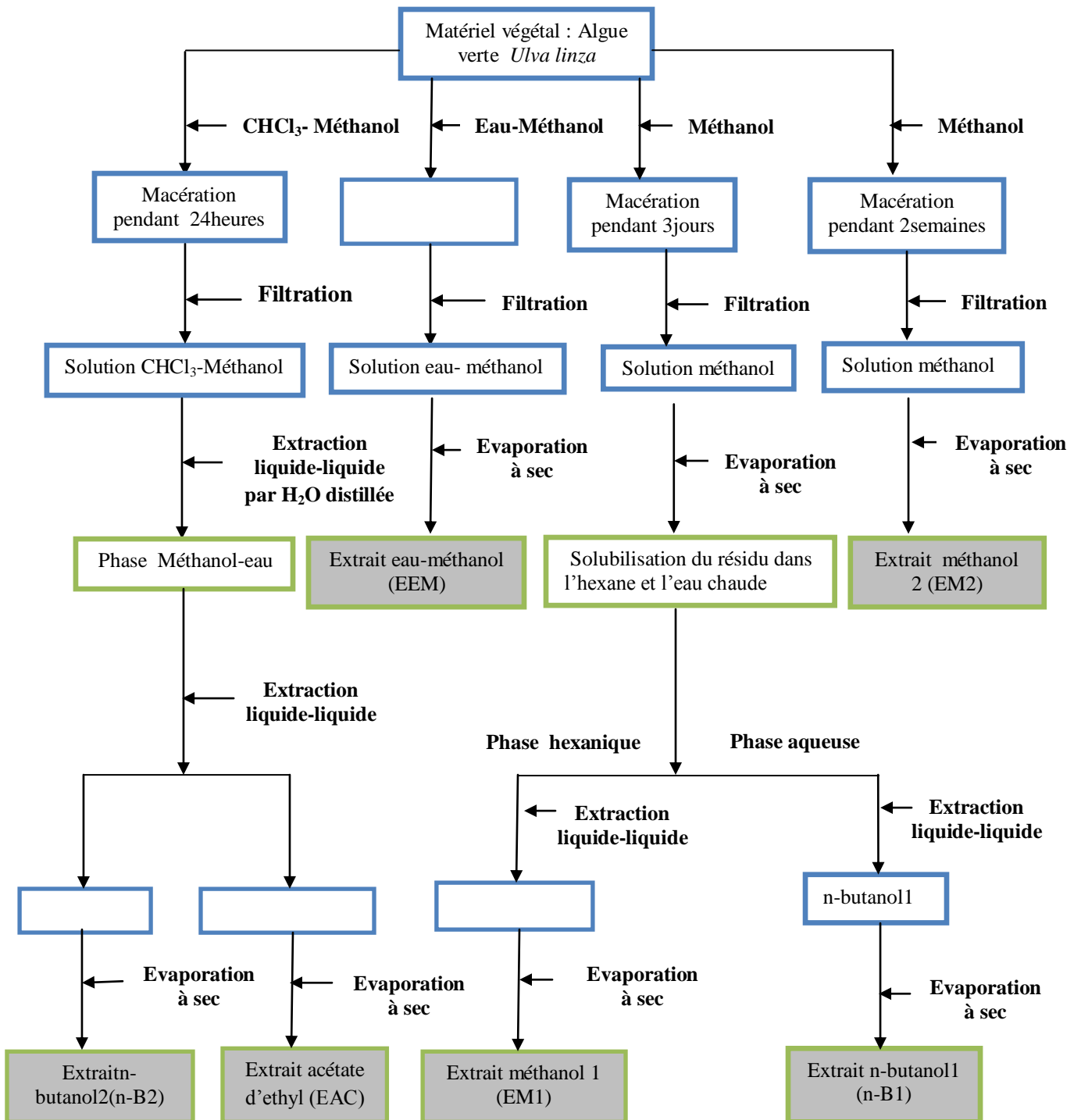
Après récupération séparément des deux phases organiques ; on procède à une évaporation à sec de la phase chloroformique, et une concentration de la phase méthanol-eau. La phase aqueuse récupérée est utilisée pour une extraction liquide-liquide par;

- Acétate d'éthyle (V/2V), l'évaporation de la phase organique génère l'extrait acétate d'éthyle (EAC).
- n-butanol (V/2V) dont l'évaporation à sec de la phase organique libère l'extrait butanolique (n-B2) récupéré dans le ballon d'évaporation.

## **2.4 Extrait eau-méthanol**

Un troisième extrait méthanolique a été préparé à partir de cette algue, dont l'extrait a été préparé par décoction selon le protocole suivant:

- 10g du matériel végétal est mise en décoction sous reflux dans 200 ml du mélange eau-méthanol (V-2V) pendant 1 heure à ébullition;
- Filtration de la solution obtenue,
- Evaporation à sec du filtrat,
- Récupération de l'extrait eau-méthanol (EEM).



**Figure 10:** Schéma explicatif de la préparation de différents extraits organiques à partir d'algue verte, *Ulva linza*.



### 3. Tests phytochimiques

Dans le but de vérifier quelques composés chimiques dans les extraits préparés, une analyse phytochimique a été réalisée en utilisant des réactifs spécifiques (**Karumi et al., 2004; Benariba et al., 2013**).

#### ❖ Tanins

2ml d'extrait plus 2 à 3 gouttes de  $\text{FeCl}_3$  (1%), sont incubés pendant 15 min à 50°C, leur présence est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu-noir.

#### ❖ Flavonoïdes

1ml d'extrait est mélangé à 1 ml d'acide chlorhydrique concentré plus quelques copeaux de Magnésium. L'apparition d'une coloration rouge, orange ou rose indique la présence des flavonoïdes.

#### ❖ Quinones libres

5ml d'extrait plus quelques gouttes de NaOH (1%) développent une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet, révèle la présence des quinones libres.

#### ❖ Coumarines

5 ml de l'extrait est évaporé à sec. Le résidu est dissout dans l'eau chaude (2 ml), ensuite le mélange est partagé dans deux parties égales. La première représente un témoin ; la deuxième est traitée avec 0,5 ml  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 10 %. Une goutte de chaque tube est prélevée puis déposée sur un papier filtre et l'observation sous U.V. (366 nm) d'une fluorescence intense révèle la présence de coumarines.

#### ❖ Anthraquinones

Ajoutez 5 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (10%) à 10 ml d'extrait après agitation, leur présence est indiquée par une coloration violette.

#### ❖ Alcaloïdes

5 ml d'acide chlorhydrique à 1% plus 1 ml de chaque extrait, le mélange est chauffé au bain marie puis on divise chaque extrait en deux volumes égaux. Un volume est traité par 5 gouttes de réactif de Mayer, l'autre par 5 gouttes de réactif de Wagner. La formation d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes.

### ❖ **Terpénoïdes**

Deux méthodes ont été utilisées pour détecter la présence des terpénoïdes:

✓ **Test de Libermann-Burchard** : A 5 ml d'extrait on ajoute 2 gouttes d'anhydride acétique et 1 goutte d'acide sulfurique. L'apparition d'une couleur mauve ou violette indique un test positif.

✓ 5 ml d'extrait est ajouté à 2 ml de Chloroforme et 3ml d'acide sulfurique concentré. La formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase indique la présence de terpénoïdes.

### ❖ **Saponosides: Test de mousse**

Dans un tube à essai, 10 ml de l'extrait aqueux est agité énergiquement pendant 15 secondes puis laissé au repos pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides.

### ❖ **Composés réducteurs**

On ajoute 1 ml de l'extrait à 2 ml de solution Fehling, puis les tubes sont incubés au bain marie pendant 20 minutes. Un test positif est indiqué par l'apparition d'une couleur rouge brique.

## **4. Dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux**

### **4.1 Préparation des extraits**

Pour avoir des résultats détectables (mesurables) par la courbe étalon, les extraits ont été préparés à différentes concentrations.

- Les extraits: méthanol 2 (EM2) et n-butanol 1(n-B1) sont solubilisés dans l'eau distillée à une concentration de 40 mg/ml.
- L'extrait méthanol 1(EM1) est dissout dans du méthanol à une concentration de 27,7 mg/ml.
- Les extraits: n-butanol 2 (n-B2) et méthanol-eau (EEM) sont solubilisés dans l'eau distillée à une concentration de 20 mg/ml.
- L'extrait acétate d'éthyle (EAC) est dissout dans du méthanol à une concentration de 50 mg/ml.

## 4.2 Dosage de polyphénols totaux

**Principe :** Ce dosage repose sur la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés dont l'absorbance est comprise entre 725 et 760 nm.

**Mode opératoire résumé dans le tableau 03 (Benariba et al. 2013).**

- 0,1ml d'échantillon de chaque extrait sont mélangés avec 2ml d'une solution de carbonate de sodium à 2% ;
- Agitation des tubes ;
- 1<sup>ère</sup> incubation pendant 5 minutes à température ambiante ;
- Ajouter 100  $\mu$ l du réactif Folin Ciocalteu à 0,2 N ;
- 2<sup>ème</sup> incubation pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière;
- Mesure de l'absorbance (DO) à 700 nm contre le tube blanc (**tableau 03**).

Une gamme étalon a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations finales (2,27 / 4,54 / 9,1 / 13,63 / 18,18 / 22,72 / 27,27 / 31,81 / 36,36 / 40,90 / 45,45  $\mu$ g/ml).

**Tableau 03** : Dosage de polyphénols totaux dans les extraits d'*Ulva linza*.

Concentration de l'acide gallique (µg/ml)	50	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000						
Volume de l'acide gallique (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1						
Les extraits (ml)	Méthanol 2 (EM2)											0,1					
	Méthanol 1 (EM1)												0,1				
	Eau-méthanol (EEM)													0,1			
	Acétate d'éthyle (EAC)														0,1		
	n-butanol 1 (n-B1)															0,1	
	n-butanol 2 (n-B2)																0,1
Blanc																	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<b>1<sup>ère</sup> Incubation pendant 5 min à température ambiante</b>																	
Folin Ciocalteu (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>2<sup>ème</sup> Incubation pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité</b>																	
<b>Mesure de DO à 700 nm</b>																	

Les résultats obtenu exprimés en µg Eq acide gallique/ mg d'extrait sont calculés selon la formule suivante :

$$[\text{Polyphénols}] = a \cdot f / C$$

- ⊕ a : concentration des polyphénols (µg/ml) déterminée à partir de la courbe étalon.
- ⊕ f : facteur de dilution (×22).
- ⊕ C : concentration de l'extrait.

### 4.3 Dosage des flavonoïdes totaux

Les flavonoïdes sont quantifiés par une méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) et la soude ( $\text{NaOH}$ ). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm.

#### Mode opératoire résumé dans le tableau 04 (Benariba et *al.* 2013).

- 500  $\mu\text{l}$  de chaque extrait (ou de catéchine) est mélangé avec 2 ml d'eau distillée ;
- Ajoutez 150  $\mu\text{l}$  d'une solution de nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) à 15 %.
- 1<sup>ère</sup> incubation pendant 6 minutes à température ambiante ;
- Ajouter 150  $\mu\text{l}$  de chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$ ) à 10 % ;
- 2<sup>ème</sup> incubation pendant 6 minutes à température ambiante ;
- Ajoutez 2 ml d'hydroxyde de sodium ( $\text{NaOH}$ ) à 4 % ;
- Le volume total est complété à 5 ml avec de l'eau distillée ;
- Agitez et incubez pendant 15 minutes ;
- Mesure de l'absorbance à 510 nm contre le blanc ;

Une gamme étalon a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine à différentes concentrations finales (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

**Tableau 04:** Dosage de flavonoïdes totaux dans les extraits d'*Ulva linza*

Concentration de catéchine (µg/ml)		50	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000							
Volume de la catéchine (ml)		0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5							
Les extraits (ml)	Méthanol 2 (EM2)												0,5						
	Méthanol 1 (EM1)													0,5					
	Eau-méthanol (EEM)														0,5				
	Acétate d'éthyle (EAC)															0,5			
	n-butanol 1 (n-B1)																0,5		
	n-butanol 2 (n-B2)																	0,5	
Blanc avec Eau-distillé																			0,5
Eau-distillé		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
NaNO <sub>2</sub> (ml)		0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
<b>1<sup>ère</sup> Incubation pendant 6 min à température ambiante</b>																			
AlCl <sub>3</sub> (ml)		0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
<b>2<sup>ème</sup> Incubation pendant 6 min d'incubation à température ambiante</b>																			
NaOH (ml)		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<b>Compléter le volume à 5 ml et 3<sup>ème</sup> incubation pendant 15 min à température ambiante</b>																			
<b>Mesure de l'absorbance à 510 nm</b>																			

Les résultats obtenus exprimés en µg Eq de catéchine/ mg d'extrait sont calculés selon la formule suivante :

$$[\text{Flavonoïdes}] = a \cdot f / C$$

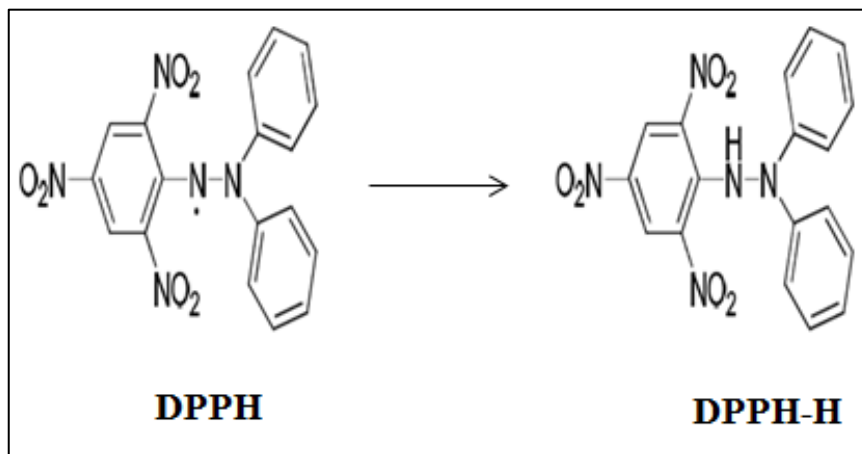
- ⊕ a : concentration des flavonoïdes (µg/ml) déterminée à partir de la courbe étalon.
- ⊕ f : facteur de dilution (×10).
- ⊕ c : concentration de l'extrait.

## 5. Le pouvoir antioxydant des extraits d'*Ulva linza*

### 5.1 Principe de la méthode DPPH

Le DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable qui absorbe à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires, le DPPH de couleur violette se réduit en 2,2 Diphényl-1-picryl hydrazine de couleur jaune (**figure 11**)(Maataoui *et al.*, 2006).

L'absorbance mesurée à 517 nm serve à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (Parejo *et al.*, 2002).



**Figure 11:** Forme libre et réduite du DPPH.

### 5.2 Mode opératoire (tableau 05)

L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par **Benariba *et al.* (2013)**.

- Préparation du DPPH à la concentration de 0,025 mg /ml dans du méthanol,
- Préparation des extraits dans l'eau distillée à différentes concentrations (2, 4, 8, 10, 12, 15, 20, 30, 40 mg/ml);
- A 1950 µl de la solution du DPPH on ajoute 50 µl pour chaque extrait à différentes concentrations;
- Préparation du tube blanc pour chaque concentration : 1950 µl du méthanol et 50 µl de chaque extrait correspondant;
- Préparation du tube control négatif : 50µl du méthanol avec 1950 µl de la solution du DPPH,
- Le tube blanc renferme 2 ml du méthanol,

- Incubation 30 min à température ambiante et à l'obscurité,
- Mesure de l'absorbance à 517 nm.

L'acide ascorbique utilisé comme contrôle positif est testé selon le même mode opératoire à différentes concentrations. Les tests sont réalisés en triplicata.

**Tableau 05:** Mode opératoire pour mesurer l'activité antiradicalaire des extraits d'*Ulva linza* par la méthode du DPPH.

<b>Concentration de l'acide ascorbique (mg/ml)</b>		0,25	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4						
<b>Volume de l'acide ascorbique (ml)</b>		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05						
<b>Les extraits (ml) à différentes [C] (0,05 ; 0,1 ; 0,2; 0,25 ; 0,3 ; 0,375 ; 0,5 ; 0,675 ; 0,75 ; 1 ) mg/ml</b>	<b>Méthanol 2 (EM2)</b>										0,05					
	<b>Eau-méthanol (EEM)</b>											0,05				
	<b>Méthanol 1 (EM1)</b>												0,05			
	<b>Acétate d'éthyle (EAC)</b>													0,05		
	<b>n-butanol 1 (n-B1)</b>														0,05	
	<b>n-butanol 2(n-B2)</b>															0,05
<b>Control négatif MeOH (ml)</b>																0,05
<b>Volume de DPPH (ml)</b>		1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95
<b>Incubation pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité</b>																
<b>Mesure de l'absorbance à 517 nm</b>																



## 5.3 Expression des résultats

### 5.3.1 Pourcentage de réduction du DPPH

Les résultats ont été exprimés en tenant compte de la moyenne de trois mesures obtenues pour chaque extrait, dont le pourcentage de réduction du DPPH est calculé selon la formule suivante:

$$\frac{(\text{Do contr}) - (\text{Do éch})}{(\text{Do contr})} * 100$$

**DPPH (%)** : Pourcentage de réduction du DPPH.

**DO contr**: Densité optique du tube contrôle négatif.

**DO éch** : Densité optique de l'échantillon.

### 5.3.2 Détermination IC50

La valeur IC50 est la concentration qui assure la réduction de 50% du DPPH, déterminée graphiquement pour chaque extrait à partir de la courbe du pourcentage de réduction en fonction de la concentration (Samarth et al., 2008).

## *Résultats et interprétation*

### 1. Les rendements des extraits d'*Ulva linza*

Après extraction et récupération des extraits, leur rendement a été déterminé par rapport à 100 g de matière végétale sèche exprimé en pourcentage.

Les résultats obtenus (**tableau 06**) montrent que le rendement le plus élevé est celui de l'extrait méthanolique 2 (21,14%), suivi par l'extrait eau-méthanol (19,64 %) et celui de l'extrait n-butanol 1 (19%). Cependant le rendement d'extrait acétate d'éthyle est le plus faible (1%). La majorité des extraits récupérés sous forme d'une pâte hygroscopique, sont solubles dans l'eau à l'exception de l'extrait acétate d'éthyle et méthanol 1 (EM1) qui sont totalement solubles dans le méthanol.

**Tableau 06:** Rendements et caractéristiques des extraits d'*Ulva linza*.

Caractéristiques	Masse (g)	Aspect	Couleur	Rendement %	solubilité
<b>Extrait méthanol 2 (EM 2)</b>	4,29	Pâte hygroscopique	Vert foncé	21,14	Eau-distillée
<b>Extrait méthanol 1 (EM1)</b>	0,28	Pâte hygroscopique	Vert foncé	2,27	méthanol
<b>Extrait eau-méthanol (EEM)</b>	1,96	Pâte hygroscopique	Vert foncé	19,64	Eau-distillée
<b>Extrait acétate d'éthyle (EAC)</b>	0,10	Pâte Hygroscopique	Vert clair	1	méthanol
<b>Extrait n-butanol 1 (n-B 1)</b>	1,90	Pâte Hygroscopique	Marron clair	19	Eau-distillée
<b>Extrait n-butanol 2 (n-B 2)</b>	0,11	Pâte Hygroscopique	Vert clair	1,07	Eau-distillée

## 2. Tests phytochimiques

Les résultats du screening phytochimique réalisé dans les différents extraits d'*Ulva linza* sont représentés dans le **tableau 07**

**Tableau 07:** Screening phytochimique des extraits d'*Ulva linza*.

		Extrait méthanol 2 (EM2)	Extrait méthanol 1 (EM1)	Extrait eau méthanol (EEM)	Extrait acétate d'éthyle (EAC)	Extrait n-butanol 1 (n-B1)	Extrait n-butanol 2 (n-B2)
<b>Flavonoïdes</b>		-	-	-	-	-	-
<b>Tanins</b>		-	-	-	-	-	-
<b>Quinones libres</b>		-	-	-	-	-	-
<b>Alcaloïdes</b>	Mayer	-	-	-	-	-	-
	Wagner	+	-	+	-	-	-
<b>Saponosides</b>	Test de mousse	-	-	+	-	-	-
<b>Terpenoïdes</b>	Liebermann	+	-	-	-	-	-
	Chloroforme	-	-	-	-	-	-
<b>Coumarines</b>		-	-	-	-	-	-
<b>Anthraquinones</b>		-	-	-	-	-	-
<b>Sucres réducteurs</b>		++	++	-	-	++	-

(+++): Test fortement positif.

(+): Test faiblement positif.

(++): Test positif.

(-): Test négatif.

Selon les résultats mentionnés dans ce tableau, on remarque l'absence de flavonoïdes, tanins, quinones libres, anthraquinones et coumarines dans l'ensemble des extraits.

Les alcaloïdes sont présents seulement dans les extraits méthanol 2 et eau-méthanol. De même, les saponosides sont présents seulement dans l'extrait eau-méthanol. Le test de mousse confirme leur présence dans cet extrait. Les sucres réducteurs sont présents dans les extraits méthanol 2, méthanol 1 et n-butanol 1.

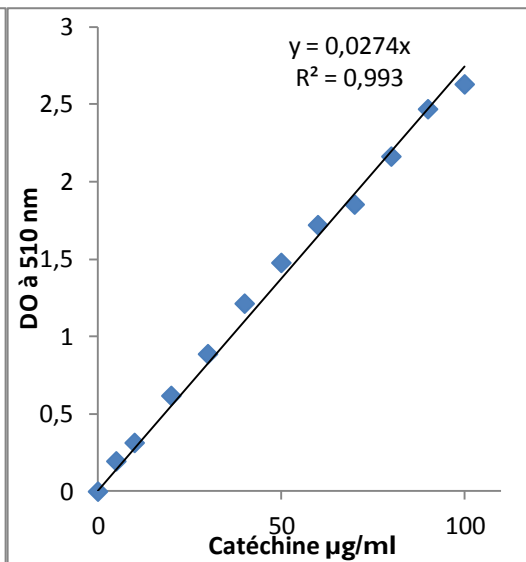
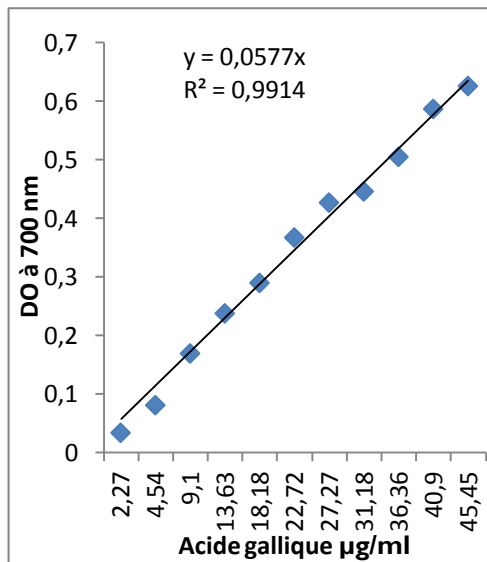
### 3. Dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux

Le dosage de polyphénols et de flavonoïdes totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrique en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu et le trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ), respectivement.

Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 08**. Les courbes étalons de l'acide gallique et la catéchine sont représentées dans les **figures 12, 13** respectivement.

Selon les résultats du dosage de polyphénols, on remarque dans l'ensemble des extraits des teneurs relativement faibles. Les extraits méthanol 1, eau-méthanol et n-butanol 2 renferment les taux les plus élevés en polyphénols et flavonoïdes 22,52; 38,84; 21,79  $\mu\text{g.Eq}$  acide gallique par mg d'extrait et 16,67; 23,83; 8,56  $\mu\text{g.Eq}$  catéchine/ mg d'extrait. Les extraits n-butanol 1, méthanol 2 et acétate d'éthyle présentent des taux relativement proches en polyphénols 4,99; 7,36 et 12,38  $\mu\text{g.Eq}$  acide gallique par mg d'extrait ainsi qu'en flavonoïdes 1,35 ; 5,58 et 1,59  $\mu\text{g.Eq}$  catéchine/ mg d'extrait.

En fonction de ces résultats on constate que les extraits organiques sont moyennement riches en polyphénols et en flavonoïdes totaux, ce qui révèle leur faible taux dans la plante étudiée *Ulva linza*.



**Figure 12:** Courbe étalon de l'acide gallique

**Figure 13:** Courbe étalon de la catéchine.

**Tableau 08** : Taux de polyphénols et de flavonoïdes totaux dans les extraits d'*Ulva linza*.

	<b>Polyphénols</b> ( $\mu\text{g.Eq}$ acide gallique/mg d'extrait)	<b>Flavonoïdes totaux</b> ( $\mu\text{g.Eq}$ catéchine/ mg d'extrait)
<b>Méthanol 1 (EM1)</b>	22,52	16,67
<b>Eau-méthanol (EEM)</b>	38,84	23,83
<b>n-butanol 2 (n-B2)</b>	21,79	8,56
<b>n-butanol 1 (n-B1)</b>	4,99	1,35
<b>Méthanol 2 (EM2)</b>	7,36	5,58
<b>Acétate d'éthyle (EAC)</b>	21,38	1,59

#### 4. Activité antiradicalaire des extraits d'*Ulva linza*

Les résultats de l'effet antiradicalaire de la vitamine C et des différents extraits d'*Ulva linza* sur le DPPH sont représentés dans les **tableaux 09 et 10**.

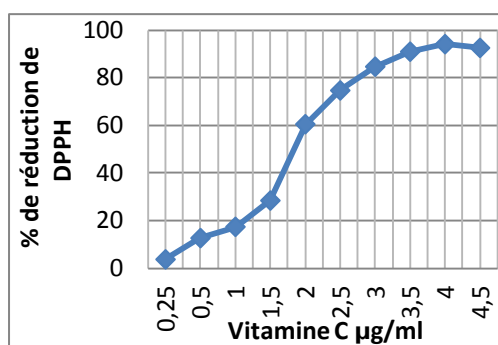
Selon les résultats obtenus on note une augmentation de l'activité antiradicalaire proportionnelle à l'augmentation de la concentration des extraits. A faible concentration 0,05 mg/ml, les extraits eau-méthanol et méthanol 1 présentent un faible pourcentage de réduction du DPPH 6,04% et 1,05%, respectivement. Par contre dans l'extrait n-butanol 1 et 2, acétate d'éthyle et méthanol 2 l'effet antiradicalaire est non déterminé.

Aux concentrations moyennement élevées, 0,3 et 0,375 mg/ml, les extraits eau-méthanol et méthanol 1 présentent des pourcentages de réduction du DPPH plus élevés qui varient entre 16,80; 19,46 et de 6,85; 10,09, respectivement.

Par contre, à forte concentration 0,75 et 1 mg/ml les extraits méthanol 2 et n-butanol 1 montrent un pourcentage qui augmente progressivement de 5,16 à 8,08 %. Dans ces concentrations, l'extrait eau-méthanol augmente son effet antiradicalaire à 50%. L'acide ascorbique (**tableau 09**) testé à faibles concentrations (0,25; 0,05 ; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5 mg/ml) assure une réduction du DPPH qui atteint 92,63%.

**Tableau 09:** Pourcentages de réduction du DPPH par la vitamine C

<b>Concentrations de la vitamine C (mg/ml)</b>	0,25	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5
<b>% de réduction du DPPH</b>	3,68	12,63	17,36	28,42	60,52	74,73	84,73	91,05	94,21	92,63



**Figure 14:** réduction du DPPH par l'acide ascorbique

**Tableau 10:** Pourcentages de réduction du DPPH par les extraits d'*Ulva linza*

	Concentrations (mg/ml)									
	0,05	0,1	0,2	0,25	0,3	0,375	0,5	0,675	0,75	1
<b>Méthanol 2 (EM2)</b>	- 0,18	- 0,43	- 4,36	3,73	- 0,40	4,68	1,41	-	5,16	7,06
<b>Méthanol 1(EM1)</b>	1,05	1	1,31	3,81	6,85	10,09	11,05	12,92	-	-
<b>n-butanol 1(n-B1)</b>	- 3,70	- 11,81	- 2,89	- 9,65	- 14,0	- 0,59	- 10,66	-	6,92	8,08
<b>Eau-méthanol (EEM)</b>	6,04	6,52	16,25	16,71	16,8	19,46	21,96	-	39,78	50,67
<b>n-butanol 2 (n-B2)</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Acétate d'éthyle (EAC)</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : Non déterminée

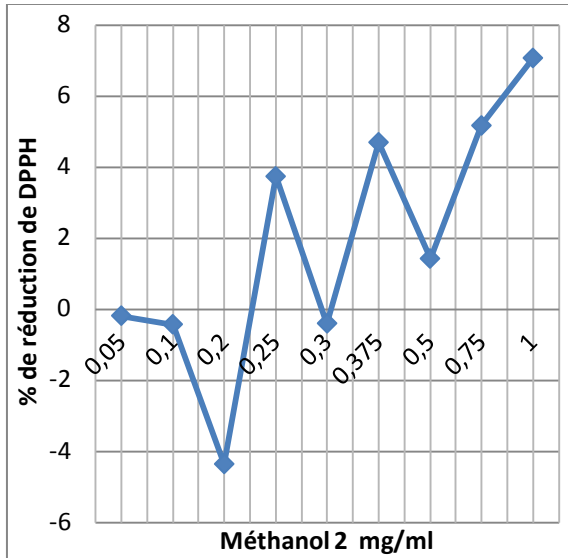


Figure 16: Pourcentage de réduction du DPPH par l'extrait méthanol 1 (EM1)

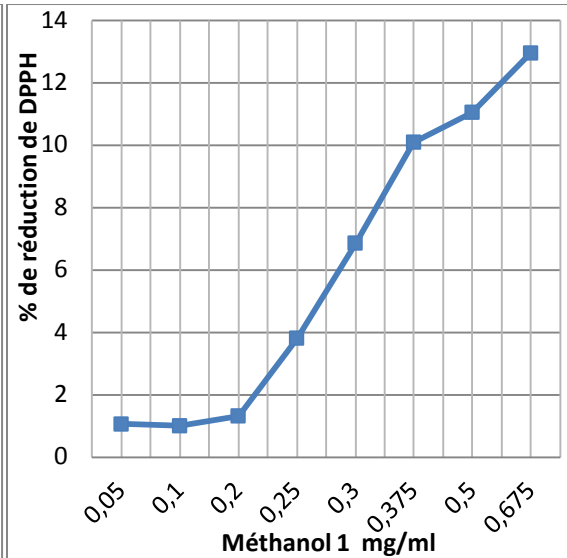


Figure 15: Pourcentage de réduction du DPPH par l'extrait méthanol 2

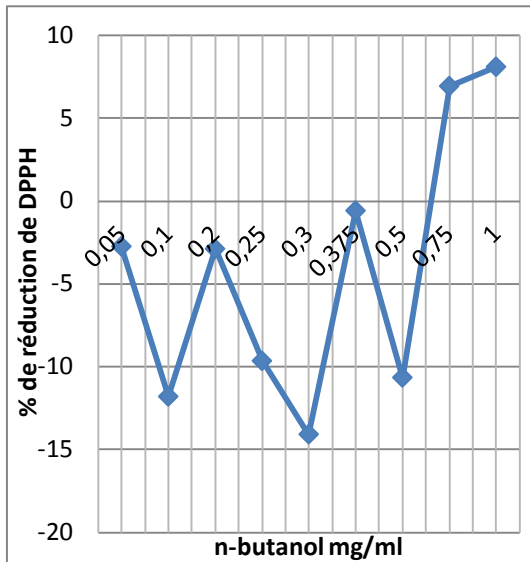


Figure 17: Pourcentage de réduction du DPPH par l'extrait n-butanol 1

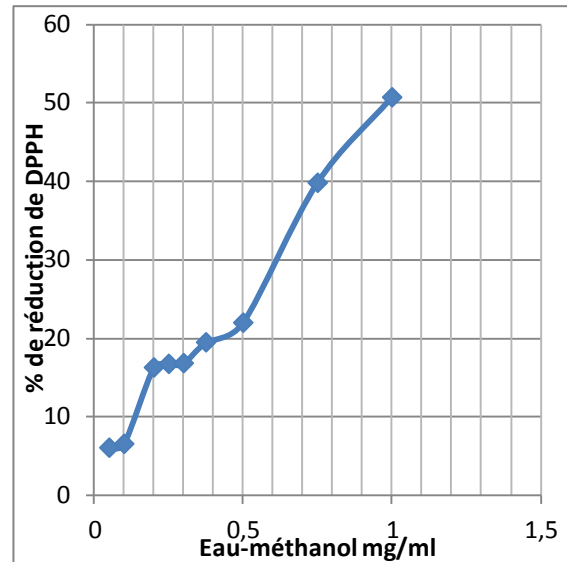


Figure 18 : Pourcentage de réduction du DPPH par l'extrait eau-méthanol



Les concentrations des extraits et de l'acide ascorbique qui inhibent 50% du DPPH (IC<sub>50</sub>) déterminées graphiquement (**figures 14, 15, 16, 17, 18**) sont mentionnées dans le **tableau 11**.

D'après les résultats obtenus on ne peut déterminer graphiquement l'IC<sub>50</sub> que pour l'extrait eau-méthanol, elle est de 0,9 mg/ml. L'acide ascorbique présente une faible IC<sub>50</sub>, 1,85 µg/ml.

A la lumière de ces résultats on constate que seul l'extrait eau-méthanol à forte dose (1mg/ml) présente un effet antiradicalaire sur le DPPH.

**Tableau 11:** IC<sub>50</sub> d'extrait eau-méthanol d'*Ulva linza* et de la vitamine C

	Vitamine C	Eau-méthanol (EEM)	Méthanol 1 (EM1)	Méthanol 2 (EM2)	n-butanol 1 (n-B1)	n-butanol 2 (n-B2)	Acétate d'éthyle (EAC)
<b>IC<sub>50</sub> (mg/ml)</b>	0,00185	0,9	-	-	-	-	-

- : non déterminée

# *Discussion*

L'objectif de cette étude est porté sur l'étude phytochimique de différents extraits d'*Ulva linza* : extrait méthanolique, eau-méthanol, butanolique et acétate d'éthyle, ainsi que l'évaluation de l'activité antiradicalaire de ces extraits sur le radical libre DPPH.

Au cours de notre étude, les résultats obtenus montrent que le rendement des extractions par des solvants polaires, notamment le méthanol, est plus important par rapport aux solvants moins polaires, acétate d'éthyle et n-butanol. Selon **Michel et al. (2012)**, le rendement des extractions par des solvants de polarité croissante dépend de la nature du solvant utilisé et des propriétés chimiques des molécules à extraire. De même, la méthode d'extraction (macération, décoction, infusion) joue également un rôle important dans la détermination du rendement ainsi que la composition chimique des extraits préparés.

Les extraits préparés à partir des thalles d'*Ulva linza* ont fait l'objet de quelques tests phytochimiques classiques, dans le but de vérifier la présence ou l'absence de certains composés chimiques. Les résultats obtenus ont révélé la présence des sucres réducteurs dans les extraits méthanol 1, méthanol 2 et n-butanol 1; ainsi que des alcaloïdes dans les extraits méthanol 2 et eau-méthanol. Aucun travail antérieur n'a été publié sur l'étude phytochimique de l'algue verte *Ulva linza*. En revanche, cette algue est riche en protéines 19,5% et en sucres 64,9%, qui sont essentiellement sous forme de polysaccharides tels que les alginates, les carraghénanes et les ulvanes. Les algues contiennent de fortes teneurs en minéraux: Potassium, Chlore, Sodium, Calcium, Magnésium, Soufre, Phosphore, Iode, Fer, Cuivre, Manganèse et de nombreux autres oligo-éléments. Elles contiennent aussi des vitamines (A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C, D<sub>3</sub>, E, K); ainsi que des phytohormones et des pigments (**Hervé-Balusson, 2012**).

Parallèlement aux tests phytochimiques nous avons procédé à une détermination du taux de polyphénols et de flavonoïdes totaux dans les extraits préparés.

Le dosage de polyphénols a été réalisé en utilisant le réactif folin –Ciocalteu. Malgré la sensibilité et la simplicité de cette méthode qui est largement utilisée, elle n'est pas spécifique des polyphénols. En effet, le réactif peut réagir avec des protéines, des sucres, l'acide ascorbique et des composés soufrés, ce qui peut influencer sur les résultats obtenus (**Singleton et Rossi, 1965**). En ce qui concerne notre étude, les résultats obtenus montrent que l'extrait eau-méthanol est le plus riche en composés polyphénoliques et en flavonoïdes avec un taux de 38,84 µg.Eq acide gallique par mg d'extrait et 23,83 µg.Eq catéchine/ mg d'extrait, suivi par l'extrait EM1 22,52 µg.Eq acide gallique par mg d'extrait et 16,67 µg.Eq catéchine/ mg d'extrait. Le taux de

polyphénols et de flavonoïdes dans l'extrait n-butanol 2 (n-B2) est de 21,79 µg.Eq acide gallique par mg d'extrait avec 8,56 µg.Eq catéchine/ mg d'extrait. Alors que les extraits n-butanol 1(n-B1), méthanol 2 (EM2) et acétate d'éthyle (EAC) renferment 4,99 ; 7,36 ; 12,38 µg.Eq acide gallique par mg d'extrait et 1,35 ; 5,58 ; 1,59 µg.Eq catéchine/ mg d'extrait, respectivement. Ces résultats montrent des teneurs élevées en polyphénols par rapport aux valeurs déterminées par **Narasimhan et al., (2013)** dans l'extrait méthanolique de cette algue avec un taux de 0,91 µg.Eq acide gallique par mg d'extrait. Par contre, les travaux réalisés par **Ganesan et al., (2011)** ont montré une teneur plus élevée en polyphénols pour l'extrait méthanol et acétate d'éthyle sont de l'ordre de 34,5 ; 29,2 µg.Eq acide gallique par mg d'extrait, respectivement.

D'après ces résultats, on constate que les extraits méthanoliques sont les plus riches en composés phénoliques. De ce fait, le méthanol reste le meilleur solvant pour extraire ces composés, cette affinité a été appuyée par plusieurs travaux (**Abdille et al. 2005; Turkmen et al., 2006; Norhaizan et al., 2010; Stankovic et al., 2010**). Cela est dû à la capacité du méthanol à inhiber l'action du polyphénol oxydase qui provoque l'oxydation des polyphénols dans les tissus végétaux (**Yao et al. 2004**).

Il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie car l'utilisation de différentes méthodes d'extraction, réduisent les possibilités de comparaison entre les études (**Trabelsi et al., 2010**). Des études récentes ont montré que les teneurs en composés phénoliques, changent de façon considérables d'une espèce à une autre et à l'intérieur de la même espèce, à cause des facteurs extrinsèques (température, climat...), génétiques (la variété et l'origine d'espèces), physiologiques (le degré de maturation de la plante, les organes utilisés) et de la durée de stockage (**Maisuthisakul et al., 2007; Ebrahimzadeh et al., 2008; Ksouri et al., 2008; Ksouri et al., 2009**). Dans notre étude, on peut également associer le facteur de température d'extraction, car une macération dans le méthanol, et une décoction dans le mélange eau-méthanol, donnent des extraits différents sur leur teneurs en polyphénols et flavonoïdes ainsi que leur activité antioxydante.

L'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits réalisée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH est une procédure commune, dans laquelle l'activité antioxydante de l'échantillon étudié est estimée par le degré de décoloration de la solution du DPPH. Ce chromogène violet est facile à utiliser avec une grande sensibilité, permet l'analyse rapide de l'activité antioxydante d'un grand nombre d'échantillons et donne des résultats reproductibles (**Gulçin et al., 2010**).

Les résultats obtenus pour la mesure de l'activité antioxydante montrent que la concentration 0,75 mg/ml des extraits : Méthanol 2, eau-méthanol, n-butanol 1 assure une réduction du DPPH de 5,16%, 39,78%, 6,92% respectivement après 30 min d'incubation par rapport à l'acide ascorbique qui peut réduire 84,73% du DPPH à 0,003 mg/ml.

Concernant les valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenus, on constate que celle de l'extrait eau-méthanol est de 0,9 mg/ml, cette valeur est nettement faible par rapport à l'acide ascorbique, IC<sub>50</sub> = 0,00185 mg/ml.

Concernant l'extrait méthanol 1 (EM1) on constate que la concentration de 0,675 mg/ml assure une réduction du DPPH de 12,92%, après 30 min d'incubation ce résultat est comparé au résultat obtenu par **Narasimhan et al. (2013)** qui ont montré que l'extrait méthanol peut réduire 19% à la concentration de 0,03 mg/ml. Tandis que **Ganesan et al. (2011)** ont montré que l'extrait méthanol assure une réduction de 50% à la concentration de 3,66 mg/ml. Cette différence au niveau des résultats peut être liée aux conditions climatiques, des endroits où elle pousse cette algue, qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires comme les polyphénols ainsi que les conditions expérimentales (méthodes d'extraction, solvants utilisés).

Selon la bibliographie les métabolites secondaires en particulier les polyphénols sont connus par leur effet antioxydant en neutralisant les radicaux libres, d'après les résultats des tests phytochimiques et le dosage de polyphénols et de flavonoïdes totaux on peut déduire que l'algue verte, (*Ulva linza*) a un effet antiradicalaire, qui est fort probable lié à sa richesse en polyphénols et en flavonoïdes. Ces composés sont dotés d'activité antioxydante en libérant un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle ou bien par leurs propriétés chélatrices des ions métalliques (**Pastre et al., 2005**).

# *Conclusion*

Au cours de notre étude, nous avons constaté que l'extraction des thalles d'*Ulva linza* dans le méthanol et à chaud, a permis de récupérer un extrait riche en polyphénols et en flavonoïdes, et qui présente un effet antioxydant intéressant, par rapport à l'extrait méthanolique préparé par macération.

A la lumière de ces résultats, cette étude préliminaire nécessite d'autres recherches qui s'intéressent à :

- L'utilisation d'autres solvants organiques (acétone, éthanol, ...) pour extraire le maximum de composants chimiques
- Approfondir l'analyse phytochimique et chromatographique pour isoler et identifier les molécules actives de cette algue
- L'évaluation de l'activité antioxydante par d'autres méthodes *in vitro*: ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) et ABTS• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique).
- L'étude *in vivo* de l'effet de cette algue sur le stress oxydatif en mesurant l'activité d'enzymes antioxydantes: Catalase, Superoxyde dismutase...,
- Etude d'autres activités biologiques; comme antidiabétique ou antimicrobienne.

*Références  
bibliographiques*



1. **Abdille M.H., Singh R.P., Jayaprakasha G.K., Jena B.S., (2005)**, Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits, *Food Chemistry*, 90(4): 891-896.
2. **Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G., (2001)**, Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition, *Biochem. J*, 357: 593-615.
3. **Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K., (2002)**, Methods for testing antioxidant activity, *Analyst*, 127: 183–198.
4. **Apak R., Güçlü K., Özurek M., et Karademir S., (2004)**, Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26): 7970-7981.
5. **Archer S., (1993)**, Measurement of nitric oxide in biological models, *FASEB J*, 7: 349-360.
6. **Arteel G.A., Sies H., (2001)**, the biochemistry of selenium and the glutathione system, *Enviro. Toxicol. Pharmacol*, 10: 153-158.
7. **Atti I., (2014)**, Evaluation des activités antioxydant et antiradicalaire d'un mélange d'épices « Ras el hanout », Mémoire de Master, Université Kasdi Merbah Ouargla.
8. **Badouard C., (2006)**, Les lésions des acides nucléiques: détection par CLHP-SM/SM dans les milieux biologiques humains et intérêt comme biomarqueurs du stress oxydant et de l'inflammation, Thèse de Doctorat, université JOSEPH FOURIER-GRENOBLE.
9. **Baldus S., Heeschen C., Meinertz T., et al., (2003)**, Myeloperoxydase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes, *Circulation*, 108: 1440-1445.
10. **Barouki R., (2006)**, Ageing free radicals and cellular stress, *Med. Sci (Paris)*, 22(3): 266-272.
11. **Beklova M., Kizek R., (2008)**, Determination of vitamin C (ascorbic acid) using high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection, *Sensors*, 8: 7097-7112.
12. **Benariba N., Djaziri R., Bellakhdar W., Belkacem N., Kadiata M., Malaisse W.J., Sener A., (2013)**, phytochemical screening and free radical scavenging activity of *Citrullus colocynthis* seeds extracts, *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3 (1): 35-40
13. **Benguedda-Rahal W., (2011)**, Contribution à l'étude de la bioaccumulation métallique dans les sédiments et différents maillons de la chaîne trophique du littoral extrême ouest algérien, Thèse de doctorat, université Abou Bekr Belkaïd –Tlemcen-.
14. **Benzie I.F.F., 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.
15. **Bergendi L., Benes L., Durackova Z., Ferencik M., (1999)**, Chemistry, physiology and pathology of free radicals, *Life Sci*, 65: 1865-1874.

16. **Biotecmar., (2011)**, Les algues Genèse, Classification traditionnelle, Phylogénie, [www.biotecmar.eu/IMG/pdf/joel\\_fleurence\\_algues-2.pdf](http://www.biotecmar.eu/IMG/pdf/joel_fleurence_algues-2.pdf).
17. **Bonnefont-Rousselot D.P., Thérond J.L., Peynet A., Legrand J., Delattre., (2001)**, Vieillesse et stress oxydant, Quel marqueurs potentiels?, *Ann. Biol. Clin*, 59: 453-459.
18. **Boulanouar B., Abdelaziz G., Aazza S., Gago C., Miguel G., (2013)**, Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils, *Industrial Crops and Products*, 46: 85-96.
19. **Cadet J., Douki T., Ravanat J.L., (2010)**, Oxidatively generated base damage to cellular DNA, *Free Radic. Biol. Med*, 49(1): 9-21.
20. **Cao G., Alessio H.M., Cutler R.G., (1993)**, Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants, *Free Radic. Biol. Med*, 14: 303-311.
21. **Cao G., Sofic E., Prior R.L., (1996)**, Antioxidant capacity of tea and common vegetables, *J. Agric. Food Chem*, 44: 3426- 3431.
22. **Carbonneau M.A., Peuchant E., Sess D., Canioni P., Clerc M., (1991)**, Free and bound malondialdehyde measured as thiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma, *Clin. Chem*, 37: 1423-1429.
23. **Cavalla M., (2000)**, LES MICROALGUES, [http://mcavalla.free.fr/rsr/Algues\\_operon.pdf](http://mcavalla.free.fr/rsr/Algues_operon.pdf).
24. **Centre québécois de valorisation des biotechnologies (CQVB), (2008)**, Récentes techniques pour mesurer la capacité antioxydante: impact sur la sante, [www.cqvb.qc.ca/.../recentes-techniques-pour-mesurer-la-capacite-antioxydante--impact-sur-la-sante-btd-08-3.asp](http://www.cqvb.qc.ca/.../recentes-techniques-pour-mesurer-la-capacite-antioxydante--impact-sur-la-sante-btd-08-3.asp), Récupéré le 12 avril 2010.
25. **Chaillou H.I., Nazareno M., (2006)**, new method to determine antioxidant activity of polyphenols, *J. Agric. Food Chem*, 54: 8397–8402.
26. **Choe E., Min D.B., (2005)**, "Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods", *Journal of Food Science*, 70(9): R142-R159.
27. **Cimanga K., De Bruyne T., Hu J. P., Cos P., Apers S., Pieters L., Tona L., Kambu K., Berghe D.V., et Vlietinck A.J., (1999)**, Constituents from *Morinda morindoides* Leaves as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Scavengers of Superoxide Anions, *Pharmacy and Pharmacology Communications* 5(6): 419-424.
28. **Cracowski J.L., Stanke-Labesque F., Souvignet C., Bessard G., (2000)**, Isoprostanes: nouveaux marqueurs du stress oxydatif en pathologies humaines, *Press. Med*, 29: 604-610.
29. **Cristina P., Ilonka S., Bartek T ., (2009)**, Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réaction avec le radical libre DPPH, *Rev. sGénie. Ind*, 4: 25–39.

30. **Da Silva S.L., da Silva A., Honario K.M., Marangoni S., Toyama M.H., et Da Silva A.B. F., (2004)**, The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the xanthine oxidase, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 684(1-3): 1-7.
31. **Douki T., Odin F., Caillat S., Favier A., Cadet, J., (2004)**, Predominance of the 1, N2-propano 2'- deoxyguanosine adduct among 4-hydroxy-2-nonenal-induced DNA lesions, *Free Radic. Biol. Med*, 37:62-70.
32. **Durackova Z., Djrolo F., Hougbe H., Avode G., Attoulou V., Addra B., Kodjoh N., Avimadj M., (2008)**, Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress, *Mitochondrial medicine*, (ed) Gvozdjakova A: 19-43.
33. **Ebrahimzadeh M.A., Pourmorad F., Bekhradnia A.R., (2008)**, Iron chelating activity screening, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran, *African Journal of Biotechnology*, 7(18): 3188-3192.
34. **Echtay K.S., Esteves T.C., Pakay J.L., Jekabsons M.B., Lambert A.J., Portero-Otin M., Pamplona R., Vidal-Puig A.J., Wang S., Roebuck S.J., Brand M.D., (2003)** ,A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling, *Embo. J*, 22: 4103-4110.
35. **Eddouks M., Ouahidi M.L., Farid O., Moufid A., Khalidi A., Lemhadri A., (2007)**, l'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc, *pharmacognosie*, 5: 194-203.
36. **El-Sohemy A., Baylin A., Spiegelman D., Ascherio A., Campos H., (2002)**, Dietary and adipose tissue gamma-tocopherol and risk of myocardial infarction, *Epidemiology*, 13: 216-223.
37. **Farid Y., Etahiri S., Assobhei O., (2011)**, Activité antimicrobienne des algues marines de la lagune d'Oualidia (Maroc) : Criblage et optimisation de la période de la récolte, *J. Appl. Biosci*, 24: 1543 – 1552.
38. **Favier A., (2003)**, Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, *L'actualité chimique*: 108-115.
39. **Feng S. L., Wang J., Chen X. G., Fan J., (2005)**, Kinetic spectrofluorimetric determination of trace ascorbic acid based on its inhibition on the oxidation of pyronine Y by nitrite, *Spectrochim. Acta. Part A*, 61: 841-844.

40. **Feng Z., Hu W., Amin S., Tang M. S., ( 2003)**, Mutational spectrum and genotoxicity of the major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, induced DNA adducts in nucleotide excision repair-proficient and -deficient human cells, *Biochemistry*, 42: 7848-54.
41. **Forstermann U., Boissel J.P., Kleinert H., (1998)**, Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III), *FASEB J*, 12: 773-790.
42. **Frankel, E.N., (1998)**, Lipid oxidation. Dundee, UK: The Oily Press.
43. **Frankel E.N., Bosanek C.A., Meyer A.S., Silliman K., Kirk L.L., (1998)**, Commercial grape juices inhibit the in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food. Chem*, 46: 834-838.
44. **Frankel E.N., Meyer A.S., (2000)**, "The problems of using one-dimensional methods to evaluate multidimensional food and biological antioxidants", *Journal of Science and Food Agriculture*, 80: 1925-1941.
45. **Gao Y., (2010)**, the multiple actions of NO, *Pflugers. Arch*, 459(6): 829-839.
46. **Ganesan K., Kumar K.S., Rao P.S. (2011)**, Comparative assessment of antioxidant activity in three edible species of green seaweed, *Enteromorpha* from Okha, Northwest coast of India, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(1): 73-78.
47. **Garait B., (2006)**, Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin, Thèse de doctorat en biologie cellulaire, Université Joseph Fourier-France-
48. **Gayral P., (1975)**, Les algues: morphologie, cytologie, reproduction, écologie, ed Doin: 41.
49. **Gazdik Z., Zitka O., Petrlova J., Adam V., Zehnalek J., Horna A., Reznicek V., Beklova M., Kizek., (2008)**, Determination of vitamin C (ascorbic acid) using high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection, *Sensors*, 8: 7097-7112.
50. **Géraldine D., Céline L., (2009)**, Les algues, le trésor de la mer, Haute école de santé Genève.
51. **Goto M., Ueda K., Hashimoto T., Fujiwara S., Matsuyama K., Kometani T., Kanazaw K., (2008)**, A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2'-deoxythymidine, *Free Radical Biology and Medicine*, 45: 1318-1325.
52. **Goyer M., 1998** - Cité de la mer. Association Estran (site Internet).
53. **Gruber C.W., Cemazar M., Heras B., Martin J.L., Craik D.J., (2006)**, Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding, *Trends in biochemical sciences*, 31: 455-464.
54. **Guetens G., De Boeck G., Highley M., van Oosterom A.T., de Bruijn E.A., (2002)**, Oxidative DNA damage: biological significance and methods of analysis, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci*, 39: 331-457.

55. **Gulcin I., Huyut Z., Elmastas M., Aboul-Enein H Y., (2010)**, radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid, *Arabian Journal of Chemistry*, 3: 43-53.
56. **Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., CHARlier C., CHaPelle J.P., (2007)**, Le stress oxydant, *Rev Med Liège*, 62: 628-663.
57. **Hennebelle T., (2006)**, "Investigation chimique, chimio-taxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants, Thèse de Doctorat en Chimie Organique et Macromoléculaire: 303.
58. **Hervé B., (2012)**, ULVANS, Ulves Valorisation Nutrition Santé, [www.biogenouest.org/sites/.../atelier24\\_demais\\_legoff\\_gen2bio](http://www.biogenouest.org/sites/.../atelier24_demais_legoff_gen2bio).
59. **Hong J.H., Kim M.J., Park M.R., Kwag O.G., Lee I.S., Byun B.H., Lee S.C., Lee K.B Rhee S.J., (2004)**, Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats, *Clin. Chim. Acta*, 340: 107-115.
60. **Huang D., Ou B., Hampsch-Woodill M., Flanagan J.A., Deemer E.K., (2002)**, Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated beta-cyclodextrin as the solubility enhancer. *J. Agric. Food. Chem*, 50: 1815-1821.
61. **Hulbert A.J., (2005)**, on the importance of fatty acid composition of membranes for aging, *J Theor. Biol* 234: 277-288.
62. **Iltis A., (1980)**, Les algues, In : Durand Jean-René (ed.), Lévêque Christian (ed.). Flore et faune aquatiques de l'Afrique sahélo-soudanienne: tome 1. Paris : ORSTOM, 44: 9-61. (Initiations-Documentations Techniques; 44).
63. **Jacob C., Knight I., Winyard P.G., (2006)**, Aspects of the biological redox chemistry of cysteine: from simple redox responses to sophisticated signalling pathways, *Biol. Chem*, 387: 1385-1397.
64. **Julien J.C., (2007)**, Description de *Ulva* (Enteromorpha) spp, [En ligne] <http://www.mer-littoral.org/53/enteromorpha-spp>.
65. **Kanoun K., (2011)**, Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis*L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine), Mémoire de Magister, université Abou Bekr Belkaïd –Tlemcen-.
66. **KarumiY., Onyeyili P.A., Ogugbuaja V.O., (2004)**, Identification of active principles of *M.balsamina* (Balsam Apple) leaf extract, *J. Med. Sci*, 4 (3): 179-182.
67. **Knowles P.F., Gibson J.F., F.M. Pick, Bray F.R.C., (1969)**, ESR evidence for enzymatic reduction of oxygen to free radicals: the superoxide ion, *Biochem. J*, 111: 53-58.

68. **Ksouri R., Falleh H., Megdiche W., Trabelsi N., Hamdi B., Chaieb K., Bakhrouf A., Magné C., Abdelly C., (2009)**, Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L and related polyphenolic constituents, *Food and Chemical Toxicology*, 47(8): 2083-2091.
69. **Ksouri R., Megdiche W., Falleh H., Trabelsi N., Boulaaba M., Smaoui A., Abdelly C., (2008)**, Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes, *Comptes Rendus biologiques*, 331(11): 865-873.
70. **Lefèvre G., Beljean-Leymarie M., Beyerle F., (1998)**, Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique, *Ann. Biol. Clin*, 56: 305-319.
71. **Levine R.L., (2002)**, Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease, *Free Radic .Biol. Med*, 32: 790-796.
72. **Maataoui B.S., Hmeyene A., Hilali S., (2006)**, Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*), *Lebanese Science Journal*, (1):3-8.
73. **Magder S., (2006)**, Reactive oxygen species: Toxic molecules or spark of life?, *Crit care*,10: 208-216.
74. **Maier C.S., Chavez J., Wang J., Wu J.,(2010)**, Protein adducts of aldehydic lipid peroxidation products identification and characterization of protein adducts using an aldehyde/ketoreactive probe in combination with mass spectrometry, *Methods Enzymol*, 473: 305-330.
75. **Maisuthisakul P., Pongsawatmanit R., Gordon M.H., (2007)**, Assessment of phenolic content and freeradical scavenging capacity of some Thai indigenous plants, *Food Chemistry*, 100(4): 1409-1418.
76. **Malgalhae L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J., (2008)**, Methodological aspects about vitro evaluation of antioxidant properties, *Analytica. Chemical. Acta*, (613): 1-19.
77. **Marc F., Davin A., Deglene-Benbrahim L., Ferrand C., Baccaunaud M., Fritsch P., (2004)**, Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Med Sci (Paris)*, 20(4):458-463.
78. **Masuda M., Suzuki T., Friesen M.D., Ravanat J.L., Cadet J., Pignatelli B., Nishino H., Ohshima H., (2001)**, Chlorination of guanosine and other nucleosides by hypochlorous acid and myeloperoxidase of activated human neutrophils, *J. Biol. Chem*, 276: 40486-40496.
79. **Mates J.M., Pérez-Gomez C., De Castro I.N., (1999)**, "Antioxidant enzymes and human diseases", *Clinical Biochemistry*, 32(8): 595-603.

80. **McCall M.R., Frei B., (1999)**, "Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans?", *Free Radical Biology and Medicine*, 26(7-8): 1034-1053.
81. **Medjouja O., Benlifa A., (2014)**, Méthodes d'études d'activité des antioxydants des plantes médicinales, Mémoire de licence, université Kasdi Merbah, Ouargla.
82. **Michel T., Destandau E., Le Floch G., Lucchesi M.E., Elfakira C.,(2012)**, Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed, *Food Chemistry*, 131(3): 754-760.
83. **Miller N.J., Rice-Evans C.A., (1997)**, The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink, *Food Chem*, 60: 331-337.
84. **Mohammedi Z., (2013)**, Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie, Thèse de Doctorat, université Abou Bekr Belkaïd –Tlemcen-.
85. **Molyneux P., (2004)**, the use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxydant activity, *Song Klama Karin J.Sci, Technol*, 26 (2): 211-219.
86. **Munoz J., (2011)**, Extraction de l'éponge marine *Axinella donnani* et synthèse d'une chimiothèque d'analogues du dispacamide A, Thèse de doctorat, Université Paris sud XI, France.
87. **Nakamura A., Kawakami K., Kametani F., Nakamoto H., Goto S., (2010)**, Biological significance of protein modifications in aging and calorie restriction, *Ann N Y Acad Sci*, 1197: 33-39.
88. **Narasimhan M.K., Shenoy K.P., Vishnupriya K., Muthukumar C., (2013)**, In vitro Analysis of Antioxidant, Antimicrobial and Antiproliferative Activity of *Enteromorpha* antenna, *Enteromorpha linza* and *Gracilaria corticata* Extracts, *Jundishapur J Nat Pharm Prod*, 8(4): 151-159.
89. **Nguyen M.T.T., Awale S., Tezuka Y., Tran Q.L., Watanabe H., et Kadota S., (2004)**, Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Vietnamese Medicinal Plants, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(9): 1414-1421.
90. **Norhaizan M.E., Hern S.E., Ismail A., Yee C.L., (2010)**, Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds, *Food Chemistry*, 122(4): 1055-1060.
91. **Nur Alam M., Bristi N., Rafiquzzaman M., (2013)**, Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity, (21):145-149.

92. **Oskoueian E., Abdullah N., Hendra R., Karimi E., (2011)**, Composés bioactifs, antioxydant, la xanthine oxydase inhibiteur, inhibiteur de la tyrosinase et anti-inflammatoires de la sélection agro-industriel des sous-produits, (12): 8616.
93. **Ou B., Hampsch-Woodill M., Prior R.L., (2001)**, Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food. Chem.*, 49: 4619-4926.
94. **Pamplona R., Portero-Otin M., Ruiz C., Gredilla R., Herrero A Barja G., (2000)**, Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals, *Mech. Ageing. Dev.*, 112: 169-183.
95. **Parejo I., Viladomat T.F., Bastida J., Rosas-Romero A., Flerlage N., Burillo J., Codina C., (2002)**, Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and non-distilled Mediterranean herbs and aromatic plants, *J Agric. Food .Chem.*, (5): 6882-6884.
96. **Pastre J., Pastre O., Pastre C., (2005)**, Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation, Thèse de Vétérinaire, Université de Toulouse.
97. **Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., (2003)**, Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays, *J Nutr.*, 133(9): 2812-2819.
98. **Peng J., Jones G.L., Watson K., (2000)**, Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements, *Free Radic. Biol. Med.*, 28: 1598-1606.
99. **Person J., (2011)**, Algues, filières du futur, ed. AdebioTech: 91.
100. **Phipps S., Sharaf M., Butterweck V., (2007)**, Assessing antioxidant activity in botanicals and other dietary supplements, *Pharmacopeial Forum*, 33: 810-814.
101. **Pietri S., Leibgott T., Frévajille C., Tordo P., Culacasi M., (1998)**, Nitron spin traps and their pyrrolidine analogs in myocardial reperfusion injury : hemodynamic and ESR implications, Evidence for a cardioprotective phosphate effect for 5-(diethoxyphosphoryl)-(-methyl-1- pyrroline N-oxide in rat hearts, *Eur. J. Biochem.*, 254: 256-265.
102. **Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J.O., (1999)**, L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin, *Vaisseaux, Cœur, Poumons*, 4(5): 133-8.
103. **Prior R.L., (2003)**, Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage, *Am. J. Clin. Nut.*, 78: 570S-578S.



104. **Prior R. L., Wu, X., Schaich K., (2005)**, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (10): 4290–4302.
105. **Pulido R., Bravo L., Sauro-Calixo F., (2000)**, Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay, *J. Agri. Food. chem.*, 48: 3396-3402.
106. **Rezaire A., (2012)**, Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa), Thèse de Doctorat, Université des Antilles et de la Guyane, France.
107. **Rissanen T.H., Voutilinen S., Nyyssonem K., Salonen R., Kaplan G.A., Salonen J.T., (2003)**, Serum lycopene concentrations and carotid atherosclerosis: The Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study, *Am. J Clin. Nutr.*, 77: 133-138.
108. **Roberts II L.J., Morrow K.P., (2000)**, Measurement of F2-iso-prostanés as an index of oxidative stress in vivo, *Free Rad. Biol. Med.*, 28: 505-513.
109. **Samarth R.M., Panwar M., Soni A., Kumar M., Kumar A.; (2008)**, Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extract, *Food Chemistry*, 106: 868-873.
110. **Sánchez-Moreno C., (2002)**, Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems, *Food Sci. Technol. Int.*, 8(3): 121-137.
111. **Sekli-Belaidi F., (2011)**, Fonctionnalisation de surfaces d'électrodes par un film de poly(3,4éthylènedioxythiophène) PEDOT pour l'élaboration de microcapteur spécifique des acides ascorbique et urique: application à l'étude des propriétés antioxydantes du sérum sanguin, Thèse de doctorat, université de Toulouse.
112. **Sharpe P.C., Duly E.B., MacAuley D., (1996)**, total radical trapping antioxidant potential (TRAP) and exercise, *QJM*, 89(3): 223-228.
113. **Schlesier K., Harwat M., Bohm V., Bitsch R., (2002)**, Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods, *Free Radical Research*, 36(2): 177-187.
114. **Singleton V.L., Rossi J.A., (1965)**, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-153.
115. **Souchard J.P., Arnal J.F., Rochette L., (2002)**, Les radicaux libres et le stress oxydatif radicalaire, *Techniques en biologie*, 23: 245-257.

116. **Spingart D., (2013)**, le règne végétal, [csakb.plongee.free.fr/Documents/bio/.les algues](http://csakb.plongee.free.fr/Documents/bio/.les%20algues)  
Niveau1.
117. **Stadtman E.R., (1992)**, Protein oxidation and aging, *Science*, 257(5074): 1220-1224.
118. **Stadtman E.R., Starke-Reed P.E., Oliver C.N., Carney J.M, Floyd R.A.,(1992)**, Protein modification in aging, *EXS*, 62: 64-72.
119. **Stankovic S.M., Topuzovic M., Solujic S., Mihailovic V., (2010)**, Antioxidant activity and concentration of phenols and flavanoids in the whole plant and plant parts of *Teucrium chamaerdys* L. var *glanduliferum* Haussk, *Journal of Medicinal Plant Research*, 4(20): 2092-2098.
120. **Takano Y., Hase-Aoki K., Horiuchi H., Zhao L., Kasahara Y., Kondo S., Becker M. A.,(2005)**, Selectivity of febuxostat, a novel non-purine inhibitor of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase, *Life Sciences*, 76(16): 1835-1847.
121. **Taviano M.F., Marino A., Trovato A., Bellinghieri V., Melchini A., Dugo P., Cacciola F., Donato P., Mondello L., Guvenc A., De-Pasquale R., Miceli N., (2013)**, *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. “berries” from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities, *Food and Chemical Toxicology*, 58: 22-29.
122. **Tepe B., Sokmen M., Akpulat H.A., Sokmen A., (2006)**, Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey, *Food Chem*, (95): 200-204.
123. **Thomas M., (2011)**, Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*), Thèse de Doctorat en Chimie Analytique – Phytochimie l'université d'Orléans.
124. **Trabelsi N., Megdiche W., Ksouri R., Falleh H., Oueslati S., Bourgou S., Hajlaoui H., Abdelly C., (2010)**, Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves, *Food Science and Technology*, 43(4): 632-639.
125. **Turkmen N., Sari F., Velioglu Y.S., (2006)**, Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods, *Food Chemistry*, 99(4): 835-841.
126. **USDA., (2007)**, Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, [www.ars.usda.gov/sp2userfiles/place/12354500/.../orac/orac07.pdf](http://www.ars.usda.gov/sp2userfiles/place/12354500/.../orac/orac07.pdf).

127. **Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J., Telser J., (2004)**, Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Mol. Cell .Biochem*, 266(1-2): 37-56.
128. **Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J., (2007)**, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J Biochem. Cell. Biol* 39: 44-84.
129. **Vertuani S., Angusti A., Manfredini S., (2004)**, the antioxidants and pro-antioxidants network: an overview, *Curr Pharm Des*, 10(14): 1677-1694.
130. **Wang H., Cao G., Prior R.L., (1996)**, Total antioxidant capacity of fruits, *J. Agr. Food. Chem*, 44: 701–705.
131. **Wardman P., Candeias L.P., (1996)**, "Fenton chemistry: An introduction", *Radiation Research*, 145(5): 523-531.
132. **Will J.C, Byers T., (1996)**, Does diabetes mellitus increase the requirement for vitamin A, C and E, *New Rev*, 54: 193-202.
133. **Wu X., Beecher G.R., Holden J.M., Haytowitz D.B., Gebhardt S.E., Prior R.L., (2004)**, Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States, *Agric. Food Chem*, 52: 4026-4037.
134. **Yao H.W., Li J., Chen J.Q., Xu S.Y., (2004)**, Inhibitory effect of leflunomide on hepatic fibrosis induced by CCl<sub>4</sub> in rats, *ActaPharmacologica Sinica*, 25(7): 915-920.
135. **Yeh G.C., Henderson J.P., Byun, J., Andada A.D., et Heinecke J.W., (2003)**, 8-Nitroxanthine, a product of myeloperoxidase, peroxyxynitrite, and activated human neutrophils, enhances generation of superoxide by xanthine oxidase, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 418(1): 1-12.
136. **Zangar R.C., Davydov D.R., Verma S., (2004)**, Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450, *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 199(3): 316-331.
137. **Zhao Y., Yang X., Lu W., Liao H., Liao F., (2009)**, Uricase based methods for determination of uric acid in serum, *Microchim. Acta*, 164: 1-6.