

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI**

**Évaluation du potentiel antioxydant et antibactérien d'extraits de macroalgues du  
Saint-Laurent**

Mémoire présenté

dans le cadre du programme de maîtrise en océanographie

en vue de l'obtention du grade d'océanographe

PAR

**Catherine Boisvert**

**Juillet 2013**



**Composition du jury :**

**Richard St-Louis président du jury, Université du Québec à Rimouski**

**Lucie Beaulieu, directrice de recherche, Université du Québec à Rimouski**

**Émilien Pelletier, codirecteur de recherche, Institut des sciences de la mer  
de Rimouski, Université du Québec à Rimouski**

**Éric Deslandes, examinateur externe, Université de Bretagne Occidentale**

Dépôt initial le 26 février 2013

Dépôt final le 08 juillet 2013



UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI  
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.



Être égal à soi même: «Être naturel sans fausse honte de ce que l'on est. Ne pas se farder d'artifices pour plaire à tout le monde. Lutter pour ses idées sans violence, accepter que les autres soient différents de nous, car nous sommes nous-mêmes différents des autres. S'accepter tel que l'on est et non pas vivre dans l'imposture de notre moi.» *anonyme*

Merci Daniel de m'avoir emmené à l'aventure sous les eaux du bout du monde pour que je me retrouve.





## RÉSUMÉ

Le but de cette recherche était de contribuer la valorisation de la biomasse marine en déterminant le potentiel antioxydant et antibactérien de trois extraits d'espèces de macroalgues de l'estuaire du Saint-Laurent, soit *Saccharina longicuris*, *Ascophyllum nodosum* et *Ulva lactuca*, obtenus par extraction avec de l'éthanol 100 % à des températures de 50 et 80 °C. La quantité de phénols totaux mesurée était respectivement de 7,1 50,2 et 6,9 mg GAE/g. Les activités antioxydantes les plus importantes étaient de 90,6 % de DPPH réduit, à 50 °C, pour *A. nodosum* lorsque quantifiées avec l'essai DPPH et de 128,6 µmol TE/g avec l'essai ORAC. Pour l'essai FRAP c'est *U. lactuca* avec 2972,7 µmol TE/g, à 50 °C, qui possédait la réponse la plus importante. L'extrait éthanolique total d'*U. lactuca*, en présence des bactéries *Escherichia coli* et *Micrococcus luteus*, a induit les diminutions les plus importantes de la croissance cellulaire avec 69,5 et 61,5 % tandis que l'extrait de *S. longicuris*, a induit une plus grande diminution de la croissance chez *Brochothrix thermosphacta* avec 38,0 % d'inhibition. Les fractions F2, F3, F4, F5 et F6, issues du fractionnement bioguidé des extraits éthanoliques totaux réalisés à 80 °C, possèdent toutes un potentiel antioxydant supérieur à l'extrait initial, lorsqu'évaluées avec FRAP. Cette augmentation, était plus particulièrement observée pour F3 et F4 avec 2 212,8 et 1 238,5 µmol TE/g. Cette étude est le début d'un projet plus vaste et la purification ainsi que l'identification de composés actifs restent à venir. Les macroalgues du Saint-Laurent possèdent des molécules à valeurs ajoutées démontrant des propriétés antioxydantes et antibactériennes ce qui peut conduire à la valorisation de cette biomasse d'importance dans le Québec maritime.

Mots clés : antioxydant, antibactérien, valorisation, macroalgues, *Saccharina longicuris*, *Ascophyllum nodosum*, *Ulva lactuca*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Brochothrix thermosphacta*, DPPH, FRAP, ORAC.



## ABSTRACT

The purpose of this research was to valorize the marine biomass by determining the antioxidant and antibacterial potential of three seaweed species of the St. Lawrence River estuary, which are *Saccharina longicuris*, *Ascophyllum nodosum* and *Ulva lactuca*, extracted with 100% ethanol, to both 50 °C temperature and 80 °C. The amount of total phenols was 7.1, 50.2 and 6.9 mg GAE / g, respectively. The most important antioxidant activities were 90.6% of DPPH reduced at 50 °C for *A. nodosum*, quantified with the DPPH assay, and 128.6 µmol TE/g with the ORAC assay. With the FRAP assay, *U. lactuca* displayed the best response with 2972.7 µmol TE/g at 50 °C. The total ethanolic extract of *U. lactuca* induced the most significant growth inhibition of *Escherichia coli* and *Micrococcus luteus* bacterial strains with 69.5 and 61.5 %, respectively, while the *S. longicuris* extract reduced most significantly the *Brochothrix thermosphacta* growth with an inhibition of 38.0 %. The fractions F2, F3, F4, F5 and F6, resulting from bioguided fractionation of the total ethanolic extracts, performed at 80 °C, displayed higher antioxidant potential in comparison to the initial extract, when assessed with the FRAP assay. This increase was especially important for F3 and F4 with values of 212.8 and 1 238.5 µmol TE/g, respectively. This study is the beginning of a larger project expecting further isolation and identification of active compounds. Seaweeds of the St. Lawrence River estuary possess high value-added molecules demonstrating antioxidant and antibacterial properties which could lead to the enhancement of this biomass of importance in the Quebec maritime.

*Keywords:* antioxidant, antibacterial, valorisation, seaweeds, *Saccharina longicuris*, *Ascophyllum nodosum*, *Ulva lactuca*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Brochothrix thermosphacta*, DPPH, FRAP, ORAC.



## TABLE DES MATIÈRES

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 LES ALGUES .....</b>	<b>3</b>
1.1.1 LES CLASSIFICATIONS, LES DISTRIBUTIONS ET LES STRUCTURES .....	3
1.1.2 SPÉCIFICITÉS DES ALGUES UTILISÉES .....	7
<b>1.2 L'HOMME ET L'ALGUE .....</b>	<b>8</b>
1.2.1 HISTORIQUE ET UTILISATIONS DES ALGUES .....	8
1.2.2 COMPOSITION NUTRITIONNELLE DES ALGUES .....	9
1.2.3 LE MARCHÉ MONDIAL DES ALGUES .....	11
1.2.4 LES USAGES COMMERCIAUX DES ALGUES .....	13
<b>1.3 POTENTIEL ANTIOXYDANT .....</b>	<b>14</b>
1.3.1 LES ANTIOXYDANTS ET L'ORGANISME .....	15
1.3.2 LES ANTIOXYDANTS ET L'INDUSTRIE .....	16
1.3.3 LES TYPES D'ANTIOXYDANTS .....	17
<b>1.4 MICROBIOLOGIE .....</b>	<b>21</b>
1.4.1 LES SOUCHES BACTÉRIENNES .....	22
1.4.2 LES ANTIMICROBIENS ET L'INDUSTRIE .....	23
1.4.3 APPROCHE DES MÉTHODES.....	25
<b>1.5 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS .....</b>	<b>26</b>
<b>CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 PRODUITS CHIMIQUES ET APPAREILS .....</b>	<b>27</b>
<b>2.2 ÉCHANTILLONS .....</b>	<b>28</b>
<b>2.3 EXTRACTION .....</b>	<b>28</b>
<b>2.4 CARACTÉRISATION CHIMIQUE .....</b>	<b>29</b>
<b>2.5 MÉTHODES DE DOSAGE DU POTENTIEL ANTIOXYDANT .....</b>	<b>29</b>
2.5.1 ESSAI DPPH .....	29

2.5.2	ESSAI FRAP .....	32
2.5.3	ESSAI ORAC .....	34
<b>2.6</b>	<b>ESTIMATION DES PHÉNOLS TOTAUX .....</b>	<b>39</b>
<b>2.7</b>	<b>MÉTHODE DE DOSAGE DU POTENTIEL ANTIBACTÉRIEN .....</b>	<b>41</b>
<b>2.8</b>	<b>SÉPARATIONS ET FRACTIONNEMENTS BIOGUIDÉS .....</b>	<b>44</b>
<b>CHAPITRE 3 : RÉSULTATS.....</b>		<b>47</b>
<b>3.1</b>	<b>CARACTÉRISATION CHIMIQUE .....</b>	<b>47</b>
<b>3.2</b>	<b>POTENTIEL ANTIOXYDANT .....</b>	<b>48</b>
3.2.1	ESSAI DPPH.....	48
3.2.2	ESSAI FRAP .....	51
3.2.3	ESSAI ORAC .....	53
<b>3.3</b>	<b>PHÉNOLS TOTAUX .....</b>	<b>55</b>
<b>3.4</b>	<b>POTENTIEL ANTIBACTÉRIEN .....</b>	<b>56</b>
<b>3.5</b>	<b>FRACTIONNEMENT BIOGUIDÉ D'<i>ULVA LACTUCA</i> .....</b>	<b>60</b>
3.5.1	POTENTIEL ANTIOXYDANT DES FRACTIONS D' <i>ULVA LACTUCA</i> .....	60
3.5.2	POTENTIEL ANTIBACTÉRIEN DES FRACTIONS D' <i>ULVA LACTUCA</i> .....	64
<b>CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....</b>		<b>65</b>
<b>4.1</b>	<b>CARACTÉRISATION CHIMIQUE .....</b>	<b>65</b>
<b>4.2</b>	<b>POTENTIEL ANTIOXYDANT .....</b>	<b>66</b>
4.2.1	ESSAI DPPH .....	67
4.2.2	ESSAI FRAP .....	71
4.2.3	ESSAI ORAC .....	73
4.2.4	MÉCANISMES ET PROPRIÉTÉS ANTIOXYDANTS DES MACROALGUES .....	74
<b>4.3</b>	<b>PHÉNOLS TOTAUX .....</b>	<b>75</b>
4.3.1	EFFET DE LA TEMPÉRATURE D'EXTRACTION .....	76
<b>4.4</b>	<b>POTENTIEL ANTIBACTÉRIEN .....</b>	<b>77</b>
4.4.1	<i>E. COLI</i> (ATCC 25922) .....	77
4.4.2	<i>M. LUTEUS</i> (ATCC 9342) .....	79
4.4.3	<i>B. THERMOSPACTA</i> (ATCC 11509) .....	80

4.4.4 COMPARAISON DES ACTIVITÉS ANTIBACTÉRIENNES .....	80
4.4.5 MÉCANISMES ET PROPRIÉTÉS ANTIBACTÉRIENS DES MACROALGUES .....	81
<b>4.5 FRACTIONNEMENT BIOGUIDÉ D'<i>U. LACTUCA</i> .....</b>	<b>83</b>
4.5.1 POTENTIEL ANTIOXYDANT .....	83
4.5.2 POTENTIEL ANTIBACTÉRIEN .....	85
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>87</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>89</b>
<b>ANNEXE.....</b>	<b>103</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Concentrations des extraits algaux pour l'essai ORAC .....	37
Tableau 2 : Comparaison de la composition chimique globale d' <i>U. lactuca</i> , d' <i>A. nodosum</i> et de <i>S. longicuris</i> .....	48
Tableau 3 : Pourcentages d'inhibition de la croissance bactérienne d' <i>E. coli</i> , <i>M. luteus</i> et <i>B. thermosphacta</i> en présence d'extraits éthanoliques à différentes concentrations .....	59



## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Comparaisons des structures des macroalgues et des plantes vasculaires terrestres .....	5
Figure 2 : Structure moléculaire de base d'un phénol.....	18
Figure 3 : Exemple de cinétique recherchée avec l'ajustement de concentrations des échantillons lors du test ORAC.....	16
Figure 4 : Résultats % DPPH réduit des extraits éthanoliqes, réalisés à 50°C (A) et 80 °C (B), de <i>U. lactuca</i> , <i>A. nodosum</i> et <i>S. longicruris</i> .....	50
Figure 5 : Résultats FRAP ( $\mu\text{mol TE/g}$ ) des extraits éthanoliqes, réalisés à 50 (A) et 80 °C (B), de <i>U. lactuca</i> , <i>A. nodosum</i> et <i>S. longicruris</i> .....	52
Figure 6 : Résultats ORAC ( $\mu\text{mol TE/g}$ ) des extraits éthanoliqes, réalisés à 50 °C, de <i>U. lactuca</i> , <i>A. nodosum</i> et <i>S. longicruris</i> .....	54
Figure 7 : Détermination des phénols totaux ( $\mu\text{g GAE/g}$ ) des extraits éthanoliqes de <i>U. lactuca</i> , <i>S. longicruris</i> et <i>A. nodosum</i> .....	55
Figure 8 : Courbes de croissance de <i>E. coli</i> (A), <i>M. luteus</i> (B) et <i>B. thermosphacta</i> (C) en présence d'extraits éthanoliqes, réalisés à 50 °C, de <i>U. lactuca</i> , <i>S. longicruris</i> et <i>A. nodosum</i> .....	57
Figure 9 : Résultats DPPH moyens (% DPPH réduit) des fractions d' <i>U. lactuca</i> , issues du fractionnement bioguidé des extraits éthanoliqes réalisés à 50°C (A) et 80 °C (B).....	61
Figure 10 : Résultats FRAP ( $\mu\text{mol TE/g}$ ) des fractions d' <i>U. lactuca</i> issues du fractionnement bioguidé des extraits éthanoliqes réalisés à 50°C (A) et 80 °C (B) .....	63
Figure 11 : Courbes de croissance d' <i>E. coli</i> en présence des fractions d' <i>U. lactuca</i> , issues du fractionnement bioguidé des extraits éthanoliqes réalisés à 50 °C.....	64



## INTRODUCTION GÉNÉRALE

La communauté scientifique, l'industrie et le public en général montrent un intérêt grandissant pour les extraits naturels et les molécules dérivées des bioressources. Au moment où le marché des plantes à intérêt nutraceutique et médicinal connaît une importante croissance annuelle (15% depuis 1995) en Amérique du Nord, les macroalgues du Québec demeurent une source encore partiellement exploitée et mal valorisée (Tahi, 2004). Dépendamment des espèces étudiées, les algues possèdent des composés immunostimulants, des agents antiviraux et antibactériens, des agents anticancéreux, des agents anticoagulants et anti-inflammatoires, ainsi que des antioxydants puissants (Fitton & Irhimeh, 2008; Krinsky, 1989). Depuis maintenant plusieurs années, le potentiel antioxydant des algues est connu comme ayant une implication dans la prévention du cancer, des dommages dus aux rayons ultra-violet et des dommages cellulaires induits par les espèces oxygénées hautement réactives. Par contre, jusqu'à présent, peu d'articles ont présenté des travaux sur le potentiel antimicrobien des algues. Les agents bactéricides trouvés dans les algues incluent les acides aminés, les terpénoïdes, les phlorotannins, l'acide acrylique, les composés phénoliques, les stéroïdes, les halogénés, les cétones et les alcanes, les polysulfides cycliques et les acides gras (Watson & Cruz-Rivera, 2003). Avec la nécessité de conservation des produits alimentaires ainsi que la résistance développée par des pathogènes aux antibiotiques, le besoin de trouver d'autres composés ayant des activités antimicrobiennes se fait plus pressant. Dans cette perspective, les macroalgues offrent une possibilité intéressante d'étude.

Depuis quelques années, des entreprises de la filière des biotechnologies marines québécoises développent des activités de production commerciale et de valorisation des macroalgues. Cet engouement pour l'étude de composés algaux à haute valeur ajoutée conduit à des innovations dans les domaines alimentaires, cosméceutique et

nutraceutique, ce qui s'inscrit dans le regroupement sectoriel sur les macroalgues de la Technopole Maritime du Québec, dans la Chaire de recherche industrielle dans les collèges du CRSNG en valorisation des macroalgues du Cégep de la Gaspésie et des Îles, ainsi que dans le Groupe d'intérêt sur les produits marins de l'Institut sur la nutrition et les aliments fonctionnels (INAF, Université Laval, Québec, Qc, Canada). Dans le cadre de ce projet de recherche, l'entreprise Organic Ocean (Rimouski) a fourni le matériel algal nécessaire aux activités de recherche. L'entreprise était grandement intéressée par la diversification des applications de ces macroalgues utilisées principalement en horticulture, ce qui ne représente qu'une faible valorisation de la biomasse algale. S'inscrivant dans une vision globale de développement durable, les procédés d'extraction ont été réalisés avec l'aide d'une technologie verte, utilisant un solvant recyclable et non toxique, employé par l'équipe du professeur Émilien Pelletier de l'ISMER-UQAR, codirecteur du projet. Oeuvrant dans une optique de valorisation de biomasse marine et de l'économie régionale, notre étude visait à déterminer le potentiel antioxydant et antibactérien de trois espèces d'algues communes de l'estuaire du Saint-Laurent, soit *Saccharina longicuris* (algue brune), *Ascophyllum nodosum* (algue brune) et *Ulva lactuca* (algue verte), ayant subi des transformations dans des conditions industrielles réelles et rentables.

Notre étude a permis d'approfondir les connaissances scientifiques sur des extraits d'algues riches en biomolécules actives ce qui contribue au développement de nouveaux composés actifs qui pourront être exploités en alimentation ou dans le secteur de la santé.

## CHAPITRE 1

### REVUE DE LITTÉRATURE

#### 1.1 LES ALGUES

Les algues sont à l'origine de la vie dans les océans et, par la suite, de celle sur terre en ayant produit l'oxygène et la couche d'ozone nécessaire aux organismes que l'on connaît aujourd'hui. Les algues ne constituent pas un ensemble homogène malgré les ressemblances morphologiques observées. Il existe plus de différences génétiques entre une algue brune de type *Fucus* et une algue verte du genre *Ulva*, qu'entre une algue et un chêne (Person, 2011).

Pendant des millénaires, les macroalgues marines ont été exploitées par les populations côtières, mais la biotechnologie qui leur est associée s'est développée et diversifiée significativement que depuis les 30 dernières années. Tous les types d'algues jouent un rôle primordial dans les milieux aquatiques. La forme microscopique, appartenant au phytoplancton, est à la base de la chaîne alimentaire et régule tous les réseaux trophiques d'une façon ou d'une autre. Toutefois, dans certaines situations où leur densité devient trop importante, elles peuvent s'avérer envahissantes ou toxiques.

##### 1.1.1 LES CLASSIFICATIONS, LES DISTRIBUTIONS ET LES STRUCTURES

Les algues sont des thallophytes eucaryotes autotrophes. On dénombre environ 25 000 espèces, dont 22 000 espèces unicellulaires allant jusqu'à deux micromètres de diamètre (Tahi, 2004). Cependant, on retrouve à l'opposé des algues gigantesques pouvant atteindre des longueurs de 30 à 50 mètres (Tahi, 2004).

Les algues appartiennent au règne végétal sans toutefois constituer un ensemble homogène tel que déjà mentionné précédemment. Les voies évolutives, indépendantes les unes des autres, des algues se distinguent en organismes eucaryotes uni ou pluri

cellulaires se différenciant en algues vertes, rouges ou brunes et les organismes procaryotes en cyanobactéries. Les deux critères principaux de distinction sont la couleur et la taille. La taille différencie les algues visibles à l'œil nu, nommées macroalgues, de celles qui sont microscopiques, les microalgues. Le critère de la couleur répartit les algues en quatre grandes classes principales possédant toutes de la chlorophylle : les algues vertes (*Chlorophyceae*), les algues brunes (*Pheophyceae*), les algues rouges (*Rhodophyceae*) et les algues bleu vert (*Cyanophytceae*) (Hoek, Mann, & Jahns, 1995; Paris & Moyses, 1967).

Les algues sont grandement répandues dans les eaux du globe, communes dans les milieux terrestres, elles sont aussi présentes dans des environnements inusités tels que la neige et la glace. Les macroalgues croissent principalement dans les eaux marines peu profondes de moins de 100 mètres, mais certaines ont été observées dans des milieux aussi profonds que 360 mètres (Round, 1984). La majorité se retrouve dans les océans où elles représentent 90 % des végétaux (Faller, 2011). La répartition se fait en fonction de la latitude, de la salinité et de la qualité des eaux.

Chez les macroalgues, il y a absence de feuilles, de tiges et de racines. L'appareil végétatif est dit thalle. Il est constitué de cellules associées en filaments ou en lames plus ou moins épaisses qui se relient au stipe (Fig. 1). Ce dernier se termine sur un crampon qui se trouve à être l'organe de fixation. Tout comme les plantes terrestres, les algues nécessitent de l'eau, de la lumière et du dioxyde de carbone pour effectuer la photosynthèse grâce aux pigments chlorophylliens qu'elles possèdent. Les algues macroscopiques absorbent les nutriments par toute la surface du thalle en contact avec son milieu.

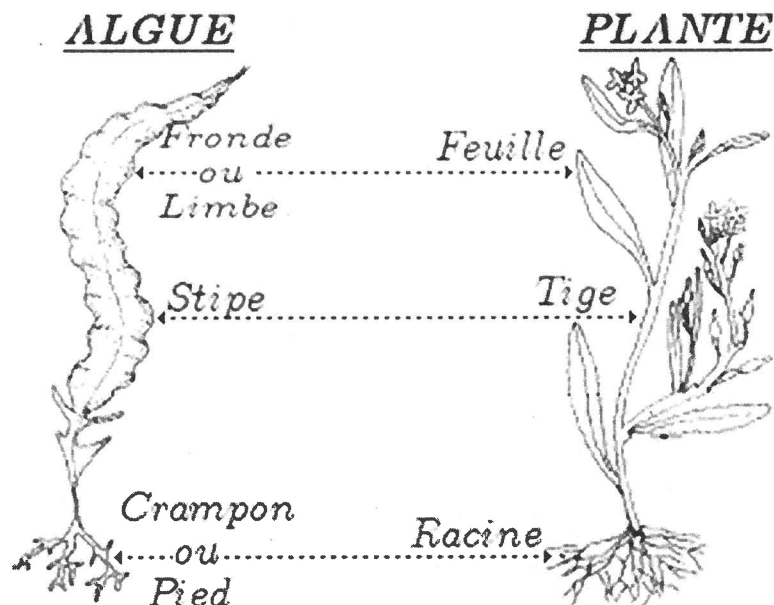


Figure 1 : Comparaison des structures des macroalgues et des plantes vasculaires terrestres (Gayral & Cosson, 1979)

#### 1.1.1.1 Les *Pheophyceae*

Les *Pheophyceae* sont un large groupe d'algues, pluricellulaires, principalement marines, englobant la majorité des macroalgues des eaux froides du globe (Raven, Evert, & Eichhorn, 2007). Elles combinent à la fois le rôle d'habitat et celui de source de nourriture pour les organismes marins ainsi que pour l'homme. Mondialement, il existe entre 1 500 et 2 000 espèces d'algues brunes qui se distinguent principalement par leurs chloroplastes entourés par quatre membranes et par la présence du pigment fucoxanthine, responsable de leur couleur distinctive vert-brune qui leur a donné leur nom (Hoek et al., 1995). Presque toutes les algues brunes sont des espèces sessiles. Le genre *Sargassum* échappe à cette règle en créant des masses flottantes situées dans la mer des Sargasses. Les algues brunes sont abondantes près des côtes tempérées d'eaux froides. Plus spécifiquement, au Québec, les espèces telles qu'*Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* et *Saccharina longicruris* y sont abondantes et constituent une

biomasse d'intérêt. Ces trois espèces sont entre autres convoitées pour leurs phycocolloïdes ayant des propriétés gélifiantes, épaississantes et antioxydantes (Rioux, 2005). De plus, certaines de leurs molécules démontrent des propriétés en nutraceutiques et en pharmaceutiques présentement à l'étude comme des activités anticancérigènes, antitumorales, antiangiogéniques, etc. (Heo et *al.*, 2008; Valko et *al.*, 2007; Yamamoto et *al.*, 2011)

#### 1.1.1.2 Les *Chlorophyceae*

Le groupe des algues vertes, le genre *Ulva* par exemple, englobe près de 17 000 espèces, microscopiques ou de grandes tailles, ayant des structures et des cycles de développement très diversifiés. Elles se retrouvent sous forme macroscopique, unicellulaire et en colonies flagellées ayant généralement deux flagelles par cellule, mais aussi sous forme de colonies cocoïdales et filamenteuses. La majorité est rencontrée en eaux douces, mais elles sont aussi présentes dans des habitats aussi différents que le milieu marin, les troncs d'arbres, le sol, en association symbiotique avec des lichens, des protozoaires, des éponges et des cœlentérés (Raven et *al.*, 2007). Les algues vertes sont les seules à emmagasiner l'amidon à l'intérieur de plastides et à posséder, avec les bryophytes et les plantes vasculaires, de la chlorophylle *a* et *b*. De plus, elles possèdent aussi de la  $\beta$ -carotène et diverses xanthophylles.

Certaines algues vertes sont bien connues comme indicateurs de dérèglements de l'environnement causés par l'homme. Dans certaines régions de la Bretagne, ce sont des marées vertes de prolifération d'ulves qui se déposent sur les plages chaque année. Les conditions naturelles comme la température, la luminosité et l'hydrodynamisme créent d'abord un caractère saisonnier de multiplication. Ensuite, il y a la disponibilité des nutriments qui n'est plus uniquement due au milieu, mais aussi aux activités anthropiques et aux rejets issus de l'agriculture dans les eaux d'écoulement ce qui crée



encore plus de perturbations. Cela engendre la dégradation d'une quantité importante de végétaux qui produisent alors de l'hydrogène sulfureux, toxique pour l'homme. De plus, l'eutrophisation bouleverse les conditions initiales d'oxygène et de lumière du milieu marin entraînant aussi un changement des paramètres physico-chimiques. Ces nouvelles conditions peuvent favoriser la multiplication de certaines espèces de la faune et de la flore tout en défavorisant d'autres au détriment de l'équilibre de l'écosystème marin. Une voie de valorisation de cette biomasse qui devient de plus en plus envahissante est le compostage et la production de méthane pour le fonctionnement de turbine pour la production d'énergie renouvelable.

#### 1.1.2 SPÉCIFICITÉS DES ALGUES UTILISÉES

##### 1.1.2.1 *Ascophyllum nodosum*

Rattachée à la famille des *Fucaceae* à cause de la croissance de ses groupes cellulaires apicaux, l'algue brune *Ascophyllum nodosum* se distingue par une absence de nervure médiane (Graham & Wilcox, 2000). Un thalle mince avec de grands axes ainsi que des ramifications dichotomiques et des branchements latéraux caractérisent cette algue brune (Rioux, 2005). La présence d'aérocystes près des ramifications qui se succèdent sur les frondes la différencie du genre *Fucus* (Julien, 2007). Grâce à ses aérocystes, *A. nodosum* se redresse quand elle est submergée et à marée basse, elle s'étale de toute sa longueur. Elle se fixe au substrat par un disque basal et certains spécimens atteignent jusqu'à trois mètres de long. *Ascophyllum nodosum* est présente autant sur les côtes atlantiques européennes que celles de l'Amérique du Nord (Hill & White, 2008).

### 1.1.2.2 *Saccharina longicuris*

*Saccharina longicuris* appartient à la famille des *Saccharinaceae* (Raven et al., 2007). Cette espèce possède un stipe cylindrique creux au sommet et se caractérise par une coloration entre le brun pâle et le jaune. Cette algue se compose d'un crampon qui se ramifie pour supporter une fronde simple qui ondule sur les côtés de 50 à 70 centimètres de large (Gendron, 1983). Cette espèce atteint des longueurs variant entre deux et sept mètres (Chapman, 1987). De fortes populations sont présentes en Nouvelle-Écosse et dans la Baie des Chaleurs, sur les côtes du Québec (Rioux, 2005).

### 1.1.2.3 *Ulva lactuca*

*Ulva lactuca* appartient à la famille des *Ulvaceae* est largement distribuée dans les eaux froides et tempérées. Elle possède une lame souple formée de deux couches cellulaires ayant un chloroplaste en forme de coupe et d'un thalle mince et aplati. La couleur de la lame varie du vert foncé au vert clair et peut atteindre jusqu'à un mètre de longueur dans les milieux riches en nutriments. *Ulva lactuca* adhère au substrat grâce à un stipe très court, surmonté d'un petit disque de fixation. Elle croît généralement dans la zone supralittorale, mais peut se développer jusqu'à dix mètres de profondeur.

## 1.2 L'HOMME ET L'ALGUE

### 1.2.1 HISTORIQUE ET UTILISATIONS DES ALGUES

L'étude de la botanique remonte à l'époque où les végétaux constituaient la majeure partie de l'alimentation humaine, ce qui veut probablement dire la préhistoire. Les algues ont été utilisées par l'Homme depuis des milliers d'années comme aliments, remèdes, fourrages et fertilisants. De nos jours, les principaux consommateurs directs de

cette ressource, en Amérique du Nord, sont les migrants des pays où les algues ont toujours fait partie de l'alimentation, comme la Chine, le Japon, et la Corée ainsi que la Malaisie et l'Indonésie. En important cette culture avec eux, ils ont contribué à ce qui fait qu'aujourd'hui, il y a beaucoup plus de pays qui ont intégré les algues à leur consommation. Dans l'alimentation, c'est sous forme de salade, de consommé, de feuilles d'algues reconstituées ou encore de sushis que se dégustent les algues. Plus récemment, ce sont les composés extraits des algues qui ont fait l'objet d'une très forte demande sur le marché mondial en réponse à l'intérêt et à la diversité des applications qui en découlent. Les industries de l'agroalimentaire, des cosmétiques, du textile, de la thalassothérapie, de la diététique, de la pharmacologie et de l'énergie sont toutes à l'affût des dernières découvertes algales.

#### 1.2.2 COMPOSITION NUTRITIONNELLE DES ALGUES

L'intérêt nutritionnel exploité de cet aliment par les populations de l'Asie a permis de réaliser des études épidémiologiques dans cette région. Il a été mis en évidence que les plus faibles incidences du cancer du sein, du côlon et de la prostate étaient liées à la consommation régulière d'algues par ces populations. Ces résultats suggèrent de possibles rôles sur la santé des facteurs nutritionnels liés à la présence de différents nutriments dans les algues comme des polysaccharides sulfatés, des minéraux, des oligoéléments, des protéines, des métabolites secondaires tels que les polyphénols, les caroténoïdes, les stérols et les bétaines (Marfaing & Lerat, 2007).

Par ailleurs, on y retrouve aussi une importante quantité de fibres de structures variées, représentant 33 à 61 % de leur masse, qui diffèrent grandement de celles des végétaux terrestres (Gomez-Ordez et al., 2010). Selon l'espèce, la fraction des fibres solubles constituée d'agars, de carraghénanes, de xylanes, d'alginate, de fucanes, de laminaranes et d'ulvanes offre un intérêt particulier associé leur nature originale. Plus précisément, les oligoalginates et oligolaminaranes qui résultent de leur dégradation ont démontré des activités bifidogène *in vitro*, ce qui laisse place à des applications dans le

domaine des prébiotiques (Marfaing & Lerat, 2007). Les algues puisent dans leur environnement aquatique une quantité impressionnante de minéraux d'une remarquable richesse qui forment jusqu'à 36 % de leur poids sec (Marfaing & Lerat, 2007). Le calcium, le sodium, le magnésium, le potassium, le phosphore, l'iode, le fer, le zinc et bien d'autres ont été observés. Plus spécifiquement, les algues sont une source végétale importante de calcium, avec des teneurs de 6 % du poids sec chez les macroalgues (*Ulva* sp) et de magnésium avec des concentrations moyennes pouvant atteindre 4,7 g par 100 g de matière sèche (*Ulva* sp). Toutes catégories confondues, se sont les algues brunes qui possèdent la teneur d'iode la plus importante. Les laminaires et les fucales peuvent en contenir, respectivement, jusqu'à 1500 à 8000 mg/kg et 500 à 1000 mg/kg de poids sec (Marfaing & Lerat, 2007). L'iode est un composé de la structure moléculaire de deux hormones thyroïdiennes qui régulent la thermogénèse, l'homéostasie glucidique et lipidique: la triiodothyrosine (T3) et la tétraiodothyrosine (thyroxine ou T4) (Viguerie et al., 2005). De plus, l'iode est retrouvé fréquemment dans des suppléments pris pour favoriser la perte de poids, car l'activité endocrinienne à laquelle il participe régule les gènes de l'obésité et stimule le métabolisme. La composition algale en vitamine est assez complète. Une particularité est que la vitamine B<sub>12</sub> y est retrouvée en bonne concentration, tandis qu'elle est inexistante chez les plantes terrestres. Pour un apport protéinique complet, l'algue devient un bon aliment alternatif. L'activité antioxydante des polyphénols, encore appelés phlorotannins, se retrouve uniquement dans les algues brunes. Leurs grandes possibilités d'activité biologique en font de bons agents potentiels contre les stress oxydatifs. Particulièrement abondants chez les algues brunes, un autre type d'antioxydants puissants sont les caroténoïdes, notamment la fucoxanthine, le  $\beta$ -carotène et la violaxanthine (Gonzalez et al., 1999).

### 1.2.3 LE MARCHÉ MONDIAL DES ALGUES

Sur la côte est des États-Unis et du Canada, Acadian Seaplants (Dartmouth, N-É, Canada) est la seule compagnie qui cultive les macroalgues sur le rivage et dans des réservoirs, spécialement pour la consommation humaine et leur marché est en pleine

expansion avec des exportations vers le Japon (Barsanti & Gualtieri, 2006). En plus de la consommation directe, l'agar et la carraghénane, extraits de macroalgues rouges, et l'alginate extrait de macroalgues brunes, ont été intégrés à la composition de nombreux produits alimentaires préparés principalement pour la modification de la viscosité et de la texture. L'utilisation globale des macroalgues est en croissance et en terme de récolte de biomasse par an, elles sont le plus important organisme marin cultivé (Barsanti & Gualtieri, 2006).

En 2006, 42 pays rapportaient une activité commerciale en lien avec des macroalgues. La Chine détient le premier rang de production, principalement composée de *Saccharina* sp, suivie de la Corée du Nord, de la Corée du Sud, du Japon, des Philippines, du Chili, de la Norvège, de l'Indonésie, des États-Unis et de l'Inde (Barsanti & Gualtieri, 2006). Ces dix pays contribuent à 95 % du volume commercial des macroalgues et 90 % de cette production est basée sur des pratiques d'algoculture (Barsanti & Gualtieri, 2006). *Saccharina japonica*, la plus cultivée, à elle seule représente plus de 60 % du total de macroalgues produites tandis que *Porphyra*, *Kappaphycus*, *Undaria*, *Euclima* et *Gracilaria* complètent le reste de la production jusqu'à 99 %. Selon la FAO, de 1981 à 2002, la quantité totale mondiale de macroalgues récoltées est passée de trois millions de tonnes, à près de 13 millions de tonnes, en poids humide (Barsanti & Gualtieri, 2006). En 2007, la production mondiale s'élevait à 14 millions de tonnes pour une valeur de huit milliards de dollars américains (Cartier & Guillou, 2010). Un cinquième de cette production est assuré par la Chine, le Japon et la Corée. Une proportion de 75 % de celle-ci est destinée à l'alimentation humaine directe, 12,5 % à l'extraction de colloïdes et le restant est exploité dans différents secteurs comme l'agriculture, l'alimentation animale et le secteur des cosmétiques (Marfaing & Lerat, 2007).

Au Québec, plusieurs espèces fréquemment retrouvées dans l'estuaire du Saint-Laurent sont comestibles telles que les laminaires (algues brunes) et la main de mer palmée (*Palmaria palmata*, algue rouge). Ce sont les algues brunes qui sont les plus

récoltées bien que les algues vertes et rouges soient des espèces émergentes d'intérêt (MPO, 2010). La cueillette d'algues se pratique dans la baie d'Ungava, sur la Côte-Nord, en Gaspésie et dans le Bas-Saint-Laurent (Cartier & Guillou, 2010). Les études sur les ressources algales du Québec sont extrêmement rares et dans la plupart des cas, datant de plusieurs dizaines d'années. Par contre, avec l'intérêt récent de la valorisation des macroalgues, quelques données récentes commencent à être disponibles. Dans le golfe du Saint-Laurent et sur les côtes atlantiques de Terre-Neuve et de la Nouvelle-Écosse, ce sont les algues brunes qui forment la plus grande partie de la biomasse végétale dans la bande côtière (Gendron, 1983). De grands herbiers denses de fucus et d'ascophylles sont présents dans la zone intertidale tandis que les laminaires forment des forêts sous-marines immergées en permanence sous la limite de la marée basse. Les rares informations disponibles indiquent un important volume d'algues le long des côtes du Québec. Plus précisément dans la Baie des Chaleurs, entre New-Richmond et Paspébiac, la biomasse des laminaires a été évaluée à 25 000 tonnes métriques en 1982 (Gendron, 1983). Au Nunavik, totalement au nord du Québec, dans la baie d'Ungava, les inventaires réalisés en 2006 par la compagnie Nunavik BioScience indiquent que les volumes de fucus pourraient atteindre 82 000 tonnes tandis que dans la baie de Payne, des herbiers de laminaires d'une superficie de 100 hectares pourraient atteindre une biomasse de 10 000 tonnes (Sharp *et al.*, 2008).

#### 1.2.4 LES USAGES COMMERCIAUX DES ALGUES

Les usages commerciaux actuels des algues se retrouvent dans les domaines des nutraceutiques, de l'aquaculture, des pharmaceutiques, de l'agroalimentaire et des cosmétiques (Milledge, 2011). Malgré le fait que le potentiel des algues soit bien plus grand, les principaux produits commerciaux apparaissent comme étant les produits de

santé naturels et les nutraceutiques qui sont malheureusement sujets aux modes et aux vagues d'intérêts des consommateurs (Milledge, 2011). L'autre important domaine d'applications commerciales est celui des additifs alimentaires sous forme de phycocolloïdes, de caroténoïdes, de pigments et d'acides gras. Ces molécules ont certains avantages fonctionnels en comparaison avec les produits synthétiques comme fournir l'isomère naturel de la  $\beta$ -carotène dans son ratio naturel. L'isomère naturel de la  $\beta$ -carotène a un taux d'assimilation supérieur à la forme trans-synthétique ce qui maximise entre autres la coloration de la chair des animaux qui la consomment (Milledge, 2011; Spolaore et *al.*, 2006). Toutefois, leur coût de production beaucoup plus imposant crée un désavantage majeur dans un marché compétitif. À la base de la chaîne alimentaire, les algues jouent un rôle déterminant dans l'aquaculture étant la source de nourriture de plusieurs larves de mollusques, de crustacés et de poissons. De plus, elles servent à l'alimentation du zooplancton, qui à son tour, nourrit l'élevage larvaire.

Tout comme les plantes terrestres, les algues marines contiennent des composés organiques et inorganiques qui peuvent améliorer la santé humaine (Kuda et *al.*, 2002). Les algues marines sont une importante source de composés bioactifs grâce à leur capacité de produire une grande variété de métabolites secondaires caractérisés par un large spectre d'activités biologiques. Dans les dix prochaines années, de nombreuses indications laissent supposer que le domaine de l'aquaculture prendra une grande part du marché des algues, mais les pharmaceutiques et les biocarburants sont en tête de liste quant aux attentes du domaine (Pulz & Gross, 2004). Les applications écologiques des algues telles que les traitements des eaux usées, la fixation de l'azote en agriculture et la décontamination de sols ont aussi des potentiels économiques prometteurs. Même si la culture d'algues pour l'alimentation animale et pour les aliments fonctionnels semble être sur le point d'atteindre une production de masse capable de maintenir une demande, beaucoup d'applications appartiennent encore au futur. Il est donc important de poursuivre les recherches sur le potentiel de valorisation des nutriments, des métabolites secondaires et des éléments de structures des algues marines qui est immense.

### 1.3 POTENTIEL ANTIOXYDANT

Il est bien établi que les algues sont une source importante d'antioxydants lorsqu'elles sont intégrées à la diète en fournissant des vitamines A, C et E, des caroténoïdes, des polyphénols, du glutathion et des minéraux (Pietta, 2000). Une molécule antioxydante est un inhibiteur de l'oxydation d'une molécule. L'oxydation est définie chimiquement comme étant la portion d'une réaction d'oxydoréduction qui est caractérisée par une perte d'électron ou par l'augmentation du nombre d'électrons de l'élément oxydé. Il peut en résulter une production de radicaux libres qui déclenche une réaction en chaîne d'oxydation appelée stress oxydatif. Quand ces réactions surviennent dans une cellule, elles peuvent causer de sérieux dommages ou la mort de celle-ci. Ces dommages ont la capacité d'entraîner des conditions dégénératives liées à l'âge, des cancers, des tumeurs et bien d'autres maladies (Hassan et *al.*, 2011; Stahl & Sies, 2007; Tapiero et *al.*, 2004; Valko et *al.*, 2007). Les antioxydants interviennent auprès des intermédiaires des radicaux libres pour interrompre la réaction en chaîne en s'oxydant grâce à un transfert d'électron ou bien d'un atome d'hydrogène. Ils sont définis comme agents réducteurs tels que le thiol, l'acide ascorbique et les polyphénols (Sies, 1997). Toutefois, paradoxalement, l'oxydation est une réaction vitale pour le métabolisme même si elle peut être dommageable.

#### 1.3.1 LES ANTIOXYDANTS ET L'ORGANISME

La vaste majorité de la vie sur Terre nécessite de l'oxygène qui est une molécule hautement réactive et qui donne lieu à la création d'espèces oxygénées réactives (ROS) (Davies, 1995). L'environnement des algues marines est rude et la combinaison de lumière et d'importantes concentrations en oxygène favorisent la formation de radicaux libres et d'autres agents oxydatifs puissants. Cependant, les algues marines ne semblent



pas souffrir d'aucun dommage métabolique sérieux ce qui suggère que leurs cellules possèdent leurs propres mécanismes de protection. Effectivement, en réponse aux ROS, les organismes ont développé des processus complexes, ainsi que des métabolites et des enzymes antioxydantes qui travaillent conjointement pour prévenir les dommages oxydatifs (Sies, 1997; Vertuani et *al.*, 2004). Le glutathion, les vitamines C et E ainsi que des enzymes telles que la catalase, la superoxyde dismutase et diverses peroxydases font partie de ces adaptations.

Tous ces systèmes préviennent la formation des ROS et les inactivent avant qu'ils puissent endommager les composants vitaux des cellules. Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'acide hypochlorique (HClO), les radicaux hydroxyle ( $\cdot OH$ ) et les anions superoxydes ( $O_2^-$ ) sont tous des ROS créés dans les cellules (Valko et *al.*, 2007). Le radical hydroxyle est particulièrement instable et réagit rapidement, de façon non spécifique avec les molécules biologiques. Si ces molécules sont de l'ADN, cela peut causer des mutations qui, à leur tour, peuvent mener à de la cancérogénèse, de l'inhibition enzymatique ainsi qu'à la dénaturation et à la dégradation de protéines (Nakabeppu et *al.*, 2006; Stadtman, 1992). Le but n'est pas d'inhiber totalement les réactions d'oxydation, mais de les maintenir à un niveau optimal. Le corps humain se défend en synthétisant des enzymes à partir des constituants de l'organisme ou en absorbant des composés au potentiel antioxydant qui ne peuvent être synthétisés par l'organisme. On parle entre autres de vitamines E et C, de caroténoïdes, de sélénium, de folates, de tannins, de phénols (Pelli & Lyly, 2003). Le stress oxydatif est à la fois la cause et la conséquence de plusieurs maladies chez l'homme telles que les maladies neurodégénératives, l'inflammation chronique, certains cancers et des troubles coronariens (Stahl & Sies, 2007; Valko et *al.*, 2007). C'est pourquoi les antioxydants ont été grandement étudiés en pharmacologie et en nutrition (Edge et *al.*, 1997; Finkel & Holbrook, 2000; Hassan et *al.*, 2011; Yamamoto et *al.*, 2011).

### 1.3.2 LES ANTIOXYDANTS ET L'INDUSTRIE

La fin du 19<sup>e</sup> siècle a donné lieu à d'importantes recherches sur l'utilisation des antioxydants dans des procédés industriels comme la prévention de la corrosion des métaux, de la polymérisation des combustibles dans les moteurs à combustion et la vulcanisation du caoutchouc (Mattill, 1947). Les applications industrielles des molécules antioxydantes varient de la préservation des aliments et des cosmétiques à la stabilisation de combustibles, de plastiques et de lubrifiants. En 2007, le marché global des antioxydants industriels tournait autour de 880 000 tonnes et générait des revenus de 3,7 milliards de dollars américains (Ceresana Research, 2008). Les antioxydants synthétiques, préparés en laboratoire, dominent le marché grâce à leurs prix beaucoup plus compétitifs (Spolaore et *al.*, 2006). Cependant, à la demande du consommateur, beaucoup plus d'antioxydants naturels commencent à être intégrés dans l'alimentation. En aquaculture, les molécules naturelles telles que l'astaxanthine sont aussi préférées, car l'absorption est plus efficace ainsi que la coloration de la chair qui est recherchée pour que l'aliment soit plus attrayant pour le consommateur (Milledge, 2011; Pulz & Gross, 2004; Stahl & Sies, 2007). Les algues sont la principale source commerciale de pigments et d'antioxydants naturels. Elles sont un choix intéressant pour l'industrie grâce à leur possibilité d'être employées comme une bioraffinerie servant à la synthèse de molécules complexes et exploitables.

### 1.3.3 LES TYPES D'ANTIOXYDANTS

#### 1.3.3.1 De type enzymatique

L'activité antioxydante est principalement régulée par une panoplie d'enzymes présentes dans l'organisme. Rencontrée sous différentes isoformes, la superoxyde

dismutase a comme rôle l'accélération de la dismutation (réaction d'oxydo-réduction) de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène pour arrêter les réactions de stress oxydatif qu'il induit. L'anion superoxyde et son potentiel oxydant est connu pour provoquer la peroxydation des lipides et peut aussi générer des radicaux plus réactifs. La catalase est une enzyme qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. La majorité des cellules aérobiques possèdent cette enzyme qui se trouve en forte quantité dans le foie et les érythrocytes où l'oxygène est présent en grande concentration, ainsi que dans le cytosol et les peroxysomes (Tahi, 2004). Le glutathion est un tripeptide ayant une liaison  $\gamma$ -amide inhabituelle qui participe à plusieurs processus de détoxification, de transport et de métabolisme (Voet & Voet, 2005). Le rôle de la glutathione peroxydase est aussi la dismutation du peroxyde d'hydrogène, mais aussi celle des peroxydes lipidiques qui réagissent avec les doubles liaisons des acides gras dans les membranes cellulaires ce qui forme des hydroperoxydes organiques qui à leur tour entraînent la rupture de liaisons C-C d'acides gras.

### **1.3.3.2 De type non enzymatique**

#### **1.3.3.2.1 Les minéraux et vitamines**

Toute une gamme de molécules, sans être une enzyme, possède des activités biologiques qui sont associées au potentiel antioxydant. Les minéraux sont une classe importante connue interagissant entre autres avec les enzymes brièvement présentées précédemment. Une autre catégorie de molécules ayant des implications dans les mécanismes antioxydants est celle des vitamines. Elles sont indispensables au métabolisme et ne peuvent être synthétisées en quantité suffisante pour le bon fonctionnement de l'organisme humain. Ce type de molécules organiques est une coenzyme renfermant un ou plusieurs radicaux nécessaires à la synthèse d'une enzyme ou d'une hormone.

### 1.3.3.2.2 Les phénols

Les composés phénoliques ou les polyphénols forment l'un des groupes de molécules les plus importants avec plus de 8000 structures connues (Soobrattee et *al.*, 2005). Les phénols sont les composés qui possèdent au moins un groupe hydroxyle lié à un des carbones d'un cycle benzénique et ils ont été répertoriés dans des centaines de plantes terrestres et aquatiques (Fig. 2) (Arnaud et *al.*, 2009).

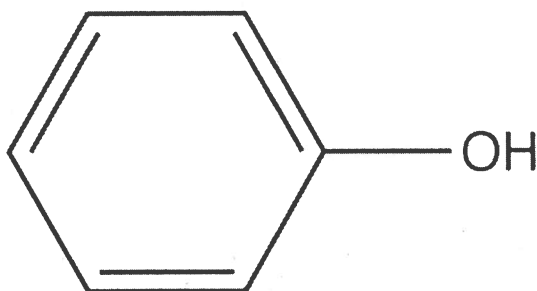


Figure 2 : Structure moléculaire du phénol (Harrison, 2011)

Omniprésents chez les métabolites secondaires du règne végétal, les polyphénols se retrouvent sous la forme de molécules simples (acide phénolique, flavonoïde), ou encore de composés hautement polymérisés (mélanine, tannins) (Bravo, 1998). Parmi les polyphénols les plus abondants, on peut citer l'épicatéchine, le kaempférol, l'acide ellagique, l'acide cinnamique, la procyanidine B1, les tocophérols, les tannins et les acides phénoliques ainsi que les flavonoïdes qui sont une famille de molécules ayant un squelette formé de 15 atomes de carbone (Haslam, 1989; Shukla et *al.*, 1997). Les bienfaits des polyphénols sont principalement dus à leur potentiel antioxydant, à leur capacité de neutraliser les radicaux libres, à leur aptitude de chélation d'ions métalliques impliqués dans des réactions d'oxydoréduction (redox), la modulation d'expression génique et dans leur interaction avec la signalisation cellulaire (Soobrattee et *al.*, 2005). Ils interviennent ainsi dans le stress oxydatif, les maladies neurodégénératives, le cancer,

le diabète, les dysfonctions cardiovasculaires, l'inflammation chronique et le vieillissement.

Depuis quelques années, l'intérêt grandit pour les sources naturelles d'antioxydants et d'antimicrobiens dans l'optique d'une réduction de l'utilisation des formes synthétiques comme le BHA (butylhydroxyanisol) et le BTH (butylhydroxytoluène). Les antioxydants provenant des plantes peuvent réagir rapidement avec les radicaux libres conférant un ralentissement ou une diminution de la détérioration oxydative d'une cellule ou bien pour la préservation de la qualité et l'augmentation de la conservation d'un aliment (Cox et *al.*, 2010).

#### 1.3.3.2.3 Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments tétraterpénoïdes organiques, synthétisés dans les chloroplastes et les chromoplastes des plantes, des algues, mais aussi synthétisés par quelques bactéries et certains types de champignons. Toutefois les animaux et les humains sont incapables d'en produire et pour compenser ils les incorporent à leur diète (Tapiero et *al.*, 2004). Il y a plus de 600 structures connues se différenciant en deux classes. Celle des xanthophylles qui contient un ou plusieurs atomes d'oxygène et celle des carotènes qui sont hydrocarbonés, sans oxygène. Les caroténoïdes sont formés de huit unités isoprènes avec, généralement, un certain nombre de cycles et des doubles liaisons conjuguées (Seyhan, 2004).

Ces composés naturels liposolubles sont des micronutriments majeurs dans la diète humaine et ceux les plus importants quantitativement sont la  $\beta$ -carotène, le lycopène, la lutéine, la  $\beta$ -crytoxanthine, la zéaxanthine et l'astaxanthine (Riccioni, 2009). Ils sont aussi responsables de plusieurs fonctions physiologiques, dont celle d'être des précurseurs de la vitamine A et ils stimulent le système immunitaire. Dans l'organisme

humain, les caroténoïdes participent aussi au système de défense cellulaire grâce à leur structure chimique qui leur octroie un potentiel antioxydant (Müller et *al.*, 2011).

Chez les plantes, les caroténoïdes jouent un rôle de protection lors des procédés de photooxydation et ils sont des antioxydants efficaces contre les radicaux peroxydes et les molécules d'oxygène singlet (Stahl & Sies, 2003). En général, les plantes marines possèdent significativement moins d'épibiontes sur leurs thalles comparativement aux biofilms du substrat non vivant qui les entoure. Par conséquent, il a été suggéré que les plantes se défendent via la production de métabolites secondaires qui préviennent l'attachement et la croissance des colonies microbiennes (Lam & Harder, 2007; Maximilien et *al.*, 1998).

L'action antioxydante des caroténoïdes est due à leur capacité de neutraliser un singlet d'oxygène et à trapper les radicaux peroxydes (Stahl & Sies, 1996). Ils réagissent plus rapidement avec les radicaux peroxydes que les chaînes acyles insaturées, mais dans ce procédé de protection le caroténoïde est détruit (Woodall et *al.*, 1997). Ils sont présents dans les membranes cellulaires où ils font partie intégrante du complexe membranaire. Leur orientation et localisation dans cette dernière définiront l'importance de leur potentiel antioxydant (Paiva & Russell, 1999). Indépendamment de l'activité de la vitamine A, ils protègent partiellement ou entièrement les cellules, plus spécifiquement les cellules HepG2 du foie, contre les oxydants induisant la peroxydation des lipides (Martin et *al.*, 1996). En association avec les lipoprotéines, ils protègent les lipoprotéines de faible densité (LDL) d'une modification oxydative qui est connue pour être une étape critique du début de l'artériosclérose (Paiva & Russell, 1999; Pavia et *al.*, 1998).

Les caroténoïdes pourraient être utilisés comme un moyen peu coûteux de prévention ou un possible traitement pour une population humaine possédant un niveau élevé de stress oxydatif (Lichtenstein, 2009). Certaines études démontrent leur potentiel

contre les maladies cardiovasculaires et le cancer de la peau (Fraser & Bramley, 2004; Inbaraj *et al.*, 2008; Kohlmeier & Hastings, 1995).

## 1.4 MICROBIOLOGIE

Les microorganismes sont un groupe qui comprend les bactéries, les mycètes, les protozoaires, les algues microscopiques et les virus (Tortora *et al.*, 2012). En plus d'être une source d'éléments nutritifs pour ceux qui les consomment, les aliments sont aussi un milieu propice au développement de microorganismes. On les emploie à la création de délicieux produits comme le chocolat, les saucissons, les fromages, le vin et la bière. Cependant, les microorganismes sont aussi responsables de l'altération et de la détérioration d'aliments ainsi que la transmission de maladies. La microbiologie alimentaire se spécialise en détection et en contrôle de pathogènes tout au long de la séquence de manipulations que subissent les denrées alimentaires, depuis la production jusqu'aux consommateurs. Avec les problèmes liés à la résistance aux antibiotiques et la tendance des consommateurs à vouloir éliminer les produits de synthèse de leur alimentation, les molécules naturelles prennent de l'importance en recherche. Elles sont une excellente alternative, tout en permettant la valorisation de la biomasse. Dans cette étude, afin de vérifier si les extraits totaux et les fractions algales produites sont une excellente source de molécules antibactériennes à valeur ajoutée permettant la valorisation d'un produit du Saint-Laurent, les bactéries qui ont été sélectionnées sont connues pour être impliquées dans la contamination agroalimentaire ou de produits cosmétiques.

### 1.4.1 LES SOUCHES BACTÉRIENNES

#### 1.4.1.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* est un bacille gram négatif qui appartient à la famille des Enterobacteriaceae. *E. coli* croit dans une échelle de température variant entre 7 °C et 50 °C, la température optimale étant de 37 °C (OSM, 2011). Certaines souches peuvent se multiplier dans des milieux acides allant jusqu'à pH 4,4, ainsi que dans des aliments dont l'activité de l'eau est au minimum de 0,95 (OSM, 2011). Les conditions de croissance influencent sa taille, qui lorsqu'elles sont appropriées, donnent lieu à des bactéries plus allongées et plus grandes que celles quiescentes. Retrouvée communément dans la microflore commensale intestinale de l'homme et des animaux, la bactérie *E. coli* s'établit dans le tractus digestif dans les jours qui suivent l'accouchement. Les vecteurs de transmission à l'homme sont la consommation d'aliments contaminés, viande hachée crue ou mal cuite, le lait cru, etc.

#### 1.4.1.2 *Micrococcus luteus*

*Micrococcus luteus* est une bactérie Gram-positif, de 0,5 à 3,5 micromètres de diamètre, oxydase-positif et sporophyte appartenant à la famille des *Micrococcaceae* (Madigan & Martinko, 2005). Elle se retrouve de façon générale dans les environnements avoisinant les 37 °C. Elle vit en aérobie obligatoire, mais peut tolérer des concentrations de dioxyde de carbone très basses ainsi qu'un potentiel hydrique réduit, de fortes dessiccations et des concentrations salines importantes (M. Kocur et al., 2006). Elle forme des colonies pigmentées jaunes. *M. luteus* se retrouve dans le sol, les poussières, l'eau douce et de mer, l'air, les plantes, les vecteurs passifs et fait partie de la flore normale de la peau des mammifères (Bannerman & Peacock, 2007; Smith et al., 1999).

#### 1.4.1.3 *Brochothrix thermosphacta*

*Brochothrix thermosphacta* est un bacille à Gram positif, ramifié, de 0,6 à 0,75 µm de diamètre sur 1 à 2 µm de longueur, isolée ou groupée en courtes chaînes pouvant



se retrouver sous une forme coccoïdale dans des cultures âgées. Elle est non capsulée, non sporulée, immobile, oxydase négative, non pigmentée, catalase positive et aéroanaérobie. Sa température optimale de croissance se situe entre 20 et 25 °C, mais elle tolère une échelle de température allant de 0 à 30 °C. Un pH en dessous de 3,9 ne permet aucune croissance, mais elle est observée entre les pH de 5 et 9. La bactérie *B. thermosphacta* a comme habitat le sol, les végétaux, les fèces et la laine de mouton ainsi que la surface de certains fromages. Les espèces du genre *Brochothrix* ne sont pas considérées comme étant pathogènes, cependant *B. thermosphacta* est connue pour être un agent d'altération des viandes et de denrées alimentaires entreposées à l'air libre ou sous atmosphère modifiée dans des enceintes réfrigérées. Favorisée par la conservation à basse température, elle constitue la flore dominante des produits carnés réfrigérés et a été isolée de viandes de bœufs, de porcs, d'agneaux, de volailles, de poissons fumés, de crustacés et de charcuteries telles que la saucisse (Hovda et al., 2007).

#### 1.4.2 LES ANTIMICROBIENS ET L'INDUSTRIE

Depuis quelque années, les consommateurs réclament des aliments frais, avec un minimum de procédés de conservation et de transformation ce qui nécessite aussi une augmentation de la prudence et de la qualité des produits offerts. La pression créée sur la communauté scientifique et l'industrie alimentaire de retirer progressivement les agents de conservation chimiques a généré un intérêt pour les extraits naturels et les molécules dérivées de bioressources ainsi que le besoin de trouver des composés naturels antimicrobiens alternatifs (Cox et al., 2010).

Avec l'augmentation considérable des maladies cardiovasculaires, l'industrie agroalimentaire se voit demander de réduire les quantités de sodium qu'elle inclue dans ses produits. Cependant, le sel est non seulement ajouté aux aliments pour relever leur goût, mais aussi pour la prévention de croissance microbienne en créant des conditions

de croissance défavorables. Plusieurs inquiétudes ont été soulevées quant à la manière de garantir une même qualité de conservation malgré sa diminution dans les aliments. Chaque année, environ un tiers de la nourriture produite pour la consommation humaine est perdue ou gaspillée ce qui représente près de 1,3 milliard de tonnes par an. Pour chaque personne en Amérique du Nord, la perte d'aliments est de 280 à 300 kg par an (Gustavson, et *al.*, 2011). Le besoin de nouveaux types d'agents de conservation, entre autres contre les microorganismes, entraîne la recherche de nouvelles sources de biomasses dont celles d'origine marine qui proposent une toute autre approche grâce à ses mécanismes d'action qui diffèrent des sources terrestres.

Les phénomènes d'adaptation des macroalgues marines aux contraintes de leur environnement, leur permettent de produire des métabolites secondaires structurellement uniques et biologiquement actifs impliqués dans leur mécanisme de défense. Les agents bactéricides issus des algues incluent notamment les acides aminés, les terpénoïdes, les composés phénoliques, les stéroïdes et les acides gras (Watson & Cruz-Rivera, 2003). Malgré ces informations, peu de recherches supportent le fait que les algues marines possèdent des potentiels antimicrobiens (Cox et *al.*, 2010; Ganesan et *al.*, 2008; Plaza et *al.*, 2010). Pourtant, aucune donnée n'est rapportée sur les potentiels des macroalgues du Saint-Laurent. Les dérivés algaux présentent une possibilité intéressante de valorisation de biomasse passant par des applications dans le domaine agroalimentaire, des nutraceutiques et des cosmétiques.

#### 1.4.3 APPROCHE DES MÉTHODES

Pour des fins d'applications industrielles et commerciales, les produits issus de la valorisation de la biomasse algale doivent être concurrentiels sur un vaste marché ou encore doivent générer des profits suite à leur utilisation conduisant à un avantage

compétitif clair (Milledge, 2011). Bien que certaines molécules aient des caractères thermosensibles ou encore photosensibles, aucune précaution supplémentaire n'a été prise pour préserver leur intégrité. Les recherches se sont plutôt penchées sur les composés stables présents dans les extraits algaux. La raison est que dans un contexte commercial, les molécules peu stables engendrent des coûts additionnels considérables de production ce qui, en général, diminuent leur valeur. L'éthanol est l'un des rares solvants organiques à pouvoir être employé dans les processus de production de composés dont l'usage est destiné aux industries impliquant des risques d'intoxication comme celle de l'agroalimentaire et c'est pourquoi il a été sélectionné. De plus, sa polarité permettait d'obtenir un grand éventail de molécules tout en garantissant sa présence à l'état de trace suite à son évaporation. En partant du principe que ce projet de recherche fondamentale était la première étape vers de la recherche plus appliquée, le choix d'une méthode d'extraction semi-automatisée s'est arrêté sur l'extraction accélérée par solvant (ASE). Cette méthode reflète mieux le type d'extraction à grande échelle que l'on peut retrouver dans l'industrie. L'ASE combine une température d'extraction pouvant être contrôlée et une pression importante pour augmenter l'efficacité du processus d'extraction en diminuant le temps nécessaire, en réduisant significativement l'utilisation de solvant, en augmentant la solubilité des analytes, en réduisant l'effet de matrice et en accélérant la diffusion de l'analyte de la matrice vers le solvant (Dionex Corporation, 2010).

## 1.5 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Lors de cette présente étude, on pose l'hypothèse que les extraits éthanoliques des macroalgues *Ascophyllum nodosum*, *Saccharina longicuris* et *Ulva lactuca* possèdent

un potentiel d'activités antioxydantes et antimicrobiennes contre des souches bactériennes d'intérêt en agroalimentaire. Les objectifs qui en découlent sont :

1. Production des extraits éthanoliques des macroalgues marines *Ascophyllum nodosum*, *Saccharina longicruris* et *Ulva lactuca* avec la technique d'extraction accélérée par solvant (ASE).
2. Détermination de l'activité antioxydante des molécules extraites avec la technique *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC), le dosage de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et la technique de *Ferric Reducing Antioxydant Power* (FRAP).
3. Détermination de l'activité antibactérienne des pigments sélectionnés selon la méthode de microdilution en microplaques avec les souches bactériennes *Escherichia coli* (ATCC 25922, Gram-), *Micrococcus luteus* (ATCC 9342, Gram+) et *Brochothrix thermosphacta* (ATCC 11509, Gram+).
4. Caractérisation plus spécifique des fractions ayant présenté une forte activité antibactérienne et antioxydante par fractionnement bioguidé.

Ce projet s'insère dans un volet plus vaste d'études du laboratoire de recherche en biotechnologies et chimie de l'environnement CRABE (Collectif de Recherche Appliquée aux Bioprocédés et à la chimie de l'Environnement), dirigé par Lucie Beaulieu, sur la valorisation de plusieurs types de biomasse d'origine marine et la caractérisation des interactions chimiques des composés à valeur ajoutée.

## CHAPITRE 2

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1 PRODUITS CHIMIQUES ET APPAREILS

Les produits chimiques utilisés lors de ce projet sont l'acide gallique, 2,4,6-tri-2-pyridinyl-1,3,5-triazine (TPTZ), la fluorescéine, le réactif Folin-Ciocalteu, le dihydrochlorure de 2,2'-azobis-2-méthyl-propanimidamide (AAPH), le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), l'acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchromane-2-carboxylique (Trolox), le chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ), le phosphate de sodium dibasique, le phosphate de sodium, le carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), tous obtenus chez Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). L'acide chlorhydrique (HCl), le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'acétate de sodium trihydrate, l'acide acétique glacial ainsi que le gel de silice S833-1, grade 60, taille 170-230, ont été achetés chez Fisher Scientific Company (Ottawa, ON, Canada). Le méthanol, l'éthanol anhydre, le n-hexane et le propanol qui ont été utilisés sont de grade analytique (Fisher Scientific Company, Ottawa, ON, Canada). Les milieux de cultures *Tryptic Soy Broth* (TSB), lot 72832127, et *Tryptic Soy Agar* (TSA), lot 73832127, proviennent des Laboratoires QUELAB (Montréal, QC, Canada) et la gentamicine servant de standard pour les analyses antibactériennes, de VWR International (Ville Mont-Royal, QC, Canada).

Les appareils utilisés sont l'extracteur Dionex ASE-200 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA), l'évaporateur centrifuge Genevac EZ-2 Plus (SP Scientific, Stone Ridge, NY, USA), l'évaporateur rotatif Rotavapor R-114, équipé de la pompe Vacuum pump V-700 (BUCHI Corporation, Thornhill, ON, Canada), le spectrophotomètre lecteur de microplaque PowerWave™ XS2 (BioTek, Winooski, VT, USA) et les spectrophotomètres TECAN *Spectrafluorplus* (MTX Lab System, inc.,

Vienna, VA, USA), Genesys 20 (Thermo Scientific, Ottawa, ON, Canada) et SpectraMax® Gemini (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

## 2.2 ÉCHANTILLONS

Les algues, séchées et broyées, ont été fournies par la compagnie Organic Ocean Inc. (Rimouski, Qc, Canada). Les numéros de lots sont 2009-OC-10 pour *Ascophyllum nodosum*, 2011-JL-06 pour *Saccharina longicurris* et 2008-JN pour *Ulva lactuca*.

## 2.3 EXTRACTION

L'extraction ASE des macroalgues a été réalisée avec l'appareil Dionex ASE-200®. Exactement, environ 5 g d'échantillon ont été pesés dans une nacelle, puis mélangés avec de la terre de diatomée et transférés dans une cellule d'acier inoxydable de 1 mL, bien identifiée. Le matériel a été bien tassé et la cellule comblée jusqu'à ras le bord avec de la terre de diatomée. Des vials vides de 40 mL et leurs bouchons respectifs ont été identifiés et pesés. Les cellules et les vials ont été déposés, à leur place respective, sur le carrousel automatique de l'extracteur Dionex ASE-200®. Un seul cycle d'extraction liquide pressurisée à l'éthanol (100 %) s'est effectué à 1500 PSI, à deux températures différentes de 80 et 50 °C, avec une minute de préchauffage, cinq minutes de chauffage et cinq minutes de plateau. Pour limiter l'obstruction de l'orifice à la sortie de la cellule par la terre de diatomée, un cycle de rinçage a été effectué (annexe I-1). Chaque vial contenant l'extrait liquide a été pesé, puis son contenu a été évaporé avec l'aide d'un évaporateur centrifuge Genevac EZ-2 Plus. Enfin, le vial et son contenu sec ont été repesés pour obtenir le poids sec de l'extrait. Tous les extraits ont été conservés à -80 °C, à l'abri de la lumière, jusqu'à leur utilisation lors des différentes méthodes d'analyses utilisées.

## 2.4 CARACTÉRISATION CHIMIQUE

La caractérisation chimique des trois espèces d'algues sèches fournies par Organic Ocean a été réalisée par Merinov (Gaspé, Qc, Canada). La quantification des cendres a été faite selon la méthode No. 938.08 de l'AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) qui consiste à chauffer le matériel à 550 °C pendant 4 à 5 heures (A.O.A.C., 2002; Beaulieu et *al.*, 2010). Le taux d'humidité contenu dans les algues a été mesuré, après une désiccation à 105 °C, selon la méthode d'analyse No. 950.46 de l'AOAC (A.O.A.C., 2002; Beaulieu et *al.*, 2010). Les lipides ont été extraits avec un mélange miscible de chloroforme et de méthanol. La purification est réalisée en isolant la phase constituée de chloroforme. Cette méthode se base sur celle de Bligh et Dyer (1959). Le dosage des caroténoïdes totaux est réalisé selon la méthode de Simpson et Haard (1985). L'extraction est effectuée avec de l'acétone froide et la purification avec de l'éther de pétrole. Tandis que les protéines ont été déterminées par la méthode Kjeldahl (facteur de conversion de 6.25) qui est une adaptation de la méthode officielle de l'AOAC (No. 988.05). En résumé, l'azote protéique est transformé en ammoniac lors d'une digestion à chaud au peroxyde d'hydrogène et à l'acide sulfurique en présence d'un catalyseur (K/Cu/Ti). L'ammoniac, alors sous forme de sulfate d'ammonium, est recueilli par entraînement à la vapeur grâce à de l'acide borique, en solution alcaline. La concentration en azote est déterminée par un titrage à l'acide chlorhydrique. Le taux de protéine est obtenu grâce à un facteur de conversion propre à la nature du matériel employé.

## 2.5 MÉTHODES DE DOSAGE DU POTENTIEL ANTIOXYDANT

### 2.5.1 ESSAI DPPH

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) joue le rôle de radicaux libres stables et peut être efficacement réduit par les antioxydants présents dans l'échantillon ou le

standard. De couleur violet avec un spectre d'absorption à 520 nm, le radical vire au jaune pâle une fois réduit en hydrazine. Ce principe d'estimation est dit SET (*Single Electron Transfert*). La réaction de ce radical avec un antioxydant est un procédé cinétique de base. La méthode DPPH est rapide et reproductible tant que la couleur de l'échantillon n'interfère pas avec la lecture de l'absorbance (Lee et *al.*, 2001).

Le potentiel antioxydant des fractions éthanoliques totales des macroalgues *Ascophyllum nodosum*, *Saccharina longicuris* et *Ulva lactuca* a été déterminé utilisant la méthode DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl). Les mesures d'absorbance en cinétique ont été réalisées à température ambiante, pour une durée de 90 minutes et à une longueur d'onde de 520 nm.

### **2.5.1.1 Préparation de l'essai DPPH**

Toutes les manipulations ont été faites à l'abri de la lumière. La solution de DPPH 90 µM a été préparée avec l'aide de 0,0089 g de DPPH dissout dans 250 ml de méthanol.

L'ajout de 0,01 g de Trolox dans 100 ml de méthanol forme la solution stock du standard Trolox à 100 µg/ml. À partir de la solution stock, des dilutions, dans des tubes en verre, ont été effectuées pour la mise en microplaque. Les concentrations variaient entre 50 et 5 µg/ml.

Les solutions mères de 10 000 µg/ml des échantillons ont été obtenues par une dilution de 100 mg d'échantillon dans 10 ml de méthanol. Les solutions filles de 1000 µg/ml ont été produites par l'ajout de 1 ml de la solution mère dans 9 ml de méthanol (dilution 1/10). À partir de la solution fille, des dilutions ont été effectuées dans des tubes en verre pour la mise en microplaque. Les concentrations testées variaient entre 500 et 10 µg/ml et les détails des manipulations sont décrits à l'annexe I-2.



### 2.5.1.2 Mise en microplaque

Lors de la mise en microplaque, 300 µl du réactif DPPH ont servi de contrôle et 300 µl de méthanol ont servi de blanc. Dans chaque puits, 50 µl d'échantillon ou de standard ont été ajoutés à 250 µl de la solution DPPH. La plaque est mise dans le noir pendant 30 minutes à température ambiante pour laisser la réaction s'effectuer. Les lectures de l'absorbance ont été réalisées à 520 nm, avec le lecteur TECAN *Spectrafluorplus*.

### 2.5.1.3 Calculs

Pour une mesure fixe dans le temps à 91 min, l'équation 1 est utilisée pour le calcul du pourcentage de DPPH réduit (Mishra et *al.*2012):

$$\% \text{ DPPH réduit} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100 \quad (1)$$

$A_0$  et  $A_1$  correspondent à l'absorbance à 520 nm du radical DPPH, en l'absence et en présence de l'extrait total algal, respectivement.

La méthode d'analyse en cinétique est une adaptation de Mishra et *al.* (2012) et la diminution de l'absorbance a été mesurée sur une période de 90 minutes à différentes concentrations d'extraits algaux en vue d'obtenir un plateau de la diminution de l'absorbance du DPPH. La diminution en fonction du temps est de nature exponentielle pour les différentes concentrations testées.

## 2.5.2 ESSAI FRAP

La méthode FRAP mesure l'habilité d'un antioxydant à réduire le complexe tripyridyltriazine ferreux  $[\text{Fe(III)-(TPTZ)}_2]^{3+}$  en  $[\text{Fe(II)-(TPTZ)}_2]^{2+}$ , dans un milieu acide, par le biais d'un changement de couleur passant au bleu intense, mesuré à 593 nm. Cette méthode est classée SET (*Single Electron Transfert*) (Iris & Strain, 1996).

### 2.5.2.1 Préparation de l'essai FRAP

Toutes les manipulations ont été effectuées à l'abri de la lumière. La solution du tampon acétate de 300 mM (pH 3,6) a été préparée avec l'aide de 3,1 g d'acétate de sodium trihydrate et de 16 ml d'acide acétique glacial dissous dans 1 000 ml d'eau nanopure. La solution de TPTZ 10 mM et de HCl 40 mM doit être préparée le jour même de son utilisation. Pour ce faire, une masse de 0,0312 g de TPTZ a été ajoutée à 33  $\mu\text{l}$  d'HCl concentré 12 M et 10 ml d'eau nanopure. La solution a été chauffée à 50 °C, jusqu'à dissolution complète du TPTZ. La solution de chlorure de fer ( $\text{FeCl}_3$ ) 20 mM est produite aussi le jour même de la manipulation avec 0,0541 g de  $\text{FeCl}_3$  dissout dans 10 ml d'eau nanopure. Le réactif FRAP se compose du tampon acétate de 300 mM de pH 3,6, de la solution de TPTZ 10 mM et de HCl 40 mM et de la solution  $\text{FeCl}_3$  dans les proportions respectives suivantes (10 :1 :1), ayant un volume total de 30 ml.

L'ajout de 0,01 g de Trolox dans 100 ml de méthanol forme la solution mère du standard de Trolox à 100  $\mu\text{g/ml}$ . À partir de la solution mère, des dilutions dans des tubes en verre ont été effectuées pour la mise en microplaque. Les concentrations variaient entre 50 et 5  $\mu\text{g/ml}$ .

Les solutions mères de 10 000  $\mu\text{g/ml}$  des échantillons ont été obtenues par une dilution de 100 mg d'échantillon dans 10 ml de méthanol. Les solutions filles de

1000 µg/ml ont été produites par l'ajout de 1 ml de la solution mère dans 9 ml de méthanol (dilution 1/10). À partir de la solution fille, des dilutions ont été effectuées pour la mise en microplaque. Les concentrations testées variaient entre 500 et 10 µg/ml et les détails des manipulations sont disponibles à l'annexe I-2.

### 2.5.2.2 Mise en microplaque

Lors de la mise en microplaque, 180 µl du réactif FRAP ont été déposés dans les puits et elle a été incubée à 37 °C pendant 10 minutes. Un contrôle a été réalisé avec 200 µl du réactif FRAP et 200 µl de méthanol ont servi de blanc. Dans chaque puits où il y avait eu du réactif FRAP chauffé, 20 µl d'échantillon ou de standard ont été ajoutés aux 180 µl présents. La plaque est mise dans le noir pendant 30 minutes à 37 °C pour laisser la réaction s'effectuer. La lecture de l'absorbance a été réalisée à 593 nm, avec l'appareil TECAN *Spectrafluorplus*.

### 2.5.2.3 Calculs

Les résultats sont présentés sous la forme d'équivalent Trolox par gramme d'extrait (µmol TE/g). Les calculs ont été réalisés avec la formule suivante et la courbe standard de Trolox (Lopez-Alarcon & Lissi, 2006; Mamelona & Pelletier, 2010) :

$$\text{Éq TE} = \frac{(X \times Fd)}{mM}$$

Min

Soit :

$$\text{Éq TE} = \text{Équivalent Trolox en } \mu\text{mol TE/g}$$

X = Quantité équivalente de Trolox calculée

$F_d$  = Facteur de dilution

mM : Masse molaire du standard (250,29 g/mol)

$M_{in}$  = Masse initiale de l'échantillon en g

Où, avec l'aide de l'équation de la courbe standard de Trolox,

$$X = (y-b)/m$$

Soit :

$$y = 0,0068x + 0,0298 \text{ (50 °C)}$$

$$y = 0,0066x + 0,0209 \text{ (80 °C)}$$

$$y = 0,0075x + 0,0241 \text{ (fractionnement bioguidé 50 °C)}$$

$$y = 0,0059x + 0,0316 \text{ (fractionnement bioguidé 80 °C)}$$

$$y = \text{Abs} - \text{Abs}^0$$

Abs = Absorbance de l'échantillon

$\text{Abs}^0$  = Absorbance du blanc

### 2.5.3 ESSAI ORAC

ORAC est une méthode dite HAT (*Hydrogen Atom Transfert*), car elle est basée sur le transfert d'un atome d'hydrogène utilisant l'AAPH (dichlorure de 2,2'-azobis-2-méthyl-propanimidamide), comme source de radical peroxyde et la fluorescéine comme marqueur servant à mesurer l'activité antioxydante. La molécule fluorescente est

affectée par le biais de la dégénération oxydative, entraînant une diminution de l'intensité de la fluorescence observée. L'antioxydant ayant la capacité de protéger la molécule fluorescente de la dégénérescence oxydative est ajouté à l'échantillon et le degré de protection (la conservation de la fluorescence) est quantifié en fluorimétrie. ORAC est une technique qui se distingue en combinant le temps total d'inhibition et le pourcentage de dommage que l'antioxydant en quantité fixe a causé à la fluorescéine. À la fin du processus, tous les antioxydants présents dans l'échantillon ont réagi avec le radical généré. L'intensité de fluorescence diminue en fonction des processus de dégradation oxydative et cette intensité est mesurée après 30 minutes d'incubation, à 37 °C suite à l'ajout du générateur de radicaux libres. Une lecture en fluorescence à une excitation de 485 nm et une émission de 538 nm pendant 90 minutes, à 37 °C permet d'obtenir la cinétique de dégradation. L'aire sous les courbes de l'intensité de la fluorescence en fonction du temps avec antioxydants et sans antioxydants est calculée. Grâce à ces cinétiques, une quantification du potentiel antioxydant peut être réalisée utilisant une courbe standard créée avec différentes concentrations de Trolox.

### **2.5.3.1 Préparation de l'essai ORAC**

Toutes les manipulations ont été effectuées à l'abri de la lumière. La solution tampon phosphate 75 mM (pH 7,4) a été préparée avec l'aide de 15,56 g de phosphate de sodium dibasique, 2,34 g de phosphate de sodium monobasique dissout dans 1000 ml d'eau nanopure. Au besoin, le tampon a été chauffé pour obtenir une dissolution complète et le pH a été ajusté avec du HCl concentré. Bien à l'abri de la lumière, la solution stock à 1 mM de fluorescéine a été produite avec 0,1881 g de fluorescéine et 500 ml de tampon phosphate. À partir de la solution stock de fluorescéine, la solution de fluorescéine de travail est préparée le jour même des manipulations en ajoutant 100 µl de la solution stock de fluorescéine (1 mM) dans 100 ml de tampon phosphate. Pour vérifier si la dilution de la solution de fluorescéine de travail est juste, une lecture en

«endpoint», à une excitation de 485 nm et une émission de 538 nm, de 200  $\mu\text{l}$  de la solution, a été réalisée avec l'appareil SpectraMax® Gemini. La valeur doit se situer entre 2500 et 3000 unités. Si ce n'était pas le cas, la dilution a dû être ajustée. La solution d'AAPH doit être préparée chaque jour, de préférence pendant les 30 minutes d'incubation de la microplaque. Elle est composée de 0,4068 g d'AAPH dissout dans 10 ml de tampon phosphate.

L'ajout de 0,0625 g de Trolox dans 25 ml de tampon phosphate forme la solution mère du standard de Trolox à 100  $\mu\text{g/ml}$ . À partir de la solution mère, des dilutions, dans des tubes en verre, ont été effectuées pour la mise en microplaque. Les concentrations variaient entre 100 et 12,5  $\mu\text{M}$  de Trolox et les détails des manipulations sont décrits à l'annexe I-3.

Les échantillons ont été dilués dans le tampon phosphate. La concentration nécessaire varie selon l'échantillon. On cherche à obtenir une courbe qui atteigne un plateau le plus près possible de la fin de la cinétique (Fig. 3). La courbe doit respecter l'intervalle de confiance d'une courbe gaussienne, soit 5 % (95 % des données doivent être incluses dans l'intervalle et 5 % peuvent en être exclus).

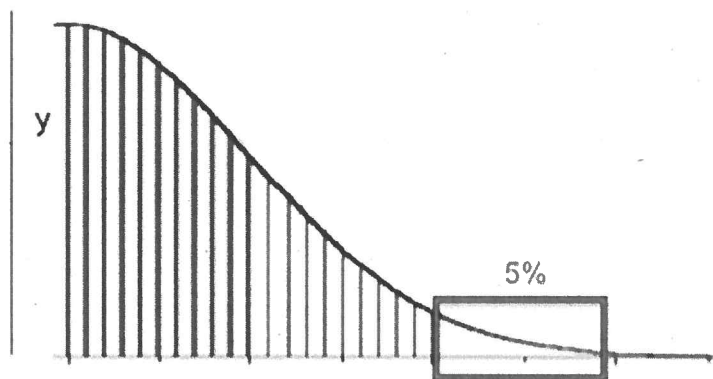


Figure 3 : Exemple de cinétique recherchée avec l'ajustement de concentrations des échantillons lors du test ORAC

Pour obtenir ce type de courbe lors de notre cinétique, des tests préliminaires sont nécessaires pour calibrer la concentration optimale de l'échantillon avec une série de dilutions 1 :1 pour cibler rapidement les trois concentrations que l'on utilisera pour les calculs de la valeur ORAC. Si les dilutions sont trop importantes, les valeurs seront en dessous du blanc et les calculs seront négatifs et si les dilutions ne sont pas assez importantes, il y aura une saturation et les cinétiques seront semblables au blanc (une ligne droite). Les concentrations ajustées des échantillons, pour permettre une bonne lecture de la fluorescence, sont représentées au tableau 1.

Tableau 1 : Concentrations des extraits algaux pour les essais ORAC

<i>U. lactuca</i>	<i>S. longicuris</i>	<i>A. nodosum</i>
( $\mu\text{g/ml}$ )	( $\mu\text{g/ml}$ )	( $\mu\text{g/ml}$ )
250,0	500,0	31,3
125,0	250,0	15,6
62,5	125,0	7,8

### 2.5.3.2 Mise en microplaque

La fluorescéine a été ajoutée dans la microplaque après les standards et les échantillons, suivi à la toute fin par l'AAPH, pour minimiser la variation des résultats en plaçant les réactifs les plus instables en dernier. Pour le blanc avec AAPH, 25  $\mu\text{l}$  de tampon phosphate 75 nM (pH 7,4) ont été ajoutés dans les puits. Pour le blanc sans AAPH, c'est 50  $\mu\text{l}$  de tampon phosphate qui ont été ajoutés. Dans les puits appropriés, 25  $\mu\text{l}$  de standard de Trolox ou d'échantillon à tester ont été combinés à 150  $\mu\text{l}$  de fluorescéine de travail ayant une fluorescence entre 2500 et 3000. La microplaque a été incubée à 37 °C, pendant 30 minutes. Pendant l'incubation, la solution d'AAPH a été

préparée, puis 50 µl de cette dernière ont été ajoutées à tous les puits sauf ceux du blanc sans AAPH.

### 2.5.3.3 Calculs

Les résultats sont présentés sous la forme d'équivalent de Trolox par gramme d'extrait (µmol TE/g). Les calculs ont été réalisés avec les formules suivantes et la courbe standard de Trolox (Lopez-Alarcon & Lissi, 2006; Mamelona & Pelletier, 2010) :

$$C_1 = (((X \times 25) / 1\,000\,000) \times F_d) / V \quad (3)$$

$$C_g = \frac{(C_1 \times 1\,000)}{C_{in}} \quad (4)$$

1 000

$$\text{Éq TE} = C_g / R \quad (5)$$

Soit :

$C_1$  = Concentration de l'échantillon en µmol/µl

$X$  = Quantité équivalente de Trolox calculée

$F_d$  = Facteur de dilution

$V$  = Volume de l'échantillon utilisé en µl

$C_g$  = Concentration de l'échantillon en µmol/g

$C_{in}$  = Concentration initiale de l'échantillon en g/ml

Éq TE = Équivalent Trolox en µmol TE/g

$R$  = Taux de récupération (masse après extraction / masse initiale)



Où, avec l'aide de l'équation de la courbe standard de Trolox,

$$X = (y-b)/m$$

Soit :

$$y = 0,3998x + 0,0914$$

$$y = \text{AUC} - \text{AUC}^0$$

AUC = Aire sous la courbe de l'échantillon

$\text{AUC}^0$  = Aire sous la courbe du blanc de réaction

## 2.6 ESTIMATION DES PHÉNOLS TOTAUX

Toutes les manipulations ont été effectuées à l'abri de la lumière. En milieu basique, le réactif Folin-Ciocalteu oxyde les groupements des composés polyphénoliques pouvant être contenus dans l'échantillon. Les produits de réactions, l'acide phosphotungstique ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) et l'acide phosphomolybdique ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ), lorsque réduits, possèdent une couleur bleue provenant des oxydes de tungstène ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) et de molybdène ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ). Au maximum d'absorption autour de 750 nm, l'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents.

### 2.6.1 PRÉPARATION DE L'ESTIMATION DES PHÉNOL TOTAUX

La solution de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 20% (w/v) a été réalisée en ajoutant 20 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 50 ml d'eau nanopure dans une fiole jaugée de 100 ml. La solution était chauffée jusqu'à dissolution complète du carbonate de sodium, puis une fois refroidie à température ambiante, de l'eau nanopure était ajoutée jusqu'au trait de jauge de 100 ml. Cette solution était conservée au réfrigérateur pendant trois semaines.

La solution mère d'acide gallique (AG) 5 000  $\mu\text{g/l}$  a été préparée avec 0,25 g d'acide gallique dissout dans 5 ml de méthanol, puis elle a été jaugée à 50 ml, avec de l'eau nanopure. À partir de la solution mère, des dilutions ont été effectuées pour la mise en microplaque. Les concentrations variaient entre 100 et 12,5  $\mu\text{M}$  de Trolox et les détails des manipulations sont décrits à l'annexe I-4.

Les extraits éthanoliques totaux ont été ajustés à une concentration de 1 000  $\mu\text{g/ml}$  par la dilution de 10 mg d'échantillon dans 10 ml de méthanol. Pour chaque essai, 6 ml d'eau nanopure, 1,25 ml de solution de carbonate de sodium 20 % (w/v), 100  $\mu\text{l}$  d'échantillon ou de standard d'acide gallique et 0,5 ml de réactif Folin-Ciocalteu ont été combinés et agités dans des tubes en verre de 10 ml.

#### 2.6.2 MISE EN MICROPLAQUE

Lors de la mise en microplaque, 200  $\mu\text{l}$  de chaque échantillon ou standard préalablement préparé ont été déposés dans leur puits respectif. Un contrôle a été réalisé avec 200  $\mu\text{l}$  de la solution mère d'acide gallique et 200  $\mu\text{l}$  de tous les réactifs, à l'exception de l'échantillon qui a été remplacé par de l'eau nanopure, ont servi de blanc. La microplaque a été placée à l'abri de la lumière, à température ambiante, pour 30 minutes afin de laisser la réaction s'effectuer. La lecture de l'absorbance s'est faite à 750 nm, avec l'appareil TECAN *Spectrafluorplus*.

#### 2.6.3 CALCULS

Les résultats sont présentés sous la forme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg GAE/g). Les calculs ont été réalisés avec la formule suivante et la courbe standard d'acide gallique (Abdelhady et *al.*, 2011) :

$$P_{\text{totaux}} = \frac{(X \times V \times F_d)}{M_{\text{in}}}$$

Soit :

$P_{\text{totaux}}$  = Phénols totaux en  $\mu\text{g GAE/g}$

$X$  = Quantité équivalente d'acide gallique calculée

$V$  = Volume de l'échantillon utilisé en ml

$F_d$  = Facteur de dilution

$M_{\text{in}}$  = Masse de l'échantillon en g

Où, avec l'aide de l'équation de la courbe standard d'acide gallique,

$$X = (y-b)/m$$

## 2.7 MÉTHODE DE DOSAGE DU POTENTIEL ANTIBACTÉRIEN

### 2.7.1 PRÉPARATION DES MILIEUX DE CULTURE

Le milieu de culture employé pour les trois souches bactériennes est le *Tryptic Soy Broth* (TSB). Pour la vérification du compte bactérien de type « *pour-plate* », le milieu utilisé est le *Tryptic Soy Agar* (TSA). Lors de la préparation des milieux de culture liquide, les instructions du manufacturier ont été respectées. Le milieu a été stérilisé à 121 °C, pendant au moins 30 minutes, pour des volumes d'un litre et moins. Un témoin de gentamicine de 200  $\mu\text{g/ml}$  a été préparé avec de l'eau nanopure.

### 2.7.2 PRÉPARATION DES SOUCHES

Pour toutes les manipulations en microbiologie qui ont été réalisées, il y a toujours eu la production d'un témoin du milieu de culture pour vérifier s'il y a eu contamination. À partir d'un cryotube ou d'une culture, la souche bactérienne ciblée a été revitalisée dans un tube de 10 ml de TSB dans les proportions 1/10. Elle a été incubée de 18 à 24 heures à 35 °C pour *E. coli*, 25 °C pour *B. thermosphacta* et 30 °C pour *M. luteus*. La souche a été repiquée une deuxième fois, mais seulement 100 µl de la souche ont été mélangés avec 9,9 ml de TSB, suivie d'une incubation de 16 à 18 heures.

### 2.7.3 PRÉPARATION DE LA SUBSTANCE INHIBITRICE À TESTER

Les échantillons algaux totaux ont été préparés à la concentration de 1000 µg/ml dans de l'eau nanopure et 1 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) (v/v). Ils ont été filtrés sur une membrane de polyéthersulfone de 0,22 µm comme méthode de stérilisation (Beaulieu et *al.*, 2010). La conservation des échantillons se fait à l'obscurité à -80 °C.

### 2.7.4 PRÉPARATION DE LA SOUCHE POUR LA MISE EN MICROPLAQUE

Pour les tests en microplaque, un inoculum de  $5 \times 10^5$  UFC/ml (Unité formatrice de colonie/ml) a été utilisé. Le repiquage a été effectué avec 100 µl de la souche qui a été incubée de 16 à 18 heures avec 9,9 ml de TSB. Le temps d'incubation, à température optimale de croissance de la souche, dépend du temps nécessaire pour obtenir une souche au milieu de la phase exponentielle de croissance, ce qui est normalement de 3 à 5 heures.

Une lecture de la densité optique (DO), en cuvettes de 2 ml, avec un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm ( $DO_{600}$ ) a été effectuée pour ajuster le compte bactérien. Le blanc est le milieu de culture liquide utilisé, soit le TSB. Une

culture âgée contient beaucoup de cellules mortes qui faussent la mesure de DO. De manière générale, une  $DO_{600}$  entre 0,10 et 0,15 après soustraction du blanc, est visée ce qui devrait donner un compte bactérien de  $2 \times 10^7$  à  $2 \times 10^8$  UFC/ml selon les espèces, généralement atteint lorsque la turbidité commence à être visible.

Une dilution en cascade a été effectuée pour l'obtention d'une culture finale ayant une concentration bactérienne de  $10^2$  UFC/ml. Donc, 1 ml de la culture ayant une  $DO_{600}$  entre 0,10 et 0,15 mesurée précédemment a été ajouté à un autre tube contenant 9 ml de TSB pour effectuer cette cascade de dilutions. Le milieu de culture possédant une concentration de  $10^5$  UFC/ml a été sélectionné pour la réalisation de la microplaque. Un décompte bactérien en pétris, avec du TSA, de type « *pour-plate* » a aussi été effectué pour une vérification du compte bactérien avec 1 ml du milieu  $10^3$ , 1 ml du milieu  $10^2$  et 0,1 ml du milieu  $10^2$ .

#### 2.7.5 MISE EN MICROPLAQUE

Le contrôle de croissance négative qui assure qu'aucune contamination microbienne n'a eu lieu dans le milieu de culture est formé de 175  $\mu$ l du milieu de culture liquide et il sert aussi de blanc. Seulement 125  $\mu$ l de TSB (1X) ont été ajoutés aux autres puits. Le contrôle positif de croissance était formé de 125  $\mu$ l de milieu de culture et de 50  $\mu$ l de la souche bactérienne ciblée. Une dilution en cascade 1 :1 a été effectuée sur une rangée de 10 puits en ajoutant 125  $\mu$ l d'échantillon à tester dans le premier puits. La concentration initiale d'extrait dans le premier puits était alors de 500  $\mu$ g/ml. Une autre dilution en cascade de 1 :1 a été réalisée sur 20 puits avec 125  $\mu$ l de gentamicine d'une concentration initiale de 200  $\mu$ g/ml. Dans chaque puits de la microplaque, 50  $\mu$ l de la souche  $10^5$  UFC/ml, réalisée par la dilution en cascade, ont été ajoutés.

### 2.7.6 LECTURE DE LA MICROPLAQUE

Avec l'aide du lecteur de microplaque PowerWave™ XS2 et du logiciel Gen 5 (BioTek, 2008), l'absorbance a été mesurée à 600 nm, pendant 18 heures, à température optimale de la souche cible. Une lecture était effectuée toutes les dix minutes précédée d'une agitation de cinq secondes.

### 2.7.7 CALCULS

Le pourcentage d'inhibition de la courbe de croissance bactérienne a été calculé avec l'équation suivante (Cox et *al.*, 2010) :

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

$$A_0$$

Soit :

$A_0$  = Absorbance du contrôle de croissance de 18:00 moins absorbance du contrôle de croissance à 0:00

$A_E$  = Absorbance nette de l'extrait à 18:00 moins absorbance nette de l'extrait à 0:00

## 2.8 SÉPARATIONS ET FRACTIONNEMENTS BIOGUIDÉS

### 2.8.1 CHROMATOGRAPHIE PRÉPARATIVE

Les extraits algaux *d'Ulva lactuca* ont été dissous avec 1 ml d'hexane:éthanol anhydre (95 :5; v :v). La séparation s'est effectuée sur une colonne de silice activée pendant cinq heures à 225 °C, en phase normale, de 10 cm de hauteur et de 2,5 cm de diamètre, tenue à température ambiante. Les éluants, optimisés par une série d'essais préliminaires, étaient dans l'ordre de passage sur la colonne : l'hexane (100 %), l'hexane:éthanol anhydre (99 :1; v :v), l'hexane:éthanol anhydre (97 :5; v :v), l'hexane:éthanol anhydre (95 :5; v :v) et l'éthanol anhydre (100 %). Sept fractions ont été collectées et évaporées grâce à l'évaporateur rotatif dans un ballon de 120 ml. L'extrait a été transféré dans des tubes (ependorfs), préalablement pesés, de polypropylène de 1,5 ml et le ballon a été rincé trois fois avec de l'éthanol anhydre. Les fractions ont été évaporées avec le Genevac EZ-2 Plus suivant la méthode « low BP » du fournisseur. Les dernières traces d'éthanol ont été retirées sous un jet d'azote. Les fractions sèches ont été pesées exactement et placées à -80 °C. Si toutes les manipulations ne pouvaient être réalisées dans la même journée, les fractions étaient conservées à -80 °C, dans le noir.





## CHAPITRE 3

### RÉSULTATS

#### 3.1 CARACTÉRISATION CHIMIQUE

La caractérisation chimique des trois macroalgues à l'étude est présentée au tableau 2. *U. lactuca* détient la plus grande quantité de protéines avec 19,9 g/100 g suivi par *S. longicruris* avec 14,1 g/100 g et *A. nodosum* avec 6,6 g/100 g. Peu de lipides sont présents dans ces macroalgues comparativement avec certaines microalgues, qui peuvent en contenir de 10 à 30 %, soit entre 1,1 et 1,5 g/100 g (Rodolfi et al., 2009). Les sels et minéraux contenus dans les cendres ainsi que les glucides représentent une proportion importante du poids total. Les algues contenant la quantité de cendres la plus importante, en ordre décroissant, sont *S. longicruris* (27,5 g/100 g), *U. lactuca* (29,0 g/100 g) et *A. nodosum* (18,2 g/100 g) tandis que pour les glucides, *A. nodosum* possède une proportion plus importante (51,4 g/100g) comparativement aux deux autres algues soit de 38,3 g/100g pour *U. lactuca* et de 36,6 g/100g pour *S. longicruris*. La plus grande quantité de caroténoïdes se retrouve chez *S. longicruris* qui en possède 1,8 fois plus qu'*A. nodosum* et 10,5 fois plus qu'*U. lactuca*.

Tableau 2 : Comparaison de la composition chimique globale d'*U. lactuca*, d'*A. nodosum* et de *S. longicruris*. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  l'écart type (N = 2)

Algues	Composition totale (g/100 g exprimés sur base sèche)				
	Protéines	Lipides	Cendres	Glucides*	Caroténoïdes ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )
<i>U. lactuca</i>	18,2 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	26,6 $\pm$ 0,4	38,3 $\pm$ 0,4	5,8 $\pm$ 0,7
<i>A. nodosum</i>	5,7 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,3	15,6 $\pm$ 0,0	51,4 $\pm$ 0,0	31,4 $\pm$ 1,3
<i>S. longicruris</i>	12,1 $\pm$ 0,0	1,3 $\pm$ 0,2	23,6 $\pm$ 0,4	36,6 $\pm$ 0,2	57,1 $\pm$ 1,7

\* : Résultats obtenus par calculs

### 3.2 POTENTIEL ANTIOXYDANT

Toutes les manipulations ont été réalisées, au minimum, en triplicata technique (trois puits dans chaque plaque) et en triplicata analytique (trois plaques différentes) (N = 3 minimum) et les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  l'écart type. Les tests statistiques ont été réalisés avec l'aide du logiciel JMP-9 (SAS Institute, Toronto, ON, Canada). L'ANOVA, respectant toutes les conditions d'application, et le test de Tukey ont été utilisés afin de comparer les données obtenues avec un niveau significatif de  $p < 0,05$ .

#### 3.2.1 ESSAI DPPH

Les pourcentages de DPPH réduit des extraits totaux éthanoliques réalisés à 50 °C sont significativement différents de ceux réalisés à 80 °C seulement pour l'algue

*S. longicruris* où une augmentation de l'activité est notée à 80 °C (Fig.4). Les détails des résultats sont présentés à l'annexe II-1. *A. nodosum* est l'algue démontrant le potentiel antioxydant le plus important, allant même jusqu'à n'avoir aucune différence significative entre les valeurs obtenues à une concentration de 500 µg (90,6 % à 50 °C et 93,3 % à 80 °C) et le standard de Trolox (102,0 % à 50 °C et 102,1 % 80 °C), suivie de *U. lactuca* (56,0 % à 50 °C et 55,2 % à 80 °C) et de *S. longicruris* (48,3 % à 50 °C et 49,6 % à 80 °C). Les résultats de *A. nodosum* augmentent en fonction de la concentration contrairement à *U. lactuca* et à *S. longicruris* qui ne sont pas influencés par la concentration des échantillons. La table d'association du test de Tukey du pourcentage de DPPH réduit suite à une ANOVA croisée à trois facteurs ( $p < 0,05$ ), soit l'espèce d'algue, la température d'extraction et la concentration de l'extrait est présentée à l'annexe II.

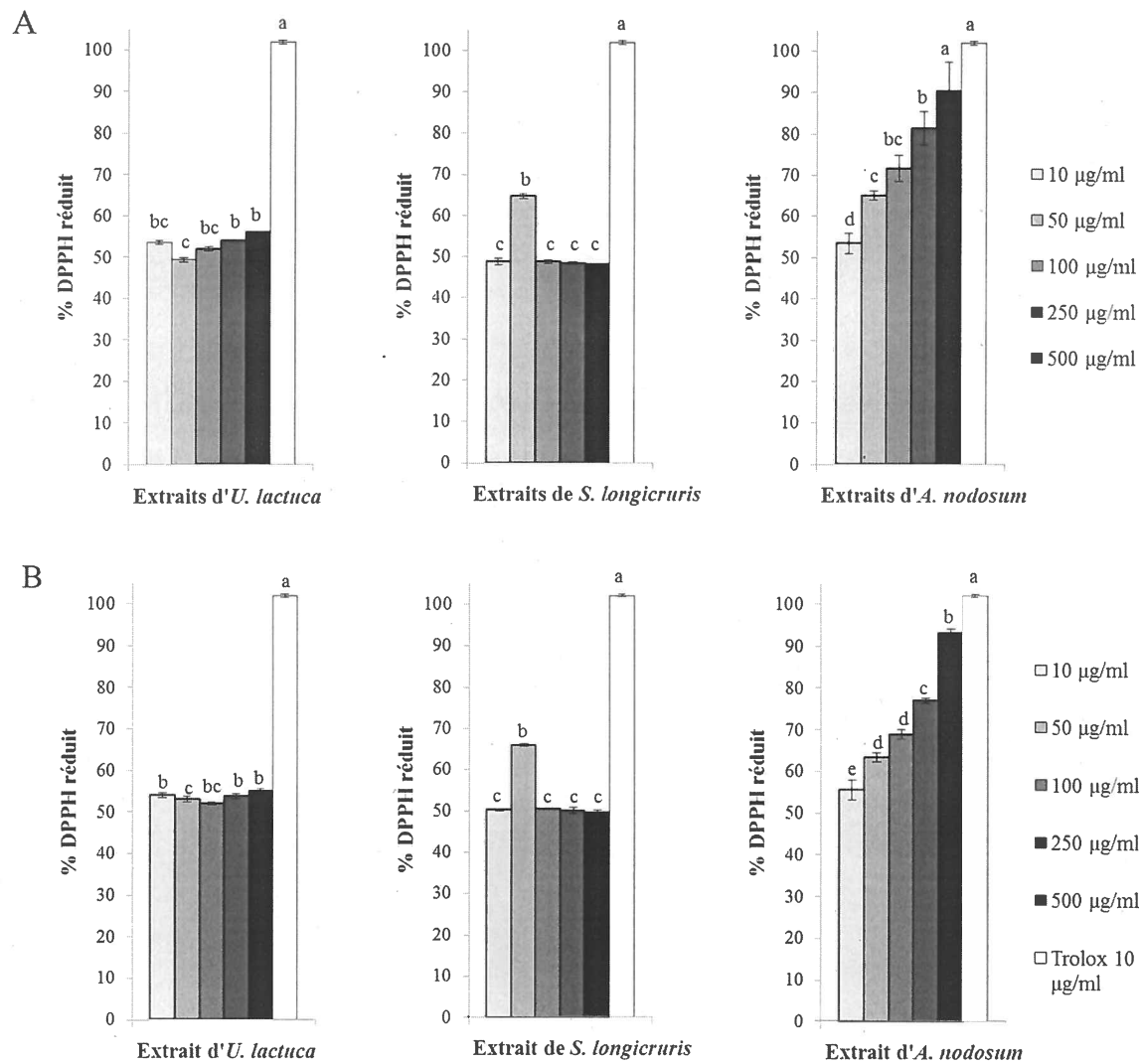


Figure 4 : Résultats % DPPH réduit des extraits éthanoliques, réalisés à 50 °C (A) et 80 °C (B), de *U. lactuca*, *A. nodosum* et *S. longicruris* ainsi que le standard de Trolox. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  l'écart type (N = 9). Grâce au test de Tukey, les moyennes n'étant pas associées par la même lettre sont significativement différentes ( $p < 0,05$ )

### 3.2.2 ESSAI FRAP

Les tests FRAP, exprimés en équivalent de Trolox (TE), des extraits totaux éthanoliques réalisés à 50 °C sont significativement différents de ceux réalisés à 80 °C (Fig. 5). Les détails des résultats sont présentés à l'annexe II-2. Avec ce test, le potentiel antioxydant diminue de manière significative ( $p < 0,05$ ) lorsque les extraits sont produits à une température de 80 °C comparativement à ceux à 50 °C. De plus, à 50 °C, il y a une tendance qui indique une diminution du potentiel antioxydant avec une augmentation de la concentration pour *U. lactuca*. L'algue *A. nodosum* semble aussi suivre cette tendance, mais de façon moins marquée. L'activité la plus importante est démontrée par *U. lactuca* à 10 et 50 µg/ml (2972,7 et 912,1 µmol TE/g à 50 °C) suivie par *A. nodosum* aussi à 100 µg/ml (677,2 µmol TE/g à 50 °C) tandis que *S. longicuris*, ne démontre pas une bonne réponse au test FRAP peu importe les températures. Le standard de Trolox à une concentration de 10 µg/ml a une valeur de 4205,0 µmol TE/g. La table d'association du test de Tukey de la réponse de l'essai FRAP suite à une ANOVA croisée à trois facteurs ( $p < 0,05$ ), soit l'espèce d'algue, la température d'extraction et la concentration de l'extrait est présentée à l'annexe II.

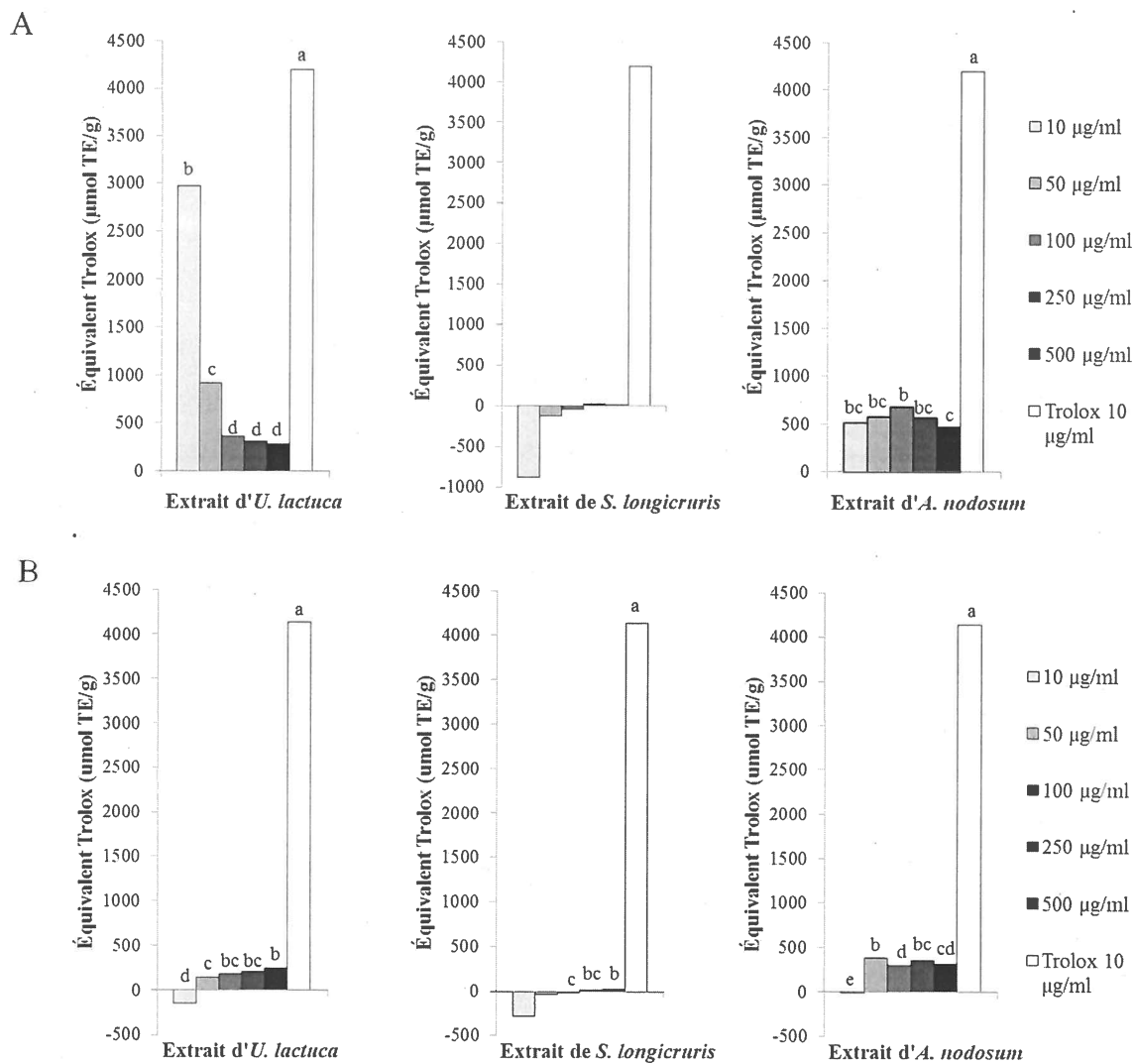


Figure 5 : Résultats FRAP ( $\mu\text{mol TE/g}$ ) des extraits éthanoliques, réalisés à 50 °C (A) et 80 °C (B), de *U. lactuca*, *A. nodosum* et *S. longicuris* ainsi que le standard de Trolox. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  l'écart type (N = 9). Grâce au test de Tukey, les moyennes n'étant pas associées par la même lettre sont significativement différentes ( $p < 0,05$ )

### 3.2.3 ESSAI ORAC

Avec ce test aucun effet significatif de la température n'a été observé, donc seulement les données obtenues avec les extraits traités à 50 °C sont présentées à la figure 6. L'espèce d'algue *S. longicuris*, avec des concentrations de 500, 250 et 125 µg/ml, fournit les valeurs d'équivalent de Trolox les moins importantes, soit respectivement, 8,45, 9,38 et 13,87 µmol TE/g. L'espèce *A. nodosum*, avec des concentrations de 31,2, 15,6 et 7,8 µg/ml, obtient des valeurs de 78,27, 85,89 et 128,60 µmol TE/g. Puis, pour l'espèce d'algue *U. lactuca* aux concentrations de 250, 125 et 62,5 µg/ml, les résultats obtenus sont de 41,47, 46,25 et de 52,96 µmol TE/g. Le standard de Trolox à une concentration de 25 µg/ml a une valeur de 3979,7 µmol TE/g. Les trois algues suivent la même tendance : les deux concentrations les plus importantes ne sont pas différentes significativement et le potentiel antioxydant augmente avec la diminution de la concentration.

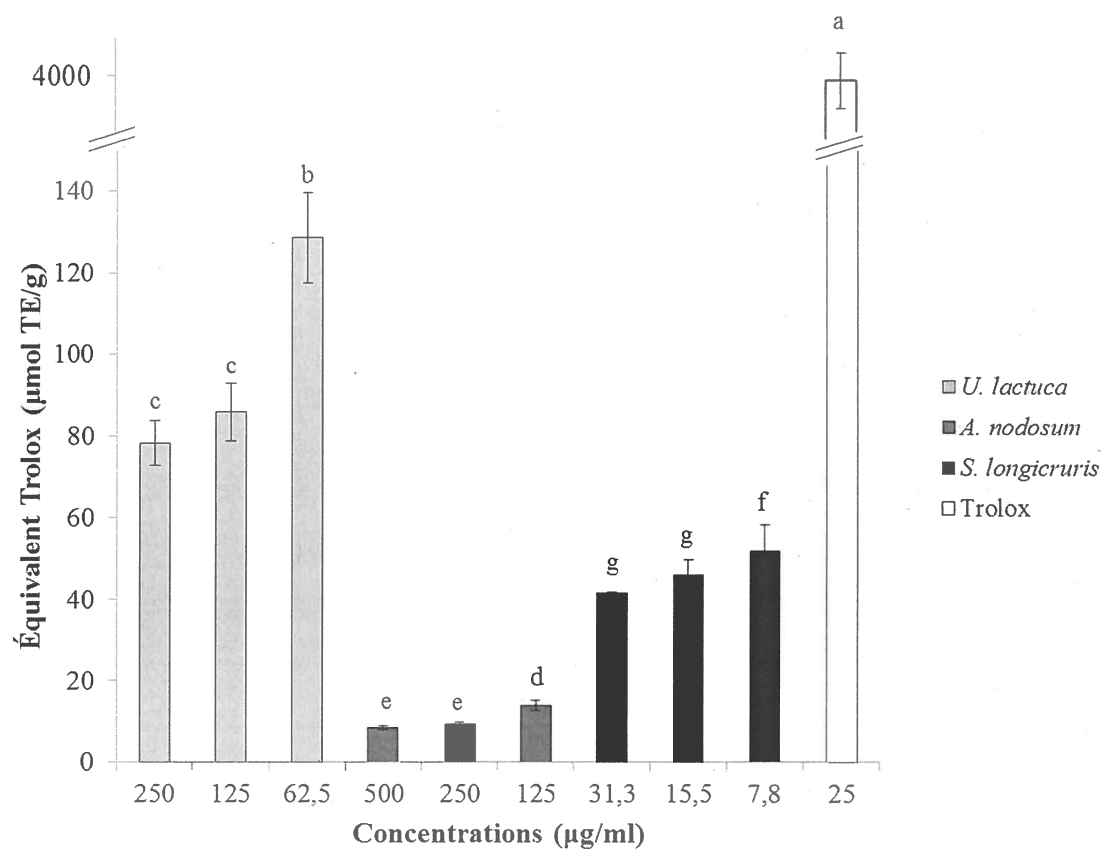


Figure 6 : Résultats ORAC ( $\mu\text{mol TE/g}$ ) des extraits éthanoliques, réalisés à  $50\text{ }^\circ\text{C}$ , de *U. lactuca* (250, 125 et  $62,5\ \mu\text{g/ml}$ ), *A. nodosum* (31,2, 15,6 et  $7,8\ \mu\text{g/ml}$ ) et *S. longicruris* (500, 250 et  $125\ \mu\text{g/ml}$ ) ainsi que le standard de Trolox ( $25\ \mu\text{g/ml}$ ). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  l'écart type ( $N = 3$ ). Les moyennes n'étant pas associées par la même lettre sont significativement différentes ( $p < 0,05$ )



### 3.3 PHÉNOLS TOTAUX

La température d'extraction n'est pas un facteur significatif lors de l'extraction des phénols totaux. *A. nodosum* est l'algue qui possède le plus de phénols avec 50,2 mg GAE/g à 50 °C et 42,8 mg GAE/g à 80 °C (Fig. 7). Les détails des résultats sont présentés à l'annexe II-3. Pour *U. lactuca* et *S. longicruris* la quantité totale de composés phénoliques est de 6,9 et 3,3 mg GAE/g à 50 °C et de 7,1 et 2,0 mg GAE/g à 80 °C. Le standard d'acide gallique à une concentration de 50 µg/ml possède une valeur de 98,9 mg GAE/g.

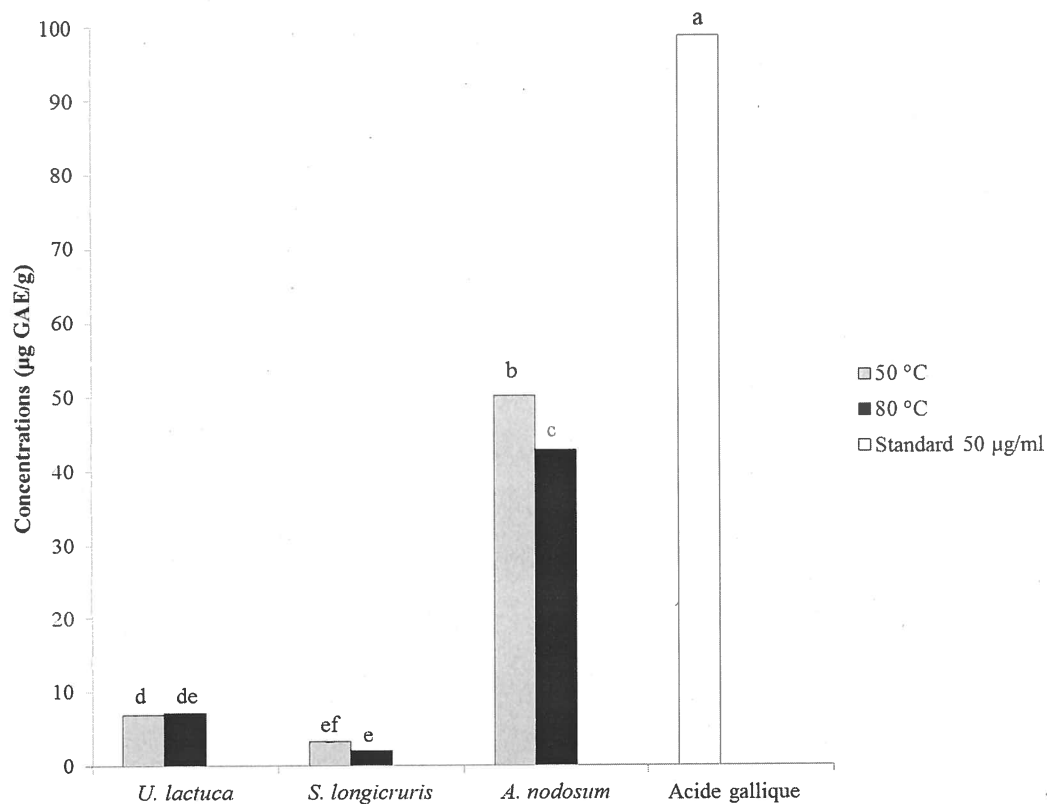


Figure 7 : Détermination des phénols totaux (µg GAE/g) des extraits éthanoliques de *U. lactuca*, *S. longicruris* et *A. nodosum* ainsi que le standard d'acide gallique. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± l'écart type (N = 4). Les moyennes n'étant pas associées par la même lettre sont significativement différentes (p < 0,05)

### 3.4 POTENTIEL ANTIBACTÉRIEN

Il n'y avait aucune différence significative entre les échantillons produits à 50 °C et à 80 °C quant au potentiel antibactérien. Les résultats présentés sous forme de cinétiques sont ceux des données réalisées à 50 °C et à une concentration de 500 µg/ml (Fig. 8). Les cinétiques indiquent qu'en présence d'extraits éthanoliques algaux les phases de latence sont similaires à celles du contrôle de croissance, sauf pour *B. thermosphacta* en présence d'*A. nodosum* où un retard de deux heures dans le début de la phase exponentielle est observé. Une diminution de microorganismes est principalement observée lors de la phase exponentielle de croissance. Le plateau de croissance est atteint avec une absorbance moins élevée et dans certains cas, plus rapidement.

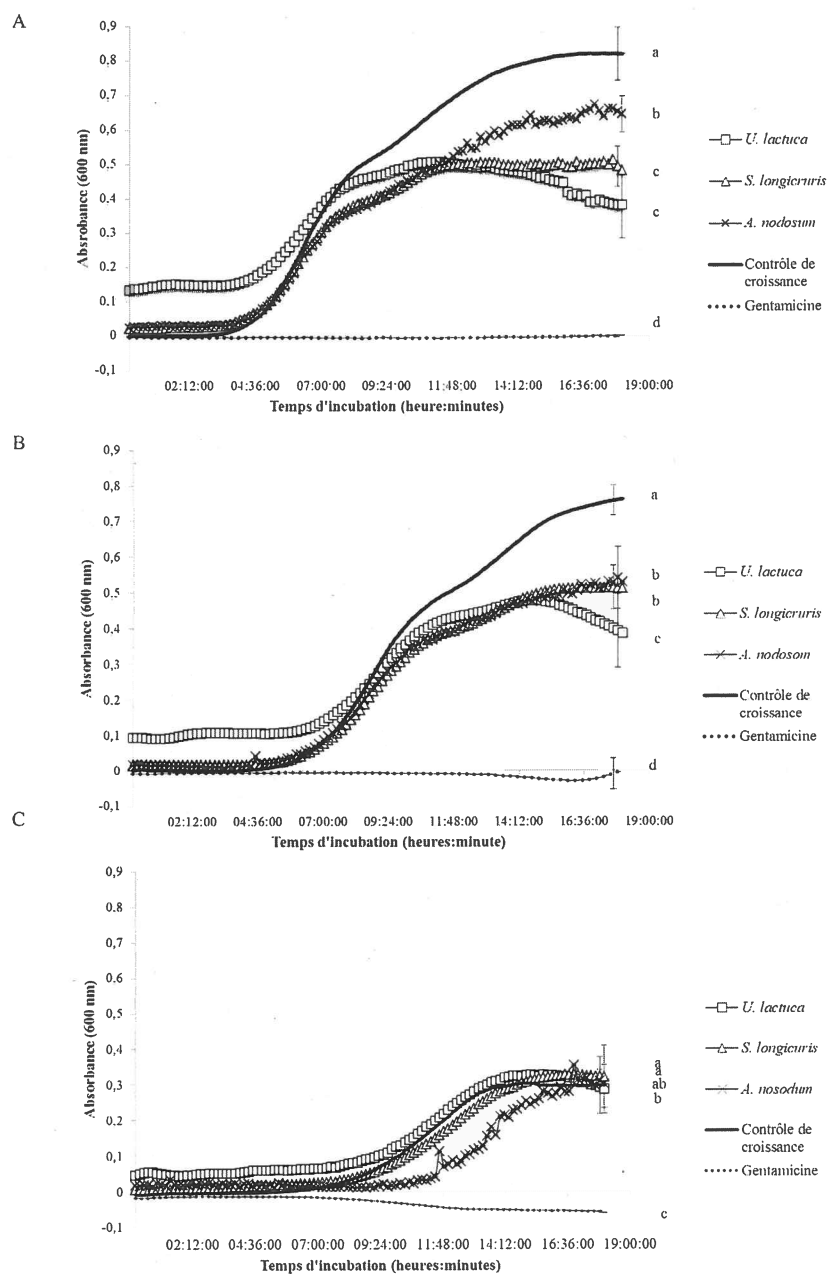


Figure 8 : Courbes de croissance d'*E. coli* (A), *M. luteus* (B) et *B. thermosphacta* (C) en présence d'extraits éthanoliques, réalisés à 50 °C, de *U. lactuca*, *S. longicruris* et *A. nodosum* à une concentration de 500 µg/ml ainsi que le standard gentamicine (25 µg/ml). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  l'écart type (N = 3). Les moyennes n'étant pas associées par la même lettre sont significativement différentes ( $p < 0,05$ )

L'inhibition de la croissance bactérienne des souches *E. coli*, *M. luteus* et *B. thermosphacta* causée par l'ajout d'extraits algaux d'*U. lactuca*, de *S. longicruris* et d'*A. nodosum* à différentes concentrations est exprimée en pourcentage et détaillée au tableau 3. À la suite d'une ANOVA réalisée sur les données, on observe une interaction significative entre les concentrations, les espèces de macroalgues et les souches bactériennes ( $p = 0,0033$ ). L'inhibition de croissance la plus importante est observée chez *E. coli* (69,5 %) et *M. luteus* (61,5 %) en présence d'*U. lactuca* à 500 µg/ml. Ces deux souches ont réagi en fonction de la concentration des extraits par une inhibition plus importante en présence de plus grandes concentrations. Les pourcentages d'inhibition les plus importants pour *B. thermosphacta* sont ceux à plus faibles concentrations, excepté ceux obtenus en présence d'*U. lactuca* qui suivent la même tendance qu'observée chez *E. coli* et *M. luteus*. L'inhibition la plus marquée (38,0 %) est celle provoquée par *S. longicruris* à 62,5 µg/ml.

Tableau 3 : Pourcentages d'inhibition de la croissance bactérienne d'*E. coli*, *M. luteus* et *B. thermosphacta* en présence d'extraits éthanoliques à différentes concentrations

Concentrations des extraits ( $\mu\text{g/ml}$ )	% de diminution de croissance bactérienne								
	<i>E. coli</i>			<i>M. luteus</i>			<i>B. thermosphacta</i>		
	<i>U</i>	<i>A</i>	<i>S</i>	<i>U</i>	<i>A</i>	<i>S</i>	<i>U</i>	<i>A</i>	<i>S</i>
500,0	69,5	24,1	44,0	61,5	34,7	34,0	21,4	-	7,3
250,0	37,6	10,2	25,4	40,1	20,5	14,4	-	-	-
125,0	25,1	0,2	8,5	33,5	6,8	2,0	-	-	30,9
62,5	15,7	-	-	21,4	-	-	-	9,7	38,0
31,3	2,6	-	-	7,4	-	-	-	25,7	27,9
15,6	-	-	-	-	-	-	-	24,9	27,8
7,8	-	-	-	-	-	-	-	30,3	17,2
3,9	-	-	-	-	-	-	6,1	26,5	31,5
1,9	-	-	-	-	-	-	4,0	8,9	14,5
1,0	-	-	-	-	-	-	-	12,0	18,8

U : *U. lactuca*, S : *S. longicruris* et A : *A. nodosum*

- : Aucune activité antibactérienne détectée

Les effets inhibiteurs de la croissance commencent à être observés à 62,5  $\mu\text{g/ml}$  pour *A. nodosum* et à 125  $\mu\text{g/ml}$  pour *S. longicruris*. Pour les deux algues, à 3,9  $\mu\text{g/ml}$ , l'activité mesurée diminue considérablement ce qui pourrait être le point où la concentration du composé actif diminue assez pour ne plus être capable d'avoir le même potentiel antibactérien. Pour l'espèce *U. lactuca*, la réaction est légèrement différente. Une inhibition de 21,4 % à 500  $\mu\text{g/ml}$ , qui est la plus considérable, laisse croire qu'*U. lactuca* affecte *B. thermosphacta* de la même façon qu'*E. coli* et *M. luteus*; soit

que l'activité antibactérienne augmente en fonction de la concentration. Par contre, une activité significative, de 6,1 et 4,0 %, est détectée aux concentrations aussi basses que 3,9 et 1,9 µg/ml.

### **3.5 FRACTIONNEMENT BIOGUIDÉ D'*ULVA LACTUCA***

#### **3.5.1 POTENTIEL ANTIOXYDANT DES FRACTIONS D'*ULVA LACTUCA***

##### **3.5.1.1 Essai DPPH du fractionnement bioguidé**

L'extrait éthanolique d'*U. lactuca* a été fractionné en sept fractions. Le potentiel antioxydant de chacune d'elle, quantifié avec la méthode DPPH, était significativement influencé par la température et la fraction ( $p = 0,0231$ ). Cependant, la concentration de chaque fraction n'influçait aucunement la réponse antioxydante. Les données ont été regroupées pour en faire des moyennes de pourcentage de DPPH réduit qui sont représentées à la figure 9. La réponse de l'activité antioxydante suit une tendance similaire, peu importe la température, en présentant une diminution à 80 °C. Toutefois, l'extrait total, toutes concentrations confondues, possède un pourcentage de DPPH réduit plus important que celui des fractions.

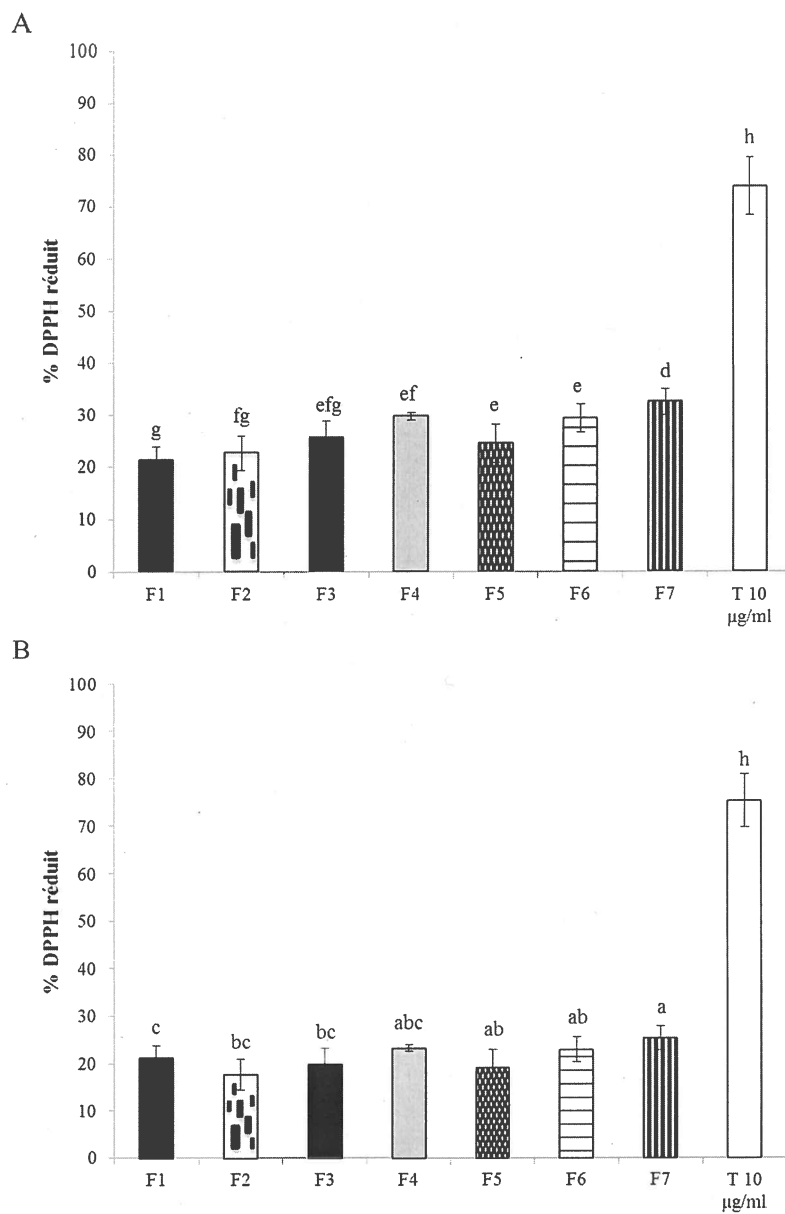


Figure 9 : Résultats DPPH moyens (% DPPH réduit) des fractions d'*U. lactuca*, issues du fractionnement bioguidé des extraits éthanoliques réalisés à 50°C (A) et 80 °C (B), et du standard de Trolox (10 µg/ml). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  l'écart type (N = 3). Les moyennes n'étant pas associées par la même lettre sont significativement différentes ( $p < 0,05$ )

### 3.5.1.2 Essai FRAP du fractionnement bioguidé

L'activité antioxydante mesurée avec l'essai FRAP est dépendante d'une interaction significative entre la température d'extraction de l'extrait éthanolique total, de la concentration et de la fraction qui est testée ( $p < 0,0001$ ). Les résultats sont présentés à la figure 10. La fraction 5, issue de l'extraction d'*U. lactuca* produite à 50 °C, est celle qui démontre la plus importante activité, mais seulement aux plus faibles concentrations (847,3  $\mu\text{mol TE/g}$  à 50  $\mu\text{g/ml}$  et 666,7  $\mu\text{mol TE/g}$  à 100  $\mu\text{g/ml}$ ) comme pour l'extrait non fractionné. Les extraits totaux réalisés à 80 °C d'*U. lactuca* et d'*A. nodosum* répondent que très faiblement, ou aucunement dans le cas de *S. longicruris*, au test FRAP, tandis que les fractions F3, F4 et F5, donnent une réponse supérieure. Le potentiel antioxydant le plus grand est aussi observé à la plus faible concentration, plus précisément, des fractions 3 et 4 avec 2 212,8  $\mu\text{mol TE/g}$  et 1 238,5  $\mu\text{mol TE/g}$ .



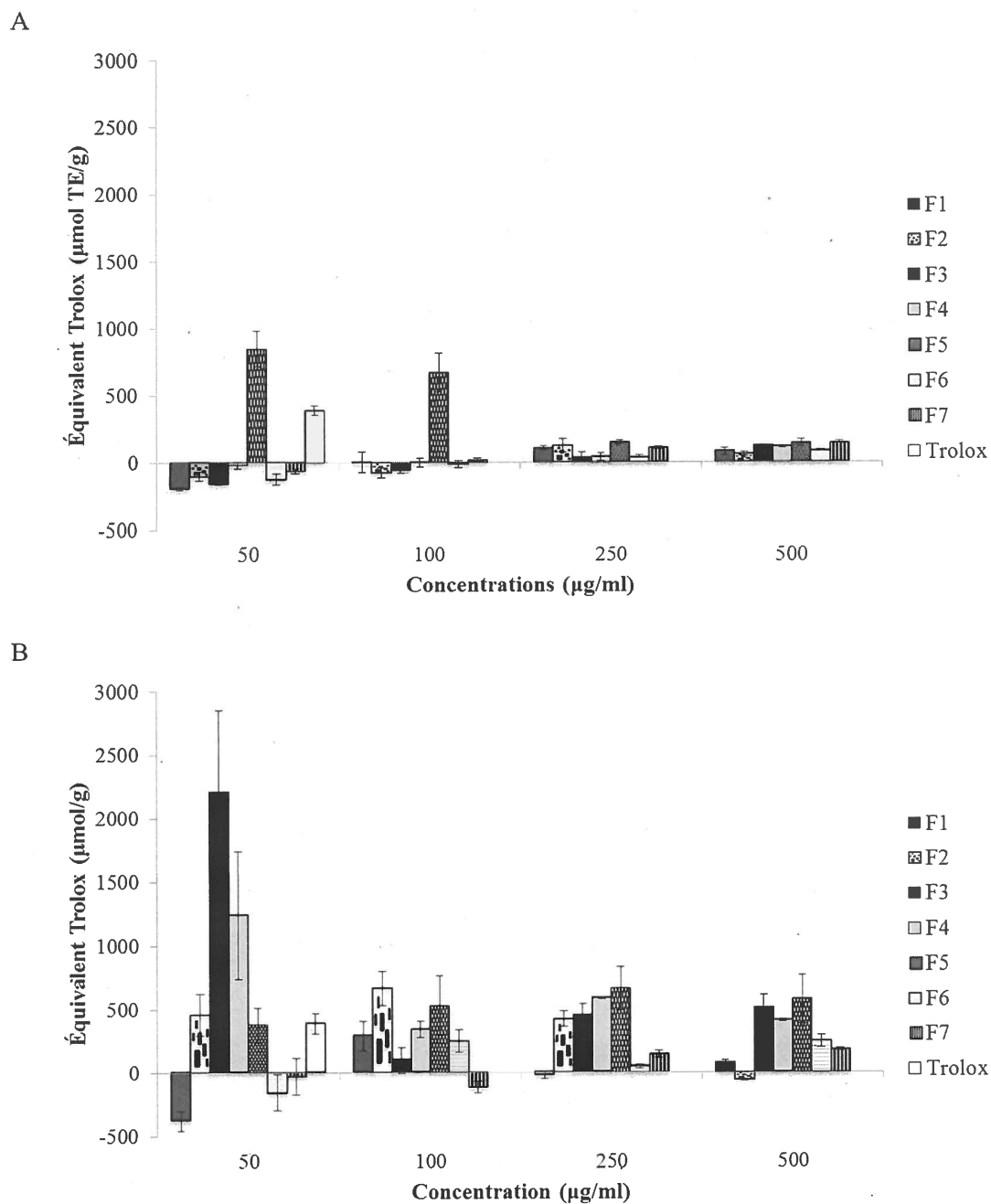


Figure 10 : Résultats FRAP ( $\mu\text{mol TE/g}$ ) des fractions d'*U. lactuca* (50, 100, 250 et 500  $\mu\text{g/ml}$ ) issues du fractionnement bioguidé des extraits éthanoliques réalisés à 50°C (A) et 80 °C (B), et du standard de Trolox (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  l'écart type (N = 3)

### 3.5.2 POTENTIEL ANTIBACTÉRIEN DES FRACTIONS D'*ULVA LACTUCA*

#### 3.5.2.1 *E. coli*

Les fractions produites par fractionnement bioguidé ont seulement été testées sur la souche bactérienne *E. coli*. Le seul facteur qui influence significativement la réponse antibactérienne dans ce cas est la concentration de la fraction ( $p < 0,0001$ ). Aucune différence n'a été observée entre les températures d'extraction ou encore le type de fraction. La seule concentration totalement différente du contrôle de croissance est 500  $\mu\text{g/ml}$ . Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne de toutes les fractions à la même concentration (Fig. 11). L'inhibition de croissance de la souche bactérienne est de 8,8 % à 500  $\mu\text{g/ml}$ .

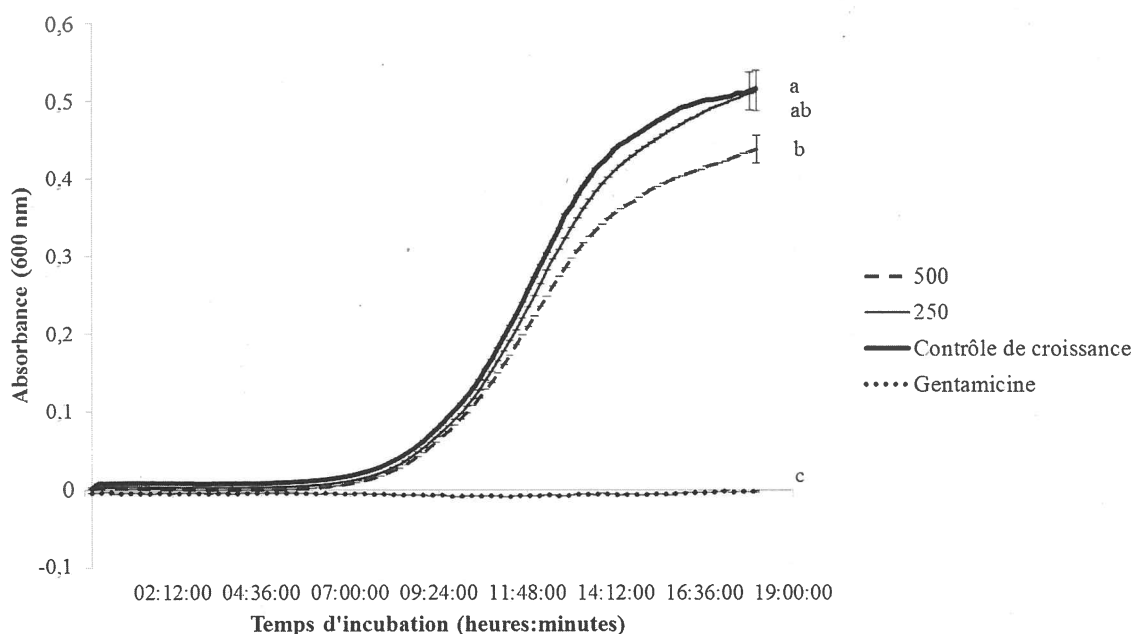


Figure 11 : Courbes de croissance d'*E. coli* en présence des fractions d'*U. lactuca*, issues du fractionnement bioguidé des extraits éthanoliques réalisés à 50 °C, ainsi que le standard de Gentamicine (25  $\mu\text{g/ml}$ ). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  l'écart type (N = 18). Les moyennes n'étant pas associées par la même lettre sont significativement différentes ( $p < 0,05$ )

## CHAPITRE 4

### DISCUSSION

#### 4.1 CARACTÉRISATION CHIMIQUE

La composition chimique des macroalgues n'est pas aussi bien connue que celles des plantes terrestres, cependant on sait qu'elles sont riches en glucides, en protéines et en minéraux ainsi qu'en composés bioactifs tels que les polyphénols, les terpénoïdes, les caroténoïdes et les tocophérols (Gupta & Abu-Ghannam, 2011). Elles synthétisent une variété de métabolites qui ne sont pas retrouvés chez les plantes terrestres (Plaza *et al.*, 2008). La nature bioactive de plusieurs métabolites secondaires peut résulter de la présence de groupes fonctionnels hautement réactifs. En raison de cette réactivité, ces composés peuvent être sujet à des réactions de décomposition ou de conversion pouvant mener à une diminution des rendements des métabolites naturels, une mauvaise interprétation des données quantitatives, une diminution de l'ampleur des activités des bioessais et à l'attribution à tort d'activités biologiques induites par un artefact à des métabolites secondaires naturels. Lors d'études sur les interactions biochimiques parmi les organismes marins, l'information sur la variation de la composition des métabolites secondaires à l'intérieur d'une population, ou chez un même individu, est cruciale pour déterminer les facteurs qui affectent leur formation et comment ces derniers influencent le fonctionnement des structures de l'organisme. Plusieurs études ont démontré que les méthodes d'entreposage et d'extraction des échantillons d'algues pouvaient considérablement modifier le rendement et l'importance du potentiel d'activité biologique (Chen & Ciou, 2008). Quelques composés bioactifs ont été isolés et identifiés comme étant des polysaccharides sulfatés comme les laminaranes et les fucoïdanes, des phénols tels que les phlorotannins, des pigments caroténoïdiens incluant la fucoxanthine et l'astaxanthine, des stérols et des acides aminés de type mycosporine (MAAs)

(Airanthi et al., 2011; Zou et al., 2008). L'eckol, dieckol, le 6,6'-bieckol, 8,8'-bieckol et le phlorofucofuroeckol-A sont tous des phlorotannins qui ont été observés dans des extraits d'algues brunes. Parmi les polyphénols retrouvés chez les algues vertes, on mentionne l'épigallocatechine, la myricetine, l'acide caffeique, l'hesperidine et la cathéchole (Yoshie et al., 2002).

La composition chimique totale varie en fonction de plusieurs paramètres comme la situation géographique, les variations saisonnières, les marées, la température et les pressions du milieu tel que la prédation. L'évaluation de ce paramètre est importante, car elle informe sur les activités biologiques potentielles qui peuvent être retrouvées dans la biomasse que l'on veut valoriser. La composition chimique totale des trois macroalgues à l'étude est comparable aux données compilées dans différentes revues de la littérature (Annexe III-1) (MacArtain et al., 2007). De plus, les trois macroalgues à l'étude, toujours selon les données recueillies dans la littérature, sont d'importantes sources de sels et minéraux. Plus particulièrement, elles sont une source abondante de calcium, de potassium, de sodium, d'iode et de magnésium supérieure à des aliments de consommation courante tels que le riz brun, le steak de surlonge, les épinards, les bananes, etc (Annexe III-2). Avec leurs implications dans les processus enzymatiques antioxydants ou encore leurs effets antimicrobiens, les sels et minéraux des algues sont un élément additionnel qui fait des macroalgues une biomasse intéressante à valoriser (Shechter et al., 2000; Tah, 2004; Voet & Voet, 2005).

#### **4.2 POTENTIEL ANTIOXYDANT**

L'activité antioxydante est certainement celle qui a suscité le plus grand intérêt parmi les composés significatifs trouvés dans les algues, car elle est considérée comme un facteur clef contre plusieurs maladies. De plus, la pertinence d'utiliser des composés d'origine naturelle est de plus en plus supportée par les consommateurs préoccupés par la

toxicité des antioxydants synthétiques. Donc, trois méthodes de dosage ont été réalisées, soit DPPH, FRAP et ORAC, pour mieux caractériser le potentiel antioxydant des extraits algaux.

À ce jour, très peu de publications utilisent des méthodes antioxydantes sous différentes conditions ce qui implique que les données sont difficilement comparables si les protocoles ont besoin d'être optimisés. La complexité de la comparaison augmente avec la spécificité des espèces de macroalgues utilisées et des particularités de leurs méthodes d'extraction.

#### 4.2.1 ESSAI DPPH

L'activité antioxydante, mesurée avec l'essai DPPH et obtenue à partir des extraits éthanoliques totaux de l'algue *S. longicuris*, était significativement influencée par la température d'extraction en présentant une diminution du potentiel antioxydant à 80 °C et par les variations de concentrations. Cette diminution peut être en partie expliquée par le fait que le potentiel antioxydant mesuré avec DPPH possède une excellente corrélation avec la quantité de phénols totaux et que de hautes températures d'extraction influencent à la baisse ces derniers qui seraient dégradés par la chaleur (Wu *et al.*, 2012). Il est difficile de comparer les valeurs de potentiel antioxydant de cette algue avec la littérature, car très peu d'information est disponible. D'autres études recensent des données sur des macroalgues pouvant être considérées similaires sur plusieurs points, dont *L. hyperborea* qui a une activité antioxydante qui varie principalement entre 30 et 50 % de DPPH réduit et *L. digitata* qui a une activité non détectable avec cette méthode quand le matériel est préparé avec du méthanol et de l'eau désionisée (50 :50, v/v) (Connan *et al.*, 2006). Cependant, des valeurs de 20 à 33 % ont été observées par Rajauria *et al.* (2012) pour *L. digitata* avec des extraits provenant d'un gradient de méthanol passant de 20 à 100 %. Lors de cette recherche, les échantillons testés étaient

sous la forme d'un homogénat de la plante totale ce qui, évidemment, entraîne une composition analysée différente, donc des résultats différents de ceux obtenus des extraits éthanoliques évalués dans cette étude. Quant aux extraits éthanoliques totaux de *S. longicuris*, à 50 °C, les réponses varient entre 48,3 et 64,7 % et à 80 °C, de 50,1 à 65,9 %.

La concentration des extraits éthanoliques totaux n'influence pas la réponse antioxydante du test DPPH pour *U. lactuca*, peu importe la température d'extraction. La réponse moyenne mesurée de 53,3 % est près de quatre fois supérieure dans notre étude, tandis que le pourcentage de DPPH réduit rapporté pour *U. lactuca*, extraite avec du méthanol, est de 14,2 %, (Meenakshi et al., 2012). Le méthanol et l'éthanol possèdent des propriétés d'extraction assez similaires. Cette importante différence entre les résultats pourrait provenir de l'importante variation saisonnière de la composition chimique, principalement en métabolites secondaires qui augmentent avec la saison de croissance (Chapman & Craigie, 1977).

Dans le cas d'*A. nodosum*, la concentration de l'extrait influence significativement le pourcentage de DPPH réduit, contrairement à la température. Apostolidis et Lee (2010) ont aussi observé cette tendance sur des extraits aqueux d'*A. nodosum* frais produits à 20, 40, 60 et 80 °C. De plus, il y a une tendance à l'augmentation du potentiel antioxydant en fonction de la concentration. À 500 µg/ml, la réponse (90,6 %) n'était pas significativement différente du standard de Trolox ce qui apparaît exceptionnel. Des valeurs plus basses que celles mesurées dans la présente étude ont été rapportées dans la littérature. La valeur de 25,6 % de DPPH réduit pour *A. nodosum* a été présentée par d'autres auteurs (O'Sullivan et al., 2009). Les valeurs de pourcentage de DPPH réduit obtenues, variant de 53 à 93 %, sont bien supérieures à celles décrites par Jinénez et al. (2010), qui varient de 12 à 62 %, malgré le fait que les concentrations qu'ils ont utilisées étaient égales ou jusqu'à 800 fois plus importantes (0,5, 2, 4, 6, 8 mg/ml). Par contre, selon leur méthodologie, le temps de réaction était de 15 minutes au lieu de 90 minutes. Comme il est maintenant décrit dans la littérature, la cinétique est un aspect important de

la réponse obtenue (Mishra et *al.*, 2012; Sharma & Bhat, 2009). L'explication de nos résultats très élevés pour cette algue peut provenir d'un temps de réaction plus long permettant à certaines réactions plus lentes de prendre place et contribuer à la réduction du DPPH.

Les cinétiques des extraits éthanoliques totaux des trois macroalgues sont classées comme étant de moyennes à lentes, soit respectivement entre 0 et 150 minutes et 0 et 150 minutes et plus. Dans cette présente étude, l'essai DPPH a été réalisé en cinétique sur 90 minutes au cours desquelles les extraits des algues *U. lactuca* et *S. longicuris* ont atteint leur plateau tandis que ceux d'*A. nodosum* n'ont sûrement pas complété leur réaction. Comme les standards utilisés ont généralement des cinétiques rapides, sinon instantanées, dans la plupart des cas, le potentiel antioxydant se trouve sous-estimé ce qui serait potentiellement le cas avec les extraits d'*A. nodosum*.

Müller et *al.* (2011) ont rapporté que le  $\beta$ -carotène et le lycopène ne répondent pas de façon dépendante à la concentration lorsque testés avec l'essai DPPH. Pour le lycopène, c'est une relation inverse qui est présente entre la dose et le potentiel antioxydant. De plus, les valeurs de DPPH qu'ils ont relevé sont vraiment plus basses que celles de leur standard. Lors de cette étude, les mêmes observations ont été notées pour les extraits éthanoliques totaux. Les extraits algaux, particulièrement à grande concentration, ajoutés au réactif DPPH produisaient une couleur violet foncé, tirant parfois sur le brun ce qui interfère avec la lecture de l'absorbance à 515 nm qui est la plus commune dans les protocoles. Cependant, deux autres articles relatent ce problème et il y est proposé de faire une lecture à 540 nm, où DPPH possède encore une absorbance significative, pour réduire l'interférence (Liu et *al.*, 2008; Müller et *al.*, 2011). L'absorbance a été mesurée à 520 nm dans le cas de ce projet. Il est possible que le potentiel antioxydant acquis avec DPPH soit sous-estimé, car même si l'absorbance est un peu plus élevée, elle reste très près de 515 nm.

La méthode DPPH a été fréquemment employée au cours des dernières années pour l'estimation du potentiel antioxydant. Les revues de publications des dix dernières années soulèvent le fait que plusieurs protocoles et méthodes sont employés et que plusieurs facteurs influencent la réponse tels que la concentration de DPPH n'ayant pas réagi, le temps de réaction, le type de solvant, la concentration de l'échantillon et le pH, ce qui mène à une variabilité dans les résultats publiés (Mishra et *al.*, 2012). Comme dans le cas présent, les propriétés antioxydantes d'extraits naturels sont reliées à leur composition autant quantitativement que qualitativement ce qui entraîne différentes réponses utilisant un même solvant d'extraction. Par ailleurs, la même plante peut non seulement avoir des variations quantitatives et qualitatives, mais aussi de composition. Les acides naturels et les ions métalliques sont un bon exemple de ce genre de composés (Dawidowicz et *al.*, 2011). Les ions métalliques sont naturellement présents dans les plantes, plus particulièrement dans les algues, et leurs concentrations varient en fonction du type de plante, des conditions de croissances, de d'autres types d'ions présents, des conditions d'extractions, etc. La modification de la cinétique entre le DPPH et l'antioxydant peut être attribuée à la formation de complexes métalliques avec les composants du système que l'on mesure (Barton & Horanska, 1973; Leh & Wan, 1972). Ce n'est pas un détail qu'il faut négliger comme source de variation ou encore d'erreur lors de l'estimation antioxydante des macroalgues, car elles possèdent d'importantes quantités de sels et minéraux dans leur composition chimique globale (MacArtain et *al.*, 2007). Comme la concentration du DPPH n'ayant pas réagi dépend du type et de la concentration des ions métalliques, leur présence n'est pas négligée. Enfin, parce que la quantité de DPPH n'ayant pas réagi sert de mesure à l'activité antioxydante, les résultats de Dawidowicz et *al.* (2011) pointent de possibles erreurs dans l'estimation des propriétés antioxydantes.

Selon l'étude mentionnée ci-haut à propos de la réaction DPPH/BHT (hydroxytoluène butylé), l'activité antioxydante estimée avec la méthode DPPH dépend du type de solvant utilisé pour la dissolution de l'antioxydant ce qui modifie la vitesse de la cinétique et de la quantité de solvant, car un grand volume ralentit la vitesse de



réaction. L'activité augmente avec le contenu en eau dans le système et diminue avec la concentration d'ions métalliques. Elle dépend de la quantité d'hydrogène, car en présence d'une concentration importante d'ion hydrogène, la cinétique entre le DPPH et l'antioxydant est ralentie. Toutefois, à un pH près de 4, une accélération est observée.

#### 4.2.2 ESSAI FRAP

Beaucoup moins de résultats sont disponibles sur le dosage de l'activité antioxydante avec l'essai FRAP. Les standards utilisés pour le calcul de l'activité équivalente sont plus variés ce qui rend la comparaison entre les valeurs obtenues et celles de la littérature plus difficile. *S. longicuris* n'a pas bien répondu à ce test en présentant des valeurs négatives ou très petites (13,0 à 22,9  $\mu\text{mol TE/g}$ ) aux plus importantes concentrations soit 250 et 500  $\mu\text{g/ml}$ . Les macroalgues *S. lattissima*, *L. hyperborea* et *L. digitata* possèdent un potentiel respectif de 208,1, 183,6 et 4 033,3  $\mu\text{mol acides ascorbiques/g}$  (O'Sullivan et al., 2009). Lors d'extractions effectuées avec *L. digitata*, en utilisant du méthanol 20, 40, 60, 80 et 100 %, des réponses variant de 2,4 à 4,9  $\text{mg TE/g}$  ont été observées (Rajauria et al., 2012), ce qui correspond à 9,59 et 19,58  $\mu\text{mol TE/g}$  une fois les unités transformées aux fins de comparaison avec celles de cette présente étude. Une étude réalisée par Jiménez-Escrig et al. (2001) avec des laminaires comestibles dites Kombu, a démontré des valeurs de 6,9  $\mu\text{mol TE/g}$  obtenues après quatre minutes suite à l'ajout des réactifs et de 13,3  $\mu\text{mol TE/g}$  après huit minutes. La concentration des échantillons n'était pas spécifiée, mais le potentiel mesuré reste dans le même ordre de grandeur que ce qui a été observé dans cette étude et dans celle de Rajauria et al. (2012).

La réponse antioxydante d'*U. lactuca* est significativement influencée par la température et par la concentration des extraits. Les extraits éthanoliques d'*U. lactuca* traités à 50 °C varient entre 2 972,7 et 276,4  $\text{mol TE/g}$  et ceux à 80 °C, entre 250,0 et

143,4 mol TE/g. De plus, à 50 °C, il y a une tendance claire où l'activité antioxydante est inversement proportionnelle à la concentration. Un tel résultat est étonnant et mérite d'y porter attention. Les produits de comparaison utilisés pour l'estimation du potentiel antioxydant sont peu standardisés et comme l'essai FRAP est rarement employé avec des macroalgues, la comparaison entre les résultats obtenus et ceux qui ont déjà été publiés est difficile et peu fiable. Ce qui est rapporté pour l'instant par Garcia-Casal et al. (2009) est une activité de 4,64  $\mu\text{mol Fe/g}$  et pour Meenasshi et al. (2012), elle est de 50 mg GAE/g. Il se pourrait qu'une interférence, dont l'action de protection augmente plus vite avec l'augmentation de la concentration que l'action des molécules antioxydantes, soit à l'origine de cette observation. L'hypothèse serait que cette interférence ne donnerait pas une relation linéaire entre la dose et la réponse, mais plutôt une relation exponentielle.

Les études sur l'estimation du potentiel antioxydant d'*A. nodosum* avec FRAP sont presque inexistantes. O'Sullivan et al. (2009) recensent une valeur de 81,4  $\mu\text{mol}$  d'acide ascorbique/mg lorsque l'extraction d'*A. nodosum* est réalisée avec du méthanol 60 %. Il est difficile de faire un rapprochement à cause du standard de comparaison qui diffère de celui utilisé. Cependant, une étude récente ayant produit des extraits à partir d'*A. nodosum* avec de l'éthanol 80 % utilisant la méthode ASE, a démontré une réponse de cet extrait de 56,66  $\mu\text{g TE/mg}$ , ce qui donne une valeur de 150,92  $\mu\text{mol TE/g}$  suite à une conversion des unités (Tierney et al., 2012). Les valeurs obtenues par ces auteurs varient entre 1 161,07 et 461,51  $\mu\text{mol TE/g}$  pour les échantillons produits à 50 °C et entre 0,01 et 358,51  $\mu\text{mol TE/g}$  pour ceux à 80 °C. À l'exception de l'activité mesurée pour la concentration de 50  $\mu\text{g/ml}$  à 80 °C, les résultats obtenus pour ce travail sont entre 49 et 87 % plus élevés que ceux mentionnés dans la publication de Tierney et al (2012).

Le test FRAP est généralement utilisé pour les mesures d'activités antioxydantes *in vitro* ce qui explique encore la rareté des données disponibles à propos des algues en général. Ce test est dit de type SET, comme la méthode  $\alpha$ -TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), dans lequel le potentiel redox des composés analysés est

important avec une bonne corrélation ( $R = 0,780$ ) (El-Agamey & McGarvey, 2008). Par contre, Müller et *al.* (2011) ont observé une corrélation faible ( $R = 0,491$ ) entre les valeurs FRAP et le potentiel redox de plusieurs caroténoïdes. Ils expliquent cette différence à cause de la faible activité du cycle  $\beta$ -ionone que possèdent les caroténoïdes et les cétocaroténoïdes. Normalement, les extraits testés devraient réagir de façon similaire, car FRAP et  $\alpha$ TEAC ont le même mécanisme antioxydant et que les potentiels redox des réactifs utilisés soit le Fe(II)/(III) (0,70 V) et ABTS/ABTS $\bullet+$  (0,68 V), sont semblables. Seulement une faible corrélation est présente entre les résultats de FRAP et ORAC, car l'essai ORAC exprime plus que le potentiel de réduction des radicaux libres (Müller et *al.*, 2011). Comme les radicaux peroxydes sont générés tout au long du test, par l'AAPH, c'est la seule méthode, avec l'essai LPSC (*Luminol-chemiluminescence based Peroxyl radical Scavenging Capacity*), qui combine l'inhibition dans le temps et le degré d'inhibition. Ce n'est qu'un exemple qui démontre la complexité des réactions antioxydantes.

#### 4.2.3 ESSAI ORAC

L'effet de la température d'extraction n'est pas significatif lorsque le test ORAC est effectué pour l'évaluation du potentiel antioxydant. La concentration l'est par contre avec la même tendance retrouvée lors de l'essai FRAP, soit qu'il y a une diminution de l'activité antioxydante avec l'augmentation de la quantité de substrat de la concentration des extraits éthanoliques des macroalgues à l'étude. La même hypothèse décrite précédemment pour tenter d'expliquer les résultats obtenus avec FRAP est retenue, soit qu'une interférence de type exponentielle camouflerait la réponse antioxydante aux plus grandes concentrations testées. À notre connaissance, seulement Wang et *al.* (2009) ainsi que Apostolidis et *al.* (2011) ont choisi d'utiliser ORAC lors de leurs recherches sur les macroalgues. Pour une extraction à l'acétone 70 %, les valeurs exprimées en  $\mu\text{mol TE/g}$  pour *U. lactuca*, *A. nodosum*, *S. lattissima*, *L. hyperborea* et *L. digitata*, sont

respectivement de 240, 1417, 480, 975 et 4 (Wang et *al.*, 2009). Pour une extraction aqueuse, *A. nodosum* a une activité équivalente à 16  $\mu\text{mol TE/g}$  (Apostolidis et *al.*, 2011). Les résultats ORAC de *S. longicruris*, d'*U. lactuca* et d'*A. nodosum* varient respectivement, entre 8,5 et 13,9, 78,3 et 128,6 et 41,5 et 52,1  $\mu\text{mol TE/g}$ . Il en ressort une grande différence entre les résultats tirés de la littérature et ceux de cette étude. Il serait important, pour l'avenir, d'avoir une plus grande base de données permettant une meilleure évaluation du potentiel antioxydant avec la méthode ORAC.

#### 4.2.4 MÉCANISMES ET PROPRIÉTÉS ANTIOXYDANTS DES MACROALGUES

Les molécules déjà identifiées dans les macroalgues ayant un potentiel antioxydant sont, entre autres, des pigments comme la fucoxanthine et l'astaxanthine, des polyphénols, des composés apparentés à la chlorophylle, des phospholipides, des flavonoïdes, des bromophénols et des polysaccharides (Gupta & Abu-Ghannam, 2011). Le potentiel de chélation métallique de ces composés a été identifié comme étant dépendant de la structure phénolique, du nombre et de la location des groupes hydroxyles (Santoso et *al.*, 2004). Le cycle des composés polyphénoliques agit comme une trappe à électrons et il est responsable des propriétés antioxydantes de cette classe de molécules. Les phlorotannins algaux ont jusqu'à huit cycles interconnectés ce qui en fait des antioxydants plus puissants que leurs homologues terrestres (Athukorala et *al.*, 2003; Wang et *al.*, 2009). Une forte corrélation entre le contenu phénolique total et l'activité antioxydante est démontrée par plusieurs chercheurs (Athukorala et *al.*, 2003; Chew et *al.* 2008; Rajauria et *al.*; Wang et *al.*, 2009).

### 4.3 PHÉNOLS TOTAUX

Les informations portant sur les phénols totaux de *S. longicruris* sont très limitées. Par contre, d'autres algues dans la même famille ont été étudiées et on note des valeurs, exprimées sur base sèche, de 0,2 à 0,3 %, pour des extraits de *L. hyperborea* obtenus avec du méthanol : eau désionisée à 40 °C (50/50, v/v) et de 1,3 mg GAE/g pour des extraits de *Saccharina latissima* obtenus avec de l'eau à 90 °C (Apostolidis & Lee, 2010; Connan et al., 2006; Connan et al., 2007). Pour *L. digitata*, on rapporte une quantité de 17,6 à 46,6 mg GAE/g, pour des extractions au méthanol entre 20 et 100 % à 29 °C. Les valeurs qui ont été obtenues dans notre étude sont dans le même ordre de grandeur, soit de 0,3 à 0,2 %, ou 3,26 à 2,04 mg GAE/g, des extraits secs produits à 50 et 80°C. Malgré le fait que *S. longicruris* soit l'algue qui possède le moins de phénols totaux, il est souvent mentionné dans la littérature que se sont les algues brunes qui possèdent les plus grands taux de composés phénoliques et qu'ils sont l'un des antioxydants les plus efficaces dans ce type de macroalgue (Cox et al., 2010; Nagai & Yukimoto, 2003).

Pour *U. lactuca*, certains auteurs obtiennent une valeur de 1,6 mg GAE/g, exprimée sur base sèche, comparativement à 6,9 mg GAE/g pour les extraits réalisés à 50 °C et 7,1 mg GAE/g pour ceux à 80 °C. Il a aussi été démontré, pour *U. lactuca* qu'il y avait une quantité de 0,9 % de phénols, exprimés sur base sèche, ce qui est assez similaire à la valeur évaluée de 0,7 % lors de ce projet (Wong & Cheung, 2001).

Les valeurs de pourcentage de phénols totaux, exprimés sur base sèche, des extraits éthanoliques d'*A. nodosum* sont similaires à celles obtenues par Connan et al. (2006, 2007) soit entre 4 et 5,2 %. Les valeurs présentées en mg GAE/g par Apostolidis et Lee (2010) sont dix fois moins importantes que celles mesurées dans cette étude. Cependant, leurs extraits ont été produits en utilisant de l'eau comme solvant ce qui implique une tout autre composition que celle qui a été évaluée. Wong et Cheung (2001) ont mesuré une quantité de phénols totaux, d'une extraction à l'acétone 80 %, de

6,8 mg GAE/g en comparaison à 50,2 et 42,8 mg GAE/g, respectivement pour les extractions réalisées à 50 et 80 °C. Il est possible que ces divergences soient dues à une variation de la structure des groupements des composés phénoliques ou encore à la présence de molécules à grande activité antioxydante telles que les caroténoïdes, plus particulièrement la fucoxanthine (Heo et *al.*, 2008; Le Tutour et *al.*, 1998; Sachindra et *al.*, 2007), les terpénoïdes (Anggadiredja et *al.*, 1997; Watson & Cruz-Rivera, 2003) et la pyrophéophytine *a* (Cahyana et *al.*, 1992). Puisqu'à une même concentration en phénols totaux, l'activité antioxydante d'*A. nodosum* est supérieure à celle de plantes terrestres, cela fait de cette macroalgue une biomasse intéressante à valoriser (Connan et *al.*, 2006).

#### 4.3.1 EFFET DE LA TEMPÉRATURE D'EXTRACTION

Dans ce travail, la différence entre les températures d'extraction n'influence pas de façon significative les résultats de phénols totaux, sauf pour *S. longicuris*. Dans la littérature, il est mentionné qu'à plus haute température, en employant la méthode d'extraction ASE, les extraits produits démontrent une diminution de potentiel antioxydant pouvant être due à une dégradation des composés phénoliques causée notamment par des hydrolyses, des réactions d'oxydoréduction interne et de polymérisation (Alonso-Salces et *al.*, 2001; Simon et *al.*, 1990). Selon Chen et Ciou (2008), l'augmentation de la température est corrélée avec une augmentation des rendements des extraits avec une extraction optimale des polyphénols à 40 °C. De plus, la récupération de la plupart des composés phénoliques était similaire à 40 et 63 °C, mais les températures supérieures à 40 °C extrayaient plus de composés non actifs de la biomasse initiale. Lim et Murtijaya (2007) ainsi que Chen et Ciou (2008) rapportent aussi une diminution significative du contenu phénolique total selon les traitements de séchage. Lors de l'étude de l'effet de la température d'extraction, de *Laminaria saccharina*, *Laminaria digitata* et *Himanthalia elongata*, sur la quantité de composés

phénoliques et leur capacité antioxydante, Rajauria et *al.* (2010) ont observé une augmentation significative du potentiel antioxydant total.

#### 4.4 POTENTIEL ANTIBACTÉRIEN

L'augmentation de la demande de recherche pour trouver de nouveaux composés thérapeutiques de source naturelle a créé un intérêt pour la bioprospection chez les organismes marins. Dans la littérature récente, de plus en plus, il est démontré que des produits naturels marins possèdent des activités biologiques. Les macroalgues sont connues pour avoir des potentiels antimicrobiens, mais ils sont encore que très peu étudiés. Trois souches bactériennes connues pour leurs implications dans des contaminations dans le domaine de l'agroalimentaire ont été sélectionnées, soit *E. coli*, *M. luteus* et *B. thermosphacta*, pour tester le potentiel antibactérien des algues *S. longicruris*, *U. lactuca* et *A. nodosum*. Les algues fraîches sont reconnues pour posséder plus d'activités antibactériennes que les algues sèches, car certains principes actifs sont éliminés par la déshydratation (Shanmughapriya et *al.*, 2008; Tuney et *al.*, 2006). Ce phénomène pourrait être relié à la présence de composés volatils antimicrobiens comme des peroxydes d'hydrogène, des terpénoïdes, des acides gras volatiles et des bromo-éthers (Masuda et *al.*, 1997). Ainsi, les extraits éthanoliques des algues séchées et traitées par Organic Ocean ont démontré des inhibitions de la croissance bactérienne.

##### 4.4.1 *E. COLI* (ATCC 25922)

L'effet antibactérien le plus important sur *E. coli* est obtenu avec l'extrait éthanolique d'*U. lactuca*, avec une diminution de croissance de 69,5 %. Considérant que la quantité de composés bioactifs de l'extrait est inconnue, *U. lactuca* détient un potentiel de valorisation à explorer, car avec l'activité qu'elle démontre, elle pourrait

offrir de grandes possibilités pour des composés à valeur ajoutée s'ils étaient isolés et concentrés. La méthode d'évaluation du potentiel antimicrobien en microplaque est peu répandue lors d'essais effectués avec des extraits d'origine marine, bien qu'elle soit beaucoup plus précise et qu'elle donne des informations importantes sur la cinétique de la croissance du microorganisme. La majorité des essais se font encore par des méthodes élémentaires en pétris avec des disques ou des puits contenant la substance à tester. La comparaison avec les résultats de la littérature disponible ne se fait donc pas sur les mêmes unités de mesure. Chiheb *et al.* (2009) ont étudié des extraits d'*U. lactuca* pour leur effet inhibiteur contre *E. coli* (ATCC 25922). Ils ont observé un diamètre d'inhibition de 16 à 20 mm. Quant à Ravikumar *et al.* (2002), ils ont étudié la même algue sur la même souche bactérienne (ATCC 25922), avec un disque imbibé de 20 mg d'échantillon, et ont obtenu un diamètre d'inhibition de 6 à 8 mm. D'autres auteurs ont utilisé la souche bactérienne *E. coli* (D31) en présence d'extraits d'*U. lactuca*, à des concentrations de 200, 300 et 400 µg/ml, et ont obtenu des diamètres d'inhibition de 11, 14 et 17 mm, qu'ils ont qualifié comme une activité moyenne à forte (I. Kim *et al.*, 2007).

La seconde activité la plus importante est celle de l'extrait éthanolique de *S. longicuris*, avec une diminution de croissance de 44,0 %. Aucune autre référence connue n'emploie des laminaires comme source potentielle d'activités biologiques pour des essais antimicrobiens sur les souches à l'étude. Les réponses sont dépendantes de l'algue, de la concentration et de la souche qui sont employées ce qui complexifie les parallèles possibles avec d'autres travaux similaires. Il en ressort un besoin important de continuer les recherches sur ce sujet, encore que très peu exploité, pour la création d'une banque de données quasiment inexistante pour le moment.

Les concentrations significatives pour *A. nodosum* sont celles de 500 et 250 µg/ml associées à des inhibitions de croissance respectives de 24,1 et de 10,2 %. Cependant, Jiménez *et al.* (2010) ont fixé la concentration minimale d'inhibition d'*A. nodosum* à 400 µg/ml. La méthodologie diffère puisqu'une extraction à l'acétone a été utilisée, à



une concentration initiale de 2 500 µg/ml. Cette différence de procédure est amplement suffisante pour expliquer la divergence des résultats, car les molécules étudiées ne sont pas les mêmes.

#### 4.4.2 *M. LUTEUS* (ATCC 9342)

L'algue *U. lactuca* est celle qui inhibe le plus la bactérie en répondant par une diminution de croissance de 61,5 %. Une autre étude effectuée sur des extraits d'*U. lactuca*, à des concentrations de 200, 300 et 400 µg/ml, a permis d'obtenir des diamètres d'inhibition respectifs de 8, 10 et 12 mm sur la souche bactérienne *M. luteus* (KCTC1056), ce qui est caractérisé d'activité moyenne par les auteurs (I. Kim et al., 2007).

L'extrait de *S. longicruris* diminue la croissance bactérienne de 34,0 % lorsqu'ajouté au milieu nutritif. Aucune autre étude connue ne fait mention de l'utilisation d'extrait de *Laminaria* ou de *Saccharina* pour induire une réponse antibactérienne sur la souche *M. luteus*.

*M. luteus*, en présence des extraits d'*A. nodosum*, a démontré une baisse significative de 34,7 % de l'absorbance mesurée. Jiménez et al. (2010) ont déterminé la concentration minimale inhibitrice d'*A. nodosum* qui est de 250 µg/ml lorsque testé sur *M. luteus*. Encore une fois, les différences dans la méthodologie peuvent expliquer en bonne partie les variations entre les réponses de l'activité antibactérienne de cette macroalgue.

#### 4.4.3 *B. THERMOSPACTA* (ATCC 11509)

Plusieurs études existent sur l'activité antibactérienne de divers produits et molécules pour contrer la contamination de produits alimentaires par *B. thermosphacta*. Cependant, dans la littérature connue, aucune mention n'est faite de l'utilisation d'extraits de macroalgues quelconques pour le contrôle de la croissance de *B. thermosphacta*. Il est impossible de comparer les valeurs obtenues avec d'autres études pouvant être similaires ce qui souligne l'importance d'acquérir plus d'informations sur le sujet.

Contrairement aux deux autres souches bactériennes, la souche bactérienne *B. thermosphacta* exposée à de faibles concentrations, plus particulièrement celles de *S. longicuris* et d'*A. nodosum*, démontre des diminutions de croissance allant de 4,0 % à 38,0 %. En présence d'*U. lactuca*, *B. thermosphacta* répond avec une diminution de croissance de 21,4 %.

La même tendance est observée pour *S. longicuris* et *A. nodosum*. Aux concentrations les plus grandes, l'activité biologique observée n'est pas significativement différente du contrôle de croissance ou bien plus faible que les concentrations moyennes testées qui possèdent les réponses les plus fortes. Aux plus faibles concentrations, le potentiel antibactérien diminue de nouveau. Dans ce cas-ci, l'activité biologique n'augmente pas en fonction de la concentration des extraits algaux, mais plutôt graphiquement représentée, sous la forme d'une cloche.

#### 4.4.4 COMPARAISON DES ACTIVITÉS ANTIBACTÉRIENNES

La souche bactérienne *B. thermosphacta*, soumise aux extraits éthanoliques de *S. longicuris* et d'*A. nodosum*, semble réagir différemment qu'*E. coli* et *M. luteus*, à un composé se trouvant indisponible lorsque les concentrations sont plus importantes. C'est

un peu comme si la souche répondait de deux façons différentes ou à deux composés différents. Une première hypothèse pourrait être que ce composé pourrait être lié ou impliqué dans des interactions le rendant indisponible pour une activité antibactérienne. Lorsque les dilutions sont plus importantes, ce composé alors libéré de ses interactions affecterait la croissance bactérienne. Une deuxième hypothèse serait qu'il pourrait y avoir une substance probiotique, qui à concentration élevée, ferait augmenter la croissance bactérienne. L'effet probiotique n'étant pas assez important à faible concentration, ne peut pas contrer la réponse antibactérienne qui est alors détectée. L'hypothèse que la ou les molécules, issues de l'extrait éthanolique total d'*U. lactuca*, affectant la croissance des trois souches bactériennes en fonction de leurs concentrations sont différentes de celle(s) qui affectent *B. thermosphacta* aux concentrations entre 125,0 et 1,0 µg/ml, peut être émise. Des recherches similaires ont été réalisées au Centre de recherche en biotechnologie marine (CRBM) et suite à une conversation avec le chercheur Amine Badri, il a suggéré que la réponse obtenue pour *B. thermosphacta* pourrait être le résultat d'une interférence avec la couleur des échantillons ce qui pourrait créer, dans ce cas-ci, la tendance décrite précédemment (communication personnelle).

#### 4.4.5 MÉCANISMES ET PROPRIÉTÉS ANTIBACTÉRIENS DES MACROALGUES

Des effets antibactériens contre plusieurs souches à Gram positif et négatif sont observés en présence d'extraits bioactifs issus d'algues marines (Gupta et *al.*, 2010; Han et *al.*, 2005; Y. B. Kim et *al.*, 2008). Les différences entre les réponses antibactériennes des différentes souches pourraient être dues à la composition propre de leur membrane cellulaire. Certaines molécules impliquées dans des inhibitions de croissances ont été identifiées comme étant des fucophlorethols polyhydroxylés, des terpènes, des phénols ou des molécules de nature lipophile (Sandsdalen et *al.*, 2003).

L'influence d'un extrait naturel ou encore d'un composé synthétique est généralement très claire sur une activité antimicrobienne, par contre le mécanisme de cette action reste peu étudié. Il est connu que les composés phénoliques s'attaquent aux membranes et parois cellulaires ce qui conduit à une lyse et à une perte du contenu intracellulaire. Par ailleurs, l'interférence avec les fonctions membranaires est un autre mode d'action répertorié pouvant prendre la forme d'une perturbation de la chaîne de transport des électrons, de l'apport en nutriments et en protéines, de la synthèse des acides nucléiques et de l'activité enzymatique (Gupta & Abu-Ghannam, 2011). De plus, les mécanismes invasifs de certains polyphénols actifs, tout comme les interactions entre les phlorotannins et les protéines bactériennes joueraient un rôle important dans leur potentiel antibactérien tel que Nagayama et *al.* (2002) et Bajpai et *al.* (2007) le suggèrent. Wang et *al.* (2009) proposent à leur tour que les phlorotannins induiraient une inhibition d'enzymes extracellulaires des bactéries, la privation de substrats nécessaires à leur croissance ou encore l'inhibition directe de la phosphorylation oxydative impliquée dans la voie métabolique qui produit de l'énergie. Ils observent aussi une activité bactériostatique à partir d'une concentration de 25 µg/ml et bactéricide à une concentration supérieure à 50 µg/ml contre *E. coli*, en présence de phlorotannins d'*A. nodosum*. Cette activité supérieure à celle des tannins d'origine terrestre serait attribuée à la présence d'un plus grand nombre de groupements hydroxyles. Cette hypothèse serait supportée par des images, prises par un microscope électronique à transmission, d'*E. coli* incubée avec des phlorotannins et des tannins terrestres, qui suggèrent une altération de la membrane comme mécanisme d'inhibition. Bien que plusieurs études traitant des extraits d'algues marines soient mentionnées, dans très peu de cas des extraits algaux ont été incorporés à des produits alimentaires dans le but d'en augmenter la sécurité et la qualité (Bajpai et *al.*; Nagayama et *al.*, 2002).

Enfin, un fractionnement bioguidé adéquat, ciblant les composés responsables de l'activité observée chez *B. thermosphacta*, principalement causée par *S. longicruris* et *A. nodosum*, pourrait être une excellente piste pour faire continuité à cette étude. Dans ce même ordre d'idée, la macroalgue *U. lactuca* a été choisie, suite à l'intéressant potentiel

antioxydant et antibactérien qu'elle a démontré, pour être l'objet d'un fractionnement bioguidé. De plus, son potentiel de valorisation est d'autant plus intéressant considérant les biomasses importantes et problématiques pouvant être retrouvées sur certaines plages, dont celles de la Bretagne (Cabioc'h et *al.*, 1992). Des produits naturels à valeur ajoutée extraits de cette algue seraient une excellente façon d'utiliser cette ressource et de créer une économie régionale spécialisée et forte.

#### 4.5 FRACTIONNEMENT BIOGUIDÉ D'*U. LACTUCA*

Dans la littérature, il n'est présenté que les résultats de fractionnement bioguidé finaux. Une fois que le fractionnement est optimisé parfaitement, la fraction possédant les propriétés désirées est analysée pour y caractériser les complexes ou la molécule responsable(s) des activités biologiques. Il est pour le moment impossible de faire des comparaisons entre les données de cette étude et d'autres projets similaires, car les manipulations réalisées dans le cadre du fractionnement bioguidé n'étaient que les prémices à un projet plus large qui est présentement en cours. Les informations recueillies sont toutefois essentielles pour la suite des recherches qui mèneront éventuellement à des réponses pouvant être mises en parallèle avec la littérature existante.

##### 4.5.1 POTENTIEL ANTIOXYDANT

Les activités antioxydantes mesurées avec l'essai DPPH issues du fractionnement bioguidé d'*U. lactuca* ne sont pas statistiquement influencées par la concentration des fractions. Cependant, contrairement aux réponses obtenues avec l'extrait éthanolique total d'*U. lactuca*, une différence significative entre les réponses à 50 et 80 °C est présente pour les fractions d'*U. lactuca*. Une importante baisse de l'activité antioxydante

mesurée avec la méthode DPPH est notée entre l'extrait éthanolique total et les sept fractions produites lors du fractionnement bioguidé.

Considérant que le but était d'isoler et de concentrer l'activité détectée précédemment, la méthode de fractionnement bioguidé reste à être optimisée. Le type de gel utilisé en chromatographie, les éluants ou encore leurs proportions ne sont peut-être pas adaptés pour permettre la séparation des complexes actifs mesurés auparavant. Une seconde évaporation et l'augmentation importante des manipulations qu'implique le fractionnement sont aussi des facteurs pouvant affecter les résultats.

L'activité antioxydante mesurée avec l'essai FRAP des sept fractions issues de l'extraction réalisée à 50 °C subit une baisse en comparaison avec l'extrait éthanolique total. Entre les deux valeurs les plus importantes obtenues pour l'extrait éthanolique total, le pourcentage de diminution du potentiel d'activité est de 71,5. Dans ce cas-ci, le fractionnement bioguidé entraîne une perte de potentiel antioxydant. La tendance est complètement inverse, comparée aux extraits éthanoliques totaux, en présentant une réponse que très faible au test FRAP lorsque la température d'extraction est de 50 °C, contrairement à celle de 80 °C.

Lorsque l'on compare le résultat le plus important mesuré pour l'extrait éthanolique total à 80 °C aux plus importants obtenus avec le fractionnement bioguidé, les fractions F2, F3, F4, F5 et F6 possèdent toutes un potentiel antioxydant supérieur. Cette augmentation, plus particulièrement pour la fraction 3 et la fraction 4 à 50 µg/ml, consiste en une concentration de l'activité antioxydante détectée dans les manipulations précédentes. Le fractionnement bioguidé pourrait être légèrement optimisé pour l'obtention d'une isolation plus précise, mais ces données indiquent que les prochaines étapes vers l'identification des composés responsables de ces propriétés peuvent être entamées. Une séparation plus fine par chromatographie en couche mince ou bien encore sur colonne, suivie de tests en HPLC pourrait être entreprise pour une comparaison de la composition des fractions avec une série de standards.

## 4.5.2 POTENTIEL ANTIBACTÉRIEN

### 4.5.2.1 *E. coli*

La croissance d'*E.coli* a été similaire pour toutes les fractions issues de l'extrait éthanolique d'*U. lactuca* à 50 °C, mais seulement la concentration peut influencer la réponse bactérienne. Les données ont donc été rassemblées par concentration, sans distinction pour la fraction, afin d'accroître la puissance statistique. Finalement, seulement la concentration de 500 µg/ml était significativement différente du contrôle de croissance avec une inhibition de 8,8 %.

Dans un organisme vivant, les interactions sont nombreuses et complexes et les mécanismes qui les régulent le sont tout autant. Ce qui a modulé la croissance bactérienne dans les extraits éthanoliques totaux peut être le résultat d'un complexe, composé de plusieurs molécules, qui une fois séparé par chromatographie perd son potentiel antibactérien. L'altération de la molécule cible par les processus de fractionnement bioguidé choisis est une autre hypothèse qui expliquerait l'importante baisse de l'activité biologique recherchée une fois les échantillons fractionnés. Une modification du protocole afin d'isoler et de concentrer les composés à l'origine des observations de diminution de croissance pourrait mener vers d'importantes avancées.





## CONCLUSION

L'objectif de cette étude était d'évaluer le potentiel antioxydant et antibactérien de trois macroalgues du Saint-Laurent dans le but d'en faire une valorisation pouvant mener à une commercialisation éventuelle des ressources marines des régions où elles sont présentes.

Pour obtenir une caractérisation plus complète, trois méthodes de dosage de l'activité antioxydante, soit DPPH, FRAP et ORAC, ont été utilisées. Les deux algues ayant le mieux répondues, tous essais confondus, sont *U. lactuca* et *A. nodosum*. L'activité antioxydante était inversement proportionnelle à la concentration pour les réponses obtenues avec FRAP et ORAC contrairement à DPPH. La température affectait la réponse au test FRAP dans tous les cas et *S. longicruris* au test DPPH. Que ce soit pour l'évaluation du potentiel antioxydant d'une seule fraction ou bien d'extraits bruts, plusieurs méthodes basées sur divers principes et mécanismes doivent être utilisées, car elles donnent des réponses différentes. Cette étude démontre la grande variabilité entre les résultats et soutient le fait de plus en plus invoqué par la communauté scientifique, qu'il y a un réel besoin de standardisation entre les méthodes de détection des activités antioxydantes malgré le fait que depuis plusieurs années des efforts ont été faits dans ce sens. La création d'une nouvelle méthode dépend définitivement de l'utilisation d'un oxydant et d'un élément cible avec une importance biologique significative et des conditions de réactions étant les plus similaires possible à celles retrouvées en milieu *in vivo*. La possibilité de développer un essai avec plus d'une seule espèce oxydante présente simultanément dans le système réactionnel peut aussi être considérée. En général, on observe que des températures d'extraction élevées employées avec la méthode ASE, n'étaient pas nécessaires pour produire des extraits de macroalgues riches en polyphénols, et des potentiels d'activités antioxydantes. De plus, des températures trop grandes peuvent entraîner la perte de molécules cibles thermosensibles.

Le potentiel antibactérien des extraits éthanoliques des macroalgues sélectionnées a été mesuré sur trois souches bactériennes causant des pertes dans le domaine de l'agroalimentaire. L'activité antibactérienne, qui n'était pas influencée par la température d'extraction, était proportionnelle à la concentration pour *E. coli* et *M. luteus*. Les valeurs d'inhibition les plus fortes étaient de 69,5 % pour *E. coli* en présence d'*U. lactuca*, de 61,5 % pour *M. luteus* en présence d'*U. lactuca* et de 38,0 % pour *B. thermosphacta* en présence de *S. longicruris*.

La réduction du contenu en sel des produits destinés à l'alimentation humaine est un défi, cependant comme les algues marines sont une source riche en protéines, mais surtout en sels et en minéraux, elles constituent un substitut sans précédent. De plus, l'ajout d'extraits de macroalgues pourrait aider à réduire la quantité d'agents de conservation de synthèse chimique que les consommateurs redoutent tant et pour lesquels les conséquences à long terme ne sont toujours pas connues. À la lumière de cette étude, les informations recueillies fournissent de précieux renseignements sur la génération d'extraits antioxydants et antimicrobiens à partir de macroalgues du Saint-Laurent ce qui peut s'avérer profitable pour la valorisation future de ces dernières, plus particulièrement, comme nutraceutiques ou toutes autres molécules à valeur ajoutée.

## RÉFÉRENCES

- A.O.A.C. (2002). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (17eme édition ed.). Washington.
- Abdelhady, M., Motaal, A., & Beerhues, L. (2011). Total phenolic content and antioxidant activity of standardized extracts from leaves and cell cultures of three callistemon species. *American Journal of Plant Sciences*, 2(6), 847-849.
- Airanthi, M. K. W. A., Hosokawa, M., & Miyashita, K. (2011). Comparative antioxidant activity of edible japanese brown seaweeds. *Journal of Food Science*, 76(1), 104-111.
- Alonso-Salces, R. M., Korta, E., Barranco, A., Berrueta, L. A., Gallo, B., & Vicente, F. (2001). Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple. *Journal Chromatography A*, 933, 37-42.
- Anggadiredja, J., Andyani, R., Hayati, H., & Muawanah, M. (1997). Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* (Phaeophyta) and *Laurencia obtusa* (Rhodophyta) from Seribu Islands. *Journal of Applied Phycology*, 9(5), 477-479.
- Apostolidis, E., Karayannakidis, P. D., Kwon, Y., Lee, C. M., & Seeram, N. P. (2011). Seasonal variation of phenolic antioxidant-mediated  $\alpha$ -glucosidase inhibition of *Ascophyllum nodosum*. *Plant Foods for Human Nutrition* 66(4), 313-319.
- Apostolidis, E., & Lee, C. M. (2010). In vitro potential of *Ascophyllum nodosum* phenolic antioxidant-mediated  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibition. *Journal of Food Science*, 75(3), 97-101.
- Arnaud, P., Jamart, B., Bodiguel, J., & Brosse, N. (2009). *Chimie organique : cours avec 350 questions et exercices corrigés* (18eme ed.). Paris: Dunod.
- Athukorala, Y., Lee, K. W., Song, C., Ahn, C. B., Shin, T. S., Cha, Y. J., Shahidi, F., Jeon, Y. J. (2003). Potential antioxidant of marine red alga *Grateloupia filicina* extracts. *Journal of Food Lipids*, 10(3), 251-266.
- Bajpai, V. K., Rahman, A., Choi, U. K., Youn, S. J., & Kang, S. C. (2007). Inhibitory parameters of the essential oil and various extracts of *Metasequoia glyptostroboides* to reduce food spoilage and food-borne pathogens. *Food Chemistry*, 105(3), 1061-1066.

- Bannerman, T. L., & Peacock, S. J. (2007). *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci, P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A. Pfaller (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (9ème ed., pp. 390-403). Washington, USA: ASM Press.
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2006). *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- Barton, J., & Horanska, V. (1973). Metal compounds in free radical processes. I. Effect of copper (II) ion on the ligand reactivity in transfer reactions. *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia*, 40(1), 157-162.
- Beaulieu, L., Thibodeau, J., Desbiens, M., Saint-Louis, R., Zatylny-Gaudin, C., & Thibault, S. (2010). Evidence of antibacterial activities in peptide fractions originating from snow crab *Chionoecetes opilio* by-products. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2(3), 197-109.
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Pysiology*, 37(8), 911-917.
- Borel, P., Draï, J., Faure, H., Fayol, V., Galabert, C., Laromiguiere, M., & Le Moël, G. (2005). Données récentes sur l'absorption et le catabolisme des caroténoïdes. *Annales de Biologie Clinique*, 63(2), 165-177.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-332.
- Cabioc'h, J., Boudouresque, C. F., & Floc'h, J. Y. (1992). *Guide des algues des mers d'Europe: Manche/Atlantique, Méditerranée*: Delachaux et Niestlé.
- Cahyana, A. H., Shuto, Y., & Kinoshita, Y. (1992). Pyropheophytin a as an antioxidative substance from the marine alga, arame (*Eisenia bicyclis*). *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, 56(10), 1533-1535.
- Cartier, S., & Guillou, A. (2010). Valorisation des macroalgues. *BioTendance®*, BTD 10-11, 8.
- Ceresana Research. (2008). Market Study: Antioxidants. Consulter le 21 juin 2012, <http://www.ceresana.com/en/market-studies/additives/antioxidants/>
- Chapman, A. R. O. (1987). The wild harvest and culture of *Laminaria longicuris* in Eastern Canada, M. S. Doty, J. F. Caddy & B. Santelices (Eds.), *Case Studies of Seven Commercial Seaweed Resources* (Vol. 281, pp. 209-213). Rome: FAO.

- Chapman, A. R. O., & Craigie, J. S. (1977). Seasonal growth in *Laminaria longicruris*: Relations with dissolved inorganic nutrients and internal reserves of nitrogen. *Marine Biology*, 40(3), 197-205.
- Chen, C.-L., & Ciou, Y.-J. (2008). Design and optimization of indirect energy storage systems for batch process plants. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47(14), 4817-4829.
- Chew, Y. L., Lim, Y. Y., Omar, M., & Khoo, K. S. (2008). Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *Food Science and Technology*, 41(6), 1067-1072.
- Connan, S., Delisle, F., Deslandes, E., & Ar Gall, E. (2006). Intra-thallus phlorotannin content and antioxidant activity in *Phaeophyceae* of temperate waters. *Botanica Marina*, 49(1), 39-45.
- Connan, S., Deslandes, E., & Ar Gall, E. (2007). Influence of day/night and tidal cycles on phenol content and antioxidant capacity in three temperate intertidal brown seaweeds. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 349(2), 359-369.
- Cox, S., Abu-Ghannam, N., & Gupta, S. (2010). An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. *International Food Research Journal* (17), 205-220.
- Davies, K. J. (1995). Oxidative stress: The paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposia*, 61, 1-32.
- Dawidowicz, A. L., Wianowska, D., & Olszowy, M. (2011). On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). *Food Chemistry*, 131(3), 1037-1043.
- Dionex Corporation. (2010). Les systèmes ASE. Consulter le 16 janvier 2013, <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/88744-Bro-FRENCH-ASE-Series-Brochure-14Oct10-LPN2654.pdf>
- Edge, R., McGarvey, D. J., & Truscott, T. G. (1997). The carotenoids as anti-oxidants -- a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 41(3), 189-200.
- Egan, A. F., Eustace, I. J., & Shay, B. J. (1988). Meat packaging: Maintaining the quality and prolonging the storage life of chilled beef, pork and lamb, M. R. Laboratory (Ed.), Division of Food Processing (p. 7). Cannon Hill: CSIRO.

- El-Agamey, A., & McGarvey, D. J. (2008). Carotenoid Radicals and Radical Ions, Hanspeter (Ed.), Carotenoids (Vol. 4, pp. 119-154). Basel: Birkhäuser.
- Faller, H. (2011). Les applications et la toxicité des algues marines. Diplôme d'état de docteur en pharmacie, Université de Limoges, Limoges.
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247.
- Fitton, J. H., & Irhimeh, M. (2008). Macroalgae in Nutricosmetics. *Cosmetics and toiletries*, 123(5), 93-97.
- Fraser, P. D., & Bramley, P. M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, 43(3), 228-235.
- Ganesan, P., Kumar, C. S., & Bhaskar, N. (2008). Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresource Technology*, 99(8), 2717-2723.
- García-Casal, M. N., Ramírez, J., Leets, I., Pereira, A. C., & Quiroga, M. F. (2009). Antioxidant capacity, polyphenol content and iron bioavailability from algae (*Ulva* sp., *Sargassum* sp. and *Porphyra* sp.) in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 101, 79-85.
- Gayral, P., & Cosson, J. (1979). Les algues. Rennes: Ouest-France.
- Gendron, L. (1983). Inventaire des populations de laminaires de la baie des chaleurs (secteur Caps noir/Pointe Bonaventure), Ministère de l'Agriculture (Ed.). Ottawa: Gouvernement du Canada.
- Gomez-Ordez, E., Jimenez-Escrig, A., & Ruperez, P. (2010). Dietary fibre and physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast. *Food Research International*, 43(9), 2289-2294.
- Gonzalez, R., Rodriguez's, S., Romay, C., Gonzalez, A., Armesto, J., Ramirez, D., & Merino, N. (1999). Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acetic acid-induced colitis in rats. *Pharmacological Research*, 39(1), 55-59.
- Graham, L. E., & Wilcox, L. W. (2000). *Algae*. Upper Saddle River: Prentice Hall, p.640.
- Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality

- attributes of foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(4), 600-608.
- Gupta, S., Rajauria, G., & Abu-Ghannam, N. (2010). Study of the microbial diversity and antimicrobial properties of Irish edible brown seaweeds. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(3), 482-489.
- Gustavson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., Van Otterdijk, R., & Meybeck, A. (2011). Global food losses and food waste. In FAO (Ed.), *Save Food!* Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Han, L., Xu, N., Shi, J., Yan, X., & Zeng, C. (2005). Isolation and pharmacological activities of bromophenols from *Rhodomela confervoides*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 23, 226-229.
- Harrison, K. (Producer). (2011). Phenol (Molecule of the Month for July 1998) Chemistry, Structures & 3D Molecules @ 3Dchem.com. Consulted le 13 novembre 2012, <http://www.3dchem.com/molecules.asp?ID=100#>
- Haslam, E. (1989). *Plant Polyphenols: Vegetable Tannins Revisited*. Cambridge: University of Cambridge Oriental Publications.
- Hassan, S., El-Twab, S. A., Hetta, M., & Mahmoud, B. (2011). Improvement of lipid profile and antioxidant of hypercholesterolemic albino rats by polysaccharides extracted from the green alga *Ulva lactuca Linnaeus*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18(4), 333-340.
- Heo, S. J., Ko, S. C., Kang, S. M., Kang, H. S., Kim, J. P., Kim, S. H., Jeon, Y. (2008). Cytoprotective effect of fucoxanthin isolated from brown algae *Sargassum siliquastrum* against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell damage. *European Food Research and Technology A*, 228, 145-151.
- Hill, J. M., & White, N. (2008). Knotted wrack - *Ascophyllum nodosum*. Biology and Sensitivity Key Information Sub-programme [on-line] Consulted le 11 juillet 2012, <http://www.marlin.ac.uk/speciesfullreview.php?speciesID=2632>
- Hoek, C. V. D., Mann, D. G., & Jahns, H. M. (1995). *Algae An Introduction to Phycology*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Hovda, M. B., Sivertsvik, M., Lunestad, B. T., Lorentzen, G., & Rosnes, J. T. (2007). Characterisation of the dominant bacterial population in modified atmosphere packaged farmed halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) based on 16S rDNA-DGGE. *Food Microbiology*, 24, 362-371.

- Inbaraj, B. S., Lu, H., Hung, C. F., Wu, W. B., Lin, C. L., & Chen, B. H. (2008). Determination of carotenoids and their esters in fruits of *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(4), 812-818.
- Iris, 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.
- Jiménez, J.T., O'Connell, S., Lyons, H., Bradley, B., Hall, M. (2010). Antioxidant, antimicrobial, and tyrosinase inhibition activities of acetone extract of *Ascophyllum nodosum*. *Chemical Paper*, 64(4), 434-442.
- Julien, J. C. (2007). Description de *Ascophyllum nodosum*. Consulter le 17 décembre 2012, <http://www.mer-littoral.org/62/ascophyllum-nodosum.php>
- Kim, I., Lee, D. G., Lee, S., Ha, J. M., Ha, B. J., Kim, S. K., & Lee, J. H. (2007). Antibacterial activity of *Ulva lactuca* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12(5), 579-581.
- Kim, Y. B., Moon, Y. G., & Heo, M. S. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of seaweed, *Ecklonia cava*. *Journal of Biotechnology*, 136, Supplement(0), 598.
- Kocur, M., Kloos, W. E., & Schleifer, K. H. (2006). *The Genus Micrococcus* (3ème ed. Vol. 3). New York: Springer.
- Kohlmeier, L., & Hastings, S. B. (1995). Epidemiologic evidence of a role of carotenoids in cardiovascular disease prevention. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62(6), 1370-1376.
- Korkeala, H. J., & Björkroth, K. J. (1997). Microbiological spoilage and contamination of vacuum-packaged cooked sausages. *Journal of Food Protection*, 60(6), 724-731.
- Krinsky, N. I. (1989). Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 7(6), 617-635.
- Lam, C., & Harder, T. (2007). Marine macroalgae affect abundance and community richness of bacterioplankton in close proximity. *Journal of Phycology*, 43(5), 874-881.



- Le Tutour, B., Benslimane, F., Gouleau, M., Gouygou, J., Saadan, B., & Quemeneur, F. (1998). Antioxidant and pro-oxidant activities of the brown algae, *Laminaria digitata*, *Himanthalia elongata*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus* and *Ascophyllum nodosum*. *Journal of Applied Phycology*, 10(2), 121-129.
- Lee, D. S., Kim, N. S., & Lee, S. H. (2001). 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate, a stable free radical, is an alpha-glucosidase inhibitor. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24(6), 727-728.
- Leh, F., & Wan, J. K. S. (1972). The CuCl: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical complex. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 45(1), 308-309.
- Lichtenstein, A. H. (2009). Nutrient supplements and cardiovascular disease: a heartbreaking story. *Journal of Lipid Research*, 50, 429-433.
- Liu, D., Shi, J., Colina Ibarra, A., Kakuda, Y., & Jun Xue, S. (2008). The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and  $\beta$ -carotene mixtures on the DPPH free radical. *Food Science and Technology*, 41(7), 1344-1349.
- Lopez-Alarcon, C., & Lissi, E. (2006). A novel and simple ORAC methodology based on the interaction of Pyrogallol Red with peroxy radicals. *Free Radical Research*, 40(9), 979-785.
- MacArtain, P., Gill, C. I. R., Brooks, M., Campbell, R., & Rowland, I. R. (2007). Nutritional Value of Edible Seaweeds. *Nutrition Reviews*, 65(12), 535-543.
- Madigan, T. M., & Martinko, J. M. (2005). *Brock Biology of Microorganisms* (11ème ed.). Upper Saddle River: Prentice Hall.
- Mamelona, J., & Pelletier, E. (2010). Producing high antioxidant activity extracts from echinoderm by products by using pressured liquid extraction. *Biotechnology* 9(4), 523-528.
- Marfaing, H., & Lerat, Y. (2007). Les algues ont-elles une place en nutrition? *Phytothérapie*, 5(0), 2-5.
- Martin, K. R., Failla, M. L., & Smith, J. C. (1996). Beta-carotene and lutein protect HepG2 human liver cells against oxidant-induced damage. *The Journal of nutrition*, 126(9), 2098-2106.

- Masuda, M., Abe, T., Sato, S., Suzuki, T., & Suzuki, M. (1997). Diversity of halogenated secondary metabolites in the red alga *Laurencia nipponica* (*Rhodomelaceae*, *Ceramiales*). *Journal of Phycology*, 33(2), 196-208.
- Mattill, H. A. (1947). Antioxidants. *Annual Review of Biochemistry*, 16, 177-182.
- Maximilien, R., Nys, R., Holmström, C., Gram, L., Givskov, M., Crass, K., Steinberg, D. (1998). Chemical mediation of bacterial surface colonisation by secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra*. *Aquatic Microbial Ecology*, 15(3), 233-242.
- Meenakshi, S., Umayaparvathi, S., Arumugam, M., & Balasubramanian, T. (2012). In vitro antioxidant properties and FTIR analysis of two seaweeds of Gulf of Mannar. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedecine*, 66-70.
- Milledge, J. (2011). Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 10(1), 31-41.
- Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130(4), 1036-1043.
- Morton, J. F. (1981). *Atlas of medicinal plants of Middle America, Bahamas to Yucatan*. Springfield: Charles C. Thomas.
- MPO. (2010). La culture d'algues marines. Consulter le 10 février 2011, <http://www.dfo-mpo.gc.ca/aquaculture/marine-fra.htm>
- Müller, L., Fröhlich, K., & Böhm, V. (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (aTEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*, 129(1), 139-148.
- Nagai, T., & Yukimoto, T. (2003). Preparation and functional properties of beverages made from sea algae. *Food Chemistry*, 81(3), 327-332.
- Nagayama, K., Iwamura, Y., Shibata, T., Hirayama, I., & Nakamura, T. (2002). Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(6), 889-893.
- Nakabeppu, Y., Sakumi, K., Sakamoto, K., Tsuchimoto, D., Tsuzuki, T., & Nakatsu, Y. (2006). Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids. *Biological Chemistry* 387(4), 373-379.

- Neter, E., Westphal, O., Luderitz, R., Gino, M., & Gorzynski, E. A. (1955). Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. *Paediatrics*, 16, 801-807.
- O'Sullivan, A. M., O'Callaghan, Y. C., O'Grady, S., Kraan, M. N., Kerry, J. P., & O'Brien, N. M. (2009). Determination of the antioxidant potential of seaweed extracts using different methods. *Proceedings of the Nutrition Society*, 68, 110.
- OSM. (2011). *Escherichia coli* entérohémorragique (ECEH). Aide-mémoire N125. Consulter le 5 juillet 2012, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/fr/>
- Paiva, S. A. R., & Russell, R. M. (1999). Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, 18(5), 426-433.
- Paris, R. R., & Moyses, H. (1967). *Précis de matière médicale*. Paris: Masson et Cie.
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, R. G., & Engel, R. G. (1998). *Introduction to organic laboratory techniques: a small scale approach* (1ère ed.). Orlando: Harcourt Brace & Compagny.
- Pelli, K., & Lyly, M. (2003). Les antioxydants dans l'alimentation., VTT Biotechnology (Vol. 3, p. 28). Paris: Institut National de la Recherche Agronomique.
- Person, J. (2011). *Algues, filière du futur*. Livre Turquoise. Romainville: Adebitech.
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035-1042.
- Plaza, M., Cifuentes, A., & Ibanez, E. (2008). In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science & Technology*, 19(1), 31-39.
- Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., Garcia-Blairsy Reina, G., Herrero, M., Senorans, F. J., & Ibanez, E. (2010). Screening for bioactive compounds from algae. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 450-455.
- Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6), 635-648.
- Rajauria, G., Jaiswal, A. K., Abu-Ghannam, N., & Gupta, S. (2010). Effect of hydrothermal processing on colour, antioxidant and free radical scavenging capacities of edible Irish brown seaweeds. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(12), 2485-2493.

- Raven, P. H., Evert, R., F., & Eichhorn, S. E. (2007). *The Biology of plants* (2ème ed.). New-York: W.H. Freeman et Co.
- Rioux, L. È. (2005). Caractérisation rhéologique des polysaccharides extraits des algues brunes. Maîtrise en Sciences et technologie des aliments, Université Laval, Québec.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 100-112.
- Round, F. E. (1984). *The Ecology of Algae*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Sachindra, N. M., Sato, E., Maeda, H., Hosokawa, M., Niwano, Y., Kohno, M., & Miyashita, K. (2007). Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8516-8522.
- Sandsdalen, E., Haug, T., Stensvag, K., & Styrvold, O. (2003). The antibacterial effect of a polyhydroxylated fucophlorethol from the marine brown alga, *Fucus vesiculosus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(8), 777-782.
- Santé Canada. (2010). *Micrococcus*: Fiche technique Santé-Sécurité; Agents pathogènes. Direction de la réglementation des agents pathogènes. Consulter le 5 juillet 2012, <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/micrococcus-fra.php#endnote2>
- Santé Canada. (2011). *E. coli*. Salubrité des aliments. Consulter le 5 juillet 2012, <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/ill-intox/ecoli-fra.php#q3>
- Santoso, J., Yoshie-Stark, Y., & Suzuki, T. (2004). Anti-oxidant activity of methanol extracts from Indonesian seaweeds in an oil emulsion model. *Fisheries Science*, 70(1), 183-188.
- Seyhan, E. N. (2004). *Organic chemistry: structure and reactivity* (5ème ed.). Boston: Houghton Mifflin Co.
- Shanmughapriya, S., Manilal, A., Sujith, S., Selvin, J., Kiran, G., & Natarajaseenivasan, K. (2008). Antimicrobial activity of seaweeds extracts against multiresistant pathogens. *Annals of Microbiology*, 58(3), 535-541.
- Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202-1205.

- Sharp, G., Allard, M., Lewis, A., Semple, R., & Rochefort, G. (2008). The potential for seaweed resource development in subarctic Canada; Nunavik, Ungava Bay. *Journal of Applied Phycology*, 20(5), 491-496.
- Shechter, M., Sharir, M., Labrador, M. J. P., Forrester, J., Silver, B., & Bairey Merz, C. N. (2000). Oral magnesium therapy improves endothelial function in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 102(19), 2353-2358.
- Shukla, A., Rasik, A. M., & Patnaik, G. K. (1997). Depletion of reduced glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant defence enzymes in a healing Cutaneous wound. *Free Radical Research*, 26(2), 93-111.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*, 82(2), 291-295.
- Simon, B. F., Pérez-Ilzarbe, J., Hernandez, T., Gomez-Cordovés, C., & Estrella, I. (1990). HPLC study of the efficiency of extraction of phenolic compounds. *Chromatographia*, 30(1-2), 35-37.
- Smith, K. J., Neafie, R., Yeager, J., & Skelton, H. G. (1999). *Micrococcus folliculitis* in HIV-1 disease. *British Journal of Dermatology*, 141(3), 558-561.
- Simpson, B.K. & Haard, N.F. (1985) The use of proteolytic enzymes to extract carotenoproteins from shrimp wastes. *Journal of Applied Biochemistry*, 7(3), 212-222.
- Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., & Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 579(1-2), 200-213.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87-96.
- Stadtman, E. (1992). Protein oxidation and aging. *Science*, 257(5074), 1220-1224.
- Stahl, W., & Sies, H. (1996). Lycopene: A Biologically Important Carotenoid for Humans? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 336(1), 1-10.
- Stahl, W., & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6), 345-351.

- Stahl, W., & Sies, H. (2007). Carotenoids and flavonoids contribute to nutritional protection against skin damage from sunlight. *Molecular Biotechnology*, 37(1), 26-30.
- Sugiura, Y., Matsuda, K., Yamada, Y., Nishikawa, M., Shioya, K., Katsuzaki, H., Amano, H. (2006). Isolation of a new anti-allergic phlorotannin, phlorofucofuroeckol-B, from an edible brown alga, *Eisenia arborea*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(11), 2807-2811.
- Tahi, A. (2004). Évaluation du potentiel nutraceutique de l'algue brune *Laminaria longicruris*. Maîtrise en Sciences et technologie des aliments, Université Laval, Québec.
- Tapiero, H., Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2004). The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedecine & Pharmacotherapy*, 58(2), 100-110.
- Tierney, M. S., Smyth, T. J., Hayes, M., Soler-Vila, A., Croft, A. K., & Brunton, N. (2012). Influence of pressurised liquid extraction and solid-liquid extraction methods on the phenolic content and antioxidant activities of Irish macroalgae. *International Journal of Food Science & Technology*, 1-10.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2012). *Introduction à la Microbiologie* (L. Martin, Trans.). St-Laurent: Person.
- Tuney, I., Çadirci, B. H., Ünal, D., & Sukatar, A. (2006). Antimicrobial activities of extracts of marine algae from the coast of Urla (Izmir, Turkey). *Turkish Journal of Biology*, 30, 171-175.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84.
- Vertuani, S., Angusti, A., & Manfredini, S. (2004). The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview. *Current Pharmaceutical Design*, 10(14), 1677-1694.
- Viguerie, N., Poitou, C., Canello, R., Stich, V., Clément, K., & Langin, D. (2005). Transcriptomics applied to obesity and caloric restriction. *Biochimie*, 87(1), 117-123.
- Voet, D., & Voet, J. G. (2005). *Biochimie* (G. Rousseau & L. Domenjoud, Trans. 2ème ed.). Bruxelles: John Wiley & Sons Inc.

- Wang, T., Jónsdóttir, R., & Ólafsdóttir, G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, 116(1), 240-248.
- Watson, S. B., & Cruz-Rivera, E. (2003). Algal chemical ecology: an introduction to the special issue. *Phycologia*, 42(4), 319-323.
- Wong, K. H., & Cheung, P. C. K. (2001). Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds Part II. In vitro protein digestibility and amino acid profiles of protein concentrates. *Food Chemistry*, 72(1), 11-17.
- Woodall, A. A., Britton, G., & Jackson, M. J. (1997). Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: Relationship between carotenoid structure and protective ability. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1336(3), 575-586.
- Wu, T. T., Shiau, S. Y., & Chang, R. C. (2012). Effects of drying temperature and extraction solvent on the antioxidant, color and sensory properties of *Angelica sinensis* leaves. *Journal of Food Processing and Preservation*, 1-9.
- Yamamoto, K., Ishikawa, C., Katano, H., Yasumoto, T., & Mori, N. (2011). Fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, induce apoptosis of primary effusion lymphomas. *Cancer Letters*, 300(2), 225-234.
- Yoshie, Y., Wand, W., Hsieh, Y. P., & Suzuki, T. (2002). Compositional difference of phenolic compounds between two seaweeds, *Halimeda* spp. *Journal of the Tokyo University of Fisheries*, 88, 21-24.
- Zou, Y., Qian, Z. J., Li, Y., Kim, M. M., Lee, S. H., & Kim, S. K. (2008). Antioxidant Effects of Phlorotannins Isolated from *Ishige okamurae* in Free Radical Mediated Oxidative Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7001-7009.





**ANNEXE I**

**MATÉRIEL ET MÉTHODES**

**Annexe I-1 : Extraction : cycle de rinçage**

Tableau AI-1 : Description du cycle de rinçage du Dionex ASE 200 utilisé

Cycle de rinçage	Solutions utilisées	Nombre de rinçage
1	Méthanol : Eau nanopure (50 :50)	3 fois
2	Méthanol (100 %)	3 fois
3	Propanol (100 %)	3 fois

**Annexe I-2 : Préparation de courbes standards et des échantillons pour DPPH et FRAP**

Tableau AI-2 : Préparation de la courbe standard Trolox pour les essais DPPH et FRAP

Concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ )	Dilutions
50	5 ml de la solution stock Trolox dans 5 ml de méthanol.
40	4 ml de la solution stock Trolox dans 6 ml de méthanol
25	2,5 ml de la solution stock Trolox dans 7,5 ml de méthanol
10	1 ml de la solution stock Trolox dans 9 ml de méthanol
5	0,5 ml de la solution stock Trolox dans 9,5 ml de méthanol
Blanc	Méthanol

Tableau AI-3 : Préparation des dilutions des extraits algaux pour les essais DPPH et FRAP

Concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ )	Dilutions	Suivi des dilutions depuis la solution mère
500	5 ml de la solution fille dans 5 ml d'eau nanopure	20 fois
250	2,5 ml de la solution fille dans 7,5 ml d'eau nanopure	40 fois
100	1 ml de la solution fille dans 9 ml d'eau nanopure	100 fois
50	500 $\mu\text{l}$ de la solution fille dans 9,5 ml d'eau nanopure	200 fois
10	100 $\mu\text{l}$ de la solution fille dans 9,9 ml d'eau nanopure	1000 fois

**Annexe I-2 : Préparation de courbes standards pour ORAC**

Tableau AI-4 : Préparation de la courbe standard Trolox pour l'essai ORAC

Concentrations ( $\mu\text{M}$ )	Dilutions
100	100 $\mu\text{l}$ de la solution mère Trolox dans 9,9 ml de tampon phosphate 75 nM; pH 7,4.
50	5 ml de la solution 100 $\mu\text{M}$ Trolox dans 5 ml de tampon phosphate 75 nM; pH 7,4
25	5 ml de la solution 50 $\mu\text{M}$ Trolox dans 5 ml de tampon phosphate 75 nM; pH 7,4
12,5	5 ml de la solution 25 $\mu\text{M}$ Trolox dans 5 ml de tampon phosphate 75 nM; pH 7,4
Blanc	tampon phosphate 75 nM; pH 7,4

**Annexe I-2 : Préparation de courbes standards pour le dosage des phénols totaux**

Tableau AI-5 : Préparation de la courbe standard d'acide gallique pour le dosage des phénols totaux

Concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ )	Dilutions
200	500 $\mu\text{l}$ de la solution mère d'AG dans 9,50 ml d'eau nanopure
150	300 $\mu\text{l}$ de la solution mère d'AG dans 9,70 ml d'eau nanopure
100	200 $\mu\text{l}$ de la solution mère d'AG dans 9,80 ml d'eau nanopure
50	100 $\mu\text{l}$ de la solution mère d'AG dans 9,90 ml d'eau nanopure
25	50 $\mu\text{l}$ de la solution mère d'AG dans 9,95 ml d'eau nanopure



## ANNEXE II RÉSULTATS

### Annexe II-1 : Détails des résultats pour DPPH

Tableau II-1.1 : % de DPPH réduit des extraits éthanoliques de *U. lactuca*, *S. longicuris* et *A. nodosum* ainsi que le standard Trolox. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  l'écart type (N=9)

	Concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ )	% DPPH réduit	
		50 °C	80 °C
<i>U. lactuca</i>	10	53,65 $\pm$ 0,23	53,95 $\pm$ 0,53
	50	49,34 $\pm$ 0,17	53,03 $\pm$ 0,63
	100	52,01 $\pm$ 0,57	52,00 $\pm$ 0,31
	250	54,12 $\pm$ 0,53	53,73 $\pm$ 0,62
	500	56,04 $\pm$ 0,42	55,16 $\pm$ 0,49
<i>S. longicuris</i>	10	48,78 $\pm$ 0,15	50,11 $\pm$ 0,24
	50	64,72 $\pm$ 0,35	65,90 $\pm$ 0,27
	100	48,79 $\pm$ 0,34	50,35 $\pm$ 0,08
	250	48,51 $\pm$ 0,64	50,04 $\pm$ 0,80
	500	48,32 $\pm$ 0,91	49,59 $\pm$ 0,46
<i>A. nodosum</i>	10	53,49 $\pm$ 6,84	55,46 $\pm$ 2,45
	50	65,17 $\pm$ 4,01	63,30 $\pm$ 1,14
	100	71,82 $\pm$ 3,19	68,84 $\pm$ 1,14
	250	81,43 $\pm$ 1,11	77,03 $\pm$ 0,56
	500	90,60 $\pm$ 2,51	93,27 $\pm$ 1,04
Trolox	10	101,97 $\pm$ 0,44	102,13 $\pm$ 0,40

Tableau II-1.2 : Table d'association du test de Tukey du % de DPPH réduit suite à une ANOVA croisée à trois facteurs ( $p < 0,05$ ), soit l'espèce d'algue, la température d'extraction et la concentration de l'extrait.

Algues*Concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ) *Température ( $^{\circ}\text{C}$ )	Table d'association du test de Tukey	
Trolox, 10, 80	A	
Trolox, 10, 50	A	
<i>A. nodosum</i> , 500, 50	A	
<i>A. nodosum</i> , 500, 80	A	B
<i>A. nodosum</i> , 250, 50		B C
<i>A. nodosum</i> , 250, 80		C
<i>S. longicruris</i> , 50, 80		C
<i>A. nodosum</i> , 100, 50		C
<i>A. nodosum</i> , 50, 50		C D
<i>S. longicruris</i> , 50, 50		C D
<i>A. nodosum</i> , 100, 80		C D
<i>A. nodosum</i> , 50, 80		D E
<i>A. nodosum</i> , 10, 50		E F
<i>U. lactuca</i> , 500, 50		E F G
<i>U. lactuca</i> , 250, 50		E F G
<i>A. nodosum</i> , 10, 80		F G H
<i>U. lactuca</i> , 10, 50		F G H I
<i>U. lactuca</i> , 500, 80		F G H I J
<i>U. lactuca</i> , 100, 50		F G H I J K
<i>U. lactuca</i> , 10, 80		F G H I J K
<i>U. lactuca</i> , 250, 80		F G H I J K
<i>S. longicruris</i> , 100, 50		F G H I J K
<i>U. lactuca</i> , 50, 50		G H I J K
<i>S. longicruris</i> , 500, 50		G H I J K
<i>S. longicruris</i> , 250, 50		G H I J K
<i>S. longicruris</i> , 10, 50		G H I J K
<i>U. lactuca</i> , 100, 80		G H I J K
<i>S. longicruris</i> , 100, 80		H I J K L
<i>S. longicruris</i> , 10, 80		I J K L
<i>S. longicruris</i> , 250, 80		J K L
<i>U. lactuca</i> , 50, 80		K L
<i>S. longicruris</i> , 500, 80		L

\* Les moyennes qui ne sont pas connectées pas les mêmes lettres sont significativement différentes

### Annexe II-2 : Détails des résultats pour FRAP

Tableau II-2.1 : Résultats FRAP ( $\mu\text{mol TE/g}$ ) des extraits éthanoliques de *U. lactuca*, *S. longicruris* et *A. nodosum* ainsi que le standard Trolox. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  l'écart type (N=9)

	Concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ )	FRAP ( $\mu\text{mol TE/g}$ ) des extraits réalisés à 50 °C	FRAP ( $\mu\text{mol TE/g}$ ) des extraits réalisés à 80 °C
<i>U. lactuca</i>	10	2972,71 $\pm$ 0,02	-152,85 $\pm$ 0,05
	50	912,08 $\pm$ 0,01	143,23 $\pm$ 0,01
	100	360,81 $\pm$ 0,00	175,07 $\pm$ 0,00
	250	307,84 $\pm$ 0,02	206,01 $\pm$ 0,00
	500	276,38 $\pm$ 0,01	249,93 $\pm$ 0,00
<i>A. nodosum</i>	10	511,66 $\pm$ 0,05	-7,57 $\pm$ 0,02
	50	567,12 $\pm$ 0,03	$\pm$ 0,01
	100	677,22 $\pm$ 0,01	294,79 $\pm$ 0,01
	250	562,11 $\pm$ 0,01	358,51 $\pm$ 0,00
	500	461,51 $\pm$ 0,02	320,71 $\pm$ 0,00
<i>S. longicruris</i>	10	-891,45 $\pm$ 0,01	-279,98 $\pm$ 0,01
	50	-129,21 $\pm$ 0,01	-31,38 $\pm$ 0,00
	100	-44,23 $\pm$ 0,00	-0,55 $\pm$ 0,00
	250	22,34 $\pm$ 0,00	17,75 $\pm$ 0,00
	500	12,97 $\pm$ 0,00	22,85 $\pm$ 0,00
Trolox	10	4204,95 $\pm$ 0,00	4148,71 $\pm$ 0,05

Tableau II-2.2 : Table d'association du test de Tukey de la réponse de l'essai FRAP suite à une ANOVA croisée à trois facteurs, soit l'espèce d'algue, la température d'extraction et la concentration de l'extrait

Algues*Concentrations (µg/ml) *Température (°C)	Table d'association du test de Tukey
Trolox, 10, 50	A
Trolox, 10, 80	A
<i>U. lactuca</i> , 10, 50	A
<i>U. lactuca</i> , 50, 50	B
<i>A. nodosum</i> , 100, 50	B C
<i>A. nodosum</i> , 10, 50	B C D
<i>A. nodosum</i> , 50, 50	B C D
<i>A. nodosum</i> , 250, 50	B C D
<i>A. nodosum</i> , 500, 50	C D E
<i>A. nodosum</i> , 50, 80	D E F
<i>U. lactuca</i> , 100, 50	D E F
<i>A. nodosum</i> , 250, 80	D E F
<i>A. nodosum</i> , 500, 80	E F G
<i>U. lactuca</i> , 250, 50	E F G
<i>A. nodosum</i> , 100, 80	E F G
<i>U. lactuca</i> , 500, 50	F G H
<i>U. lactuca</i> , 500, 80	F G H
<i>U. lactuca</i> , 250, 80	G H I
<i>U. lactuca</i> , 100, 80	H I
<i>U. lactuca</i> , 50, 80	I
<i>U. lactuca</i> , 10, 80	J
<i>S. longicruris</i> , 500, 80	J K
<i>A. nodosum</i> , 10, 80	J K
<i>S. longicruris</i> , 250, 50	K L
<i>S. longicruris</i> , 250, 80	K L
<i>S. longicruris</i> , 500, 50	K L
<i>S. longicruris</i> , 100, 80	L

\* Les moyennes qui ne sont pas connectées pas les mêmes lettres sont significativement différentes



### Annexe II-3 : Détails des résultats pour le dosage des phénols totaux

Tableau II-3 : Détermination des phénols totaux ( $\mu\text{g GAE/g}$ ) des extraits éthanoliques de *U. lactuca*, *S. longicruris* et *A. nodosum* ainsi que le standard d'acide gallique. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  l'écart type (N=4)

Acide gallique (25 $\mu\text{g/ml}$ )	Températures d'extraction	<i>U. lactuca</i> (1000 $\mu\text{g/ml}$ )	<i>A. nodosum</i> (1000 $\mu\text{g/ml}$ )	<i>S. longicruris</i> (1000 $\mu\text{g/ml}$ )
1,834 $\pm$ 0,009	50° C	0,069 $\pm$ 0,002	0,502 $\pm$ 0,038	0,033 $\pm$ 0,002
	80° C	0,071 $\pm$ 0,004	0,428 $\pm$ 0,002	0,020 $\pm$ 0,004



## ANNEXE III

## CARACTÉRISATION CHIMIQUE TOTALE

## Annexe III-1 : Revue de littérature caractérisant la composition chimique et évaluant la teneur en caroténoïdes

Tableau III-1 : Revue de la littérature de la composition chimique globale d'*Ulva sp.*, d'*A. nodosum* et des *Saccharina* et *Laminaria*.

Algues	Composition totale (g/100 g exprimée sur base sèche)					
	Humidité (% poids humide)	Protéines	Lipides	Cendres	Poly- saccharides	Acides gras
<i>Ulva sp.</i>	78-80	4-44	1,1	11-55	15-65	0,3-1,6
<i>A. nodosum</i>	67-87	12-15	1,3	18-27	42-70	1,2-4,8
<i>Laminaria/ Saccharina</i>	73-90	3-21	1,5	15-45	38-61	0,3-2,9

(MacArtain et al., 2007)

Tableau III-2 : Revue de littérature caractérisant la composition des caroténoïdes d'*Ulva sp.*, d'*A. nodosum* et des *Saccharina* et *Laminaria*.

Algues	Caroténoïdes (mg/kg poids sec (= ppm))					
	$\beta$ - carotène	Fucoxanthine	Violaxanthine	Zéaxanthine/ Lutéine	Tocophérol	Chlorophylle- <i>a</i>
<i>Ulva sp.</i>	310	-	-	-	9,1-1070	15-65
<i>A. nodosum</i>	35-98	172-660	64-129	+ 100	3,6-500	565-1030
<i>Laminaria/ Saccharina</i>	63-336	468	110	-	8,9-34	1250

(MacArtain et al., 2007)

**Annexe III-2 : Revue de littérature caractérisant la composition en sels et minéraux**Tableau III-3 : Revue de la littérature de la composition en sels et minéraux d'*Ulva sp.*, d'*A. nodosum* et de *L. digitata* en comparaison avec celle d'aliments courants.

Type d'aliment	Calcium	Potassium	Magnésium	Sodium	Cuivre	Fer	Iode	Zinc
Macroalgues (mg/100 g poid humide)								
<i>Ulva sp.</i>	325	245	465	340	0,3	15,3	1,6	0,9
<i>A. nodosum</i>	575	765	225	1174	0,8	14,9	18,2	NA
<i>L. digitata</i>	365	2013	404	625	0,3	45,6	70,0	1,6
Aliments (mg/100 g)								
Riz brun	110	1160	520	28	1,3	12,9	NA	16,2
Lait	115	140	11	55	Tr	0,1	15,0	0,4
Fromage cheddar	720	77	25	670	0,0	0,3	39,0	2,3
Steak de surlonge	9	260	16	49	0,1	1,6	6,0	3,1
Lentilles	71	940	110	12	1,0	11,1	NA	3,9
Épinard	170	500	54	140	0,0	2,1	2,0	0,7
Banane	6	400	34	1	0,1	0,3	8,0	0,2
Noix du Brésil	170	660	410	3	1,8	2,5	20,0	4,2
Arachide	60	670	210	2	1,0	2,5	20,0	3,5

Tr : Traces

NA : Données non disponibles

(MacArtain et al., 2007)