

UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS MOSTAGANEM  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE DE DOCTORAT

EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : Nutrition et Santé

THEME

**Propriétés biologiques de l'astaxanthine produite  
par *Haematococcus pluvialis* sous conditions de  
stress**

Présentée par :

**M<sup>me</sup> SADOUD Meryem**

Soutenue le 01 Juillet 2020 devant le Jury :

**Président :** Pr. LOTMANI Brahim Université de Mostaganem

**Rapporteur :** Pr. RIAZI Ali Université de Mostaganem

**Examineurs :**

Pr. ALLEM Rachida Université de Chlef

Pr. BENALI Mohamed Université de Sidi Bel-Abbes

Dr. TEFIANI Choukri Université de Tlemcen

**Année Universitaire : 2019-2020**

## **Dédicace**

*À La mémoire de mon père que DIEU l'accueille dans son vaste paradis.*

*À Celle qui m'a aidée du mieux qu'elle pouvait pour réussir, ma très chère mère.*

*À Mes très chers frères Dilmi, Karim et Abdallah qui m'ont toujours encouragée.*

*À Mes très chères sœurs Khadidja et Meryouma pour leur soutien constant.*

*À Tous mes oncles, tantes, cousins, cousines et à toute ma belle-famille.*

*À Mes chères nièces Insaf, Noursine, Allaa Fatima Zahraa et à mes chers neveux Abdeldjalil et Zakariya.*

*Cette thèse est particulièrement dédiée à mon cher fils Yassine.*

*Enfin, pour son soutien permanent, je tiens à remercier de tout cœur mon époux Charif pour sa compréhension, sa patience et ses encouragements.*

*Je remercie l'ensemble des personnes qui, de près ou de loin, ont permis l'avancée et l'aboutissement de ce travail.*

**Mostaganem, Juillet**

**Meryem.**

## Avant-propos

Tout d'abord, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur **RIAZI Ali**, professeur à l'université de Mostaganem et Directeur de cette thèse, pour l'accueil qu'il m'a accordée dans son laboratoire « Microorganismes Bénéfiques, Aliments Fonctionnels et Santé ». Je lui exprime toute ma gratitude pour ses conseils, ses critiques constructives, sa confiance, sa disponibilité et pour ses corrections et ses relectures averties tout le long de mon travail de thèse, qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

Je souhaite témoigner mes sincères remerciements à Madame **MOKHTAR Meriem** pour m'avoir fait bénéficier de son expérience et de sa compétence. Je la remercie vivement pour les nombreuses discussions scientifiques enrichissantes que nous avons eues ensemble.

Je tiens à remercier sincèrement le Professeur **LOTMANI Brahim** de l'université de Mostaganem d'avoir bien voulu nous faire l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Je suis très honorée par la participation du professeur **ALLEM Rachida** de l'université de Chlef à mon jury d'examen malgré ses nombreuses occupations. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes sincères remerciements pour ses conseils et ses encouragements.

Je remercie vivement le professeur **BENALI Mohamed** de l'université de Sidi Bel-Abbes pour le temps précieux qu'il a consacré pour juger ce travail, ses critiques sont fortement souhaitées et très attendues.

C'est un grand honneur pour moi de voir siéger dans mon jury de thèse le docteur **CHOUKRI Tefiani** de l'université de Tlemcen, je lui adresse mes respectueux remerciements de se rendre à Mostaganem pour juger cette thèse.

J'adresse également toute ma reconnaissance à tous mes enseignants et collègues de l'université de Chlef ainsi que mes collègues du Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.

J'adresse mes remerciements aux nombreuses personnes côtoyées dans les différentes équipes des laboratoires où j'ai réalisé les travaux de recherche de ma thèse. J'ai apprécié l'accueil et le soutien de chacun d'eux.

## Résumé

L'astaxanthine de la chlorophycée *Haematococcus pluvialis* est douée d'un très puissant pouvoir antioxydant et de plusieurs autres propriétés biologiques. C'est dans ce contexte d'exploration de ces propriétés que nous avons mené cette étude avec pour objectifs: l'isolement de souches de *Haematococcus pluvialis* à partir d'eau douce, l'étude de l'influence de la teneur du milieu de culture en nitrate sur l'accumulation de la biomasse, l'étude de l'influence des conditions défavorables sur la production d'astaxanthine par la microalgue, l'évaluation du pouvoir antioxydant et des activités anti-inflammatoire, analgésique et gastroprotectrice de l'extrait DMSO de *H. pluvialis*.

Une espèce d'*H. pluvialis* a été isolée sur milieu BBM à partir des 48 échantillons d'eau douce collectée de la région de Chlef et identifiée selon ses caractéristiques morphologiques. L'étude de l'influence de la teneur du milieu de culture en nitrate de sodium sur la cinétique de croissance de cette espèce algale a montré qu'une concentration de 0.50 g/L favorise la production de biomasse avec un taux de croissance de l'ordre  $0.41 \text{ J}^{-1}$ . La production d'astaxanthine atteint  $67.25 \pm 2.28 \text{ mg/L}$  lorsque l'algue est exposée à une forte intensité lumineuse ( $200 \mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$ ) et une carence en azote. La morphologie cellulaire de *H. pluvialis* soumise à telles conditions a montré des aplanospores matures avec une paroi épaisse. L'activité anti-radicalaire, évaluée par le pouvoir de piégeage du radical libre DPPH, de l'extrait DMSO de *H. pluvialis* utilisé à une concentration de  $200 \mu\text{g/mL}$  est de l'ordre de 89.97% avec une  $\text{IC}_{50}$  de  $25.82 \mu\text{g/mL}$ . L'extrait DMSO de la microalgue a une capacité importante de réduction de fer, évaluée par le test de FRAP, et qui représente 3.7 fois celle enregistrée avec l'acide ascorbique utilisé comme standard. Selon la méthode FTC, le taux d'inhibition de la peroxydation lipidique par l'extrait algal était 2 fois plus élevé que celui induit par l'acide ascorbique. L'administration orale de l'extrait DMSO de cette microalgue à des souris à des doses de 50 à 150 mg/kg de poids vif a montré une activité contre l'inflammation induite par l'injection de la carragénine, ainsi qu'une capacité de diminuer les crampes abdominales provoquées par l'acide acétique. De même, il assure une protection significative ( $P < 0.001$ ) de la muqueuse gastrique contre l'ulcère induit par l'éthanol à des concentrations de 250 et 500  $\mu\text{g/kg}$  de poids vif. La présente étude montre que l'extrait DMSO de *H. pluvialis* possède des propriétés biologiques intéressantes pouvant être exploitées dans divers domaines relevant des industries alimentaires et pharmaceutiques.

**Mots clés :** Microalgue, *H. pluvialis*, stress nutritionnel, luminosité, propriétés biologiques.

## Abstract

*Haematococcus pluvialis* Astaxanthin has very strong antioxydant potential and other biological properties. It is in this context of exploration of these properties, that we conducted this study aiming the isolation of *H. pluvialis* strains from freshwater, the effect of the nitrate content of the culture medium on the biomass accumulation, the influence of unfavorable conditions on the astaxanthin production by the microalga, the evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory, analgesic and gastroprotective activities of the DMSO (dimethylsulfoxide) extract of *H. pluvialis*.

One strain of *H. pluvialis* microalga was isolated on a Bold's basal medium from 48 aseptically collected freshwater samples and identified according to morphological criteria. Optimal nitrate concentration giving rise to maximum biomass was 0.50 g/L with a growth rate of 0.41 D<sup>-1</sup>. Nitrate starvation associated with high light irradiance was most effective in induction of astaxanthin accumulation which reached 67.2±2.28 mg/L in *H. pluvialis* cells. *H. pluvialis* morphology under such stress has shown the occurrence of mature aplanospores with thick cell wall. The radical scavenging activity evaluated by DPPH test of the DMSO extract of *H. pluvialis* used at a concentration of 200µg/mL, is about 89.97% with an IC50 of 25.82µg/mL. Iron reducing capacity of this extract evaluated with FRAP test is about 3.7 times higher than that recorded with the standard, ascorbic acid. According to the FTC test, the lipid peroxidation inhibition rate of the algal extract is 2 times higher than that of the ascorbic acid. The oral administration of the DMSO extract of this microalga in mice at dose of 50 à 150 mg/kg of B.W. has shown an inhibition against inflammation induced by injection of carrageenan, and ability to reduce abdominal cramps induced by acetic acid. Similarly, it provides an important protection of the gastric mucosa against ethanol-induced ulcers at 250 and 500 µg/kg of B.W. The present study has shown that the DMSO extract of *H. pluvialis* has interesting biological properties which could be helpful in various fields in the food and pharmaceutical industries.

**Keywords:** Microalga, *Haematococcus pluvialis*, nutritional stress, luminosity, astaxanthin, biological properties.

## المخلص

الاستقرنتين المنتجة من طرف الطحالب الخضراء (*Haematococcus pluviialis*) لها نشاط قوي كمضاد للأكسدة و خصائص بيولوجية اخرى. في هذا السياق قمنا بدراسة كان الهدف منها عزل طحالب من نوع *Haematococcus pluviialis* من المياه العذبة، دراسة تأثير نسبة النترات في وسط النمو على تكاثر الطحالب، دراسة تأثير العوامل الغير ملائمة على انتاج الاستقرنتين من طرف هذا الطحالب، تقييم نشاط مستخلص الطحلب ضد الاكسدة و بعض الخصائص البيولوجية الاخرى : نشاط مضاد للالتهاب، مضاد للتشنج و مضاد للقرحة المعدية.

تم عزل طحالب صنف *Haematococcus pluviialis* من المياه العذبة. اظهرت النتائج ان نمو الطحلب بلغ اقصاه في وسط مضاف اليه 0.5 غ/ل من نترات الصوديوم حيث سجلنا معدل نمو يقدر ب 0.41/يوم كما انه ينتج نسبة  $67.25 \pm 2.28$  مخ/ل من الاستقرنتين في وسط يفتقر للأزوت وفي وجود شدة ضوء عالية (200 مك مول فوتون/م<sup>2</sup>/ثا). فيما يخص النشاط المضاد للأكسدة اظهر مستخلص الطحلب نشاطا عاليا من خلال الطرق الخمسة (اختبار الراديكال الحر DPPH، تبييض البيتا كاروتين، القدرة المضادة للأكسدة الاجمالية، طريقة FRAP و تثبيط اكسدة الدهون). اظهر المستخلص المدروس بتركيز 50 الى 250 مغ/كغ من الوزن الحي نشاطا ضد الالتهاب الناتج عن حقن الكراجينين لدى الفئران و كذلك نشاطا كبيرا للحد من التشنج الناجم عن حقن حمض الخل. كما اظهرت الدراسة ان للمستخلص القدرة على علاج القرحة المعدية و ذلك بتركيز 250 الى 500مكغ/كغ من الوزن الحي). بينت هاته الدراسة ان المستخلص المستخرج من الطحلب *Haematococcus pluviialis* له خصائص بيولوجية مهمة بالإمكان استغلالها في عدة مجالات ذات صلة بالصناعات الغذائية و الدوائية.

## الكلمات المفتاح

الطحالب المجهرية-*Haematococcus pluviialis*-الاجهاد الغذائي- الضوء-خصائص بيولوجية.

## Liste des abréviations

- AA** : Acide arachidonique  
**AAR** : Activité antioxydante relative  
**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**AINS** : Anti-inflammatoire non stéroïdien  
**ATCC** : American type culture collection  
**BBM** : Basal Bold Medium  
**BHA** : Butylhydroxyanisole  
**BHT** : Butylhydroxytoluène  
**CAT** : Capacité Antioxydante Totale  
**COX-1** : Cyclooxygénase 1  
**COX-2** : Cyclooxygénase 2  
**DL<sub>50</sub>** : Dose Létale de 50% d'une population animale.  
**DMSO** : Diméthylsulfoxyde  
**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl  
**ERO** : Espèces réactives oxygénées  
**ERN** : Espèces réactives azotés  
**FRAP** : Ferric-Reducing Antioxidant Power  
**FTC** : Ferric thiocyanate  
***H. pluvialis*** : *Haematococcus pluvialis*  
**HPLC** : Chromatographie liquide haute performance  
**IC<sub>50</sub>** : Concentration d'un composé inhibant 50 % de l'effet observé  
**IL** Interleukine  
**IL-1 $\beta$**  Interleukin 1 beta  
**LPS** : Lipopolysaccharide  
**NF- $\kappa$ B** : Nuclear Factor-kappa B  
**NK** : Naturel Killer  
**NO** : Monoxyde d'azote  
**NOS** : Oxyde nitrique synthase  
**PC** : Poids corporel  
**PGE** : Prostaglandines  
**P/V** : Poids sur Volume  
**RO•** : Radical alkoxyde

**ROO•** : Radicaux peroxydes

**SL** : Solution mère concentrée

**TNF-  $\alpha$**  : Tumor Necrosis Factor alpha

**TPTZ** : Tripyridyltriazine

**V/V** : Volume sur volume

**J<sup>-1</sup>** : Unité par jour

## Liste des figures

	<b>Page</b>
<b>Figure 1:</b> Observation microscopique des formes végétatives des cellules de l'algue <i>Haematococcus pluvialis</i> dans des conditions de cultures favorables (A : cellules ovales vertes et B : cellules sphériques vertes) et des cellules enkystées à paroi épaisse représentant une accumulation de caroténoïdes secondaires issues d'une exposition à un stress environnemental (C et D : cellules sphériques rouges) (Shah, 2016).....	8
<b>Figure 2:</b> Observation microscopique montrant la structure d'une cellule végétative de <i>Haematococcus pluvialis</i> dans les conditions de culture favorables (x40), <b>1</b> : Stigma, <b>2</b> : membrane cellulosique, <b>3</b> : gangue glycoprotéique, <b>4</b> : prolongements plasmatiques, <b>5</b> : flagelles (Bertrand, 2007).....	9
<b>Figure 3:</b> Cycle de vie de la microalgue <i>Haematococcus sp.</i> , <b>1</b> : Multiplication par scissiparité; <b>2</b> : Formation d'aplanospores suite à un stress; <b>3</b> : Augmentation progressive de taille des aplanospores ; <b>4</b> : Multiplication ; <b>5</b> : Transformation des aplanospores en Kystes ; <b>6 et 7</b> : Lors du retour aux conditions optimales le contenu cellulaire des formes de résistance se divise en plusieurs cellules; <b>8</b> : Libération des cellules filles de la paroi mère ; <b>9</b> : Chaque cellule devient mobile ; <b>10</b> : Transformation de cellules en gamétophyte ; <b>11</b> : Libération des gamètes ; <b>12</b> : Accolement de gamètes ; <b>13</b> : Fusion des gamètes donnant naissance à un zygote diploïde (Rmiki, 1999).....	11
<b>Figure 4:</b> Structure chimique de la molécule d'astaxanthine (Lorenz, 1999).....	18
<b>Figure 5:</b> Stéréoisomères de l'astaxanthine (Guerin et al., 2003).....	18
<b>Figure 6:</b> Schéma montrant les sites responsables du pouvoir antioxydant de l'astaxanthine, les parties polaires et la partie apolaire de la molécule (Yang et al, 2013).....	19
<b>Figure 7:</b> Position de la molécule d'astaxanthine au sein de la membrane cytoplasmique des cellules (Ranga Rao et al., 2014) .....	20
<b>Figure 8:</b> Etapes d'enkystement et de production d'astaxanthine par <i>Haematococcus pluvialis</i> après exposition à des conditions de stress (Shah et al., 2016) .....	26
<b>Figure 9:</b> Voies intermédiaires de biosynthèse de l'astaxanthine par <i>Haematococcus pluvialis</i> (d'après Harker et Hirschberg, 1997 et Fraser et al., 1998) .....	28
<b>Figure 10:</b> Extraction et dosage de l'astaxanthine produite par <i>H. pluvialis</i> dans des conditions de stress (Wan et al., 2014).....	40

<b>Figure 11:</b>	Réduction du radical DPPH diphényl-picryl-hydrazyl en diphényl-picryl-hydrazine (Sanchez-Moreno, 2002).....	42
<b>Figure 12:</b>	Réduction du fer ferrique en fer ferreux en présence d'un composé antioxydant (Prior et al., 2005).....	45
<b>Figure 13:</b>	Observation macroscopique des colonies de la microalgue isolée sur gélose BBM après incubation pendant dix jours à 25±2C° et à une intensité lumineuse de 40 µMoles photons/m <sup>2</sup> /s.....	51
<b>Figure 14:</b>	Culture de la microalgue isolée sur bouillon BBM à 25±2C° avec éclairage continu à 40 µMoles photons/m <sup>2</sup> /s pendant dix jours.....	52
<b>Figure 15:</b>	Observation microscopique des cellules de la microalgue <i>H. pluvialis</i> isolée à partir de l'échantillon 23 d'eau douce et obtenues par culture de l'isolat dans des conditions de température (25±2C°) et de luminosité (40 µMoles photons/m <sup>2</sup> /s). Grossissement : 40x10.....	53
<b>Figure 16:</b>	Observation microscopique des macrozoïdes (A), et des aplanospores matures (B) obtenues par culture de l'isolat à 25±2°C et sous une luminosité de 200 µMoles photons/m <sup>2</sup> /s. Grossissement : 40x10.....	54
<b>Figure 17:</b>	Croissance de la microalgue ( <i>H. pluvialis</i> ) isolée sur bouillon BBM en absence (0 g/L ■) ou en présence de 0.15 g/L (■), 0.25 g/L (■), 0.50 g/L (■) et 0.75 g/L (■) de nitrate de sodium à 25±2°C et à une intensité lumineuse de 40 µMoles photons/m <sup>2</sup> /s pendant dix jours. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations ±SD.....	55
<b>Figure 18:</b>	Culture en masse de la microalgue <i>H. pluvialis</i> sur milieu BBM à 0.5g/mL de NaNO <sub>3</sub> à 25±2°C et à une intensité lumineuse de 40 µMoles photons/m <sup>2</sup> /s pendant huit jours.....	59
<b>Figure 19:</b>	Observation microscopique des cellules de <i>Haematococcus pluvialis</i> après le 7 <sup>ème</sup> (J7) et 14 <sup>ème</sup> (J14) jours d'exposition aux différents stress environnementaux (carence nutritionnelle ou stress salin + 200 µMoles photons/m <sup>2</sup> /s). Grossissement : 10x40).....	60
<b>Figure 20:</b>	Mise en évidence de la production d'astaxanthine par l'isolat de <i>H. pluvialis</i> cultivé pendant 14 jours à 25±2°C et à forte intensité lumineuse de 200 µMoles photons/m <sup>2</sup> /S sur bouillons BBM carencés en azote (a), en phosphore (b), en azote et phosphore à la fois (c) ; ou additionnés de 64 mM (d), 32mM (e) ou non 0 mM (f) de chlorure de sodium.....	62
<b>Figure 21:</b>	Quantités d'astaxathine accumulées par l'isolat de <i>H. pluvialis</i> cultivé sur milieux BBM sans source d'azote (BBM-N), de phosphore (BBM-P) azote et de phosphore (BBM-N,P) et sur milieu ordinaire (contrôle) à 25±2°C et sous un éclairage continu à 200 µMoles photons/m <sup>2</sup> /s	

	pendant 14 jours. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations $\pm$ SD.....	64
<b>Figure 22:</b>	Quantités d'astaxanthine accumulées par l'isolat de <i>H. pluvialis</i> cultivé sur milieux BBM ordinaire (contrôle) ou BBM additionné de 0, 32 ou 64 mM de chlorure de sodium à $25\pm 2^\circ\text{C}$ et sous un éclairage continu à $200 \mu\text{photons/m}^2/\text{s}$ pendant 14 jours. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations $\pm$ SD.....	68
<b>Figure 23:</b>	Pourcentages de réduction du radical DPPH en fonction de la concentration de l'extrait DMSO de <i>H. pluvialis</i> (A), d'acide ascorbique (B) et de butylhydroxytoluène BHT (C). Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations $\pm$ SD.....	71
<b>Figure 24:</b>	Valeurs des IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) du BHT, de l'acide ascorbique et de l'extrait DMSO de <i>H. pluvialis</i> ( $\mu\text{g/mL}$ ).....	73
<b>Figure 25:</b>	Pourcentages d'inhibition du blanchiment du $\beta$ -carotène par l'extrait DMSO de <i>H. pluvialis</i> et par le BHT. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations $\pm$ SD.....	75
<b>Figure 26:</b>	Capacité antioxydante totale (CAT) de l'extrait DMSO de <i>H. pluvialis</i> ( $\mu\text{g Eq AA/g}$ d'extrait). Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations $\pm$ SD.....	77
<b>Figure 27:</b>	Pouvoir réducteur du fer par l'acide ascorbique, le BHT et par l'extrait DMSO de <i>H. pluvialis</i> . Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations $\pm$ SD.....	78
<b>Figure 28:</b>	Evolution des teneurs en produits d'oxydation de l'acide linoléique (mesurées par l'absorbance à 500 nm) du contrôle (■), en présence d'acide ascorbique (■) ou d'extrait DMSO de <i>H. pluvialis</i> (■) dans le système FTC. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations $\pm$ SD.....	79
<b>Figure 29:</b>	Pourcentage d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique par l'acide ascorbique (■) et l'extrait DMSO de <i>H. pluvialis</i> (■) au cours de l'incubation.....	80
<b>Figure 30:</b>	Taux d'augmentation de l'œdème (en % par rapport au témoin) en fonction des groupes de souris. Les valeurs représentent la moyenne de 5 déterminations $\pm$ SD.....	83
<b>Figure 31:</b>	Inhibition de l'œdème (en % par rapport au témoin) en fonction des groupes de souris. Les valeurs représentent la moyenne de 5 déterminations $\pm$ SD.....	85
<b>Figure 32:</b>	Inhibition des contorsions (% par rapport au témoin) provoquées par injection intrapéritonéale d'acide acétique chez les différents lots de souris. Les valeurs représentent la moyenne de 5 déterminations $\pm$ SD.....	89

<b>Figure 33:</b>	Photographies originales d'estomacs de souris : non éthanolo-ulcérées et non traitées à l'extrait algal (A), éthanolo-ulcérées mais non traitées avec l'extrait algal (témoin) (B), éthanolo-ulcérées traitées soit par 30mg d'oméprazole /kg poids vif (C), soit par 250µg (D) ou 500µg € d'extrait de <i>H. pluvialis</i> /kg poids vif.....	91
<b>Figure 34:</b>	Taux d'ulcération gastrique (en %) éthanolo-induite par instillation. Les valeurs représentent la moyenne de 5 déterminations ±SD.....	92
<b>Figure 35:</b>	Taux d'inhibition (en % par rapport au témoin) des ulcérations gastriques éthanolo-induites chez les différents lots de souris. Les valeurs représentent la moyenne de 5 déterminations ±SD.....	93
<b>Figure 36:</b>	Microphotographie de l'aspect histologique d'estomac de souris éthanolo-ulcérée mais non traitée par l'oprémazol ou l'extrait de <i>H. pluvialis</i> (groupe témoin). .....	94
<b>Figure 37:</b>	Microphotographie de l'aspect histologique d'estomac de souris prétraitée par l'oméprazole avant éthanolo-induction d'ulcère chez le groupe standard.....	96
<b>Figure 37:</b>	Microphotographie de l'aspect histologique d'estomac de souris du groupe prétraité par 250 µg d'extrait DMSO de <i>H. pluvialis</i> /kg de poids vif avant éthanolo-induction.....	96
<b>Figure 39:</b>	Microphotographie l'aspect histologique d'estomac de souris du groupe prétraité par 500 µg d'extrait DMSO de <i>H. pluvialis</i> /kg poids vif avant éthanolo-induction d'ulcère.....	97

## Liste des tableaux

	<b>Page</b>
<b><u>Tableau 1 :</u></b> Composition chimique moyenne de la microalgue <i>Haematococcus pluvialis</i> (Lorenz, 1999; Grewe et Griehl, 2012 ; Shah et al., 2016).....	12
<b><u>Tableau 2 :</u></b> Quelques activités biologiques de l'astaxanthine (Elgarem et al. (2002) ; Spiller et al. (2003) ; Comhaire et al. (2005) ; Miyawaki et al. (2008) ; Lu et al. (2010) ; Maoka et al. (2012) ; Turkez et al. (2012) ; Huangfu et al. (2013) ; Ranga Rao et al. (2014) ; Galasso et al. (2018); Lin et al. (2020a).....	24
<b><u>Tableau 3 :</u></b> Composition chimique du milieu BBM (Bold's Basal medium) (Bischoff et Bold, 1963).....	33
<b><u>Tableau 4 :</u></b> Composition des milieux de stress utilisés dans la procédure d'évaluation de l'influence de la carence en azote et/ou en phosphore associée à un stress lumineux sur la production d'astaxanthine par <i>H. pluvialis</i> .....	37

## Sommaire

## Page

Dédicaces

Avant-propos

Résumé

Abstrat

ملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Sommaire

Introduction

### Chapitre I : Généralités sur les microalgues

I.1. Définition .....	3
I.2. Habitat.....	3
I.3. Classification des microalgues.....	4
I.3.1. Cyanobactéries ou algues bleues.....	6
I.3.2. Bacillariophycées ou diatomées.....	4
I.3.3. Chrysophycées ou algues dorées.....	4
I.3.4. Chlorophycées ou algues vertes.....	5
I.4. Besoins vitaux des microalgues.....	5
I.4.1. Lumière.....	5
I.4.2. Température.....	5
I.4.3. Eléments nutritifs.....	6
I.5. Intérêt des microalgues.....	6
I.6. La microalgue <i>Haematococcus pluvialis</i> .....	7
I.6.1. Taxonomie, morphologie cellulaire et habitat.....	7
I.6.2. Ultrastructure.....	9
I.6.3. Cycle de vie.....	10
I.6.4. Composition chimique de <i>H. pluvialis</i> .....	12
I.6.4.1. Protéines.....	12
I.6.4.2. Lipides.....	13
I.6.4.3. Glucides.....	13
I.6.4.4. Caroténoïdes.....	13
I.6.4.5. Minéraux et vitamines.....	14
I.6.5. Utilisation et intérêt de <i>H. pluvialis</i> .....	14

### Chapitre II : Les caroténoïdes et l'astaxanthine

II.1. Caroténoïdes.....	15
II.1.1. Définition.....	15
II.1.2. Structure des caroténoïdes.....	15
II.1.3. Propriétés des caroténoïdes.....	16
II.1.4. Intérêt des caroténoïdes.....	16
II.2. L'astaxanthine.....	17
II.2.1. Structure chimique et propriétés biologiques de l'astaxanthine.....	17
II.2.1.1. Structure chimique de l'astaxanthine.....	17
II.2.1.2. Propriétés biologiques de l'astaxanthine.....	19
II.2.1.2.1. Activité antioxydante de l'astaxanthine.....	19
II.2.1.2.2. Activité anti-inflammatoire de l'astaxanthine.....	21

II.2.1.2.3. Astaxanthine et maladies cardiovasculaires.....	21
II.2.1.2.4. Astaxanthine et cancer.....	22
II.2.1.2.5. Astaxanthine et maladies rétinienne.....	23
II.2.1.2.6. Astaxanthine et diabète.....	23
II.2.1.2.7. Astaxanthine et système immunitaire.....	24
II.2.2. Principales sources d'astaxanthine.....	25
II.2.2.1. Les microalgues.....	25
II.2.2.2. Les levures.....	25
II.2.2.3. Les crustacées et les poissons.....	25
II.3. Caroténogénèse et production d'astaxanthine par <i>Haematococcus pluvialis</i> .....	26
II.3.1. Réponse de <i>Haematococcus pluvialis</i> au stress environnemental.....	26
II.3.2. Biosynthèse de l'astaxanthine par <i>H. pluvialis</i> .....	27
II.3.3. Extraction d'astaxanthine à partir des Kystes de <i>H. pluvialis</i> .....	29
II.3.4. Conservation et stabilité de l'astaxanthine.....	30
<b>Chapitre III : Matériels et Méthodes</b>	
III.1. Matériel biologique.....	31
III.1.1. Echantillons d'algues d'eaux douces.....	31
III.1.2. Matériel animal.....	31
III.2. Culture des algues.....	32
III.2.1. Composition du milieu de culture.....	32
III.2.2. Source de carbone.....	32
III.2.3. Conditions de culture.....	34
III.3. Méthode d'isolement, purification, identification et conservation de <i>H. pluvialis</i> .....	34
III.3.1. Isolement .....	34
III.3.2. Purification.....	34
III.3.3. Identification.....	35
III.3.4. Conservation .....	35
III.4. Protocole d'étude de l'effet de la concentration en nitrate de sodium sur la cinétique de croissance de <i>H. pluvialis</i> .....	35
III.5. Expérience d'évaluation de l'influence de la carence nutritionnelle ou de la salinité associées à un stress lumineux sur la production d'astaxanthine par <i>H. pluvialis</i> .....	36
III.5.1. Préparation de l'inoculum.....	36
III.5.2. Procédure d'évaluation de l'influence de la carence en azote et/ou en phosphore associée à un stress lumineux sur la production d'astaxanthine par <i>H. pluvialis</i> .....	38
III.5.3. Procédure d'évaluation de l'influence de la salinité associée à un stress lumineux sur la production d'astaxanthine par <i>H. pluvialis</i> .....	38
III.5.4. Inoculation des milieux de stress.....	38
III.5.5. Extraction et dosage d'astaxanthine.....	38
III.5.6. Etude des changements morphologiques des cellules soumises aux différents stress.....	41
III.6. Etude des activités biologiques de l'extrait DMSO de <i>H. pluvialis</i> .....	41
III.6.1. Etude <i>In Vitro</i> des activités biologiques de l'extrait DMSO de <i>H. pluvialis</i> .....	41
III.6.1.1. Activité antioxydante.....	41
III.6.1.1.1. Test de piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picryl hydrazyl	

(DPPH°).....	42
III.6.1.1.2. Test d'inhibition du blanchissement du $\beta$ -carotène.....	43
III.6.1.1.3. Test de réduction du phosphomolybdate ou capacité antioxydante totale (CAT) .....	44
III.6.1.1.4. Test du pouvoir réducteur de l'ion ferrique ou le test FRAP ( <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> ) .....	45
III.6.1.1.5. Méthode au FTC ( <i>Ferric thiocyanate method</i> ).....	45
III.6.2. Etude <i>In Vivo</i> des propriétés biologiques de l'extrait DMSO de <i>H. pluvialis</i> .....	46
III.6.2.1. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	46
III.6.2.2. Mesure de l'activité antalgique.....	47
III.6.2.3. Etude de l'effet gastroprotecteur.....	48
III.6.3. Détermination de la toxicité aigue.....	49
III.7. Analyse statistique.....	49
<b>Chapitre IV : Résultats et discussion</b>	
IV. 1. Résultats de l'isolement de la microalgue <i>H. pluvialis</i> .....	50
IV.1.1. Examen macroscopique de l'isolat.....	50
IV.1.2. Examen microscopique de l'iosolat.....	51
IV.2. Effet de la concentration du milieu de culture en nitrate de sodium sur la cinétique de croissance de <i>H. pluvialis</i> à 25°C et sous une luminosité de 40 $\mu$ Moles photons/m <sup>2</sup> /s.....	53
IV.3. Influence des différentes conditions de stress sur l'aspect microscopique des cellules et sur la caroténogenèse chez la microalgue <i>H. pluvialis</i> .....	58
IV.3.1. Aspect microscopique des cellules soumises aux différents stress.....	58
IV.3.2. Effet des différentes conditions de stress sur la caroténogenèse.....	60
IV.3.2.1. Stress de carence nutritionnelle associée à un stress lumineux.....	62
IV.3.2.2. Stress salin associé à un stress lumineux.....	67
IV.4. Activité antioxydante <i>In Vitro</i> de l'extrait DMSO de <i>H. pluvialis</i> .....	69
IV.4.1. Test de piégeage du radical libre DPPH et détermination de l'IC50.....	69
IV.4.2. Test de blanchiment du $\beta$ -carotène.....	73
IV.4.3. Test de la capacité antioxydante totale (CAT).....	75
IV.4.4. Test du pouvoir réducteur du fer (test FRAP : <i>Ferric Reducing Antioxydant Power</i> ).....	76
IV.4.5. Test d'inhibition de peroxydation de l'acide linoléique (méthode au FTC)....	78
IV.5. Activités biologiques <i>In Vivo</i> de l'extrait DMSO de <i>H. pluvialis</i> .....	81
IV.5.1. Activité anti-inflammatoire.....	81
IV.5.2. Activité antalgique.....	87
IV.5.3. Activité gastroprotectrice.....	89
IV.5.3.1. Observation macroscopique.....	89
IV.5.3.1.1. Détermination du degré d'ulcération (taux d'ulcération).....	90
IV.5.3.1.2. Détermination du degré de protection d'ulcération (taux d'inhibition)....	91
IV.5.3.2. Observation microscopique.....	92
IV.6. Toxicité aigue de l'extrait DMSO de <i>H. pluvialis</i> .....	98
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	100
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	

## Introduction

Les changements de mode de vie et de nutrition, la pollution, l'exposition aux xénobiotiques et aux radiations ainsi que l'activité physique intense sont les principaux facteurs responsables de développement de plusieurs pathologies métaboliques qui sont en augmentation exponentielle durant cette dernière décennie (Raposo et al., 2015).

Ce constat serait lié à une perturbation du métabolisme ayant comme conséquence une augmentation du taux de respiration cellulaire responsable d'un déséquilibre entre les produits d'oxydation cellulaire et la capacité antioxydante naturelle de l'organisme. Ce déséquilibre se caractérise par une surproduction mitochondriale (chaîne respiratoire) de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et d'azote (ERN) (Raposo et al., 2015).

Cet état prooxydant favorise l'apparition d'innombrables pathologies telles que les maladies neuro-dégénératives, cardiovasculaires, d'Alzheimer, de Parkinson, les cancers, le diabète, l'obésité...etc. Cette situation a créé cette nouvelle tendance d'utilisation des compléments alimentaires riches en antioxydants naturels tels que les polyphénols, l'acide ascorbique, le tocophérol...etc. (Raposo et al., 2015).

Les caroténoïdes, et en particulier, ceux issus de microalgues sont d'excellents antioxydants capables de neutraliser les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Les principaux caroténoïdes actuellement recherchés pour des applications à gros volume sont le  $\beta$ -carotène produit par *Dunaliella salina*, l'astaxanthine produite par *H. pluvialis*, et la canthaxanthine produite par *Coelastrella striolata* (Alves Da Costa Cardoso, 2008).

Ces biomolécules sont utilisées en tant qu'additifs dans les industries alimentaire, cosmétique et pharmaceutique pour leurs propriétés biologiques et leur rôle de colorant. Cependant, elles ont suscité un intérêt grandissant grâce à leurs propriétés antioxydantes, anti-radicalaires et pro-vitaminique A (Alves Da Costa Cardoso, 2008).

*H. pluvialis* est une Chlorophycée exploitée industriellement pour sa capacité à synthétiser et à accumuler une molécule à haute valeur ajoutée : l'astaxanthine (3,3'-dihydroxy- $\beta,\beta$ -carotène-4,4'-dione), un caroténoïde de la famille des xanthophylles. Ce

pigment est utilisé, comme colorant alimentaire, mais ses propriétés antioxydantes lui valent également des applications dans le domaine de la santé humaine (Guérin *et al.*, 2003).

Ainsi, l'activité antioxydante de l'astaxanthine a été démontrée par plusieurs études sur des rats (Nishigaki *et al.*, 1994), des lapins (Jacobsson *et al.*, 2004) et sur le saumon (Bell *et al.*, 2000) qui ont montré que le pouvoir antioxydant de l'astaxanthine est plus puissant encore que celui de la vitamine E et les autres caroténoïdes. En effet, cette molécule neutralise les radicaux libres 500 fois plus que la vitamine E et 38 fois plus que le  $\beta$ -carotène (Sarada *et al.*, 2006; Kang et Sim, 2008), elle est appelée de ce fait « Super vitamine E » (Lorenz, 2000 ; Chien *et al.*, 2003).

Ce fort pouvoir antioxydant est estimé avoir un rôle important dans les autres propriétés biologiques de la molécule, tels que ses effets préventifs de l'inflammation, de la photo-oxydation, de l'infection à *Helicobacter pylorii* et du vieillissement, l'amélioration de la réponse immunitaire et la protection du cœur, du foie et de l'œil contre les maladies (Guérin *et al.*, 2003). Il semble que son efficacité particulière réside dans sa capacité à protéger la double couche lipidique, en surface et à l'intérieur des membranes cellulaires (Goto *et al.*, 2001).

Cependant, l'accumulation de ce pigment par cette espèce algale survient à un stade particulier de son complexe cycle de vie (Chen *et al.*, 2015). En effet, ce dernier est caractérisé par deux phases distinctes. Les cellules de *H. pluvialis* existent sous forme ovale biflagellée et sont très mobiles dans les conditions de culture favorables. Lorsque ces conditions sont modifiées, les cellules subissent un polymorphisme important et se transforment en cellules sphériques de couleur rouge dû à l'accumulation d'astaxanthine et sont alors appelées hématocystes ou aplanospores (Harker *et al.*, 1996 ; Sarada *et al.*, 2006).

La présentation de ce travail est organisée en deux parties : La première est scindée en deux chapitres, le premier présente des généralités sur les microalgues ; alors que le second est consacré à la description des caroténoïdes en général et l'astaxanthine en particulier, avec une présentation de ses principales sources et de son intérêt santé. La deuxième partie présente la méthodologie utilisée et les résultats obtenus qui sont discutés et confrontés à ceux de la littérature.

## **Chapitre I : Généralités sur les microalgues**

### **I.1. Définition**

Le terme « microalgue » désigne des algues de taille microscopique (Demirbas, 2000). Elles font partie des premiers organismes vivants apparus sur notre planète (Simo, 2001). Ce sont des organismes unicellulaires eucaryotes, autotrophes et photosynthétiques, délimités par une membrane plasmique, et contiennent au sein de leur cytoplasme de nombreux organites nécessaires à leur fonctionnement et à leur métabolisme (chloroplastes, amyloplast, oléoplastes, mitochondries et son noyau entouré de son enveloppe) (De Reviere, 2002).

Ces organismes sont caractérisés par la présence de chloroplastes contenant deux enveloppes membranaires, des thylakoïdes empilés (grana) et des chlorophylles *a* et *b*. Elles transforment le carbone inorganique en matière organique. Cette transformation s'effectue grâce à l'énergie lumineuse par le processus de la photosynthèse (Masojidek et al., 2004; Cadoret et Bernard, 2008).

Elles sont de formes et de tailles variées, allant de quelques micromètres à plusieurs dizaines de micromètres (Cadoret et Bernard, 2008). Présentes dans tous les milieux (salins, eaux douces, milieux arides...), ces microorganismes représentent la majorité du plancton marin et produisent l'essentiel de l'oxygène atmosphérique (Berberoglu et al., 2009). La majorité des microalgues croissent à une température de 25-35°C avec un pH neutre (Zeng et al., 2011).

### **I.2. Habitat**

De par leur extraordinaire biodiversité et leur grande faculté d'adaptation, les microalgues sont présentes sur l'ensemble des surfaces du globe, des océans, des glaces arctiques, en passant par les lacs hyper-salés, les neiges éternelles, les forêts humides et les murs de maisons.

Elles occupent la plupart des niches écologiques mais sont surtout présentes dans les environnements aquatiques. Elles colonisent les sols et une vaste gamme de supports comme les rochers, les arbres ou encore les édifices architecturaux (Macedo et al., 2009). Mais aussi, on les rencontre dans les déserts arides à semi-arides (Sharma et al., 2007).

L'atmosphère constitue également un environnement dans lequel une diversité notable de microalgues eucaryotes et de cyanobactéries est signalée (Sharma *et al.*, 2007). Enfin, cette capacité à coloniser l'ensemble de la biosphère est une propriété qui leur permet de se développer dans des conditions dites extrêmes. C'est grâce à l'absence de structure complexe autre que la cellule et à un métabolisme orienté principalement vers la production d'énergie que les microalgues ont cette capacité à être ubiquistes (Falkowski et Raven, 1997).

### **I.3. Classification des microalgues**

Les microalgues sont classées par famille selon leur pigmentation, la nature chimique des produits de stockage issus de la photosynthèse, l'organisation des membranes photosynthétiques et d'autres caractéristiques morphologiques (Demirbas, 2000). Les quatre classes les plus communes au niveau de l'abondance relative sont :

#### **I.3.1. Cyanobactéries ou algues bleues**

Cette famille très ancienne de microalgues compte environ 2 000 espèces dans divers habitats. De structure semblable à celle des bactéries. Les cyanobactéries ne sont pas à proprement parler des microalgues car ce sont des procaryotes (absence de noyau) photosynthétiques mais elles sont souvent classées comme telles et parfois appelées algues bleu-vert. Les spirulines (*Spirulina sp.*) sont parmi les plus produites dans le monde essentiellement pour la consommation humaine (CRBM, 2006).

#### **I.3.2. Bacillariophycées ou diatomées**

Les diatomées dominent le domaine du phytoplancton des océans et elles sont aussi présentes dans les eaux douces ou saumâtres, dans les sols humides et sous les feuilles humides. Plus de 100 000 espèces de diatomées sont connues. Elles forment des colonies qui apparaissent généralement brunes ou jaunes. Elles ont la particularité d'être entourées d'une coque de silice très résistante et persistante appelée frustule, ce qui leur confère des structures géométriques complexes et très variées (Cadoret et Bernard, 2008).

#### **I.3.3. Chrysophycées ou algues dorées**

Les chrysophycées se retrouvent surtout en eaux douces et on en compte environ 1 000 espèces. Elles ressemblent aux diatomées mais elles peuvent arborer plus de couleurs que ces

dernières: du jaune au brun en passant par l'orange. Chez plusieurs espèces d'algues dorées, l'enveloppe est principalement composée de silice et en faible proportion de cellulose (NREL, 1998).

#### **1.3.4. Chlorophycées ou algues vertes**

Les algues vertes sont très abondantes en eaux douces. Elles sont riches en un pigment vert qui leur confère leur couleur: la chlorophylle. Elles peuvent se développer en mode unicellulaire ou en colonies qui peuvent devenir très denses. Elles peuvent tolérer plusieurs types de conditions. Elles se sont d'ailleurs adaptées à des milieux étonnement variés (Proschold et Leliaert, 2007).

Les algues vertes (Chlorophyta) sont caractérisées par la présence de chloroplastes contenant deux enveloppes membranaires, des thylakoïdes empilés (grana) et des chlorophylles *a* et *b*. Toutes les algues vertes produisent de l'amidon comme réserve principale de polysaccharides qui s'accumulent dans les plastides.

#### **I.4. Besoins vitaux des microalgues**

La croissance algale est affectée par plusieurs paramètres, dont les plus importants sont la lumière, la température et les éléments nutritifs.

##### **I.4.1. Lumière**

La lumière est le facteur le plus important pour la croissance des algues et a un effet sur la composition cellulaire des microalgues (Hu, 2004). L'énergie radiative ne s'accumule pas, c'est pour cela que la lumière doit être fournie en permanence et doit être considérée comme un substrat (Grima *et al.*, 1996; Miron *et al.*, 2000).

##### **I.4.2. Température**

La température est l'un des facteurs physiques influençant le plus la croissance des microalgues. Pour chaque température, il y a une intensité lumineuse spécifique pour atteindre le taux photosynthétique maximal. La température optimale augmente donc avec l'augmentation de l'intensité lumineuse (Hu, 2004).

### **I.4.3. Eléments nutritifs**

Tout comme les plantes supérieures, les microalgues ont besoin de certains nutriments essentiels pour leur métabolisme (Taiz et Zeiger, 2006). Ainsi, Le milieu de culture des microalgues doit satisfaire les besoins en éléments majeurs (ou macroéléments) C, H, N, O, P, S et en microéléments encore appelés éléments traces (Sialve et Steyer, 2013).

Les microalgues ont besoin de carbone inorganique pour la photosynthèse qui peut être apporté sous forme de sels (bicarbonate) ou par enrichissement de l'air insufflé. Pour que les microalgues puissent utiliser le CO<sub>2</sub> pour la photosynthèse, celui-ci doit être solubilisé (Cadoret et Bernard, 2008).

L'azote est un élément essentiel à la synthèse des protéines de structure et de fonctionnement. C'est l'élément le plus important après le carbone (Becker, 1994).

Le phosphore est un macronutriment important dans les processus de métabolisme cellulaire. Une carence en phosphore peut entraîner des accumulations de pigments chez certaines microalgues, mais l'impact est plus faible qu'une carence azotée (Becker, 1994).

Les microalgues ont besoin aussi de potassium, de fer, de silice (pour les diatomées), de soufre, de métaux sous forme de traces et de vitamines (Hu, 2004).

### **I.5. Intérêt des microalgues**

Les microalgues jouent un rôle majeur dans les écosystèmes marins, en tant que producteurs primaires. Elles peuvent être considérées comme des usines cellulaires car elles produisent de nombreuses molécules à forte valeur ajoutée comme les omégas 3, les polysaccharides, les antioxydants et les molécules bioactives (anticancéreuses par exemple) (Spolaore et al., 2006).

Les algues microscopiques forment le phytoplancton qui est à la base de nombreuses chaînes alimentaires. Elles sont impliquées dans des cycles biogéochimiques fondamentaux comme ceux du carbone et du soufre et participent ainsi à la régulation du climat global (Simo, 2001).

La valeur nutritionnelle des microalgues peut en effet s'expliquer en grande partie par la présence de trois grandes catégories de composants: les protéines, les lipides et les minéraux. Les microalgues contiennent aussi des pigments associés à la photosynthèse (chlorophylle,  $\beta$ -carotène, lutéine, etc) et des polysaccharides (l'agar, les alginates et les carraghénanes) (Peterson et al., 2008).

À l'instar des plantes terrestres, la biodiversité des microalgues représente un véritable réservoir de molécules originales d'intérêt médical. Parmi les métabolites connus figurent les acides gras polyinsaturés de types  $\omega 3$  et  $\omega 6$  (Kornprobst, 2005). Les pigments, qui peuvent avoir des activités anti-oxydantes, font également l'objet de nombreuses recherches portant sur la prévention et le traitement des cancers. Certains exopolysaccharides sécrétés par les microalgues ont montré des capacités antivirales sur l'Herpes simplex virus type 1 (responsable d'infections buccales) ou bien le measles virus (responsable de la rougeole) ou encore le Influenzavirus A (responsable de grippe), et antiprolifératives sur des lignées cellulaires cancéreuses (Laurienzo, 2010). Ces composés insolubles pourraient également entrer dans la formulation d'hydrogels pour la reconstruction osseuse et la vectorisation d'agents ostéoinducteurs (Raposo et al., 2013).

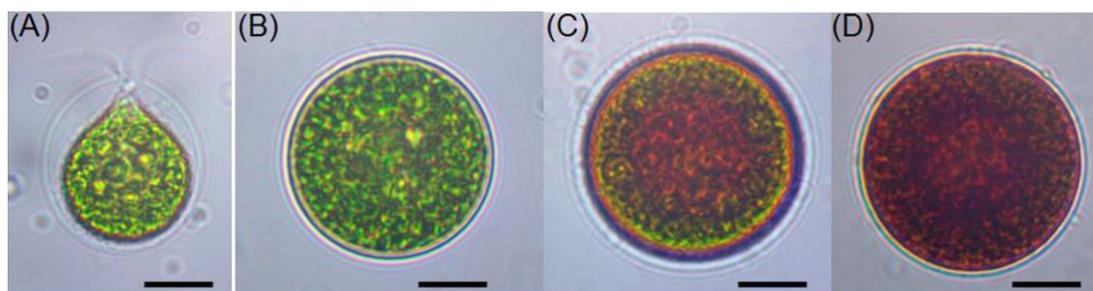
## **I.6. La microalgue *Haematococcus pluvialis***

### **I.6.1. Taxonomie, morphologie cellulaire et habitat**

*H. pluvialis* est une microalgue verte d'eau douce unicellulaire et eucaryote appartenant à l'ordre des volvocales et à la famille des Chlorophycées. Elle comporte deux flagelles lui assurant sa mobilité, ne possède qu'un seul noyau et se transforme en aplanospore, stade de dormance de la cellule, dans des conditions défavorables. Elle se développe préférentiellement dans les marrés d'eau de pluie (Sarada et al., 2002; Kang et al., 2005; Tocquin et al., 2011; Nagaraj et al., 2012).

Sa morphologie cellulaire ressemble à celles des autres membres de l'ordre des volvocales ; toutefois, cette espèce présente un polymorphisme cellulaire important. Elle se présente dans les conditions de culture favorables sous forme de cellules vertes ovales et biflagellées de 10 à 15  $\mu\text{m}$  de largeur et de 15 à 20  $\mu\text{m}$  de longueur (fig. 1, A et B). Sous des conditions de stress, les cellules subissent des changements morphologiques qui les rendent

sphériques et leurs font perdre leurs flagelles, leur paroi s'épaissit et commencent à synthétiser un caroténoïde à haute valeur ajoutée, l'astaxanthine (fig.1, C et D) (Harker et al., 1996).



**Figure 1 :** Observation microscopique des formes végétatives des cellules de l'algue *Haematococcus pluvialis* dans des conditions de cultures favorables (A : cellules ovales vertes et B : cellules sphériques vertes) et des cellules enkystées à paroi épaisse représentant une accumulation de caroténoïdes secondaires issues d'une exposition à un stress environnemental (C et D : cellules sphériques rouges) (Shah et al., 2016).

À la différence de nombreuses espèces de microalgues, et en raison de sa grande capacité d'enkystement, *H. pluvialis* est caractérisée par sa survie dans des conditions extrêmes de lumière, de température et de salinité (Proctor, 1957). Il s'agit d'une espèce ubiquitaire qui colonise de manière épisodique les étangs d'eau douce stagnante peu profonds. Elle est largement distribuée dans de nombreux habitats dans le monde entier comme les lacs d'eau de pluie, les rivières, les marées, les bassins artificiels et les étangs naturels et artificiels (Burchardt et al., 2006).

Cette microalgue est habituellement retrouvée dans les régions tempérées de l'Europe, de l'Afrique et de l'Amérique du nord. Elle a été aussi isolée des eaux saumâtres sur les rochers en bord de mer (Chekanov et al., 2014), d'un bassin d'eau douce dans la roche remplie de neige fondue sur l'île de Blomstrandhalvøya (Norvège) (Klochkova et al., 2013), d'une fontaine sèche près de Rozhen, à Blagoevgrad en Bulgarie (Gacheva et al., 2015), des poissons d'eau douce dans Bihor, en Roumanie (Dragos et al., 2010), ou encore d'une croûte adhérente à toiture d'un immeuble à Séoul en Corée (Kim et al., 2015).

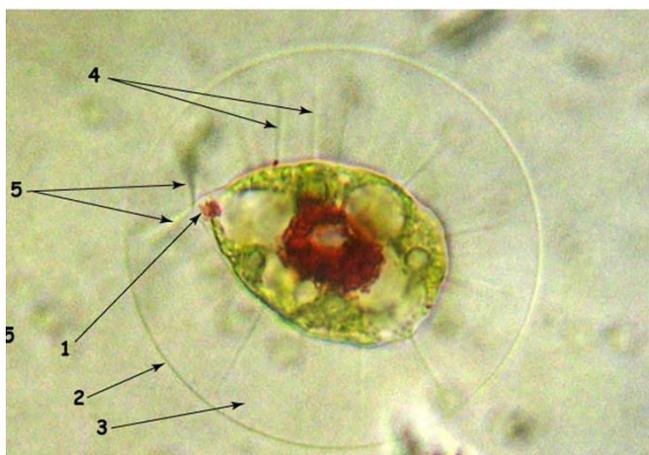
Cette microalgue se développe sur les milieux minéraux très simples, dans des conditions de lumière très diverses et sous un large intervalle de température de 12 à 33°C, avec un maximum d'accumulation d'astaxanthine à 33°C (Halldal et French, 1980). Il est déjà établi

que *Haematococcus* est capable de se développer dans des milieux de culture préférant l'azote sous forme de nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) (Tjahjono *et al.*, 1994; Nagaraj, 2012).

### I.6.2. Ultrastructure

Les cellules de *Haematococcus pluviialis* subissent de grands changements structuraux au cours de son cycle de vie et ces changements sont associés à la réponse de ces cellules aux conditions de stress environnemental. En effet, la forme biflagellée est dominante quand les conditions de culture sont favorables où les cellules s'entourent d'une paroi épaisse (0.64-0.8  $\mu\text{m}$ ) (Chekanov *et al.*, 2014) et d'une matrice extracellulaire gélatineuse d'épaisseur variable (gangue glycoprotéique). Le noyau est situé au centre de la cellule, entouré par de nombreux chloroplastes de taille importante et d'un nombre limité de petites granulations d'astaxanthines (Wayama *et al.*, 2013).

*H. pluviialis* possède un stigma (eyespot) situé dans la partie antérieure de la cellule (du côté où sont insérés les flagelles) (fig.2), et qui joue un rôle actif dans le phototactisme (Braune et Ekelund, 1990). Il est riche en caroténoïdes notamment en  $\beta$ -carotène quel que soit l'état physiologique de la cellule et les conditions de culture. Ce stigma capte la lumière grâce aux photorécepteurs situés du côté de la membrane cellulaire et transmet un signal aux vacuoles pulsatiles qui par leur contraction permettent le mouvement des flagelles (Sineshchekov *et al.*, 1990).



**Figure 2:** Observation microscopique montrant la structure d'une cellule végétative de *Haematococcus pluviialis* dans les conditions de culture favorables (x40), **1** : Stigma, **2** : membrane cellulosique, **3** : gangue glycoprotéique, **4** : prolongements plasmatiques, **5** : flagelles (Bertrand, 2007).

Au cours de leur enkystement, les cellules perdent leurs flagelles, les chloroplastes s'atrophient, les thylakoïdes sont partiellement dégradés et par conséquent, l'activité photosynthétique de la microalgue est atténuée. Une quantité importante de gouttelettes lipidiques contenant l'astaxanthine sont développées autour du noyau, ainsi que des grains de réserves d'amidon. Les cellules de la microalgue deviennent progressivement rouges (Wayama et al, 2013).

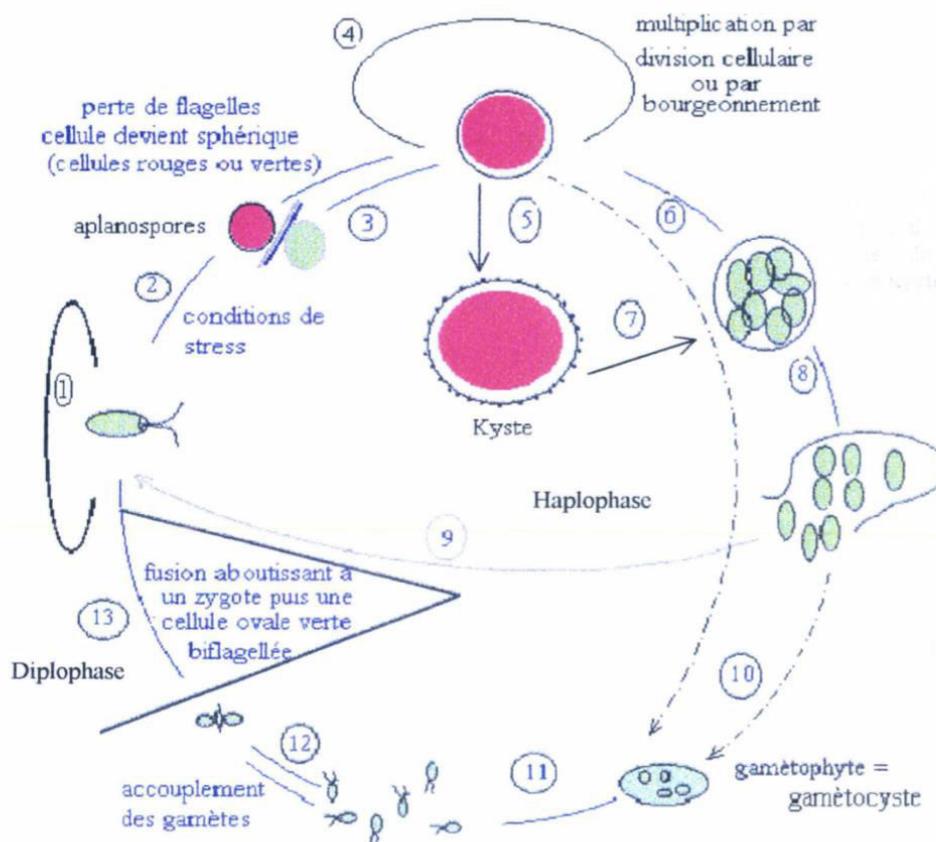
### I.6.3. Cycle de vie

Le cycle évolutif de *H. pluvialis* passe par quatre stades : macrozoïde (zoospore), microzoïde, palmella, et hématozyste (aplanospore) (fig.3). Les stades macrozoïde (zoospore), microzoïde et palmella sont les formes végétatives vertes de la microalgue, l'hématozyste (aplanospore) est le kyste rouge non mobile accumulant l'astaxanthine (Shah et al., 2016).

Dans les conditions de culture optimales *Haematococcus pluvialis* existe sous forme de macrozoïdes (zoospores) qui sont des cellules sphériques, ellipsoïdales ou en forme de poire, ayant deux flagelles identiques, leur taille varie entre 8 et 20 µm (Hagen et al., 2002). La multiplication des macrozoïdes par mitoses génère 2 à 32 cellules filles (Wayama et al, 2013).

Lorsque l'une des conditions favorables est modifiée, les macrozoïdes deviennent rondes et perdent leur flagelles. Leur volume augmente et la paroi des cellules s'épaissit par formation d'une membrane multicouche dans la matrice extracellulaire. Ces cellules végétatives immobiles en état de dormance sont appelées palmella (Hagen et al., 2002).

Lorsque le stress persiste (stress lumineux, variation de température, forte salinité, manque de nutriments), la division cellulaire s'arrête, les palmella se transforment en aplanospores. À ce stade, les cellules sont entourées d'une paroi épaisse et très rigide, ces kystes constituent une forme de résistance par excellence chez cette espèce (Santos et Mesquita, 1984; Boussiba et Vonshak, 1991). Les aplanospores matures accumulent de grandes quantités de caroténoïdes secondaires, en particulier, l'astaxanthine dans des gouttelettes lipidiques dispersées dans le cytoplasme, ce qui leur confère une couleur rouge brillante (Hagen et al., 2002).



**Figure 3:** Cycle de vie de la microalgue *Haematococcus sp.*, 1: Multiplication par scissiparité; 2: Formation d'aplanospores suite à un stress; 3: Augmentation progressive de taille des aplanospores; 4: Multiplication; 5: Transformation des aplanospores en Kystes; 6 et 7: Lors du retour aux conditions optimales le contenu cellulaire des formes de résistance se divise en plusieurs cellules; 8: Libération des cellules filles de la paroi mère; 9: Chaque cellule devient mobile; 10: Transformation de cellules en gamétophyte; 11: Libération des gamètes; 12: Accolement de gamètes; 13: Fusion des gamètes donnant naissance à un zygote diploïde (Rmiki, 1999).

Lorsqu'il y a retour aux conditions favorables, le cytoplasme de ce kyste, ou celui des formes intermédiaires d'enkystement, se divise en plusieurs cellules au moment où la paroi reste entière formant ainsi un "sac" qui contient 4 à 8 cellules. Ce sac s'ouvre à maturité pour libérer ces cellules vertes ovales biflagellées (macrozoïdes ou zoospores) au bout de 48 heures. Si le retour aux conditions normales a lieu avant l'épaississement de la paroi et l'augmentation du volume cellulaire on assiste simplement à un verdissement de la cellule suivi d'un retour à la forme ovale et la naissance de flagelles (Rmiki, 1999; Nagaraj et al., 2012).

#### I.6.4. Composition chimique de *H. pluviialis*

En raison de son cycle de vie complexe, la composition chimique de *Haematococcus pluviialis* varie en fonction du stade de vie (cellules végétatives ou aplanospores). La composition chimique moyenne de cette microalgue est représentée dans le [tableau 1](#).

**Tableau 1** : Composition chimique moyenne de *H. pluviialis* (Lorenz, 1999; Grewe et Griehl, 2012 ; Shah *et al.*, 2016).

Composé chimique (g.100 g <sup>-1</sup> )	Stade macrozoïde	Stade Aplanospore
Protéines	29 - 45	17 - 25
Lipides	22 - 25	32 - 37
Lipides neutres	59	51.9 - 53.5
Phospholipides	23.7	20.6 - 21.1
Glycolipides	11.5	25.7 - 26.5
Glucides	15 - 17	36 - 40
Caroténoïdes	0.5	2 - 5
Neoxanthine	8.3	n.d
Violaxanthine	12.5	n.d
β-carotène	16.7	1.0
Luteine	56.3	0.5
Zeaxanthine	6.3	n.d
Astaxanthine	n.d	81.2
Adonixanthine	n.d	0.4
Canthaxanthine	n.d	5.1
Echénone	n.d	0.2
Chlorophylles	1.5 - 2	0

n.d : non déterminé

##### I.6.4.1. Protéines

Dans les conditions de cultures favorables, les zoospores de *Haematococcus pluviialis* sont riches en protéines (29 - 45%). Une teneur plus faible en protéines (23.6%) a été

cependant observée chez une souche de *H. pluvialis* Rozhen-12 au stade végétatif de sa croissance (Gacheva et al., 2015). Le taux des protéines dans les aplanospores a été estimé entre 21% (Kim et al., 2005) et 23% (Lorenz, 1999) du poids sec total de la microalgue. A ce stade, les protéines sont composées essentiellement d'acide aspartique, glutamique, alanine et de leucine, dont 46 % sont des acides aminés essentiels (Kim et al., 2005).

#### **I.6.4.2. Lipides**

Des teneurs allant de 20 à 25% de lipides totaux ont été enregistrées au stade végétatif de *H. pluvialis* représentés à hauteur de 10% par des acides gras polyinsaturés à courte chaîne localisés dans les chloroplastes. En revanche, dans les aplanospores, les lipides sont sous forme de globules gras dispersés dans le cytoplasme et peuvent représenter plus de 40% du poids sec de la cellule (Boussiba et al., 1992, 1999; Saha et al., 2013).

L'étude de la composition de la fraction lipidique de *H. pluvialis* en acides gras a montré une prédominance des acides palmitique (16 :0), oléique (18 :1), linoléique (18 :2) et linoléique (18 :3). D'autres acides polyinsaturés sont également présents en quantités notables (acide octadécatétraïoïque (18 :4), acide arachidonique (20 :4) et acide écosapentanoïque (20 :5)) (Lorenz, 1999).

#### **I.6.4.3. Glucides**

Les formes végétatives de *H. pluvialis* contiennent entre 15 et 17% de glucides ; ce qui correspond à la moitié de la quantité de glucides enregistrée chez les formes enkystées de la même espèce. En effet, sous des conditions défavorables, les kystes de *H. pluvialis* accumulent de grandes quantités de grains d'amidon où des taux de l'ordre de 38% (Lorenz, 1999), 60% (Recht et al., 2012) et 74% (Boussiba et Vonshak, 1991) ont été enregistrés dans les kystes de différentes souches de cette espèce. Ces réserves glucidiques sont utilisées par la microalgue lorsque les conditions de stress persistent.

#### **I.6.4.4. Caroténoïdes**

En stade végétatif, la fraction de caroténoïdes de *H. pluvialis* est constitué essentiellement de chlorophylles *a* et *b* (caroténoïdes primaires), de lutéine (75–80%), de  $\beta$ -carotène (10–20%) et en moindre quantité, de violaxanthine, neoxanthine, lactucaxanthine et

de zeaxanthine (Renstrom et al., 1981; Harker et al., 1996). Chez les aplanospores, la fraction de caroténoïdes est considérablement importante. Les pigments chlorophylliens sont remplacés par des caroténoïdes secondaires, principalement l'astaxanthine (80 à 99% des caroténoïdes totaux) (Dragos et al., 2010).

#### **I.6.4.5. Minéraux et vitamines**

*Haematococcus pluvialis* est riche en fer (0.14-1.0%), en magnésium (0.85-1.4) et en calcium (0.93-3.3%). Par ailleurs cette microalgue est riche en vitamine C, vitamine E et vitamines du groupe B (B1, B2, B6 et B12) (Lorenz, 1999).

#### **I.6.5. Utilisation et intérêt de *H. pluvialis***

*H. pluvialis* est capable dans certaines conditions de transformer les chlorophylles qu'elle a élaborées en  $\beta$ -carotène puis en astaxanthine. Cette capacité ajoutée à sa rusticité ouvre la voie à son exploitation industrielle pour des débouchés en alimentation animale, diététique humaine, pharmacologie ou encore en cosmétologie (Aissaoui, 1995; Imamoglu, 2009).

plusieurs études ont démontré les propriétés antioxydantes de l'astaxanthine de *H. pluvialis* et le rôle qu'elle joue dans la prévention de plusieurs pathologies liées au stress oxydatif (Lin et al., 2020). Les animaux n'étant pas capables de synthétiser les caroténoïdes, ils se les procurent par leur régime alimentaire. Dans les écosystèmes d'eau douce, le zooplancton se nourrit de microalgues comme *H. pluvialis*. Par conséquent, les animaux aquatiques qui se nourrissent de zooplancton vont accumuler des caroténoïdes dans leur chair ce qui leur confère une couleur rouge-rosée caractéristique (Dore et Cysewski, 2003).

Dans une étude réalisée par Ju et al. (2012), la farine de *H. pluvialis* a été utilisée pour remplacer 12 à 50% des protéines de poisson dans des aliments destinés à des crevettes blanches. Il a été démontré que cette farine peut être utilisée comme additif dans les aliments (3%) pour stimuler la croissance et l'aspect des crevettes.

## **Chapitre II : Les caroténoïdes et l'astaxanthine**

### **II.1. Les caroténoïdes**

#### **II.1.1. Définition**

Les caroténoïdes, des métabolites secondaires, représentent une grande famille de pigments naturels très répandus dans la nature (Olivier et Palou, 2000; Donald et Martin, 2002). Plus de 700 ont été isolés et caractérisés. Une quarantaine est retrouvée régulièrement dans l'alimentation humaine, et seulement six pigments parmi eux sont majoritaires : le  $\beta$ -carotène, le lycopène, la lutéine, la  $\beta$ -cryptoxanthine, l' $\alpha$ -carotène et la zéaxanthine (Rock, 2009). Seuls les végétaux, les algues et les microorganismes sont capables de synthétiser les caroténoïdes (Abounda, 2005; Gu et al., 2007).

Plusieurs éléments interviennent dans la diversité de ces molécules: le nombre de carbones constituant le squelette de la molécule, la structure linéaire ou cyclique, le type de cycles ( $\beta$ ,  $\epsilon$  ou aromatique) et la présence ou non d'atome d'oxygène dans la molécule (Sandmann et al. 1990).

#### **II.1.2. Structure des caroténoïdes**

Les caroténoïdes appartiennent à la famille des terpènes. L'unité de base de ces structures est l'isoprène composé à 5 atomes de carbone (C5). Les terpènes sont issus de la condensation d'au moins deux isoprènes. La classification en monoterpène, diterpène ou tétraterpène dépend du nombre d'isoprènes condensés.

Les caroténoïdes sont dans la catégorie des tétraterpènes car généralement issus de la condensation de huit unités isopréniques qui forment ainsi la structure de base (C40) et qui comportent en moyenne 11 doubles liaisons conjuguées. Les différents caroténoïdes dérivent de cette structure acyclique par hydrogénation, déshydrogénation, cyclisation, oxydation ou tout autre combinaison de ces réactions (Morais et al., 2008).

Ces micronutriments sont classés en deux groupes: les carotènes et les xanthophylles. Les carotènes tels que le  $\beta$ -carotène, l' $\alpha$ -carotène et le lycopène sont des composés hydrocarbonés ; tandis que les xanthophylles telles que la  $\beta$ -cryptoxanthine, la violaxanthine ou la lutéine comprennent au moins une fonction oxygénée (hydroxyle, époxyde, carbonyle ou carboxyle). La majorité des caroténoïdes appartient à cette dernière classe (Armstrong, 1994; Van den Berg et al., 2000; Chanforan, 2010).

### II.1.3. Propriétés des caroténoïdes

La couleur est l'élément caractéristique des caroténoïdes, elle varie du jaune au rouge. Ces molécules doivent leur couleur à leur système de doubles liaisons conjuguées créant un chromophore et permettant ainsi l'absorption de la lumière visible entre 400 et 500 nm. Le degré de conjugaison du chromophore détermine les caractéristiques d'absorption du caroténoïde. Il faut un minimum sept doubles liaisons conjuguées à un composé pour absorber la lumière visible. Au-delà de 7, plus le nombre de doubles liaisons conjugués est important plus la longueur d'onde d'absorbance maximale du caroténoïde est grande et plus sa couleur tend vers le rouge foncé (Britton *et al.* 1995).

Les doubles liaisons de la chaîne hydrocarbonée des caroténoïdes peuvent exister sous deux configurations, *cis* ou *trans* (E/Z). Dans leur état naturel, les caroténoïdes se trouvent sous la forme *trans*. Les caroténoïdes avec un système étendu de doubles liaisons en configuration *trans* sont des molécules linéaires, contrairement aux caroténoïdes en configuration *cis* qui ne sont pas linéaires, ce qui affecte leur positionnement dans les structures cellulaires (Van den Berg *et al.*, 2000).

Du fait de la présence de doubles liaisons, les caroténoïdes contiennent un système réactif riche en électrons qui est susceptible de réagir avec des composés électrophiles. En présence d'oxygène, les caroténoïdes ont tendance à s'auto-oxyder. La réaction des caroténoïdes avec des agents oxydants ou des radicaux libres dépend de la longueur de la chaîne carbonée polyinsaturée et de la nature du groupement terminal (groupement hydroxyle, cycle  $\beta$ , cycle  $\epsilon$ ,...) (Van den Berg *et al.*, 2000).

### II.1.4. Intérêt des caroténoïdes

De nombreuses études ont mis en relation la consommation régulière d'aliments riches en caroténoïdes et la réduction du risque de développement d'un certain nombre de maladies. On a évoqué, comme mécanismes pouvant être à l'origine de cet effet préventif, l'activité antioxydante des caroténoïdes (Chai *et al.*, 2011). Leur structure permet de piéger les espèces réactives de l'oxygène protégeant ainsi la cellule (Bast *et al.*, 1998; Armstrong, 1999).

Un apport adéquat en caroténoïdes améliore le réseau antioxydant de l'organisme, ce qui pourrait ainsi empêcher le développement de maladies favorisées par les dommages oxydatifs causés aux composants cellulaires. Ces micronutriments étant liposolubles, ils exercent

principalement leur activité de protection contre une oxydation excessive dans les membranes cellulaires et les lipoprotéines, où ils peuvent contribuer à prévenir la dégénérescence cellulaire et donc le développement des cancers ainsi que l'athérosclérose, à l'origine de maladies cardiovasculaires (Mata-Gomez et al., 2014).

## II.2. L'astaxanthine

### II.2.1. Structure chimique et propriétés biologiques de l'astaxanthine

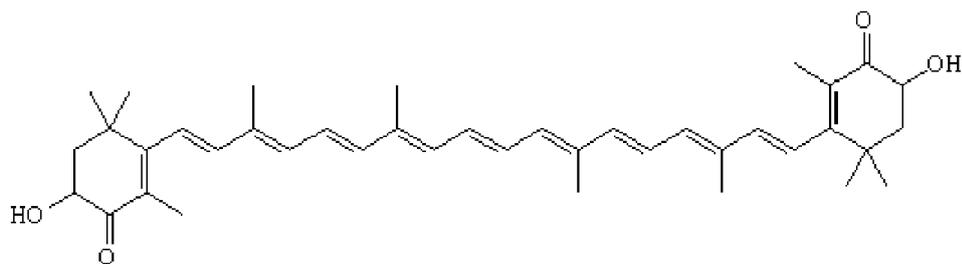
#### II.2.1.1. Structure chimique de l'astaxanthine

L'astaxanthine est un caroténoïde secondaire de la famille des xanthophylles qui tient son nom de celui de l'écrevisse dénommée en latin *Astacus astacus*. C'est un pigment liposoluble de couleur rouge brillante. On le retrouve dans les algues microscopiques, les champignons, les crustacés, les flamants roses et certains poissons (saumon, daurade rose) (Grung et al., 1992; Shah et al., 2016).

L'astaxanthine est un dérivé oxygéné des caroténoïdes. Sa formule chimique est  $C_{40}H_{52}O_4$  (3,3' dihydroxy- $\beta$ ,  $\beta$ -carotène-4, 4' dione) avec une masse molaire de 596,9 et un point de fusion à 224°C. L'astaxanthine est soluble dans la plupart des solvants organiques à des concentrations variables de 0,2 à 30 g.L<sup>-1</sup>. L'astaxanthine se trouve liée à des acides gras ou à des protéines (Ranga Rao et al., 2014).

Cette xanthophylle a des propriétés biologiques intéressantes grâce à son puissant pouvoir antioxydant. Elle a un large éventail d'applications en alimentation humaine et animale, en cosmétologie, en aquaculture, en nutraceutique et en pharmaceutiques en raison de sa forte capacité de piégeage des radicaux libres (Kidd, 2011; Yuan et al., 2011 ; Guerin et al., 2013; Shah et al., 2016). En 2010, la U.S. FDA a attribué le statut GRAS « generally recognized as safe » à l'astaxanthine extraite des cellules de *H. pluvialis* (Yang et al., 2013).

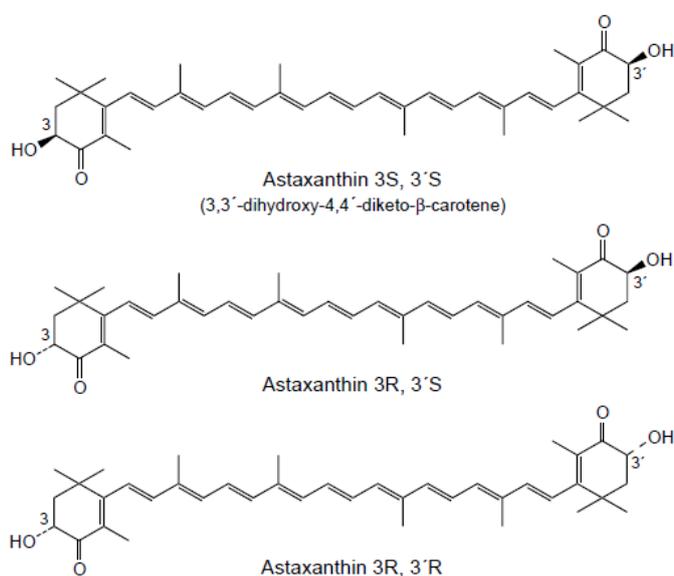
La structure chimique de l'astaxanthine est similaire à celle du  $\beta$ -carotène, et les autres xanthophylles. L'astaxanthine est composée de deux cycles ionones terminaux liés par une chaîne hydrocarbonnée polyénique comportant plusieurs doubles liaisons conjuguées et qui constitue le chromophore de la molécule (Higuera-Ciapara et al., 2006 ; Ranga Rao et al., 2014). Toutefois cette molécule se distingue des autres caroténoïdes par la présence de fonctions hydroxyles et cétones liés aux deux cycles terminaux (fig.4) (Pashkow et al., 2008).



**Figure 4 :** Structure chimique de la molécule d'astaxanthine (Lorenz, 1999).

L'astaxanthine à l'état libre est sensible à l'oxydation. A l'état naturel, elle se retrouve associée à des protéines (chez les crustacés et le saumon), ou estérifiée à un (astaxanthine monoester) ou deux (astaxanthine diester) acides gras. Chez *H. pluvialis*, la forme estérifiée est prédominante (Guerin *et al.*, 2003).

Selon la configuration des groupements hydroxyles (OH) sur les carbones asymétriques 3 et 3' des cycles terminaux de la molécule, il existe trois stéréoisomères de l'astaxanthine, les isomères « 3S, 3'S » et « 3R, 3'R » sont les plus abondants dans la nature (fig.5).



**Figure 5 :** Stéréoisomères de l'astaxanthine (Guerin *et al.*, 2003).

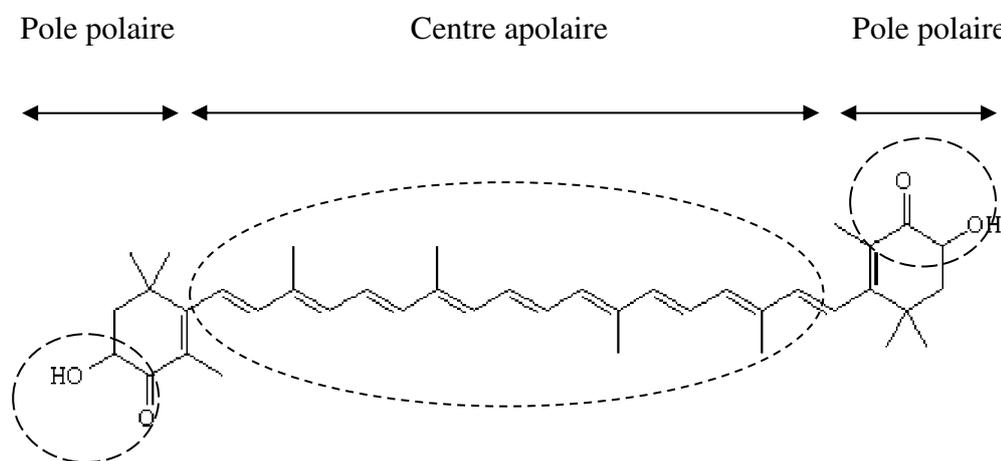
*H. pluvialis* synthétise l'isomère « 3S, 3'S » qui est le plus intéressant cependant, la levure *xanthophyllomyces dendrorhous* produit l'isomère « 3R, 3'R ». L'astaxanthine de synthèse est composée des trois isomères « 3S, 3'S », « 3S, 3'R » et « 3R, 3'R » dans un rapport 1/2/1 (Ranga Rao *et al.*, 2014).

## II.2.1.2. Propriétés biologiques de l'astaxanthine

### II.2.1.2.1. Activité antioxydante de l'astaxanthine

L'activité antioxydante de l'astaxanthine a été démontrée par plusieurs études, elle est plus importante que celle de la vitamine E et les autres caroténoïdes. En effet, cette molécule neutralise les radicaux libres 500 fois plus que la vitamine E et 38 fois plus que le  $\beta$ -carotène (Sarada *et al.*, 2006; Kang et Sim, 2008). Le pouvoir antioxydant de cette molécule est estimé avoir un rôle important dans les autres propriétés biologiques de la molécule, tels que son rôle préventif de l'inflammation, de la photooxydation, de l'infection à *Helicobacter pylorii* et du vieillissement, l'amélioration de la réponse immunitaire et la protection du cœur, du foie et de l'œil contre les maladies (Guerin *et al.*, 2003).

La structure chimique de cette molécule comportant des fonctions hydroxyles (-OH) et cétoniques (-C=O) et une chaîne hydrocarbonée comportant plusieurs doubles liaisons conjuguées (fig.6) explique son fort pouvoir antioxydant. Cette structure moléculaire permet à la molécule de neutraliser les radicaux libres ou les autres oxydants en acceptant ou en donnant des électrons, le tout sans être détruite ou devenir pro-oxydante (Guerin *et al.*, 2003; Kidd, 2011; Yang *et al.*, 2013; Ranga Rao *et al.*, 2014).

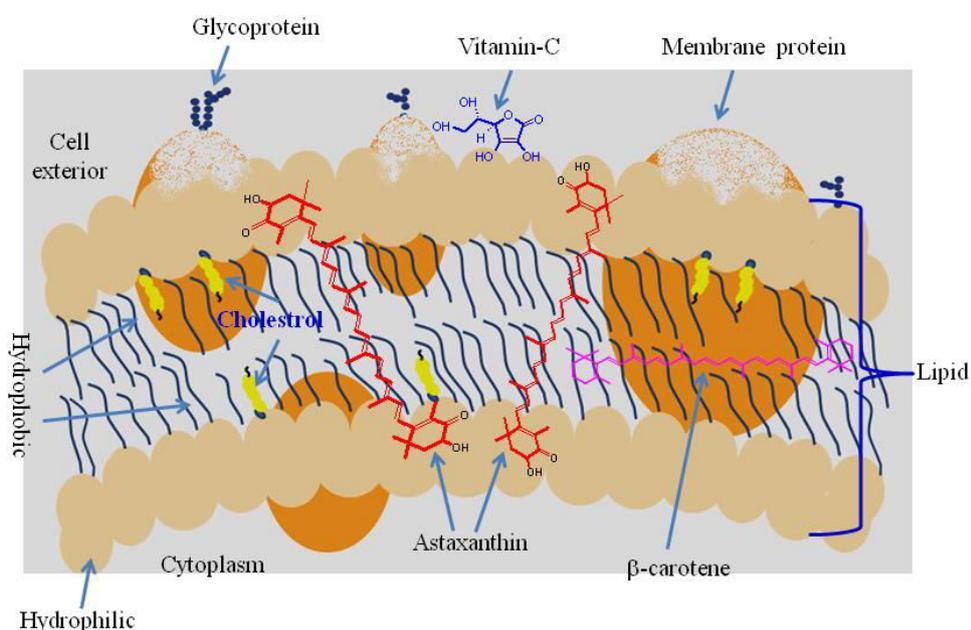


**Figure 6:** Schéma montrant les sites responsables du pouvoir antioxydant de l'astaxanthine, les parties polaires et la partie apolaire de la molécule (Yang *et al.*, 2013).

À la différence des antioxydants lipophiles (exemple de  $\beta$ -carotène) ou hydrophiles (exemple de la vitamine C), la structure moléculaire linéaire de l'astaxanthine composée de deux parties polaires hydrophiles encadrant une partie apolaire hydrophobe lui permet de

s'insérer précisément dans la membrane en la traversant de part en part. Dans cette position l'astaxanthine peut intercepter les espèces moléculaires réactives aussi bien au sein de la partie lipophile de la bicouche lipidique que le long de sa surface hydrophile (Kidd, 2011; Ranga Rao *et al.*, 2014).

Les extrémités polaires de la molécule surplombent la surface hydrophile de la membrane plasmique, tandis que la chaîne centrale apolaire s'insère dans la partie lipidique de la bicouche (Kidd, 2011). Ce caractère amphiphile permet d'après Lim *et al.* (1992) de protéger les phospholipides membranaires de la peroxydation plus que le  $\beta$ -carotène, la zeaxanthine ou la canthaxanthine (fig.7).



**Figure 7:** Position de la molécule d'astaxanthine au sein de la membrane cytoplasmique des cellules (Ranga Rao *et al.*, 2014).

L'astaxanthine a montré des effets bénéfiques divers avec une excellente tolérance ainsi qu'une grande sécurité d'utilisation. Son innocuité a été déterminée par plusieurs travaux sur des modèles animaux et des essais sur l'homme (Spiller et Dewell, 2004). Les doses d'astaxanthine utilisées dans les diverses études varient de 1 à 40mg par jour avec une majorité de 6 à 12mg par jour.

### II.2.1.2.2. Activité anti- inflammatoire de l'astaxanthine

Plusieurs études ont démontré l'efficacité de l'astaxanthine dans tous les types d'inflammation (Guerin *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Kuedo *et al.*, 2016). Kurashing *et al.*, (1990) ont montré que l'astaxanthine diminue chez le rat une enflure induite.

L'effet anti-inflammatoire de l'astaxanthine a été démontré *in vivo* chez des souris BALB/C qui ont été traitées par 40mg d'astaxanthine /kg de poids vif, 12h avant une injection intrapéritonéale de lipopolysaccharides (Lee *et al.*, 2003).

Un prétraitement à l'astaxanthine diminue les concentrations sériques monoxyde d'azote (NO), prostaglandines E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), Tumor Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ ) et interleukine IL-1 $\beta$  chez des rats souffrant d'une inflammation oculaire qui a été induite par une injection de LPS (Yang *et al.*, 2013). Dans le même sillage, Suzuki *et al.* (2006) avaient auparavant observé qu'une injection intraveineuse de 10 ou 100 mg d'astaxanthine /kg poids vif provoquait une diminution significative du nombre de cellules infiltrant la chambre antérieure, ainsi que la quantité de NO, TNF $\alpha$  et PGE dans le sang.

La bactérie *Helicobacter pylori* génère chez l'homme un état d'inflammation gastrique, qui peut évoluer à une gastrite chronique de type B, une ulcère gastro-duodéal, ou à un carcinome gastrique (Ruggiero, 2010), l'astaxanthine aide à combattre les symptômes de la maladie ulcéreuse liée à *Helicobacter pylori*. Elle réduit les symptômes de l'inflammation gastrique et est également associée à une modification de la réponse à l'inflammation (Bennedsen *et al.*, 1999). En effet, un traitement à l'astaxanthine des souris BALB/cA à une dose journalière de 10, 50 ou 100 mg / kg pendant 10 jours, préalablement inoculés par *Helicobacter pylori* par voie orale réduit de manière significative le nombre de ce microorganisme dans le tissu gastrique et prévient d'inflammation gastrique (Wang *et al.*, 2000). En outre, l'astaxanthine diminue significativement l'apparition des ulcères de la muqueuse colique, des cryptes dysplasique et adénocarcinome colique (Yasui *et al.*, 2011).

### II.2.1.2.3. Astaxanthine et maladies cardiovasculaires

Plusieurs études sur des modèles animaux et humains ont rapporté que l'astaxanthine peut réduire le risque de maladies cardiovasculaires (Yoshida *et al.*, 2010 ; Visioli *et Artaria*, 2017). Yang *et al.* (2011) ont observé chez des souris apoE (modèle d'étude de l'athérosclérose) ayant reçu un régime hyperlipidique, riche en cholestérol et additionné de

0.03 % d'astaxanthine pendant 4 semaines, des baisses importantes dans les taux plasmatiques de cholestérol total et de triglycérides par rapport au groupe témoin.

L'administration orale d'astaxanthine à des souris assure une augmentation des niveaux sanguins de cholestérol-HDL, la forme de cholestérol sanguin inversement associée aux maladies cardio-vasculaires. L'astaxanthine pourrait ainsi exercer une action bénéfique sur la santé du cœur en modifiant les niveaux de cholestérol LDL et HDL mais, également, en réduisant l'inflammation supposée être associée au développement des maladies cardio-coronariennes (Guérin *et al.*, 2003).

Yoshida *et al.* (2010) ont démontré qu'une consommation d'astaxanthine est associée à une diminution des taux de triglycérides plasmatiques et à une augmentation des taux de cholestérol HDL et d'adiponectine.

Li *et al.* (2004a) ont observé chez des lapins Watanabe atteints d'hyperlipidémie héréditaire traités par 100 mg d'astaxanthine /kg poids vif pendant 24 semaines, une diminution significative de l'infiltration des macrophages dans les plaques d'athérosclérose ; ce qui assure une meilleure stabilité des plaques.

#### **II.2.1.2.4. Astaxanthine et cancer**

Plusieurs études ont montré, chez des mammifères, le rôle de l'astaxanthine dans la prévention des cancers. Ainsi, l'une d'entre elles a mis en évidence, chez des souris, un effet protecteur de l'astaxanthine contre la carcinogenèse de la vessie (Guerin *et al.*, 2003).

Tanaka *et al.* (1994) ont nourri deux groupes de souris (respectivement 36 et 33 animaux) avec un carcinogène pendant 22 semaines. Ce carcinogène a ensuite été éliminé de l'alimentation des animaux. Après une semaine d'intervalle, le second groupe de souris a reçu dans son alimentation de l'astaxanthine pendant vingt semaines. L'examen histologique a permis de constater une incidence de 42 % des carcinomes de la vessie dans le groupe non supplémenté et de seulement 18 % dans celui ayant reçu de l'astaxanthine.

En outre, une diminution significative de l'incidence du cancer du côlon a été observée chez les souris qui ont reçu le carcinogène et l'astaxanthine par rapport à ceux recevant le carcinogène.

Dans une autre étude, des chercheurs ont montré chez des rats que l'astaxanthine pouvait prévenir la carcinogenèse buccale. Ils ont donné à deux groupes d'animaux un carcinogène connu, l'un d'eux recevant en plus du carcinogène de l'astaxanthine. Ils ont constaté une plus faible incidence de différents types de croissances cancéreuses dans la gueule des rats ayant pris de l'astaxanthine que dans celle de ceux n'ayant reçu que le carcinogène. Les chercheurs en ont conclu que l'astaxanthine offrait une protection efficace contre le cancer buccal (Tanaka *et al.*, 1995).

#### **II.2.1.2.5. Astaxanthine et maladies rétiniennes**

De nombreuses données indiquent que certains caroténoïdes peuvent participer à la protection de la rétine contre les dommages oxydatifs. Une étude réalisée par Tso et Lam (1996) sur des rats a montré que l'astaxanthine atténue efficacement les lésions rétiniennes tout en protégeant les photorécepteurs des rayons ultra-violet et de la dégénérescence.

Une autre étude (Parisi *et al.*, 2008) a montré que l'astaxanthine pourrait être bénéfique dans la prévention et le traitement des lésions neuronales associées à la dégénérescence musculaire liée à l'âge.

#### **II.2.2.1.6. Astaxanthine et diabète**

Plusieurs études (Johansen *et al.*, 2005; Ranga Rao *et al.*, 2014) ont démontré la relation entre le stress oxydatif, l'hyperglycémie et l'insulinorésistance. La consommation d'antioxydants, et en particulier l'astaxanthine, peut réduire le stress oxydatif et par conséquent améliorer les concentrations plasmatiques d'insuline et de glucose. Il a été aussi démontré que l'astaxanthine peut protéger les cellules  $\beta$ -pancréatiques contre la toxicité par le glucose.

L'effet antidiabétique de l'astaxanthine a été démontré par Uchiyama *et al.* (2002) sur des souris db/db (un modèle de souris connu par le diabète de type 2) qui ont reçu dans leur régime des doses journalières de 1 d'astaxanthine /Kg poids vif par jour d'astaxanthine pendant 12 semaines et chez lesquelles la glycémie a diminué et la tolérance au glucose a été améliorée.

Par ailleurs, une amélioration de l'insulinosensibilité a été observée chez des rats hypertendus et des souris obèses nourries d'un régime additionné d'astaxanthine (Ranga Rao *et*

*al.*, 2014). Dans la même optique, [Marin et al. \(2011\)](#) ont montré chez des rats diabétiques qu'une supplémentation alimentaire de 20 mg d'astaxanthine /kg poids vif pendant 30 jours prévient la peroxydation des lipides et des groupements carbonyles des protéines, des indicateurs de dommages oxydatifs des biomolécules.

#### II.2.1.2.7. Astaxanthine et système immunitaire

Des essais *In Vitro* et *In Vivo* sur des modèles animaux ont montré que l'astaxanthine influence significativement la fonction immunitaire. Chez des souris âgées, l'astaxanthine peut partiellement restaurer la réponse immunitaire humorale diminuée. Des études réalisées sur des cellules de sang humain ont démontré que l'astaxanthine stimule la production d'immunoglobuline en réponse à des stimuli dépendant des cellules T. Ce caroténoïde stimule également, la production d'anticorps par les cellules de la rate de souris ([Jyonuchi et al., 1991](#); [Jyonuchi et al., 1994](#)).

Une étude réalisée par [Park et al. \(2010\)](#) sur un groupe de personnes qui ont reçu de l'astaxanthine dans leur régime alimentaire pendant huit semaines, a démontré le rôle de ce caroténoïde sur l'amélioration de l'activité des cellules NK. Ainsi, le nombre des cellules T et B était élevé et les lésions de l'ADN étaient moins importantes.

D'autres activités biologiques de l'astaxanthine ont été démontrées dans plusieurs études, les plus importantes sont rapportées dans le [tableau 2](#).

**Tableau 2 :** Quelques activités biologiques de l'astaxanthine

Activité biologique	Références
Protection contre les rayons UV	<a href="#">Ranga Rao et al. (2014)</a>
Protection contre le cancer de la peau	<a href="#">Maoka et al. (2012)</a> ; <a href="#">Huangfu et al. (2013)</a>
Protection du système nerveux	<a href="#">Zhang et al. (2007)</a> ; <a href="#">Lu et al. (2010)</a> ; <a href="#">Galasso et al. (2018)</a> et <a href="#">Lin et al. (2020a)</a>
Hépatoprotection	<a href="#">Turkez et al. (2012)</a> .
Régulation de la tension artérielle	<a href="#">Spiller et al. (2003)</a> et <a href="#">Miyawaki et al. (2008)</a> .
Amélioration de la fertilité chez l'homme	<a href="#">Elgarem et al. (2002)</a> et <a href="#">Comhaire et al. (2005)</a> .

## II.2.2. Principales sources d'astaxanthine

Koller et al. (2014) rapportent que 95% de l'astaxanthine commercialisée dans les marchés mondiaux provient de la synthèse chimique. Toutefois, cette dernière ne possède pas les mêmes propriétés biologiques de l'astaxanthine naturelle. Aujourd'hui, on distingue trois sources principales de l'astaxanthine naturelle: les microalgues, les levures et les crustacés et les poissons.

### II.2.2.1. Les microalgues

Grâce à sa capacité d'accumulation de plus de 4% de son poids sec d'astaxanthine en réponse à des conditions de stress, la microalgue *Haematococcus pluvialis* constitue la source naturelle la plus importante d'astaxanthine commercialisée dans le monde (Lorenz, 1999; Ranga Rao, 2010). D'autres microalgues comme *Chlorella vulgaris* (Gouveia et al., 1996), *Chlorella zofingiensis*, *Neochloris wimmeri* (Ranga Rao, 2010) et *Chlorococcum sp.* (Zhang et Lee, 2001) semblent prometteuses.

### II.2.2.2. Les levures

La levure *Phaffia rhodozyma* est connue depuis des décennies pour sa capacité à produire de l'astaxanthine. Des études comparatives montrent l'efficacité de l'astaxanthine extraite de cette levure sur la pigmentation des saumons par rapport à celle de la méthode synthétique (Whyte et Sherry, 2001). Aujourd'hui, cette levure est vendue en poudre, et offre une concentration moyenne de 8 000 µg/g d'astaxanthine (Schmidt et al., 2010).

### II.2.2.3. Les crustacés et les poissons

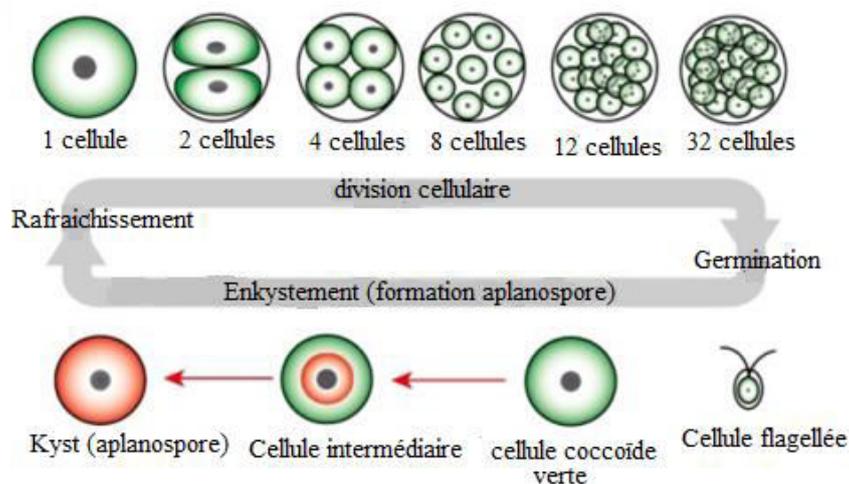
Plusieurs espèces de poissons et de crustacés, et notamment le saumon, la truite, le krill et les crevettes acquièrent l'astaxanthine en consommant le phytoplancton contenant ce caroténoïde dont l'accumulation dans leurs tissus leur procure une couleur rose rougeâtre caractéristique (Shah et al., 2016). En effet, des teneurs considérables (28 à 36 mg/kg) d'astaxanthine ont été extraites de la chair du saumon rouge sauvage par rapport à seulement 6-8 mg/kg extraite de la chair du saumon d'élevage (He et al., 2007; Ranga Rao et al., 2014).

## II.3. Caroténogénèse et production d'astaxanthine par *Haematococcus pluvialis*

### II.3.1. Réponse de *Haematococcus pluvialis* au stress environnemental

Lorsque la microalgue *Haematococcus pluvialis* est exposée à des conditions défavorables (appauvrissement du milieu en azote ou en phosphore, stress lumineux, variations de températures et de pH...) les cellules perdent leurs flagelles et leur forme ovale en faveur d'une forme ronde immobile de 20 à 40  $\mu\text{m}$  de diamètre (Grung et al., 1992 ; Vidhyavathi et al., 2008 ; Immamoglu et al., 2009; Chekanov et al., 2014).

L'accumulation des caroténoïdes secondaires commence au stade akinète après arrêt de croissance (Yong et Lee, 1991). Les inclusions cytoplasmiques chargées de pigments se situent d'abord autour du noyau puis augmentent en taille et en nombre et confèrent au cytoplasme une couleur rouge caractéristique (Nagaraj et al., 2012; Chekanov et al., 2014; Shah et al., 2016) (fig.8).



**Figure 8:** Etapes d'enkystement et de production d'astaxanthine par *Haematococcus pluvialis* après exposition à des conditions de stress (Shah et al., 2016).

Lorsqu'une de ces conditions de stress s'accroît, un enkystement de ce microorganisme est alors provoqué (Kakizono et al., 1992; Kobayashi et al., 1993). Il est caractérisé par une augmentation considérable de la taille des cellules qui atteint plus de 80  $\mu\text{m}$  de diamètre, avec la synthèse d'une paroi épaisse procurant une grande imperméabilité aux kystes. L'enkystement s'accompagne d'une importante accumulation de caroténoïdes secondaires et en particulier l'astaxanthine (Chekanov et al., 2014; Shah et al., 2016).

Kakizono *et al.* (1992) ont montré qu'une augmentation du rapport C/N déclenche l'enkystement associé à des changements intracellulaires avec une synthèse d'astaxanthine. Ces mêmes auteurs ont rapporté la formation de kystes dans des conditions hétérotrophes (à l'obscurité en présence d'acétate). Par ailleurs, l'addition d'acétate ou du fer au milieu de culture stimule l'accumulation d'astaxanthine chez des cellules vertes en phase de croissance exponentielle (Kobayashi *et al.*, 1993; Hong *et al.*, 2016).

Lorsqu'il y a retour aux conditions favorables, ces formes de résistance rouges donnent naissance, grâce à des mitoses successives à l'intérieur de cette épaisse paroi, à des cellules vertes ovales et biflagellées (4 à 32 cellules) avec une augmentation du rapport chlorophylles/caroténoïdes secondaires (Lee et Ding, 1994). Ce développement s'accompagne d'une diminution de l'épaisseur de la paroi qui devient plus perméable et par conséquent les cellules deviennent sensibles aux différents stress (Shah *et al.*, 2016).

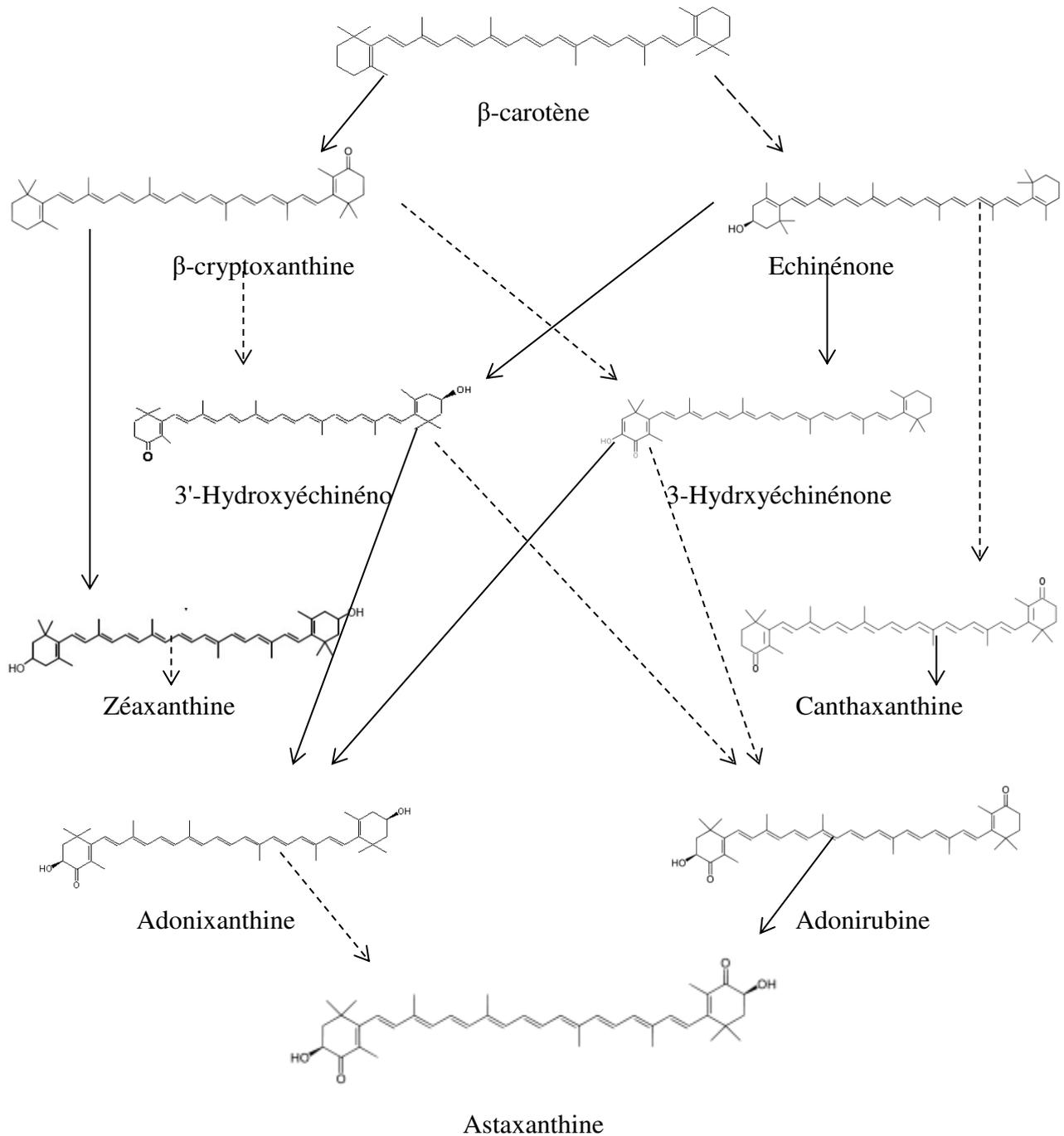
### II.3.2. Biosynthèse d'astaxanthine par *H. pluvialis*

Chez la microalgue *H. pluvialis*, l'accumulation d'astaxanthine peut atteindre plus de 5% (P/P) de la matière sèche ; ce qui représente 80 à 88% des caroténoïdes produits par cette chlorophycée. Cette microalgue synthétise une faible quantité d'astaxanthine libre (5%) mais surtout de l'astaxanthine mono (70%) et di-estérifiée (25%) à l'acide palmitique, oléique ou linoléique (Ranga Rao *et al.*, 2007; Kamath *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2016). Elle est à 99 % constitué de l'isomère « 3S, 3'S » et dans un rapport 3 :1 des deux formes géométriques *trans* et *cis*- (Ranga Rao *et al.*, 2014).

La biosynthèse d'astaxanthine par les kystes de *Haematococcus* dépend des enzymes photosensibles telles que les isomérases, les désaturases et les oxydoréductases activant la formation de géranyl-géranyl di-phosphate à partir d'un composé carboné intermédiaire du cycle de Calvin qui est transformé en  $\beta$ -carotène et enfin en astaxanthine comme produit final via l'échinénone, la canthaxanthine et l'adonirubine (Harker et Hirschberg, 1997; Rmiki, 1999).

Par ailleurs, Lotan et Hirschberg (1995) ont isolé un gène "crtO" à partir de *H. pluvialis* codant pour l'enzyme P-C-4-oxygénase qui converti le  $\beta$ -carotène en canthaxanthine par oxydation au niveau des carbones C<sub>4</sub> et C'<sub>4</sub>. Un autre gène "crtZ" codant pour une  $\beta$ -carotène hydroxylase qui converti le  $\beta$ -carotène en zéaxanthine en introduisant des groupes hydroxyl au niveau des carbones C<sub>3</sub> et C'<sub>3</sub> peut aussi intervenir dans la synthèse d'astaxanthine.

Toutefois il n'a pas été déterminé dans quel ordre ces enzymes agissent (Rmiki, 1999; Shah et al., 2016) (fig.9).



**Figure 9:** Voies intermédiaires de biosynthèse de l'astaxanthine par *Haematococcus pluvialis* (Harker et Hirschberg, 1997 et Fraser et al., 1998).

—————> : Réaction d'hydroxylation,      - - - - -> : Réaction de cétonisation

Les travaux de [Harker et Young \(1995\)](#), suggèrent l'existence de deux voies de synthèse d'astaxanthine à partir du  $\beta$ -carotène. L'une aurait comme produits intermédiaires respectivement : l'échinénone, la canthaxanthine et l'adonirubine, alors que la deuxième voie passerait par la  $\beta$ -cryptoxanthine puis la zéaxanthine et l'adonixanthine.

Ces deux voies de synthèse aboutissent à l'astaxanthine qui sera estérifiée par la suite ([Rmiki, 1999](#)). Les travaux de [Harker et Hirschberg \(1997\)](#) confirment l'existence de ces deux voies tout en suggérant l'existence de deux autres intermédiaires: 3'-hydroxyéchinénone et 3-hydroxyéchinénone qui pourraient provenir chacun à la fois de l'échinénone ou de la cryptoxanthine pour aboutir soit à l'adonirubine ou à l'adonixanthine.

[Fraser et al. \(1998\)](#) confirment l'existence de différents intermédiaires de synthèse d'astaxanthine et la possibilité de différentes voies.

### **II.3.3. Extraction d'astaxanthine à partir des Kystes de *H. pluvialis***

L'enkystement des cellules *Haematococcus pluvialis* lors de son exposition à des conditions de stress est accompagné par la formation d'une paroi épaisse, imperméable et très résistante à l'hydrolyse ([Nagaraj et al., 2002](#)). Elle est composée de 70% d'hydrates de carbone, dont 66% d'hexoses, 3% de cellulose et 3% de protéines ([Sarada et al., 2006](#)).

Plusieurs méthodes ont été développées pour la destruction de la paroi des kystes de *Haematococcus pluvialis* ([Sarada et al., 2006](#); [Ranga Rao et al., 2014](#); [Shah et al., 2016](#)).

Le procédé mécanique est le plus utilisé, il consiste en une centrifugation à une grande vitesse d'une culture de *H. pluvialis* en présence de microbilles en verre ([Shah et al., 2016](#)).

Les méthodes chimiques sont aussi utilisées, L'extraction à l'acide chlorhydrique permet une récupération de plus de 80% des caroténoïdes intracellulaires ([Sarada et al., 2006](#)). Lorsque les kystes sont traités à l'acétone (40% : V/V) à 80°C pendant deux minutes puis d'une hydrolyse enzymatique à la kitalase, une récupération de 70% des caroténoïdes est obtenue ([Kobayashi et al., 1997](#)).

[Kang et Sim \(2008\)](#), ont développé une méthode d'extraction basée sur l'utilisation des huiles végétales (de soja, de maïs, d'olive et huile de pépins de raisin) à cause du caractère

lipophile de ce caroténoïde. L'extraction à l'huile d'olive permet la récupération de 93% de l'astaxanthine intracellulaire.

### **II.3.4. Conservation et stabilité de l'astaxanthine**

[Ranga Rao et al. \(2007\)](#) ont démontré que plus de 90% de la stabilité de l'astaxanthine de *Heamatococcus* est préservée quand elle est conservée dans le son de riz, l'huile de palme ou l'huile de sésame entre 70 et 90°C, et elle est réduite entre 120 et 150°C.

[Anarjan et Tan \(2013\)](#) ont rapporté que l'astaxanthine nanodispersée dans le lait écrémé se dégradait plus que celle dans le jus d'orange.

[Raposo et al. \(2012\)](#) ont étudié la stabilité de l'astaxanthine séchée et conservée dans diverses conditions pendant neuf semaines. Ces auteurs ont constaté une intégrité supérieure à 90 % de l'astaxanthine séchée à 110°C et conservée à -21°C dans l'azote. Par ailleurs, la stabilité de l'astaxanthine conservée dans un mélange d'hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine et d'eau est améliorée à 4°C et à 25°C ([Yuan et al., 2013](#)).

[Lin et al. \(2016\)](#) ont démontré que l'encapsulation de l'astaxanthine dans des billes d'alginate de calcium améliore sa stabilité à 90 % après 21 jours de conservation à 25°C.

## Chapitre III : Matériels et Méthodes

### III.1. Matériel biologique

#### III.1.1. Echantillons d'algues d'eaux douces

Quarante-huit échantillons d'eaux douces (eau pluviale conservée dans des récipients en polyéthylène et eau de surface stagnante) ont été récoltés de six différentes régions en Algérie (Chlef : 36°9'54.90"N et 1°20'4.27"E, Ain Defla : 36°15'50.58"N et 1°58'4.44"E, Relizane : 35°44'59.99"N et 0°33'59.99"E, Oran : 35°41'28"N et 0°38.30.01"E et Mostaganem : 35°56'52.14"N et 0°5'21.05"E) pendant les périodes Février-Avril 2015 et Janvier-Avril 2016. Ces échantillons sont transférés au laboratoire dans des flacons en polypropylène.

La sélection des sites d'échantillonnage a été faite après reconnaissance visuelle permettant le recueil d'indices de présence de microalgues dans l'eau comme la couleur de l'eau, la présence ou non de dépôts, l'agglomérat de couleur en suspension ou en surface ou toute autre observation pertinente.

Chaque flacon est muni d'une étiquette sur laquelle sont notées la date, la région et la nature de l'eau. Les échantillons sont ensuite conservés à 4°C jusqu'au moment d'isolement de la microalgue d'intérêt.

#### III.1.2. Matériel animal

Notre expérimentation a été réalisée sur des souris mâles du genre *Mus Musculus* âgées de 6 à 7 semaines et pesant 25 à 30g. Elles nous ont été fournies par l'institut Pasteur d'Alger. Elles ont été placées dans des cages en plastique standardisées à une température de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  et une humidité relative de  $55 \pm 10\%$  sous une photopériode de 12h/24h ; elles ont été nourries ad libitum avec un aliment standard (aliment pour animaux, Bouzareah, Alger) et ont reçu de l'eau de robinet à volonté. Les cages sont nettoyées quotidiennement et les biberons changés tous les jours jusqu'à la fin de l'expérimentation. Les souris ont été gardées dans ces conditions pendant une période d'adaptation de 10 jours avant le début de l'expérimentation. Les souris ont été réparties en lots de 5 souris chacun ( $n=5$ ). L'éthique générale d'utilisation des animaux de laboratoires a été respectée (ECRA/AIBUM).

## III.2. Culture des algues

### III.2.1. Composition du milieu de culture

Pour l'isolement, la culture et la conservation de la microalgue *H. pluvialis*, le milieu BBM (Bold's Basal Medium) ordinaire destiné à la culture des algues d'eaux douces a été utilisé, dont la composition chimique est reportée au [tableau 3](#) (Bischoff et Bold, 1963).

La préparation du milieu ordinaire consiste à utiliser une série de solutions mères concentrées de microéléments (SL<sub>1</sub> à SL<sub>10</sub>). Ces solutions sont ajoutées extemporanément dans un Erlenmeyer de 1000mL, le volume de la solution obtenue est complété à 1000 mL avec de l'eau distillée.

La gélose BBM est ainsi obtenue par ajout de 2% d'agar-agar au bouillon BBM. Tous les milieux préparés (bouillons ou géloses) sont ajustés à un pH de 6.8 et répartis dans des flacons de 250 mL. La solution de vitamines stérilisée par filtration (porosité 0.22µm) est additionnée après autoclavage des milieux à 121°C/15min.

### III.2.2. Source de carbone

Les algues sont des autotrophes et utilisent le CO<sub>2</sub> comme source de carbone. Dans cette expérience, le CO<sub>2</sub> est apporté au milieu grâce à un dispositif fournissant un mélange spécifique de carbonate de potassium (KHCO<sub>3</sub>) et de bicarbonate de potassium (K<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>).

Ce dispositif comprend deux fioles Erlenmeyers de 250 mL montées en deux compartiments superposés reliés par un circuit stérile et fermés hermétiquement par du coton cardé et de papier para-film (Tripathi et al., 2001).

Le compartiment supérieur contient la culture algale; alors que celui en dessous contient 100 mL d'une solution à 2 M d'un mélange de KHCO<sub>3</sub>/K<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> (78V/22V). Ce système génère une pression partielle de 1.5% de CO<sub>2</sub> dans le compartiment supérieur (Tripathi et al., 2001).

**Tableau 3:** Composition chimique du milieu BBM (Bold's Basal medium) (Bischoff et Bold, 1963).

<b>Solution</b>	<b>Volume</b>	<b>Composant</b>	<b>Concentration en % (P/V)</b>	<b>Concentration finale (Moles)</b>
SL <sub>1</sub>	10 mL	NaNO <sub>3</sub>	2.5	2.94.10 <sup>-3</sup>
SL <sub>2</sub>	10 mL	MgSO <sub>4</sub>	0.75	3.04.10 <sup>-4</sup>
SL <sub>3</sub>	10 mL	NaCl	0.25	4.28.10 <sup>-4</sup>
SL <sub>4</sub>	10 mL	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.75	4.31.10 <sup>-4</sup>
SL <sub>5</sub>	10 mL	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.75	1.29.10 <sup>-3</sup>
SL <sub>6</sub>	10 mL	CaLi <sub>2</sub>	0.25	1.70.10 <sup>-4</sup>
SL <sub>7</sub>	1 mL	MgSO <sub>4</sub>	0.882	3.07.10 <sup>-6</sup>
		MnCl <sub>2</sub>	0.144	7.28.10 <sup>-6</sup>
		MoO <sub>3</sub>	0,071	4.93.10 <sup>-6</sup>
		CuSO <sub>4</sub>	0.157	6.29.10 <sup>-6</sup>
		Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,049	168.10 <sup>-6</sup>
SL <sub>8</sub>	1mL	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.14	1.85.10 <sup>-4</sup>
SL <sub>9</sub>	1 mL	EDTA-Na <sub>2</sub>	5	1.71.10 <sup>-4</sup>
		KOH	3.1	5.53.10 <sup>-4</sup>
		FeSO <sub>4</sub>	4.98	1.79.10 <sup>-4</sup>
SL <sub>10</sub>	1 mL	Vitamine B <sub>1</sub>	0.1	
		Vitamine B <sub>12</sub>	0.015.10 <sup>-3</sup>	

### III.2.3. Conditions de culture

Dans la présente expérimentation, la culture de cette algue a été réalisée à la température de  $25\pm 2^\circ\text{C}$ . La culture de *H. pluvialis* a été exposée à une intensité lumineuse de l'ordre de  $40\ \mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$  fournie par une série de tubes fluorescents disposés verticalement (white fluorescent standard lamp de 40 watt). Toutes les cultures sont agitées manuellement deux à trois fois par jour pour éviter la décantation des cellules algales.

### III.3. Méthodes d'isolement, purification, identification et de conservation de *H. pluvialis*.

#### III.3.1. Isolement

L'isolement de la microalgue a été réalisé selon la méthode décrite par [Kavitha et al. \(2015\)](#). Les échantillons d'eaux douces collectés contiennent une flore microbienne variée dont de multiples représentants gênent l'isolement de l'algue d'intérêt ; de ce fait on a procédé avant isolement à son enrichissement en bouillon BBM selon la méthode de [Anitha et Narayann \(2012\)](#) décrite ci-après.

10 mL d'eau douce sont transférés dans des fioles Erlenmeyer de 500 mL contenant 200 mL de bouillon BBM dans le but de favoriser le développement de la microalgue d'intérêt au dépend des autres microorganismes. Les milieuxensemencés sont ensuite incubés à température ambiante ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ) à une intensité lumineuse de  $40\ \mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$ . La même opération est réalisée pour l'ensemble des échantillons d'eaux douces collectés.

L'opération ensemencement consiste à inoculer  $100\ \mu\text{L}$  de chaque échantillon de *H. pluvialis* en surface dans des boites de gélose BBM qui sont ensuite incubées dans les conditions précédentes pendant plusieurs jours jusqu'à l'apparition de colonies vertes. La prolifération des algues n'étant pas rapide, la lecture se fait après environ dix à quatorze jours d'incubation ([Abou-Shanab et al., 2011](#); [Kavitha et al., 2015](#)).

#### III.2.1.2. Purification

Les cultures de microalgues obtenues sont purifiées et rendues unialgales par des repiquages successifs sur bouillon et gélose BBM. Les colonies distinctes sont transférées séparément sur 10 mL de bouillon BBM dans des tubes stériles et incubées, puis repiquées sur gélose BBM et incubées dans les mêmes conditions que précédemment. L'opération est

répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention de cultures pures. La pureté des algues est confirmée par des observations morphologiques au microscope (Abou-Shanab *et al.*, 2011).

### III.2.1.3. Identification

L'identification des microalgues est essentiellement basée sur l'étude morphologique des cellules (Santhose *et al.*, 2012 ; Kavitha *et al.*, 2015), qui consiste à effectuer un examen macroscopique des colonies à l'aide d'une loupe binoculaire et microscopique (objectifs 10x10 et 40x10) des cellules algales à l'état frais pour en déterminer la forme, la taille et la couleur.

### III.2.1.4. Conservation

La conservation des souches de *H. pluvialis* isolées est effectuée pour un mois sur bouillon BBM à 4°C et nécessite le renouvellement mensuel d'un repiquage, et pour une longue durée sur gélose BBM inclinée.

La culture de *H. pluvialis* sur gélose inclinée destinée à conserver l'algue à longue durée (4 à 6 mois) a été réalisée sur milieu BBM additionné de 1.5% (P/V) d'Agar-Agar. Ce mélange stérilisé est réparti, en surfusion, dans des tubes à essai de façon inclinée. Sur ce milieu solide ont été inoculées des suspensions algales ou des colonies prélevées sur un autre milieu solide et incubées pendant 7 jours dans les conditions précédentes et conservées à 4°C pendant 4 à 6 mois.

## III.4. Protocole d'étude de l'effet de la concentration en nitrate de sodium sur la cinétique de croissance de *H. pluvialis*

L'étude de l'effet de la teneur du milieu de culture en nitrate de sodium sur la vitesse d'accumulation de la biomasse de *H. pluvialis* dans les conditions de culture optimales (à  $25\pm 2^\circ\text{C}$  et sous une luminosité de  $40 \mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$ ) a été réalisée selon le protocole de Oroza *et al.* (2005).

En plus du milieu BBM ordinaire contenant 0.25g/L de nitrate de sodium ( $\text{NaNO}_3^-$ ), quatre autres milieux BBM modifiés à différentes concentrations finales en  $\text{NaNO}_3^-$  (0, 0.15, 0.50 et 0.75g/L) ont été préparés.

Les cultures sont réalisées dans des Erlenmeyers de 250mL contenant chacun 100mL de bouillon BBM modifié qui seront inoculés par les formes végétatives de l'isolat à raison de  $10^2$  cellules/mL. Ces cultures sont incubées dans les conditions optimales de croissance de la microalgue (température de  $25 \pm 2$  °C et une intensité lumineuse de 40  $\mu$ Moles photons/m<sup>2</sup>/s) pendant une période de 10 jours durant laquelle est suivie la cinétique de croissance de la microalgue dont le dénombrement est effectué sur un aliquot de 100 $\mu$ L grâce à un hématimètre.

Les prélèvements se font à l'aide d'une micropipette stérile (100  $\mu$ L) plongée depuis le haut jusqu'au cœur de l'Erlenmeyer après agitation manuelle des flacons et sous contrôle d'une flamme pour éviter toute contamination microbienne.

La vitesse spécifique de croissance ( $\mu$ ) de l'isolat est calculée selon l'équation suivante : (Bulter *et al.*, 2018).

$$\mu \text{ max}/\Delta t = \ln X_2 - \ln X_1 / t_2 - t_1$$

Où  $\ln X_1$  et  $\ln X_2$  représentent les logarithmes népériens des quantités de biomasse accumulées aux temps  $t_1$  et  $t_2$ , respectivement.

### **III.5. Expérience d'évaluation de l'influence de la carence nutritionnelle ou de la salinité associées à un stress lumineux sur la production d'astaxanthine par *H. pluvialis***

L'influence du stress lumineux en association avec la carence du milieu de culture en éléments minéraux (Azote et/ou Phosphore) ou avec la salinité sur la capacité *Haematococcus pluvialis* à synthétiser l'astaxanthine durant une période de 14 jours a été étudiée.

#### **III.5.1. Préparation de l'inoculum**

L'inoculum de la microalgue est préparé selon le protocole décrit par Hong *et al.* (2015) par propagation de quelques colonies de *Haematococcus pluvialis* dans le bouillon BBM et la culture est incubée dans les conditions optimales de croissance de la microalgue.

Le culot de cellules algales récupéré par centrifugation à 3500 tours/min pendant 5 min d'une culture en phase exponentielle sert à ensemercer les milieux de stress à une concentration finale de de  $10^5$  cellules/mL.

### III.5.2. Procédure d'évaluation de l'influence de la carence en azote et/ou en phosphore associée à un stress lumineux sur la production d'astaxanthine par *H. pluvialis*

L'influence de la carence du milieu de culture en deux éléments essentiels (l'azote et le phosphore) sur la production d'astaxanthine par *H. pluvialis* a été étudiée. Trois milieux de culture BBM modifiés sont préparés. Le premier milieu est sans source d'azote (BBM-N), le deuxième sans source de phosphore (BBM-P) et le troisième sans source d'azote et de phosphore (BBM-N, P). Ces milieux sont préparés selon la même méthode suivie pour la préparation du milieu BBM ordinaire. Ainsi, ils sont obtenus par élimination des solutions stock SL<sub>1</sub> pour le milieu BBM-N, SL<sub>4</sub> et SL<sub>5</sub> pour le milieu BBM-P ou SL<sub>1</sub>, SL<sub>4</sub> et SL<sub>5</sub> pour milieu BBM-N,P (tableau4).

**Tableau 4:** Composition des milieux de stress utilisés dans la procédure d'évaluation de l'influence de la carence en azote et/ou en phosphore associée à un stress lumineux (luminosité de 200  $\mu$ Moles photons/m<sup>2</sup>/s) sur la production d'astaxanthine par *H. pluvialis*.

Le milieu BBM modifié (=milieu de stress)	Elément manquant	La (ou les) solution (s) éliminée (s)
BBM sans source d'azote (BBM-N)	NaNO <sub>3</sub>	SL <sub>1</sub> .
BBM sans source phosphore (BBM-P)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	SL <sub>4</sub> et SL <sub>5</sub>
BBM sans les sources d'azote et de phosphore (BBM-N, P).	NaNO <sub>3</sub> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	SL <sub>1</sub> , SL <sub>4</sub> et SL <sub>5</sub>

### **III.5.3. Procédure d'évaluation de l'influence de la salinité associée à un stress lumineux sur la production d'astaxanthine par *H. pluvialis***

Pour étudier l'effet combiné de la salinité et le stress lumineux sur la l'accumulation de l'astaxanthine par *Haematococcus pluvialis*, des milieux BBM additionnés de différentes concentrations de chlorure de sodium (16, 32 et 64 mM ) ont été préparés selon les travaux publiés par [Sarada et al. \(2002\)](#). Les milieux sont ensuite distribués dans des flacons de 250 mL et stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 15 min.

### **III.5.4. Inoculation des milieux de stress**

Les milieux modifiés préparés ainsi qu'un milieu BBM ordinaire (avec azote et phosphore à des doses normalement requises pour une croissance optimale de la microalgue) utilisé comme témoin sont distribués dans des fioles Erlenmeyers de 250 ml à raison de 100mL par flacon et ensuite inoculés par environ  $10^5$  cellules/mL de la microalgue en sa phase exponentielle de croissance. Tous les milieux inoculés sont incubés à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  et à une intensité lumineuse de  $200 \mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$  pendant 14 jours.

### **III.5.5. Extraction et dosage de l'astaxanthine**

La production de caroténoïdes par *Haematococcus pluvialis* se traduit par virage de la couleur de la culture algale et par un changement de la morphologie cellulaire. La concentration d'astaxanthine accumulée par *Haematococcus pluvialis* sur chaque milieu est déterminée par spectrophotométrie après une extraction de ces pigments selon la méthode de [Wan et al. \(2014\)](#) à la fin de la période d'incubation ([fig.10](#)).

La procédure consiste à centrifuger un échantillon de 5 mL de la suspension algale à 3000 tours/min pendant 15 min et à récupérer le culot qui est traité pendant 15 min par 5mL d'une solution méthanolique d'hydroxyde de potassium (KOH) à 5% (P/V) chauffée à 65°C pour détruire la chlorophylle. Une deuxième centrifugation (3000 tours/min pendant 15 min) de ce milieu d'extraction permet de récupérer les kystes qui sont ensuite lavés deux fois à l'eau distillée, et additionnés de 5ml de DMSO (Diméthylsulfoxyde). Afin de récupérer le maximum des pigments caroténoïdes contenus dans les cellules algales, nous avons procédé à une forte agitation du mélange cellules-solvant à l'aide d'un vortex et en présence d'un gramme de microbilles en verre pour briser les parois cellulaires grâce aux chocs mécaniques.

Cette opération est répétée au moins trois fois jusqu'à l'obtention de débris cellulaires les moins colorés.

Après une nouvelle centrifugation (3000 tours/min pendant 15 min), l'absorbance est lue à 490 nm après élimination des microbilles et des débris cellulaire par filtration sur papier Watman numéro 4. La concentration (C) d'astaxanthine par unité de volume est calculée selon l'équation de [Davis \(1976\)](#).

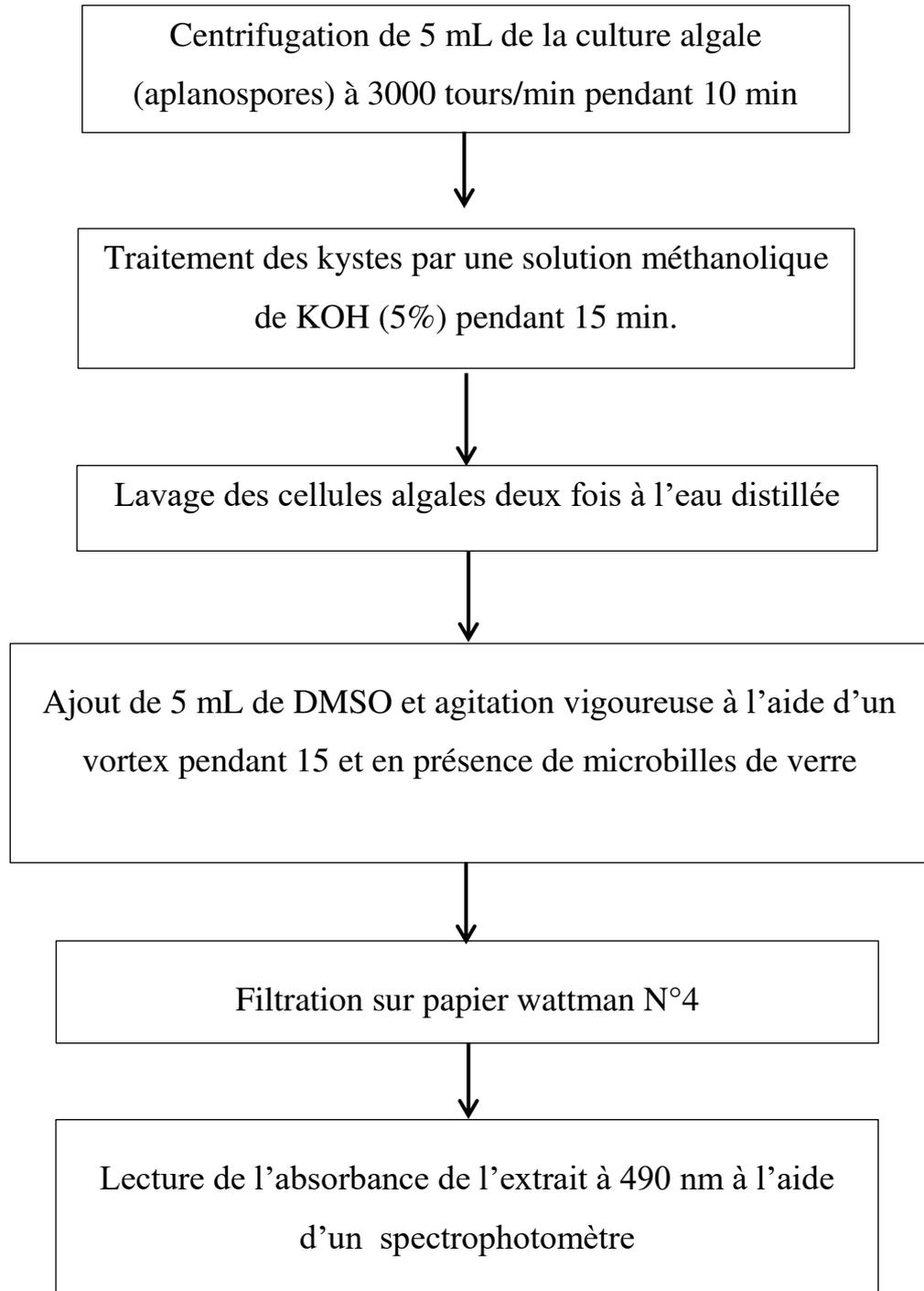
$$C \text{ (mg/L)} = 4,5/A_{490} * V_a/V_b$$

D'où :

**V<sub>a</sub> (mL)** : volume de l'extrait ;

**V<sub>b</sub> (mL)** : volume de la culture algale ;

**A<sub>490</sub>** : absorbance de l'extrait à 490 nm.



**Figure 10:** Extraction et dosage de l'astaxanthine produite par *H. pluvialis* dans des conditions de stress (Wan et al., 2014).

### **III.5.6. Etude des changements morphologiques des cellules soumises aux différents stress**

Les transformations subies par les cellules après 7 jours (J7) et 14 jours (J14) d'exposition aux conditions environnementales défavorables ont été évaluées par des observations microscopiques hebdomadaires sur des échantillons de 1 mL de la culture algale. Les échantillons sont prélevés aseptiquement à l'aide d'une micropipette stérile et après homogénéisation de la suspension algale.

### **III.6. Etude des activités biologiques de l'extrait DMSO de *H. pluvialis***

Les activités biologiques de l'extrait DMSO de *H. pluvialis* sont évaluées par des tests *in vitro* et *in vivo*. L'extrait obtenu à partir des kystes *H. pluvialis* selon le protocole de [Wan et al. \(2014\)](#) ([fig.10](#)), le solvant est ensuite évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif, les pigments récupérés sont conservés dans des flacons hermétiques à 4°C et à l'abri de la lumière et l'humidité.

#### **III.6.1. Etude *In Vitro* des activités biologiques de l'extrait DMSO de *H. pluvialis***

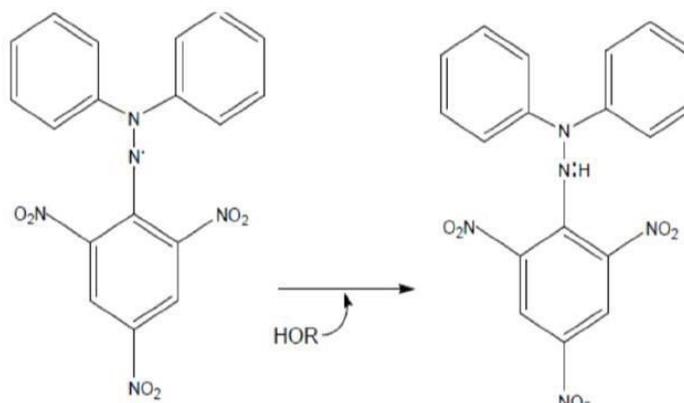
##### **III.6.1.1. Activité antioxydante**

L'activité antioxydante de l'extrait algal a été déterminée par cinq méthodes différentes (le piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picryl hydrazyl ou DPPH°, l'inhibition du blanchiment du  $\beta$ -carotène, la réduction du phosphomolybdate ou capacité antioxydante totale ou CAT, le pouvoir réducteur de l'ion ferrique ou FRAP et la méthode au Ferric thiocyanate ou FTC) afin de pouvoir comparer les résultats obtenus par chacune d'elles et en tirer les conclusions sur le plan méthodologique.

##### **III.6.1.1.1. Test de piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picryl hydrazyl (DPPH°)**

Le DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui possède une longueur d'onde d'absorption maximale à 517 nm. Le principe de ce test est basé sur la réduction du radical libre DPPH (diphényl-picryl-hydrazyl) de couleur violette en diphényl-picryl-hydrazine de couleur jaune dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons ([fig.11](#)). Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du

radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir anti-radicalaire de l'échantillon (Sanchez-Moreno, 2002).



**Figure 11:** Réduction du radical DPPH diphényl-picryl-hydrazyl en diphényl-picryl-hydrazine (Sanchez-Moreno, 2002).

La méthode utilisée est celle décrite par Bektas *et al.* (2005). 10  $\mu$ l des solutions de l'extrait DMSO de *H. pluvialis* (différentes concentrations : 200, 100, 50, 25, 12.5 et 6.25  $\mu$ g/mL) ou des standards (acide ascorbique et BHT) sont introduites dans des tubes à essai et additionnées de 1000  $\mu$ L d'une solution méthanolique de DPPH à 0.004% (P/V). Après une période d'incubation de 30 min à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est lue à 517 nm contre un contrôle négatif contenant 10  $\mu$ L du solvant (DMSO) à la place de l'extrait algal et 1000  $\mu$ L de la solution méthanolique de DPPH.

Le pourcentage de piégeage du radical DPPH par l'extrait algal est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'activité Anti-radicalaire} = [(A1 - A2) / A1] \times 100$$

Où

**A1** : absorbance du contrôle (solution du DPPH sans antioxydant).

**A2** : absorbance en présence l'extrait DMSO de *H. pluvialis* ou du standard.

Les valeurs d'IC50 (concentration inhibitrice de 50% du radical DPPH) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition =  $f$ (concentrations)].

### III.6.1.1.2. Test d'inhibition du blanchissement de $\beta$ -carotène

L'évaluation de l'activité antioxydante par le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène est basée sur la mesure de la capacité des composés bioactifs d'inhiber la dégradation du  $\beta$ -carotène par les composés organiques volatils et les hydroperoxydes conjugués diène résultant de l'oxydation de l'acide linoléique (Dapkevicius et al., 1998). En effet, la présence de ces molécules antioxydantes permet de neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique, et donc la prévention du blanchissement du  $\beta$ -carotène (Yang et al., 2008).

Le test du  $\beta$ -carotène/acide linoléique a été réalisé selon la méthode décrite par Kelin et Tepe (2008) qui consiste à dissoudre 0.5 mg de  $\beta$ -carotène dans 1mL de chloroforme, que l'on introduit ensuite dans un ballon contenant 25  $\mu$ L d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Après évaporation du chloroforme sous vide, 100 mL d'eau distillée saturée en oxygène est ajoutée avec agitation vigoureuse. 2.5 mL de l'émulsion résultante sont transférés dans des tubes contenant chacun 250 $\mu$ L d'une solution d'extrait de *H. pluvialis* à différentes concentrations (6.25, 12.5, 25, 50, 100 et 200  $\mu$ g/mL de DMSO).

Ce système d'émulsion a été incubé pendant 48h à l'obscurité. La même manipulation est répétée avec l'antioxydant synthétique, l'hydroxytoluène buthylé (BHT), utilisé comme contrôle positif, ainsi qu'avec un tube contenant de l'eau distillée faisant office de blanc. L'absorbance a été mesurée à 490 nm et l'activité antioxydante relative (AAR) a été calculée selon la formule suivante:

$$\text{AAR (\%)} = 100 \times [(A_c - A_t) / A_c]$$

Où :

**AAR** : activité antioxydante relative;

**A<sub>c</sub>**: l'absorbance du contrôle négatif (350  $\mu$ L de DMSO et 2.5 mL de l'émulsion).

**A<sub>t</sub>**: l'absorbance après 48h, en présence de l'extrait ou du BHT.

### **III.6.1.1.3. Test de réduction du phosphomolybdate ou capacité antioxydante totale (CAT)**

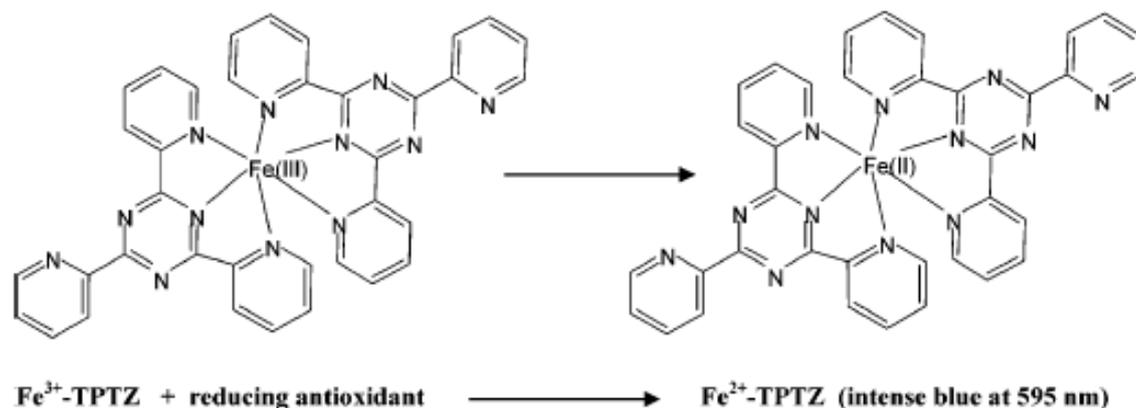
La capacité antioxydante totale de l'extrait DMSO de *H. pluvialis* a été déterminée selon la méthode décrite par Prieto *et al.* (1999) et qui est basée sur la réduction de Molybdate (VI) en Molybdate (V) à pH acide en présence des composés antioxydants ; ce qui conduit à la formation d'un complexe phosphomolybdique de couleur verte dont le maximum d'absorption est à 695nm.

La manipulation utilise 0.3mL d'extrait de *H. pluvialis* dans le DMSO mélangé avec 3 mL de solution réactive contenant 0.6 M d'acide sulfurique, 28 mM de Phosphate de sodium et 4 mM de molybdate d'ammonium. Ce mélange réactionnel est ensuite incubé 90min à 95°C. Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance du mélange est mesurée à 695 nm contre un blanc contenant 0.3 mL de DMSO à la place de l'extrait algal.

La capacité antioxydante totale de l'extrait DMSO a été exprimée en milligrammes d'équivalent acide ascorbique par gramme d'astaxanthine (mg Eq AA/g d'astaxanthine) à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec différentes concentrations (0, 20, 40, 60, 80, 100 et 120 µg/mL) d'acide ascorbique.

### **III.6.1.1.4. Test du pouvoir réducteur de l'ion ferrique ou test FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)**

Le pouvoir réducteur du fer par l'extrait DMSO de *H. pluvialis* a été déterminé selon la méthode de Benzie *et Strain* (1996) qui consiste à évaluer la capacité d'un échantillon à réduire le tripyridyltriazine ferrique (TPTZ) en tripyridyltriazine ferreux de couleur bleue dont l'intensité est mesurée à 593nm (fig. 12).



**Figure 12:** Réduction du fer ferrique en fer ferreux en présence d'un composé antioxydant (Prior et al., 2005).

Le réactif FRAP a été préparé en mélangeant du tampon acétate de sodium (300 mM, pH 3.6), une solution de TPTZ 10 mM dans 40 mM d'HCl et 20 mM de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) dans un rapport de 10V/1V/1V. 200 $\mu\text{L}$  de l'extrait DMSO de la microalgue ont été ajoutés à 3 mL de réactif de FRAP et laissés agir 30min sous 37°C à l'obscurité avant de lire l'absorbance à 593 nm contre un blanc contenant 200 $\mu\text{L}$  d'eau distillée à la place de l'extrait algal (Benzie et Strain, 1996).

Les concentrations ont été déterminées par extrapolation sur une droite étalon établie avec différentes concentrations (10, 20, 40, 80 mM) de  $\text{FeSO}_4$ . Les résultats du potentiel antioxydant de l'extrait DMSO de *H. pluvialis* ont été exprimés en moles de  $\text{Fe}^{2+}$  par gramme d'extrait algal.

#### III.6.1.1.5. Méthode au FTC (*Ferric thiocyanate method*)

La méthode au ferrothiocyanate est basée sur l'oxydation de l'acide linoléique qui génère la formation de peroxydes qui oxydent le  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$  en formant un complexe avec le thiocyanate dont absorbance maximale est à une longueur d'onde de 500 nm (Gülçin et al., 2007).

La procédure consiste à mélanger dans une fiole 1mL d'une solution d'extrait DMSO algal à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  avec 1mL de solution éthanolique d'acide linoléique à 2.5 % (V/V), 2 mL de tampon phosphate (0.02 M) à pH 7, et 1mL d'eau distillée. Ce mélange réactionnel est laissé agir à 40°C pendant pendant 96h. Le même procédé a été répété pour le standard (acide ascorbique) et un blanc ne contenant aucun antioxydant.

Au cours de l'incubation et à des intervalles de temps réguliers (chaque 24h), une aliquote de 0.1 mL du mélange a été diluée avec 9.7 mL d'éthanol, suivie par l'addition de 0.1 mL de thiocyanate d'ammonium à 30 % (W/V) et de 0.1 mL de chlorure ferreux 20mM dans de l'acide chlorhydrique à 3.5 % (P/V). Cette étape a été répétée toutes les 24h jusqu'à ce que le contrôle négatif ait atteint sa valeur maximale d'absorption. Par conséquent, une forte absorbance indique l'oxydation d'émulsion d'acide linoléique.

Le niveau de peroxydation a été déterminé par la lecture de l'absorbance à 500 nm du mélange. Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation des lipides dans l'émulsion de l'acide linoléique a été calculé par l'équation suivante:

$$\text{Inhibition de peroxydation des lipides (\%)} = 100 - [(A_{\text{Echantillon}}/A_{\text{contrôle}}) \times 100]$$

Où :

$A_{\text{contrôle}}$  : Absorbance du contrôle négatif ;

$A_{\text{Echantillon}}$  : Absorbance en présence de l'échantillon ou du standard.

### **III.6.2. Etude *In Vivo* des propriétés biologiques de l'extrait DMSO de *H. pluvialis***

#### **III.6.2.1. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire**

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait DMSO de *H. pluvialis* a été évaluée selon le protocole modifié de [Winter et al. \(1962\)](#), qui consiste à mesurer le volume de l'œdème induit par injection de la carragénine au niveau de la patte postérieure gauche de la souris.

Les souris ont été réparties en cinq lots de 5 souris chacun et mises à jeûn pendant 16h avant le démarrage de l'expérience. Le lot de souris contrôle négatif (groupe témoin) a reçu de l'eau physiologique; alors que les souris constituant le groupe standard ont reçu du diclofenac de sodium (comme médicament anti-inflammatoire) dissout dans l'eau physiologique à une dose de 30 mg/kg de poids vif. Les trois autres lots ont reçu 3 doses différentes d'extrait algal (50, 100 et 150mg/Kg poids vif).

L'injection de 0.1mL de carragénine à 1% (P/V) à toutes les souris intervient 30min après et est effectuée sous le coussinet plantaire de la patte arrière gauche. 5h après cette

injection les souris sont sacrifiées, les pattes postérieures ont été coupées à hauteur de l'articulation puis pesées.

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée grâce au calcul du pourcentage d'inhibition de l'œdème (%INH) et le pourcentage d'augmentation de volume de patte (%AUG) (Faridi et al., 2014).

### II.6.2.2. Mesure de l'activité antalgique

L'injection intrapéritonéale d'acide acétique à 0.6% chez la souris provoque un syndrome douloureux qui se traduit par des contorsions caractéristiques de type d'étirement des pattes postérieures et des torsions de la musculature dorso-abdominale (spasmes). Les crampes peuvent être réduites par un produit antispasmodique. L'effet antalgique est apprécié par le dénombrement de ces crampes pendant 5 min après l'injection de l'agent algogène (Kouakou-Siransy et al., 2010).

La méthode utilisée pour évaluer l'effet analgésique de l'extrait de *H. pluvialis* est celle décrite par Koster et al. (1956). Les souris ont été réparties en 5 lots de 5 animaux par cage. Ces souris ont été mises à jeûn pendant 16h avant le début de l'expérience puis nourries ad libitum avec un aliment standard et de l'eau de robinet. Trente minutes avant que les souris ne reçoivent l'injection intrapéritonéale d'acide acétique 0.6% (V/V) comme inducteur de douleur (0.2 mL/20g poids vif), le lot1 (lot témoin) et le lot2 (groupe standard) ont reçu, respectivement, de l'eau distillée et de l'ibuprofène à une dose de 50 mg/kg de poids vif ; alors que les autres 3 lots restants ont reçu différentes doses (50, 100 et 150mg/Kg de poids vif) de l'extrait DMSO de l'algue. Cinq minutes après l'injection de l'acide acétique 0.6%, le nombre de contorsions abdominales par souris a été compté pendant 15min.

L'effet analgésique a été évalué par détermination du pourcentage d'inhibition des spasmes par rapport au groupe témoin en utilisant la formule de Kouakou et al. (2010) :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(N_{te}-N_t) / N_{te}] \times 100$$

Où :

Nte : nombre de contorsion du témoin;

Nt : nombre de contorsion du lot test ou du standard.

### II.6.2.3. Etude de l'effet gastroprotecteur

L'effet gastroprotecteur de l'extrait DMSO de *H. pluvialis* a été testé sur l'ulcère expérimental induit par injection orale d'un agent ulcérogène, l'éthanol absolu, à des souris selon le protocole décrit par [Kamath et al. \(2008\)](#). Les souris ont été réparties de manière aléatoire en 4 lots de 6 animaux par cage (n=6) et elles ont été privées de nourriture pendant 16h avant le démarrage de l'expérience.

Une heure avant l'administration de l'agent ulcérogène (1mL d'éthanol à 90% : V/V) aux souris, les lots 1 (groupe témoin) et 2 (groupe standard) ont reçu par voie orale de l'eau distillée et de l'oméprazole (médicament anti-ulcère) dissout dans l'eau physiologique à une dose de 30mg/kg de poids vif pour le lot contrôle (témoin négatif) et le lot de référence (standard), respectivement. Les deux autres lots (lots 3 et 4) ont reçu l'extrait DMSO de *H. pluvialis* à des doses respectives de 250 et 500µg/Kg de poids vif. Une heure après l'induction de l'ulcération gastrique, les souris sont sacrifiées et les estomacs récupérés et incisés selon la grande courbure avant d'être lavés à l'eau salée et étalés sur des lames en verre.

Les photos des échantillons des estomacs ont été prises et enregistrées pour être analysés à l'aide du logiciel image J qui permet de calculer les surfaces des ulcérations. Les résultats nous ont permis de calculer deux paramètres, le pourcentage d'ulcération et le pourcentage d'inhibition d'ulcération ([Zakaria et al., 2011](#)).

$$\text{Pourcentage d'ulcération} = (\text{STI} / \text{STe}) * 100$$

Où :

**STI** : Surface totale des lésions

**STe** : Surface totale de l'estomac

$$\text{Pourcentage d'inhibition d'ulcération} = ((\text{Suc} - \text{Sut}) / \text{Suc}) * 100$$

Où :

**Suc** : Surface ulcérée du témoin ;

**Sut** : Surface ulcérée du test ou du standard.

Pour les échantillons d'ulcère gastrique aigu, la partie glandulaire de l'estomac (fixée dans du formol à 2% : V/V) a été intégrée dans une cire de paraffine, coupées en sections sagittales de 5µm et colorées avec l'hématoxyline-éosine (H & E). Les zones représentatives ont été sectionnées pour l'analyse qualitative par microscopie optique.

### III.6.3. Détermination de la toxicité aiguë

La méthode de l'Organisation de la Coopération Economique et du Développement cité par Ejebe *et al.* (2010) a été suivie pour évaluer la toxicité de l'extrait DMSO obtenu à partir des kystes de *H. pluvialis*. Cette méthode consiste à administrer par voie orale les doses expérimentales de l'extrait aux animaux et de les observer périodiquement pendant 24h pour déterminer toute manifestation de toxicité. Ces observations concernent le comportement, l'état général de ces animaux ou tout autre signe (agressivité inhabituelle, sédation, somnolence, tremblement, augmentation dans l'activité, paralysie, convulsion, salivation et locomotion insolite) pouvant entraîner la mort durant la première heure, et ensuite à chaque heure pendant 3h et finalement après les 24h qui suivent l'administration de la substance. La dose létale ou DL<sub>50</sub> correspondante à la dose d'une substance pouvant causer la mort de 50% d'une population animale dans des conditions d'expérimentation précises, a été déterminée.

Des souris mâles pesant entre 25 à 30 g de poids ont été au préalable mises à jeun 16h avant d'être mises en lot par groupe de six par cage. L'extrait algal dissout dans l'eau physiologique a été administré aux souris par voie orale à une dose de 500 mg/kg de poids vif. Les animaux du lot témoin ont reçu le même volume d'eau physiologique par voie orale. Après cela, les souris ont été mises sous observation sur une période de 24h.

### III.7. Analyse statistique

Trois répétitions indépendantes ont été réalisées pour chaque test. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  l'écart type. Une analyse statistique (analyse de variance à un facteur : ANOVA) a été réalisée par le logiciel statistique Past (version 3.19). Les différences ont été considérées statistiquement significatives à  $P < 0,05$ .

## Chapitre IV : Résultats et discussion

### IV.1. Résultats de l'isolement de la microalgue *H. pluvialis*

Dans ce travail, quarante-huit échantillons d'eaux douces ont été sélectionnés afin d'isoler *H. pluvialis*. Dix-huit isolats de microalgues ont été obtenus à partir des échantillons numérotés 4, 23, 42 et 44 collectés de Chlef ; 5 et 9 collectés de Mostaganem ; 13, 15 et 16 collectés d'Oran ; 27, 29, 30, 33 et 47 collectés de Relizane ; 38, 40 et 41 collectés de Tissemsilet et l'échantillon 45 collecté d'Ain Defla. Selon l'examen préliminaire, trois de ces 18 isolats sont susceptibles de représenter la souche d'intérêt. Cependant, un seul isolat des 3 a été choisi en raison de sa pureté et de sa capacité de division et ses caractéristiques macroscopiques et microscopiques ont été déterminées.

#### IV.1.1. Examen macroscopique de l'isolat

L'observation macroscopique des colonies de l'isolat retenu sur gélose BBM a montré des colonies identiques et bien distinctes de forme sphérique, de petite taille, de couleur verte et légèrement bombées (fig.13).



**Figure 13** : Observation macroscopique des colonies de la microalgue isolée sur gélose BBM après incubation pendant dix jours à  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  et à une intensité lumineuse de  $40 \mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$ .

La culture de cet isolat sur bouillon BBM à  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  et à une intensité lumineuse de  $40 \mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$  pendant sept jours a induit une coloration verte de la culture, témoin d'une croissance algale avec production de chlorophylle (fig.14).

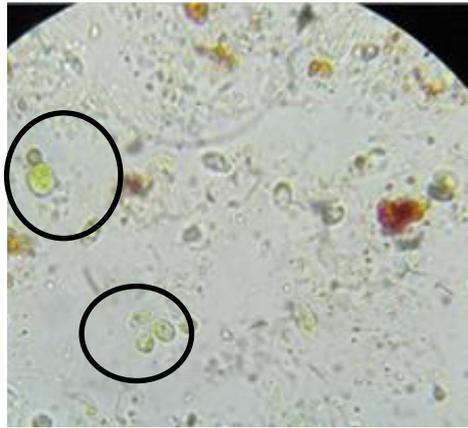


**Figure 14 :** Culture de la microalgue isolée sur bouillon BBM à  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  avec éclaircment continu à  $40\ \mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$  pendant dix jours.

#### IV.1.2. Examen microscopique de l'isolat

Les observations microscopiques des premiers tests d'isolement ont montré la présence de cellules de différentes formes, aspects, tailles et couleurs, ceci est dû à la richesse des eaux douces en phytoplancton (Prescott *et al.*, 2003).

Après plusieurs repiquages sur bouillon et gélose BBM dans des conditions de culture optimale (incubation à  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  et intensité lumineuse de  $40\ \mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$  pendant 7 jours), des colonies de cellules ovoïdes doublement flagellées, de couleur verte, de quelques micromètres de diamètre, unicellulaires et très mobiles sont obtenues (fig.15). Il s'agit de macrozoïdes ou zoospores (Shah *et al.*, 2016). Les mêmes observations ont été décrites par plusieurs auteurs (Kobayatshi *et al.*, 1991 ; Klochkova *et al.*, 2013 ; Yao *et al.*, 2020).

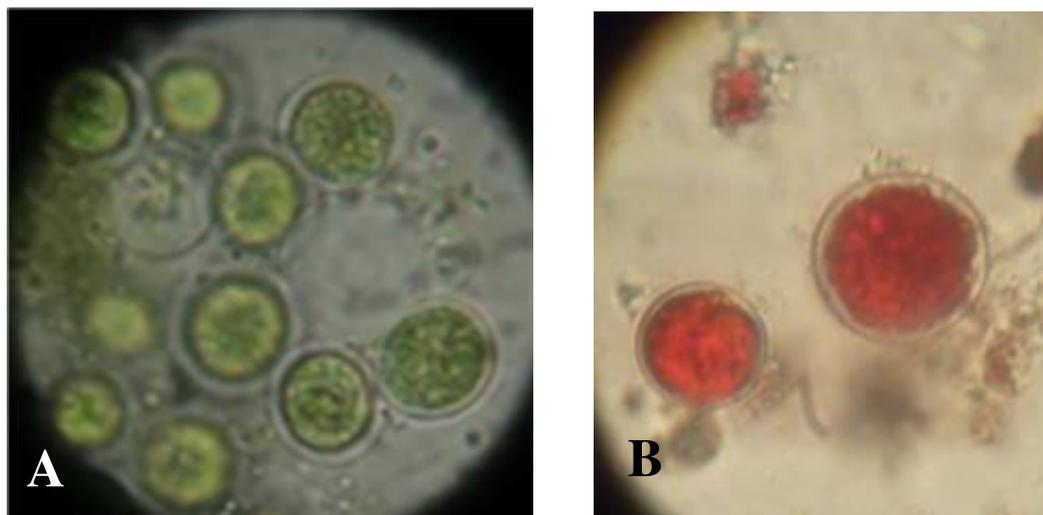


**Figure 15 :** Observation microscopique des cellules de la microalgue *H. pluvialis* isolée à partir de l'échantillon 23 d'eau douce et obtenues par culture de l'isolat dans des conditions de température ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) et de luminosité ( $40 \mu\text{Moles photons/m}^2/\text{S}$ ). Grossissement :  $40\times 10$ .

Les cellules de cet isolat subissent des transformations morphologiques importantes lorsqu'elles sont exposées à une forte intensité lumineuse pendant 14 jours ( $200 \mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$ ). En effet, elles deviennent rondes, leur taille augmente et leur paroi s'épaissit (fig. 16A).

Elles sont appelées à ce stade, cellules *palmella* (Shah et al., 2016). Chekanov et al. (2014) ont démontré que l'enkystement de *H. pluvialis* est caractérisé par une augmentation considérable de la taille des cellules qui atteint plus de  $80 \mu\text{m}$  de diamètre.

Les observations microscopiques ont aussi montré que ces cellules se remplissent progressivement de vacuoles de couleur rouge vif qui occupent la totalité de leur cytoplasme au bout de 14 jours (fig.16B). Il s'agit de caroténoïdes (astaxanthine). Les cellules sont appelées à ce stade des aplanospores ou kystes matures (Dragos et al., 2008). Les mêmes observations ont été rapportées sur d'autres souches de *Haematococcus pluvialis* par Christwardana et Hadiyanto (2017) et Bulter et al. (2018).



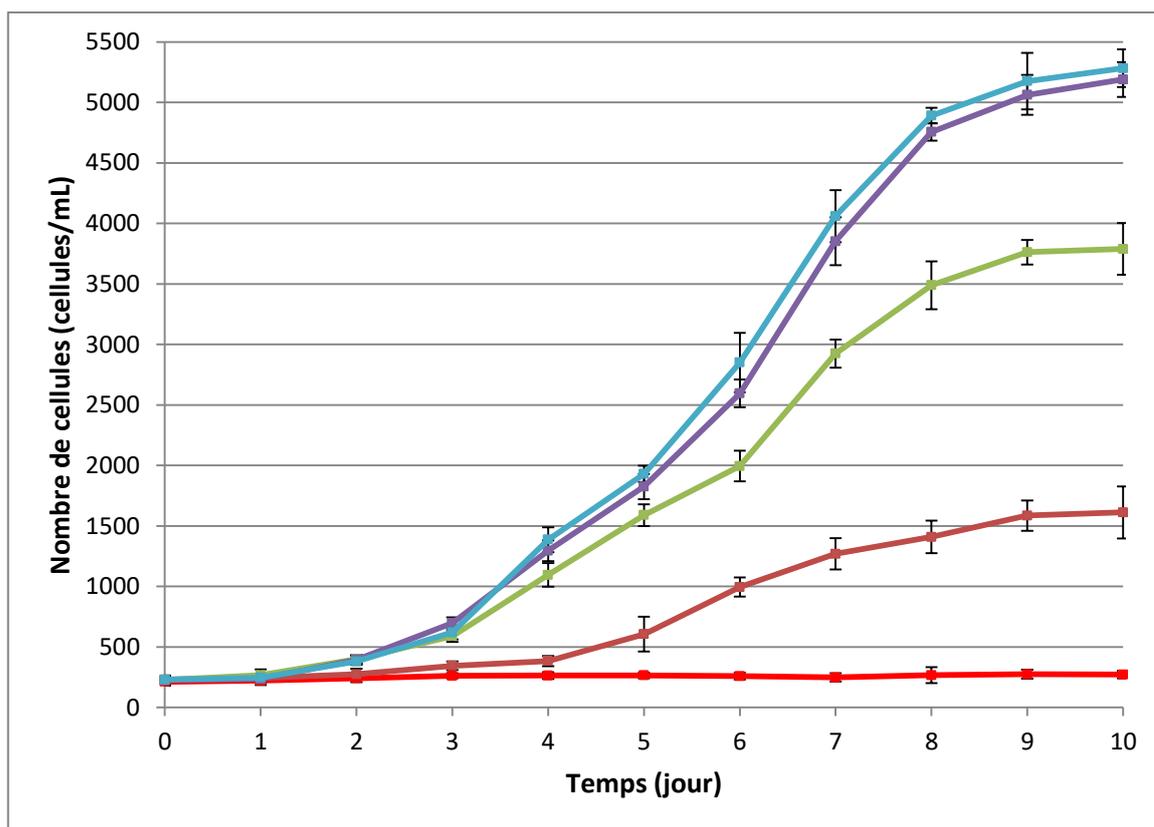
**Figure 16:** Observation microscopique des macrozoïdes de la microalgue isolée (A), et des aplanospores matures (B) obtenues par culture de l'isolat à  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  et sous une luminosité de  $200\ \mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$ . Grossissement  $40\times 10$ .

La comparaison de ces caractéristiques microscopiques avec celles publiées par [Christwardana et Hadiyanto \(2017\)](#) a permis de rattacher l'isolat de la présente étude à la souche d'intérêt : *Haematococcus pluvialis*.

#### **IV.2. Effet de la concentration du milieu de culture en nitrate de sodium sur la cinétique de croissance de *H. pluvialis* à $25^{\circ}\text{C}$ et sous une luminosité de $40\ \mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$**

Pour déterminer la meilleure concentration du milieu de culture en  $\text{NaNO}_3$  permettant d'obtenir une quantité de biomasse optimale de l'espèce *H. pluvialis* isolée, une série de concentrations de nitrate de sodium (0, 0.15, 0.25, 0.50 et 0.75 g/L) a été testée sur la vitesse de croissance de *H. pluvialis* à  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  et sous une intensité lumineuse de  $40\ \mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$ .

Les quantités de biomasses accumulées par *H. pluvialis* sur milieu BBM sans source d'azote (BBM à 0 g/L de  $\text{NaNO}_3$ ) dans les conditions de culture précitées restent négligeables durant toute la période d'incubation ([fig.17](#)). Le taux de croissance calculé sur ce milieu est de  $0.07\text{J}^{-1}$ .



**Figure 17:** Croissance de la microalgue (*H. pluvialis*) isolée sur bouillon BBM en absence (0 g/L ■) ou en présence de 0.15 g/L (■), 0.25 g/L (■), 0.50 g/L (■) et 0.75 g/L (■) de nitrate de sodium à  $25\pm 2^\circ\text{C}$  et à une intensité lumineuse de  $40 \mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$  pendant dix jours. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm\text{SD}$ .

Ce faible taux de croissance enregistré dans les premiers jours d'expérience et en absence d'une source d'azote dans le milieu de culture peut être expliqué par l'utilisation d'azote intracellulaire de la microalgue pour la synthèse protéique (Orosa et al., 2005). En effet, ces auteurs ont démontré que les cellules algales ont la capacité d'accumuler l'azote sous forme de RuBisCo responsable de la survie et d'une éventuelle multiplication des cellules algales pendant quelques heures en absence d'une source d'azote dans le milieu de culture. Ils ont démontré que *H. pluvialis* se multiplie faiblement sur milieux carencés en azote.

Par ailleurs, l'étude de la cinétique de croissance de cette microalgue sur bouillon BBM additionné de différentes concentrations de nitrate de sodium (0.15, 0.25, 0.50 et 0.75 g/mL) dans les conditions de température et de lumière précitées a montré une variation de la vitesse

de croissance durant la période d'incubation. Ainsi, les quantités de biomasse produites dépendent de la concentration du milieu de culture en nitrate de sodium. En effet, plusieurs études ont démontré que la croissance de *H. pluvialis* dépend de la teneur du milieu de culture en nitrates (Orosa et al., 2005 ; Ranga Rao, 2011).

La vitesse de multiplication des cellules de *H. pluvialis* sur les différents milieux dans les premiers jours d'incubation était relativement faible. En effet, le nombre de cellules reste sensiblement invariable ( $P < 0.05$ ) jusqu'au deuxième jour de culture sur bouillon BBM à 0.25, 0.50 ou 0.75 g/mL de  $\text{NaNO}_3$  et jusqu'au quatrième jour sur bouillon BBM à 0.15 g/mL de  $\text{NaNO}_3$ . Ainsi, des taux de croissance de 0.28, 0.29 et  $0.30 \text{ J}^{-1}$  ont été enregistrés sur bouillons BBM à 0.25, 0.50 ou 0.75 g/mL de  $\text{NaNO}_3$  respectivement entre le début de l'expérience et le deuxième jour de culture par rapport à seulement  $0.13 \text{ J}^{-1}$  enregistré sur bouillon BBM à 0.15 g/mL de  $\text{NaNO}_3$  entre le début de l'expérience et le quatrième jour de culture. Cette période correspond à la phase de latence durant laquelle il y a réactivation et synthèse des enzymes indispensables à la production de métabolites et donc à la croissance cellulaire (Orosa et al., 2005).

Les travaux de Rmiki (1999) et Orosa et al. (2005) ont montré que cette période était légèrement plus courte et s'étalait sur trois jours sur les milieux additionnés de 0.15, 0.25, 0.50, 0.75 et 1.0 g/mL de  $\text{NaNO}_3$ , mais pouvait s'étendre jusqu'au cinquième jour d'incubation selon la composition du milieu de culture.

Une amélioration significative ( $P < 0.01$ ) de la vitesse de multiplication de *H. pluvialis* est enregistrée sur les bouillons BBM à 0.25, 0.50 ou 0.75 g/mL de  $\text{NaNO}_3$  entre le deuxième et le huitième jour de culture. Les taux de croissance enregistrés durant cette période sur ces milieux sont de l'ordre de 0.36, 0.41 et  $0.40 \text{ J}^{-1}$  respectivement par rapport à  $0.32 \text{ J}^{-1}$  enregistré entre le quatrième et septième jour de culture sur bouillon BBM à 0.15 g/mL de  $\text{NaNO}_3$ .

Les mêmes observations ont été rapportées par Zheksheva et al. (2002) sur la croissance exponentielle de *H. pluvialis* sur milieu BG11 à  $25^\circ\text{C}$  et  $75 \mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$  après une phase de latence de deux jours.

Dans une étude réalisée sur une espèce de *H. pluvialis* par Dominguez-Bocanegra (2004), il a été démontré qu'en présence d'une source de carbone inorganique (1.5% de CO<sub>2</sub>) dans le milieu de culture avec exposition à la lumière (photosynthèse), l'énergie est produite sous forme d'ATP et de NADPH qui est ensuite stockée sous forme d'amidon par fixation de CO<sub>2</sub> via le cycle de Kelvin et par conséquent, la production de la biomasse.

Ainsi, le nombre de cellules algales dénombrées au deuxième jour de culture sur milieux BBM à 0.25, 0.50 et 0.75 g/mL de NaNO<sub>3</sub> est de l'ordre de 399±35, 395 ±34 et 420±28 cellules/mL respectivement. Ce nombre de cellules augmente pour atteindre au cinquième jour de culture des valeurs respectives de 1589±89, 1826±104 et 1930± 68 cellules/mL sur les mêmes milieux. En revanche, aucune différence significative (P<0.05) n'a été enregistrée entre les vitesses de croissance de la microalgue en présence de 0.25, 0.50 et 0.75 g/mL de NaNO<sub>3</sub> et ce, jusqu'au cinquième jour d'incubation.

À partir du cinquième jour d'incubation, la vitesse de croissance de *H. pluvialis* a significativement (p<0.01) diminué sur bouillon BBM à 0.25 g/mL de NaNO<sub>3</sub> par rapport à celle sur celui à 0.50 ou 0.75g/mL de NaNO<sub>3</sub>. En effet, avec ces deux dernières concentrations de nitrate de sodium, l'accumulation de biomasse est significativement (P<0.01) plus importante puisque, au huitième jour de culture, elle atteint 4756 ± 73 et 4890 ± 65 cellules/mL en présence de 0.50 et 0.75 g/mL de NaNO<sub>3</sub>, respectivement ; et seulement 3489±198 cellules/mL avec 0.25g/mL de NaNO<sub>3</sub>.

Par ailleurs, une différence significative (P<0.05) entre la vitesse de croissance de *H. pluvialis* sur milieu BBM additionné de 0.15 g/mL de NaNO<sub>3</sub> et celles enregistrées sur les milieux additionnés des concentrations les plus élevées de nitrate de sodium durant toute la période d'incubation a été enregistrée. En effet, des taux de croissance de 0.35, 0.38 et 0.38 J<sup>-1</sup> ont été enregistrés en présence de 0.25, 0.50 et 0.75 g/mL de NaNO<sub>3</sub> respectivement entre le début et le huitième jour d'expérience par rapport à celui de valeur égale à 0.22 J<sup>-1</sup> enregistré sur le même milieu additionné de 0.15g/mL de NaNO<sub>3</sub>.

D'après Sarada et al. (2002), le nitrate de sodium constitue la meilleure source d'azote inorganique pour la croissance de *H. pluvialis*. En outre, les études menées par Boussiba et Vonsak (1991) et Orosa et al. (2005) ont montré que la concentration de nitrates dans le

milieu de culture joue un rôle très important sur la vitesse de division cellulaire chez cette espèce algale.

À partir du huitième jour d'incubation, une diminution significative ( $P < 0.05$ ) de la vitesse de division des cellules algales sur les milieux additionnés de 0.25, 0.50 et 0.75 g/mL de  $\text{NaNO}_3$  a été notée. Par conséquent, le nombre de cellules reste sensiblement constant. Les taux de croissance enregistrés sur ces milieux sont de 0.040, 0.045 et 0.040  $\text{J}^{-1}$ , respectivement. Cette diminution de la vitesse de division cellulaire est plus importante et commence à partir du septième jour de culture sur BBM à 0.15 g/mL de  $\text{NaNO}_3$ . Ceci serait lié à un appauvrissement du milieu de culture en éléments nutritifs et à une consommation des nutriments par les cellules de la microalgue et en particulier des nitrates, source d'azote et élément essentiel à la division de l'espèce algale *H. pluvialis* ; ce qui se traduit par un vieillissement des cellules et un arrêt de la multiplication cellulaire.

Les vitesses de croissance de *H. pluvialis* entre le début et le dernier jour d'expérience sur bouillons BBM à 0, 0.15, 0.25, 0.50 et 0.75 g/mL de  $\text{NaNO}_3$  sont de l'ordre de 0.025, 0.19, 0.28, 0.30 et 0.31  $\text{J}^{-1}$ , respectivement. Les quantités de biomasse les plus importantes sont accumulées sur bouillons BBM additionnés de 0.50 et 0.75 g/mL de  $\text{NaNO}_3$ . Ainsi, le nombre de cellules dénombrées est de  $272 \pm 31$ ,  $1612 \pm 215$ ,  $3769 \pm 213$ ,  $5189 \pm 143$  et  $5282 \pm 156$  cellules/mL de bouillon BBM en absence (0 g/mL) et en présence de 0.15, 0.25, 0.50 et 0.75 g/mL de  $\text{NaNO}_3$  après dix jours de culture à  $25^\circ\text{C}$  et  $40 \mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$  de lumière.

Il ressort, alors, que la présence du  $\text{NaNO}_3$  aux concentrations de 0.50 et 0.75 g/mL dans le milieu BBM permet d'obtenir les quantités de biomasse les plus importantes au bout de 8 jours de culture. De ce fait, la concentration de 0.50 g/L de  $\text{NaNO}_3$  a été choisie pour l'obtention de suffisamment de biomasse de *H. pluvialis*. Les cellules sont récupérées après 8 jours de culture pour servir d'inoculum des milieux neufs (fig. 18).



**Figure 18:** Culture en masse de la microalgue *H. pluvialis* sur milieu BBM à 0.5g/mL de  $\text{NaNO}_3$  à  $25\pm 2^\circ\text{C}$  et à une intensité lumineuse de  $40 \mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$  pendant huit jours.

### **IV.3. Influence des différentes conditions de stress sur l'aspect microscopique des cellules et sur la caroténogénèse chez la microalgue *H. pluvialis***

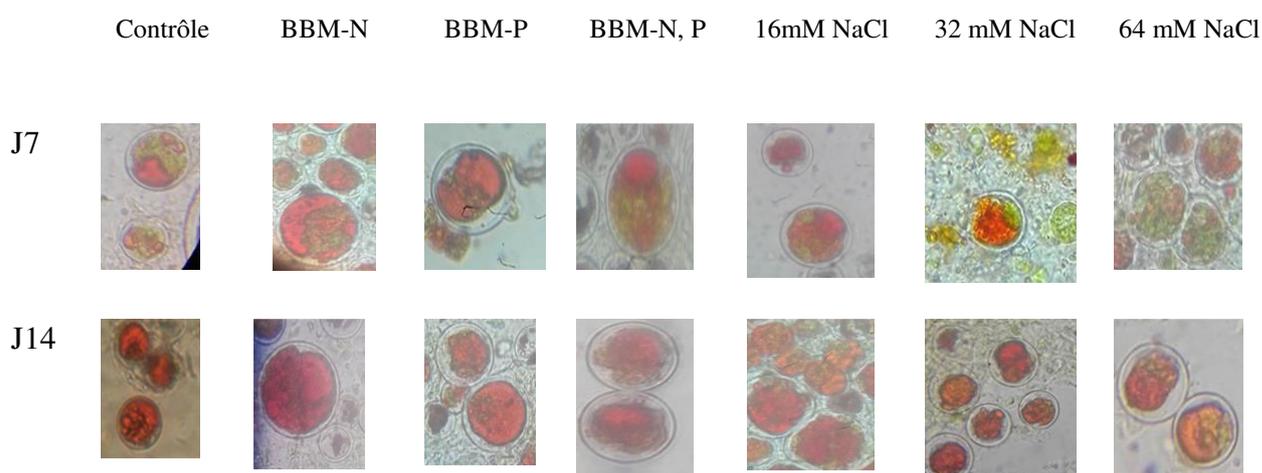
#### **IV.3.1. Aspect microscopique des cellules soumises aux différents stress**

L'examen microscopique des échantillons des cultures algales exposées pendant sept jours aux conditions défavorables de carence nutritionnelle (azote, phosphore ou les 2) ou de stress salin (16, 32 ou 64 mM NaCl) et de forte luminosité ( $200 \mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$ ) a montré que la couleur du cytoplasme des cellules est vert-rouge. Ceci traduit un début de production de caroténoïdes secondaires et par conséquent un démasquage partiel de la couleur de la chlorophylle par l'astaxanthine. Les mêmes observations ont été déjà rapportées par plusieurs travaux antérieurs He et al. (2007); Dragos et al. (2010); Hong et al. (2016) et Christwardana et Hadiyanto (2017).

Durant l'exposition aux conditions environnementales défavorables précitées, les cellules de *H. pluvialis* subissent un polymorphisme important. Les changements

morphologiques les plus importants sont une transformation des formes végétatives vertes en cellules sphériques immobiles appelées kystes ou aplanospores (Hong et al., 2016).

Les cellules ont une paroi cellulaire épaisse ce qui leur permet de résister aux conditions défavorables (Christwardana et Hadiyanto, 2017). Une augmentation du diamètre des cellules a été aussi observée (fig.19).



**Figure 19:** Observation microscopique des cellules de *Haematococcus pluvialis* après le 7<sup>ème</sup> (J7) et 14<sup>ème</sup> (J14) jours d'exposition aux différents stress environnementaux (carence nutritionnelle ou stress salin + 200  $\mu$ Moles photons/m<sup>2</sup>/s). Grossissement : 10x40).

L'observation microscopique des cellules de *H. pluvialis* cultivées pendant 14 jours sur bouillon BBM sans source d'azote et sous une forte intensité lumineuse (ie. 200  $\mu$ Moles photons/m<sup>2</sup>/s) a montré des aplanospores matures de couleur rouge brillant, de taille importante avec une paroi épaisse.

L'observation microscopique des cellules exposées aux autres conditions de stress a montré aussi des aplanospores matures de couleur rouge moins importante que celle des cellules exposées au stress azoté.

Ces résultats sont attribués à une accumulation massive de caroténoïdes secondaires et en particulier l'astaxanthine par les cellules soumises à un stress azoté comme cela a été déjà suggéré par plusieurs auteurs (Orosa et al., 2001; Cifuentes et al., 2003 ; He et al., 2007).

Toutefois, l'observation microscopique des cellules de *H. pluvialis* cultivées sur bouillon BBM additionné de 64 mM de NaCl à forte intensité lumineuse a montré des cellules de couleur jaune. Il s'agit des aplanospores non matures.

Les mêmes observations ont été rapportées par [Torres-Carvajal et al. \(2017\)](#) qui les interprètent comme étant dues à une production de caroténoïdes primaires de couleur jaune comme le  $\beta$ -carotène, la luteine, le violaxanthine, la neoxanthine et la zeaxanthine qui sont les précurseurs de caroténoïdes secondaires rouges comme l'astaxanthine. Les aplanospores meurent avant maturation.

#### **IV.3.2. Effet des différentes conditions de stress sur la caroténogénèse**

Dans des conditions environnementales défavorables comme la température élevée ([Giannelli et al., 2015](#)), les variations de pH ([Vidhyavathi et al., 2008](#)), le stress lumineux ([Choi et al., 2005](#)), la salinité ([Markoua et al., 2013](#)), les carences nutritionnelles ([Orosa et al., 2005](#); [Nagaraj et al., 2012](#))...etc., les cellules de *H. pluvialis* se transforment en kystes qui se remplissent progressivement d'astaxanthine et deviennent alors rouges ([Dragos et al., 2008](#)).

Dans ce travail, l'effet du stress lumineux en association avec la carence nutritionnelle (azote et/ou phosphore) ou avec la salinité sur la production de l'astaxanthine a été étudiée chez la microalgue *H. pluvialis*.

L'appréciation visuelle de la coloration des cultures de *H. pluvialis* exposées à des conditions défavorables a montré un virage de la couleur celles-ci vers le rouge dont l'intensité dépend du paramètre de stress étudié ([fig.20](#)).



**Figure 20:** Mise en évidence de la production d'astaxanthine par l'isolat de *H. pluvialis* cultivé pendant 14 jours à  $25\pm 2^\circ\text{C}$  et à forte intensité lumineuse de  $200 \mu\text{Moles photons/m}^2/\text{S}$  sur bouillons BBM carencés en azote (a), en phosphore (b), en azote et phosphore à la fois (c) ; ou additionnés de 64 mM (d), 32mM (e) ou non 0 mM (f) de chlorure de sodium.

Ce virage à la couleur rouge des cultures est l'expression de la transformation des formes végétatives de *H. pluvialis* en aplanospores riches en pigments caroténoïdes et en particulier en astaxanthine de couleur rouge vif. L'ampleur de ces changements dépend des quantités d'astaxanthine accumulées dans chaque milieu. En effet, la couleur la plus intense est obtenue après 14 jours de culture de *H. pluvialis* sur bouillon BBM sans source d'azote et sous une luminosité de  $200 \mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$ .

Immamoglu et al. (2009) ont observé que durant la période d'induction de la production de caroténoïdes chez *H. pluvialis*, la culture algale prend la couleur de l'astaxanthine. D'après

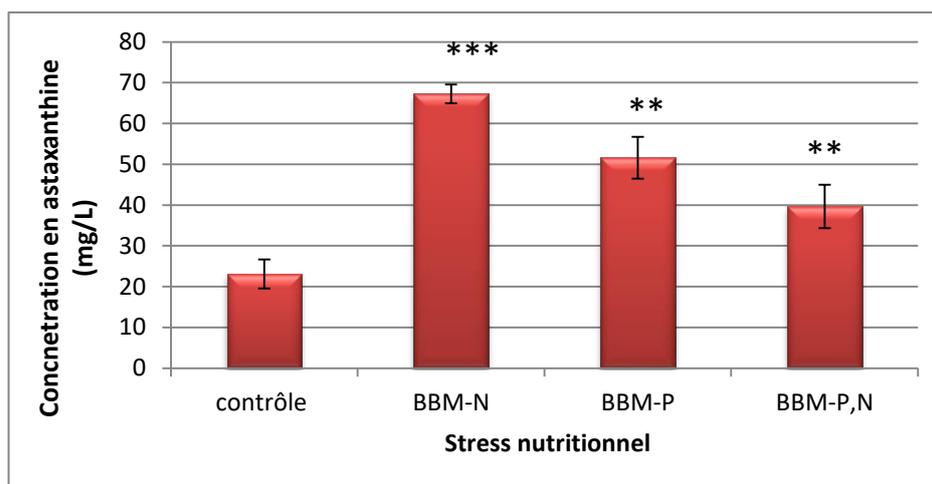
Shah et al. (2016), au stade aplanospore, le contenu en caroténoïdes totaux des cellules de *H. pluvialis* augmente avec remplacement du principal pigment caroténoïde caractéristique de la forme végétative par des caroténoïdes secondaires, et en particulier par l'astaxanthine qui représente 80 à 99% des caroténoïdes totaux accumulés par cette microalgue.

Par ailleurs, une analyse par HPLC d'un extrait d'une culture de *H. pluvialis* exposée à un stress environnemental a montré que les caroténoïdes secondaires produits par celle-ci sont composés essentiellement d'esters d'astaxanthine dans des proportions supérieures à 80% des caroténoïdes totaux. Les canthaxanthines et les échinénones sont aussi détectés mais en faibles proportions (Orosa et al., 2005).

En outre, d'autres travaux (Immamoglu et al., 2009; Ranga Rao, 2011) ont démontré que l'exposition des cultures des *H. pluvialis* à des conditions environnementales défavorables induit une accumulation importante d'astaxanthine.

#### **IV.3.2.1. Stress de carence nutritionnelle associée à un stress lumineux**

Les résultats de dosage de l'astaxanthine accumulée sous différentes conditions de stress nutritionnel et de forte luminosité sont illustrés par la figure 21. Il apparaît que la culture de *H. pluvialis* sur bouillon BBM ordinaire et à une forte intensité lumineuse permet une accumulation de  $23.12 \pm 3.57$  mg/mL d'astaxanthine. Ceci explique qu'à elle seule, l'augmentation de l'intensité lumineuse de 40 à 200  $\mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$  stimule la caroténogénèse chez ce microorganisme. Par ailleurs, plusieurs travaux antérieurs ont démontré l'effet positif de l'ensoleillement et des fortes intensités lumineuses sur l'induction de la production d'astaxanthine chez *H. pluvialis* (Ding et al., 1994; Harker et al., 1996; Brinda et al., 2004; Torzillo et al., 2005; Wang et al., 2013).



**Figure 21:** Quantités d'astaxanthine accumulées par l'isolat de *H. pluvialis* cultivé sur milieux BBM sans source d'azote (BBM-N), de phosphore (BBM-P) azote et de phosphore (BBM-N,P) et sur milieu contrôle (BBM ordinaire) à  $25\pm 2^\circ\text{C}$  et sous un éclairage continu à  $200 \mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$  pendant 14 jours. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm\text{SD}$ .

(\*\*\* ( $P<0.001$ ): différence très hautement significative, \*\* ( $P<0.01$ ): différence très significative).

Fan et al. (1994) ont démontré qu'une intensité de lumière supérieure à  $200 \mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$  augmente le rapport entre la quantité d'astaxanthine et celle de la chlorophylle jusqu'à ce qu'un équilibre soit atteint. Tandis qu'à de plus faibles intensités lumineuses ( $50$  à  $100 \mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$ ), ce même rapport reste constant sans accumulation d'astaxanthine. Par ailleurs, Yong et Lee (1991) ont rapporté que la quantité de pigments caroténoïdes accumulée par *H. pluvialis* dépend de l'intensité de la lumière.

He et al. (2007) ont observé que l'exposition d'une souche de *H. pluvialis* à une intensité lumineuse supérieure à  $170 \mu\text{Moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  favorise l'accumulation de caroténoïdes chez cette microalgue.

Les résultats de ce travail montrent que la carence nutritionnelle en azote et/ou en phosphore associée à une forte intensité lumineuse dans la culture de *H. pluvialis* exerçait une influence très hautement significative ( $P<0.001$ ) sur l'induction de la production d'astaxanthine.

En effet, la quantité d'astaxanthine enregistrée sur bouillon BBM sans source d'azote à une intensité lumineuse de 200  $\mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$  est de  $67.25 \pm 2.28$  mg/L. Ceci met en exergue l'effet synergique entre la carence nutritionnelle et le stress lumineux sur l'induction de la caroténogénèse chez la microalgue *H. pluvialis*.

Par ailleurs, les travaux menés par [Fabregas et al. \(1998\)](#) ont montré que l'effet de la carence en azote sur l'induction de la production d'astaxanthine par les cellules de *H. pluvialis* était plus important que celui exercé par le stress lumineux. En outre, ces mêmes auteurs ont trouvé que l'association de ces deux facteurs de stress permet une accumulation de  $49.52$   $\mu\text{g/mL}$  d'astaxanthine par rapport à  $37.5 \pm 6.8$   $\mu\text{g/mL}$  enregistrée dans des cultures soumises au seul stress lumineux.

D'autres études ([Borowitzka et al., 1991](#); [Hagen et al., 2000](#) ; [Nagaraj et al., 2012](#)) ont rapporté que la carence en azote de milieux de culture de *H. pluvialis* et d'autres microalgues était le facteur le plus efficace inducteur de caroténogénèse. Ainsi, cette même déficience en azote influence la production de  $\beta$ -carotène chez la microalgue *Dunaliella salina*, et la production de lipides chez d'autres espèces algales. Ces derniers auteurs attribuent ces effets au fait que la carence azotée constitue le facteur crucial de blocage de la division cellulaire et par conséquent de la production de métabolites secondaires.

La biosynthèse d'astaxanthine est induite par une carence azotée et par de fortes intensités lumineuses associées ou non à d'autres facteurs de stress environnementaux ([Jeeji Bai et al., 2017](#)). [Boussiba et Vonshak \(1991\)](#) ont rapporté qu'une carence en azote permet une accumulation rapide d'astaxanthine et qu'en revanche, une supplémentation du milieu en cet élément avait l'effet contraire.

Les travaux de [Orosa et al. \(2001\)](#) ont montré qu'après 14 jours d'incubation sous forte luminosité, *H. pluvialis* accumulait des quantités importantes d'astaxanthine sur milieux pauvres en azote ( $22.7$ mg/g de biomasse).

Les nitrates constituent la source d'azote la plus importante pour les microalgues ([Borowitzka et al., 1998](#)). L'azote joue un rôle essentiel dans la synthèse de protéines, d'acides aminés et d'autres éléments essentiels à la survie des cellules végétales et algales

(Ranga Rao, 2014). Ainsi, Fabregas et al. (2003) ont rapporté qu'une déficience en azote est très efficace sur la stimulation de la biosynthèse d'astaxanthine chez *H. pluvialis* que les fortes intensités lumineuses.

Selon Oroza et al. (2005), le taux de croissance de *H. pluvialis* sur milieu BBM normalement pourvu en azote est de  $0.47 \text{ J}^{-1}$  ; alors qu'il n'est que de  $0.12 \text{ J}^{-1}$  sur BBM à 0% d'azote, mais avec une biosynthèse de caroténoïdes améliorée. Ces auteurs ont évalué par une analyse HPLC le pouvoir de synthèse par les cellules de *H. pluvialis* d'astaxanthine libre et d'esters d'astaxanthine à  $0.41 \pm 0.00$  et  $24.11 \pm 0.38$  pg/cellule, respectivement sur bouillon BBM exempt d'azote.

Cependant, dans cette même étude, ces auteurs observent que *H. pluvialis* cultivée sur bouillon BBM à 0.15 et 0.25 g/L de  $\text{NaNO}_3$  produit respectivement (en pg/cellule)  $0.11 \pm 0.00$  et  $0.19 \pm 0.00$  d'astaxanthine libre et  $5.41 \pm 0.46$  et  $0.40 \pm 0.01$  d'esters d'astaxanthine. Ces molécules ne sont pas détectées sur bouillons BBM à 0.5, 0.75 ou 1.0 g/L de  $\text{NaNO}_3$ .

Les résultats obtenus dans la présente expérience montrent que la quantité d'astaxanthine accumulée par les cellules de *H. pluvialis* sur bouillon BBM à 0g/L de phosphore et à forte intensité lumineuse est de  $51.58 \pm 5.14$  mg/L. Cette valeur est supérieure ( $P < 0.01$ ) à celle enregistrée sur bouillon BBM ordinaire mais inférieure à celle produite sur milieu BBM sans source d'azote. En effet, des travaux antérieurs (Boussiba et al., 1999 ; Shah et al., 2016) ont rapporté qu'une culture des cellules de *H. pluvialis* sur milieu carencé en phosphore permet une production de presque la moitié de celle accumulée sur milieu dépourvu d'azote.

Immamoglu et al. (2009) ont démontré qu'à forte intensité lumineuse, les cellules de *H. pluvialis* accumulent des teneurs moins importantes d'astaxanthine sur milieu sans source de phosphore (21.32 mg/g) par rapport à celle produite sur le même milieu sans source d'azote (30.07mg/g). D'après Boussiba et al. (1999), les endommagements subits par les cellules de *H. pluvialis* à cause de la dégradation de la chlorophylle sont plus importants en absence d'azote que de phosphore.

Il est possible de stimuler la production d'astaxanthine chez les cellules de *H. pluvialis* par réduction des teneurs de phosphore dans le milieu de culture et par exposition à un stress lumineux (Jeeji Bai *et al.*, 2017).

Le phosphore est un élément essentiel à la croissance algale. Il est assure le transport de l'énergie aux cellules, intervient dans la biosynthèse des acides nucléiques et des phospholipides et constitue un élément fondamental de la composition de la membrane cellulaire (Nagaraj *et al.*, 2012). Ces auteurs ont montré qu'en absence de phosphore, les cellules de *H. pluvialis* accumulent des quantités importantes d'astaxanthine.

Des observations similaires ont été apportés par la littérature où plusieurs travaux ont montré que la carence du milieu de culture en azote n'a pas un effet synergique avec la carence en autres éléments minéraux sur l'induction de l'accumulation d'astaxanthine chez *H. pluvialis* comme la carence en azote associée à celle en magnésium (Fabregas *et al.*, 1998) ou en phosphore (Imamoglu *et al.*, 2009).

Les résultats publiés par Nagaraj *et al.* (2012) sur la production d'astaxanthine par les formes végétatives de *H. pluvialis* ont montré que la production de ces caroténoïdes est influencée par l'appauvrissement du milieu de culture en azote, en phosphore ou autres éléments essentiels à la croissance algale. Cette influence serait due à inhibition de la division cellulaire et par conséquent d'une accumulation de caroténoïdes secondaires pour la protection de l'équipement photosynthétique de la cellule.

La carence du milieu de culture en azote ou en phosphore favorise l'accumulation de quantités importantes d'astaxanthine chez *Haematococcus pluvialis* et chez les autres microorganismes producteurs de caroténoïdes secondaires. En revanche, une carence du milieu de culture en azote et en phosphore à la fois permet la transformation des formes végétatives en aplanospores mais une accumulation moins importante d'astaxanthine (Nagaraj *et al.*, 2012).

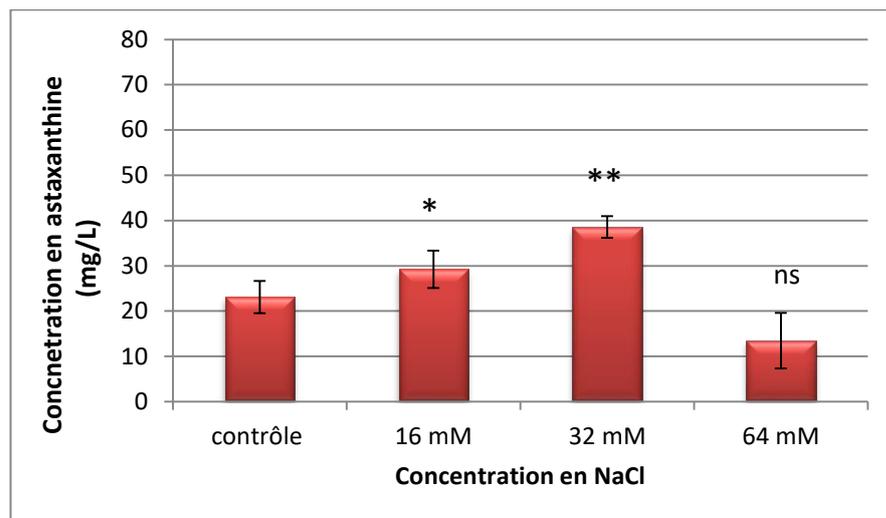
Fabregas *et al.* (1998) ont étudié l'effet d'une carence du milieu de culture en azote et/ou magnésium sur l'accumulation d'astaxanthine par *H. pluvialis* à une intensité lumineuse élevée. Ils ont enregistré des teneurs en astaxanthine de 381 pg/cellule sur milieu sans azote, 74.7 pg/cellule sur milieu sans magnésium et 163.3 pg/cellule sur milieu sans azote et sans

magnésium. D'après Jeeji Bai et al. (2017), une déficience du milieu de culture en azote ou en phosphore améliore l'accumulation d'astaxanthine par les cellules de *H. pluvialis* dans toutes les conditions.

D'autres travaux ont démontré que l'astaxanthine a un rôle protecteur sur les cellules de *H. pluvialis* vis-à-vis des conditions environnementales défavorables. En effet, Fan et ses collaborateurs (1998) ont démontré que l'addition de 10 à 90  $\mu\text{M}$  de diphénylamine, un inhibiteur de la biosynthèse d'astaxanthine, au milieu de culture entraîne la mort des cellules de *H. pluvialis* lors d'une exposition continue à une forte intensité lumineuse.

#### IV.3.2.2. Stress salin associé à un stress lumineux

Il apparaît que la quantité d'astaxanthine produite par la microalgue *H. pluvialis* exposée à une forte intensité lumineuse dépend de la teneur de chlorure de sodium (NaCl) additionnée dans le milieu de culture (fig.22).



**Figure 22:** Quantités d'astaxanthine accumulées par l'isolat de *H. pluvialis* cultivé sur milieux BBM ordinaire (contrôle) ou BBM additionné de 0, 32 ou 64 mM de chlorure de sodium à  $25\pm 2^\circ\text{C}$  et sous un éclairage continu à  $200 \mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$  pendant 14 jours. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm\text{SD}$ .

(\*\* ( $P < 0.01$ ): différence très significative, \* ( $P < 0.05$ ): différence significative, ns : non significative).

La quantité d'astaxanthine accumulée par les cellules de *H. pluvialis* cultivées sur milieu BBM à 16 mM de chlorure de sodium sous une intensité lumineuse de 200  $\mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$  pendant 14 jours est de  $29.23 \pm 4.15$  mg/L. Cette teneur est plus importante ( $P < 0.05$ ) que celle enregistrée sur bouillon BBM ordinaire sous la même intensité lumineuse ( $23.12 \pm 3.57$  mg/L).

La culture de cette microalgue sur milieu BBM additionné de 32 mM de chlorure de sodium avec exposition à une forte intensité lumineuse améliore très significativement ( $P < 0.01$ ) la production de ces caroténoïdes. Les résultats obtenus dans cette expérience montrent que ces cellules ont produit dans ces conditions une quantité d'astaxanthine de l'ordre de  $38,56 \pm 2.39$  mg/L ; ce qui explique l'influence positive de cette concentration en sel sur l'induction de la caroténogénèse chez l'espèce *H. pluvialis*. En effet, plusieurs travaux antérieurs ont démontré que les cellules de *H. pluvialis* se multiplient faiblement en présence de fortes concentrations de chlorure de sodium tandis que leur capacité d'accumulation d'astaxanthine est améliorée (Borowitzka et al., 1991; Vidhyavathi et al., 2008; Tam et al., 2012; Torres-Carvajal et al., 2017).

Les expériences menées par Borowitzka et al. (1991) ont démontré que la chlorophycée *H. pluvialis* a une faible tolérance aux fortes concentrations de chlorure de sodium, car il affecte sa vitesse de croissance et favorise par conséquent son enkystement et sa transformation en aplanospores riches en astaxanthine.

Vidhyavathi et al. (2008) ont démontré que l'addition de 0.8 à 2.5% de NaCl dans le milieu augmente la caroténogénèse chez *H. pluvialis*. De même, Tam et al. (2012) ont apporté que l'addition de concentrations croissantes de NaCl dans le milieu de culture aboutit à une stimulation de la biosynthèse d'astaxanthine.

Toutefois, en présence d'une teneur plus élevée de chlorure de sodium (64 mM) et à forte intensité lumineuse (200  $\mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$ ), la production d'astaxanthine par *H. pluvialis* est atténuée ( $13.48 \pm 6.12$  mg/mL). Ceci pourrait être expliqué par la sensibilité de cette espèce algale aux fortes concentrations de NaCl comme cela a été observé par Torres-Carvajal et al. (2017) qui rapportèrent une forte production d'astaxanthine par *H. pluvialis*

dans ces conditions fortement salines où les cellules algales meurent avant d'atteindre le stade d'aplanospores.

*H. pluvialis* est une microalgue d'eau douce dont l'exposition à une forte salinité provoque une perturbation de son environnement, et par conséquent, une stimulation de la biosynthèse de quantités élevées d'astaxanthine comme un mécanisme de protection contre les espèces réactives d'oxygène et des autres radicaux libres. L'astaxanthine protège les cellules contre l'action de ces derniers (Torres-Carvajal et al., 2017).

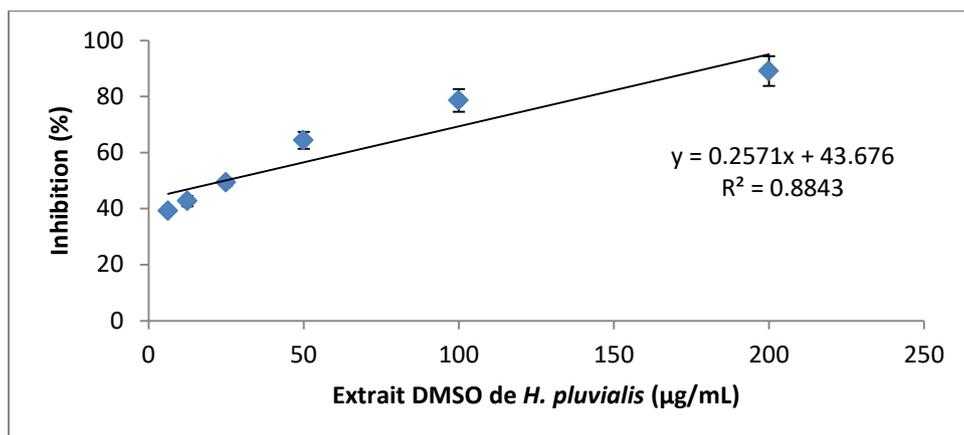
Les caroténoïdes secondaires, telle que l'astaxanthine chez *H. pluvialis*, ont deux principaux rôles chez les organismes photosynthétiques. D'une part, ils agissent comme des pigments accessoires qui interfèrent dans le phénomène de la photosynthèse par inhibition du transfert de la lumière à la cellule et, d'autre part, ils protègent l'équipement photosynthétique contre les dommages causés par les radicaux libres et l'oxygène singulier issus des phénomènes de la photo-oxydation (Immamoglu et al., 2009).

#### **IV.4. Activité antioxydante *In Vitro* de l'extrait DMSO de *H. pluvialis***

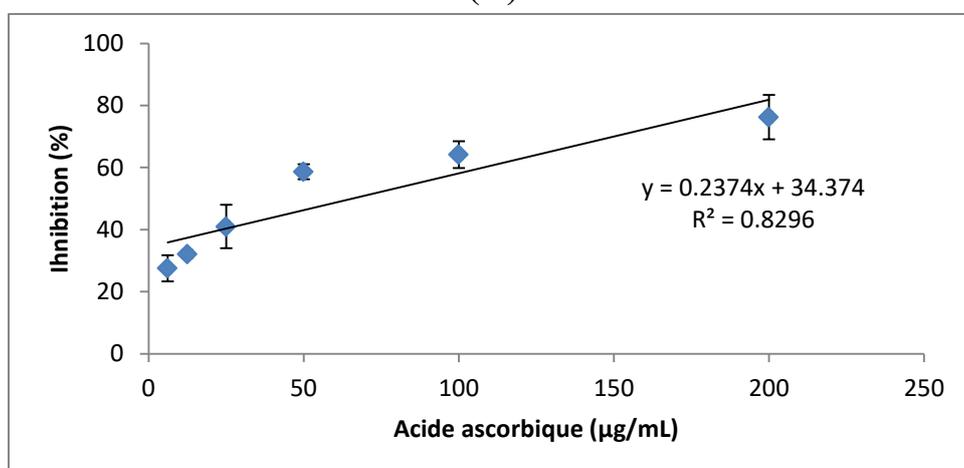
Sur la base des résultats présentés précédemment, les conditions de carence en azote dans le milieu de culture en association à un stress lumineux (200  $\mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$ ) ont été sélectionnées pour obtenir des quantités importantes d'astaxanthine. L'activité antioxydante de l'extrait dimethylsulfoxyde (DMSO) obtenu à partir des kystes de *H. pluvialis* a été déterminée selon différents tests.

##### **IV.4.1. Test de piégeage du radical libre DPPH et détermination de l'IC50**

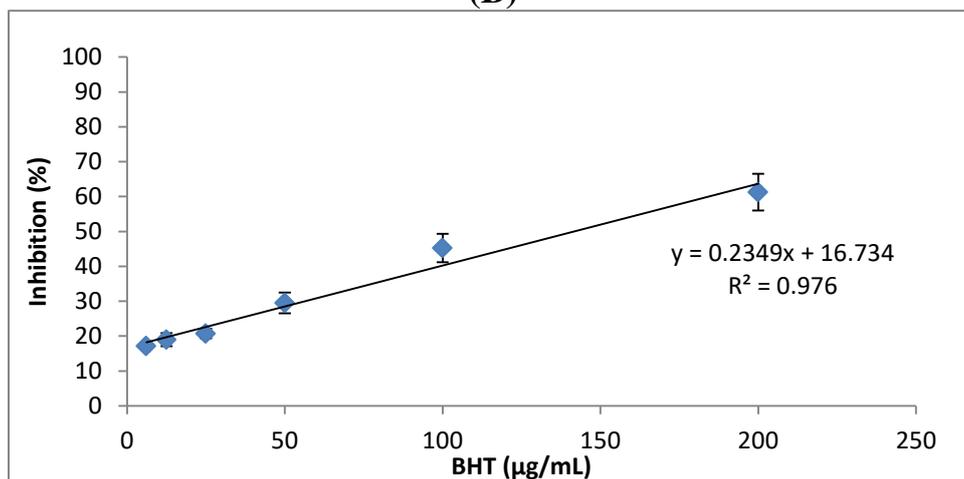
L'activité antioxydante de l'extrait DMSO de *H. pluvialis* a été évaluée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH et les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure exponentielle, ce qui signifie la réduction du radical DPPH par les différentes substances testées (fig.23).



(A)



(B)



(C)

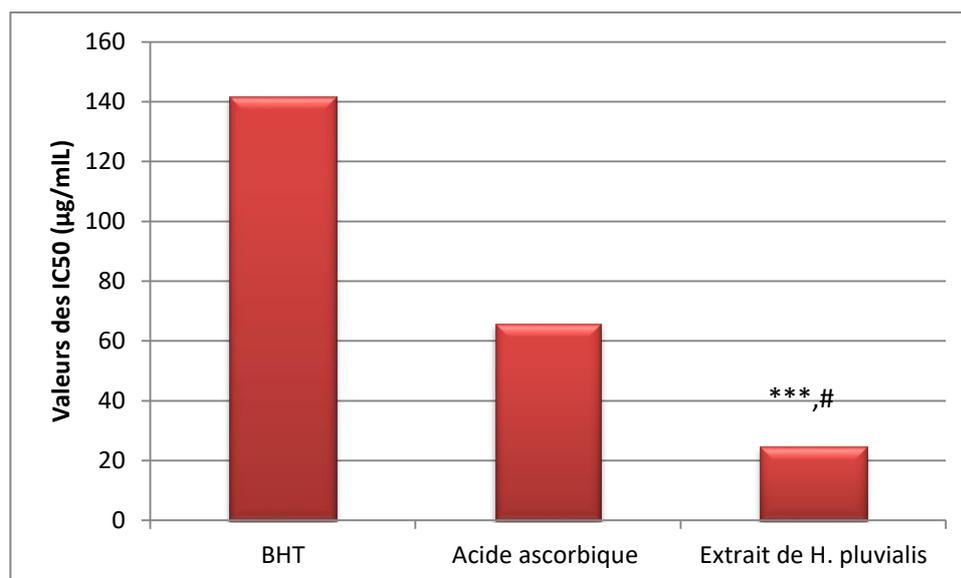
**Figure 23:** Pourcentages de réduction du radical DPPH en fonction de la concentration de l'extrait DMSO de *H. pluvialis* (A), d'acide ascorbique (B) et de butylhydroxytoluène (BHT) (C). Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$ SD.

Le test DPPH mesure l'absorbance à 517 nm. Cette absorbance diminue proportionnellement à la concentration des substances antioxydantes (Liu et al., 2016). Ceci est expliqué par un transfert d'électron ou d'un atome d'hydrogène de l'antioxydant à l'électron célibataire du radical DPPH (DPPH°) en le transformant en une forme réduite non radicalaire (DPPH-H) plus stable et par conséquent une disparition de la couleur violette de la solution de DPPH (Tepe et al., 2005). Shimada et al. (1992) ont attribué l'effet réducteur des radicaux libres à un pouvoir donateur de protons H<sup>+</sup> et d'électrons des composants antioxydants.

Les résultats ont montré qu'à doses d'antioxydants égales, l'extrait DMSO de *H. pluvialis* exerce un pouvoir inhibiteur contre le radical libre DPPH plus important que celui de l'acide ascorbique et du BHT. Ainsi, une excellente capacité inhibitrice du radical DPPH (39.2±5.12%) a été enregistrée à très faible concentration d'extrait algal (6.25 µg/mL). Cette capacité augmente proportionnellement avec la concentration de l'extrait algal. En effet, des pourcentages d'inhibition respectifs de 42.70±3.52, 49.35±1.45, 64.35±4.98 et 78.61±2.23% ont été enregistrés avec des concentrations de 12.5, 25, 50 et 100 µg/mL de l'extrait de *H. pluvialis*. L'inhibition du radical libre DPPH par cet extrait atteint son maximum (89.07±2.23%) à une concentration de 200µg/mL (fig. 23).

À partir des profils des pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les substances testées (équations de courbes de régression), les valeurs des IC50 (concentration d'antioxydant permettant d'inhiber 50% du taux du radical DPPH) de chaque substance sont déduites (fig.24). L'extrait DMSO de *H. pluvialis* possédant la valeur IC50 la plus basse, exerce alors, l'activité anti-radicalaire la plus puissante.

Il apparaît que l'extrait DMSO de *H. pluvialis* présente la valeur d'IC50 la plus faible (24.56 µg/ml) suivi par l'acide ascorbique (68.82µg/mL) et le BHT (141.61µg/mL) ; ce qui montre que le pouvoir d'inhibition du radical libre DPPH par l'extrait algal est plus important que celui des autres antioxydants. Il représente trois fois celui de l'acide ascorbique et six fois celui du BHT.



**Figure 24:** Valeurs des IC<sub>50</sub> (µg/mL) (Inhibition de 50% du radical libre DPPH) du BHT, de l'acide ascorbique et de l'extrait DMSO de *H. pluvialis*.

(\*\*\* (P<0.001): différence très hautement significative entre l'extrait DMSO de *H. pluvialis* et le BHT, # (P<0.05) : différence significative entre l'extrait DMSO de *H. pluvialis* et l'acide ascorbique).

Le fort pouvoir de l'extrait DMSO de *H. pluvialis* de neutralisation du radical libre DPPH peut être expliqué par sa richesse en astaxanthine produite par l'algue en absence d'azote et à intensité lumineuse de 200 µMoles photons/m<sup>2</sup>/s. Des explications similaires ont été apportées par [Ranga Rao \(2011\)](#) et [Zhao et al. \(2016\)](#). Par ailleurs, la capacité de piégeage des radicaux libres par l'astaxanthine a été rapportée par plusieurs travaux. En effet, [Alves-Barbosa et al. \(2015\)](#) ont démontré que l'astaxanthine produite par le champignon *Mucor circinelloides* a une action piégeage du radical libre DPPH très puissante.

[Kamath et al. \(2008\)](#) ont déterminé la valeur IC<sub>50</sub> de l'astaxanthine produite par *H. pluvialis* par le test de piégeage du radical de DPPH et qui est de 8µg/mL. En revanche, [Sila \(2015\)](#) a obtenu une valeur de 15.87µg/mL pour l'astxanthine extraite à partir des crevettes en utilisant ce même test.

Sur le plan statistique, l'analyse comparative entre la capacité antioxydante de l'extrait de la microalgue et celle des standards a montré une différence très hautement significative (P<0.001) entre la capacité réductrice du DPPH par ce caroténoïde par rapport à l'acide

ascorbique et une différence significative ( $P < 0.05$ ) entre le pouvoir de réduction du DPPH par l'extrait algal à celui du BHT.

Les travaux de Zhao *et al.* (2016) ont démontré qu'une concentration de 25 µg/mL d'astaxanthine produite par *H. pluvialis* sous conditions de stress neutralise 57.6 à 60.96% du radical libre DPPH.

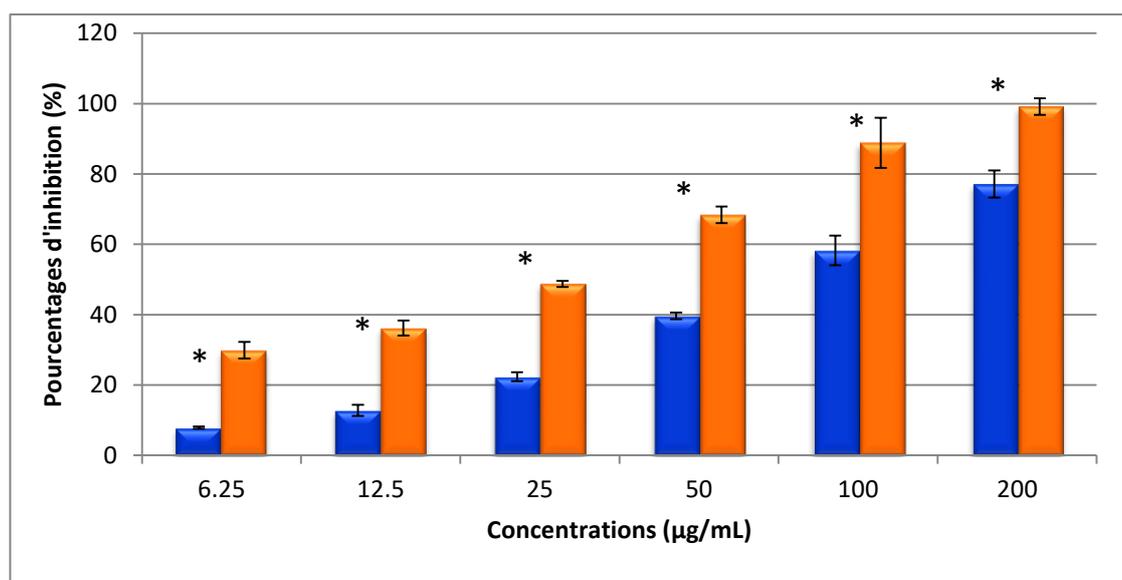
Gramza-Michałowska et Stachowiak (2010) ont étudié l'activité antioxydante d'astaxanthine produite par la levure *Phaffia rhodozyma*, et ont constaté que des concentrations de 0.02, 0.05 et 0.1% d'astaxanthine neutralisent, respectivement 93.33, 94.58 et 98.44% du radical libre DPPH.

Karppi *et al.* (2007) et Liu *et al.* (2016) ont démontré que l'astaxanthine de *H. pluvialis* possède une forte capacité de piégeage des radicaux libres tels que le radical libre DPPH et le radical cation ABTS (Acide 2,2'-azinobis-3-éthylBenzoThiazoline-6-Sulfonique). D'autres travaux (Sarada *et al.* 2006 ; Kang et Sim, 2008) ont démontré que l'astaxanthine produite par *H. pluvialis* sous conditions de stress neutralisent les radicaux libres 500 fois plus que la vitamine E et 38 fois plus que le β-carotène.

#### IV.4.2. Test de blanchiment du β-carotène

Le potentiel antioxydant l'extrait DMSO de *H. pluvialis* a été évalué par la détermination de sa capacité d'inhibition de blanchiment du β-carotène. La présence de molécules antioxydantes joue un rôle protecteur et empêche ou ralentit l'oxydation du β-carotène par les hydroperoxydes. Les hydroperoxydes formés dans ce système seront neutralisés par les antioxydants de l'extrait (Mariod *et al.*, 2009). Cet effet protecteur est mesuré par le taux d'inhibition de la décoloration du β-carotène à la fin de la durée d'incubation.

L'extrait DMSO de *H. pluvialis* et le BHT inhibent le blanchiment du β-carotène. Cette inhibition est proportionnelle à la concentration des substances antioxydantes (fig. 25). Ce même constat a été fait par Sila (2015) qui a montré que la capacité préventive du blanchiment du β-carotène par l'astaxanthine extraite à partir des crevettes est dose-dépendante.



**Figure 25:** Pourcentages d'inhibition du blanchiment du  $\beta$ -carotène par l'extrait DMSO de *H. pluvialis* (■) et par le BHT (■). Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SD.

(\* ( $P < 0.05$ ) : différence significative entre le pourcentage d'inhibition du blanchiment du  $\beta$ -carotène par l'extrait DMSO de *H. pluvialis* et le BHT à même concentration).

Dans cette étude, une différence significative ( $P < 0.05$ ) a été enregistrée entre les pourcentages d'inhibition du blanchiment du  $\beta$ -carotène par l'extrait DMSO de *H. pluvialis* par rapport au BHT.

Des pourcentages d'inhibition respectifs de  $29.87 \pm 2.35$ ,  $36.18 \pm 2.15$ ,  $48.75 \pm 0.83$ ,  $68.34 \pm 2.36$  et  $88.84 \pm 7.15\%$  ont été obtenus en présence de 6.25, 12.5, 25, 50 et 100  $\mu\text{g/mL}$  de l'extrait DMSO de *H. pluvialis* par rapport à seulement  $7.85 \pm 0.32$ ,  $12.78 \pm 1.56$ ,  $22.35 \pm 1.26$ ,  $39.65 \pm 0.98\%$  et  $58.25 \pm 4.26\%$  en présence des mêmes concentrations de BHT, respectivement. Or, l'inhibition du blanchiment du  $\beta$ -carotène est presque totale ( $99.12 \pm 2.36\%$ ) à une concentration de 200  $\mu\text{g/mL}$  d'extrait DMSO de *H. pluvialis* ; alors qu'elle est de  $77.15 \pm 3.84\%$  à la même concentration de BHT.

La prévention du blanchiment du  $\beta$ -carotène par l'extrait DMSO de *H. pluvialis* peut être expliquée par sa richesse en astaxanthine produite dans les conditions de culture défavorables. En effet, Ranga Rao (2011) a démontré la capacité antioxydante de l'extrait

acétone de *H. pluvialis* par le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène *in vitro* et *in vivo*. Cet auteur a obtenu un pourcentage d'inhibition de l'oxydation du  $\beta$ -carotène de l'ordre de 89% à une concentration 9 ppm d'extrait de *H. pluvialis*, et il a attribué cela à la richesse de cet extrait en astaxanthine. Ainsi, il a lié le fort potentiel antioxydant de ce caroténoïde à son caractère donateur d'hydrogènes et d'électrons et à sa réaction avec les radicaux libres en les transformant en produits inactifs, bloquant ainsi les chaînes de réaction des radicaux libres.

Par ailleurs, Sila (2005) trouve que l'astaxanthine extraite à partir des crevettes a une action préventive de blanchiment du  $\beta$ -carotène plus importante que celle exercée par le BHT en obtenant des pourcentages d'inhibition respectifs de 89.2 et 100% en présence de 50 et 100  $\mu\text{g/mL}$  d'astaxanthine de crevette.

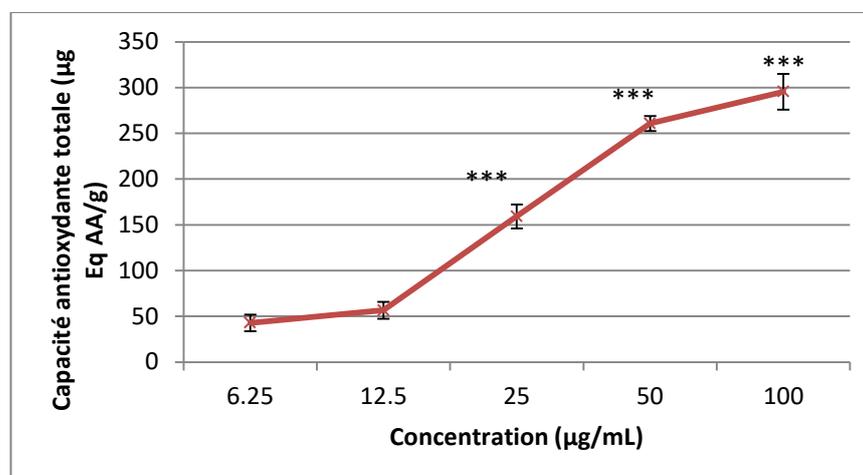
Liyana-Pathirana et Shahidi (2006) considère qu'une substance qui retarde ou inhibe le blanchissement du  $\beta$ -carotène peut être décrite comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant secondaire. Selon Palozza et Krinsky (1992), l'astaxanthine est un antioxydant hautement efficace dans la protection de la peroxydation des phospholipides membranaires et d'autres lipides.

Le grand pouvoir antioxydant de l'astaxanthine est attribué à sa structure chimique comportant plusieurs doubles liaisons conjuguées et deux fonctions cétoniques et hydroxyliques. Sa capacité antioxydante est plus importante que celle de l'acide ascorbique, l' $\alpha$ -tocophérol et des autres caroténoïdes (Miki, 1991 ; Goto *et al.* 2001). L'astaxanthine est un excellent antioxydant qui protège tous les composants cellulaires et la membrane cytoplasmique des dommages causés par les radicaux libres (Miki, 1991).

#### **IV.4.3. Test de la capacité antioxydante totale (CAT)**

La capacité antioxydante totale de l'extrait DMSO de *H. pluvialis* varie en fonction de sa concentration. En effet, des concentrations de 25, 50 et 100  $\mu\text{g/mL}$  de l'extrait algal ont une capacité antioxydante totale très hautement significative ( $P < 0.001$ ) par rapport aux valeurs enregistrées en présence de 2.25 et 12.5  $\mu\text{g/mL}$  de l'extrait algal. Ainsi, des valeurs respectives de  $159.63 \pm 12.98$ ,  $260.7 \pm 8.36$  et  $295.45 \pm 19.58$   $\mu\text{g Eq AA/g}$  en présence de 25, 50 et 100  $\mu\text{g/mL}$  de l'extrait de *H. pluvialis* par rapport à  $42.84 \pm 9.12$  et  $56.63 \pm 8.23$   $\mu\text{g Eq AA/g}$

enregistrées à des concentrations de 6.25 et 12.5 µg/mL de l'extrait de *H. pluvialis* respectivement (fig.26).



**Figure 26:** Capacité antioxydante totale (CAT) de l'extrait DMSO de *H. pluvialis* (µg Eq AA/g d'extrait). Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations ± SD.

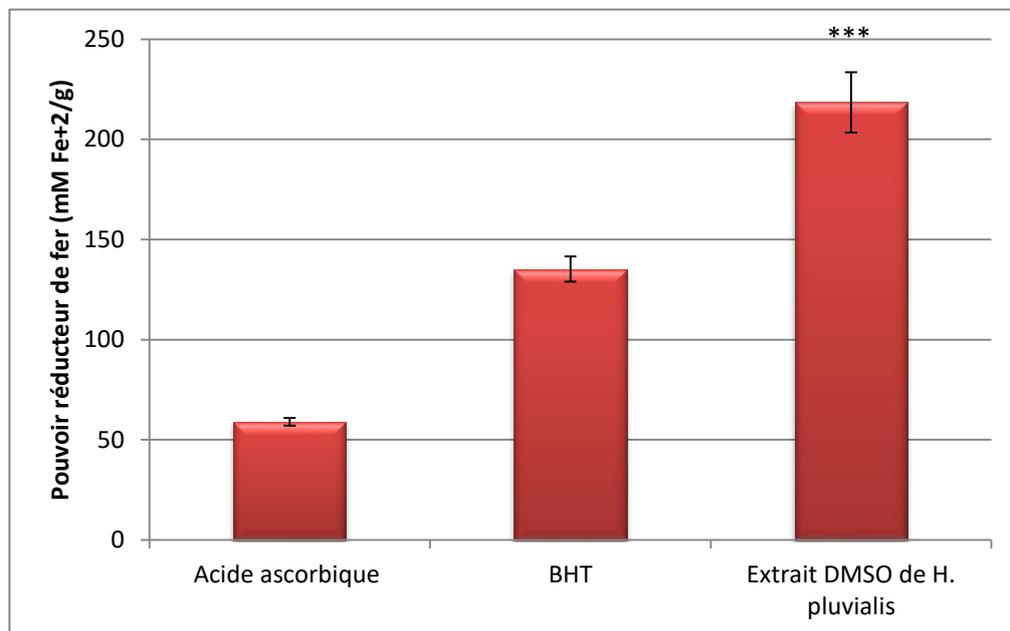
(\*\*\* (P<0.001): Différence très hautement significative).

L'absence de confrontation de nos résultats à ceux d'autres auteurs s'explique par l'absence dans la littérature d'études réalisées sur la capacité antioxydante totale de l'extrait de *H. pluvialis* ou celle d'autres microorganismes.

#### IV.4.4. Test du pouvoir réducteur du fer (test FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power)

La capacité de donation des électrons dans une réaction d'oxydoréduction peut être aussi utilisée dans la mesure de l'activité antioxydante d'un composé. Cette capacité est appelée pouvoir réducteur (Shimada et al., 1992). Elle a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP qui est basée sur la réduction du fer ferrique ( $Fe^{3+}$ -TPTZ) en fer ferreux ( $Fe^{2+}$ -TPTZ) en présence de réducteurs. Par conséquent, la concentration de  $Fe^{2+}$  peut être évaluée en mesurant et en surveillant l'augmentation de l'intensité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 593 nm (Chung et al., 2002). L'activité réductrice exprimée mM  $Fe^{2+}$ /g d'extrait, d'acide ascorbique ou de BHT ont été calculée.

Les résultats montrent que l'extrait DMSO de *H. pluvialis* a un effet très hautement significatif ( $P < 0.001$ ) sur la réduction du fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) en fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) par rapport aux antioxydants standards (BHT et acide ascorbique) (fig.27).



**Figure 27:** Pouvoir réducteur du fer par l'acide ascorbique, le BHT et par l'extrait DMSO de *H. pluvialis*. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations ± SD.

(\*\*\* ( $P < 0.001$ ): différence très hautement significative entre l'extrait DMSO de *H. pluvialis* et l'acide ascorbique et le BHT).

En effet, la capacité de réduction de fer la plus importante a été obtenue en présence de l'extrait de *H. pluvialis* ( $218.4 \pm 5.08$  mM  $Fe^{2+}$ /g d'extrait) suivi par le BHT ( $135.26 \pm 12.26$  mM  $Fe^{2+}$ /g de BHT) et l'acide ascorbique ( $59.0 \pm 1.87$  mM  $Fe^{2+}$ /g d'acide ascorbique).

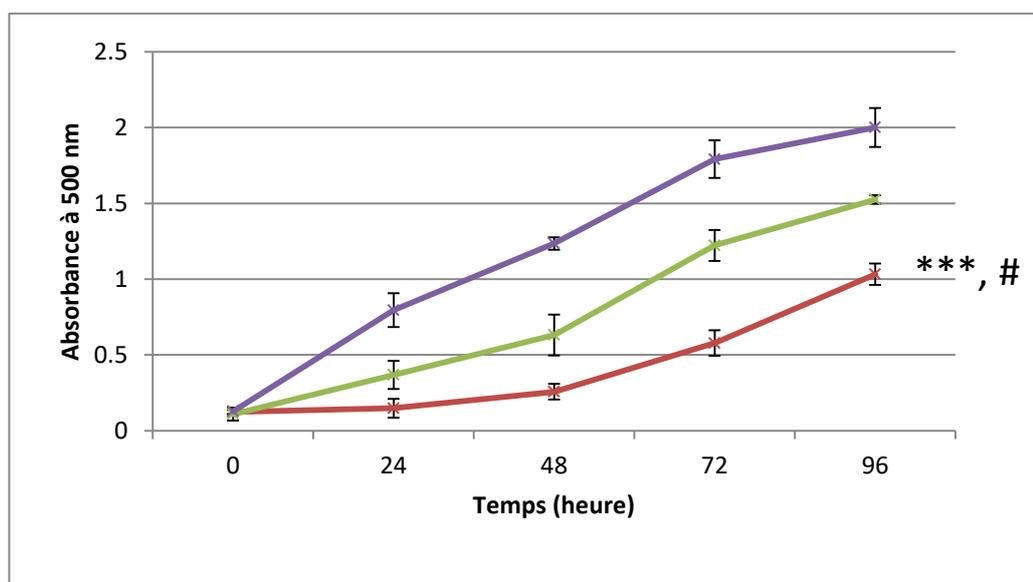
Le pouvoir réducteur de l'extrait DMSO de *H. pluvialis* est probablement dû à sa richesse en astaxanthine dont la structure chimique comporte des groupements hydroxyles qui peuvent servir de donneurs d'électrons (Guérin *et al.*, 2003; Ranga Rao, 2011).

Des résultats similaires aux nôtres ont été obtenus par Sila (2015) qui a montré que la capacité réductrice du fer par l'astaxanthine extraite à partir des crevettes était plus importante que celle du BHT.

#### IV.4.5. Test d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique (méthode au FTC)

La méthode au FTC (Ferric thiocyanate) mesure la quantité de peroxydes produits pendant les phases initiales d'oxydation des lipides. L'effet de l'extrait DMSO de *H. pluvialis* et de l'acide ascorbique sur la prévention de la peroxydation de l'acide linoléique a été déterminé par la méthode FTC.

Il apparaît que l'absorbance du contrôle (absence de substances antioxydantes) augmente au fur et à mesure de l'incubation. Ce résultat est expliqué par la formation de peroxydes de l'acide linoléique. Toutefois, l'extrait DMSO de *H. pluvialis* inhibe très significativement ( $P < 0.001$ ) la formation de ces peroxydes dans le système d'émulsion d'acide linoléique par rapport à l'échantillon contrôle (fig. 28).



**Figure 28:** Evolution des teneurs en produits d'oxydation de l'acide linoléique (mesurées par l'absorbance à 500 nm) du contrôle (■), en présence d'acide ascorbique (■) ou d'extrait DMSO de *H. pluvialis* (■) dans le système FTC. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SD.

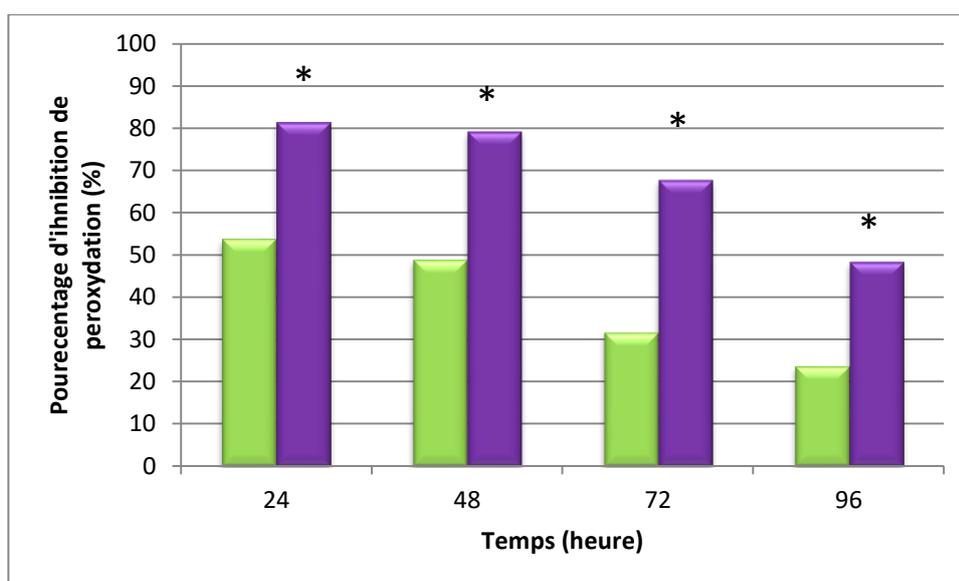
(\*\* ( $P < 0.01$ ) : Différence très significative entre l'extrait DMSO de *H. pluvialis* et le contrôle, # ( $P < 0.05$ ) : différence significative entre l'extrait DMSO de *H. pluvialis* et l'acide ascorbique).

Ainsi, l'inhibition de la formation de ces composés par cet extrait algal est significativement importante ( $P < 0.05$ ) par rapport à l'acide ascorbique. Après 96 heures

d'incubation, une absorbance de  $1.032 \pm 0.071$  en présence de l'extrait DMSO de *H. pluvialis* a été enregistrée par rapport à  $1.525 \pm 0.028$  et  $2.001 \pm 0.129$  enregistrées en présence d'acide ascorbique et dans l'échantillon contrôle, respectivement (fig. 28).

Au cours de la période d'incubation, et à des intervalles de temps de 24 heures, les pourcentages d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique par l'extrait DMSO de *H. pluvialis* ou par l'acide ascorbique ont été calculés (fig. 29).

Il a été noté que l'effet inhibiteur de la peroxydation des lipides par l'extrait DMSO de *H. pluvialis* est significativement important ( $P < 0.05$ ) par rapport à celui de l'acide ascorbique durant toute la période d'incubation. En effet, des pourcentages d'inhibition respectifs de 81.38, 79.19, 67.74 et 48.42% après 24, 48, 72 et 96 h d'incubation en présence de 40mg/mL d'extrait algal ont été obtenus par rapport à seulement 53.71, 48.82, 31.75 et 23.78% d'inhibition obtenus aux mêmes intervalles d'incubation en présence des mêmes concentrations d'acide ascorbique, respectivement.



**Figure 29:** Pourcentage d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique par l'acide ascorbique (■) et l'extrait DMSO de *H. pluvialis* (■) au cours de l'incubation.

(\* ( $P < 0.05$ ): Différence significative entre les pourcentages d'inhibition de la peroxydation par l'extrait DMSO de *H. pluvialis* et l'acide ascorbique).

Ces résultats pourraient être liés à la forte concentration en astaxanthine de l'extrait algal. Le pouvoir antioxydant de l'astaxanthine a été rapporté par de nombreuses études (Liang *et al.*, 2009; Leite *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014, Trung *et al.*, 2017 ) dont, certaines faites *in vitro* (Zhao *et al.*, 2016) et *in vivo* (Goto *et al.*, 2001), ont bien mis en évidence le rôle de l'astaxanthine et en particulier celle extraite de la microalgue *H. pluvialis* dans la prévention de la peroxydation des lipides.

L'astaxanthine produite par *H. pluvialis* joue un rôle plus important que celui de la vitamine E et des autres caroténoïdes tels que le  $\beta$ -carotène, la lutéine et le lycopène dans la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (Yang *et al.*, 2013 ; Focsan *et al.*, 2017). Ceci est attribué à la structure chimique de l'astaxanthine constituée d'une chaîne hydrocarbonée ayant plusieurs diènes conjugués, et à la présence des groupements hydroxyles (-OH) et cétoniques (CO) liés aux anneaux terminaux de la molécule (Martin *et al.*, 1999 ; Husein *et al.*, 2006 ; Ranga Rao *et al.*, 2014).

D'après Naguib (2000), l'astaxanthine est un puissant piègeur de l'oxygène singulier. Il a été démontré que cette xanthophylle neutralise deux fois plus efficacement l'oxygène singulier que le  $\beta$ -carotène (Di Mascio *et al.*, 1991). Par ailleurs, le pouvoir antioxydant de l'astaxanthine a été démontré sur des modèles cellulaires exposés à différents stress oxydatifs. Ce caroténoïde prévient la photooxydation provoquée par des rayons UV sur les fibroblastes dermiques et les kératinocytes. Cette molécule a aussi un pouvoir de répression de la production des espèces réactives de l'oxygène et améliore l'expression des enzymes antioxydants dans les cellules rétiniques (Terazawa *et al.*, 2012), les neurones (Ye *et al.*, 2012), les cellules immunitaires (Baros *et al.*, 2012) et les hépatocytes (Turkez *et al.*, 2014).

Dans une étude *in vivo* réalisée par Rang Rao *et al.* (2010) chez des rats recevant de la biomasse de *H. pluvialis* dans leur régime comme source d'astaxanthine, des taux sériques et hépatiques élevés en enzymes antioxydants, tels que la catalase, le superoxyde dismutase, la peroxydase et des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (Thiobarbituric Acid Reactive Substances ou TBARS) ont été enregistrés.

L'activité antiradicalaire *in vivo* de l'astaxanthine issue de *H. pluvialis* est plus forte que celle du  $\beta$ -carotène et de la lutéine (Ranga Rao *et al.*, 201 ; Ranga Rao *et al.*, 2013). Elle

contribue à la diminution de la production des espèces réactives de l'oxygène dans l'organisme (Lin et al., 2020).

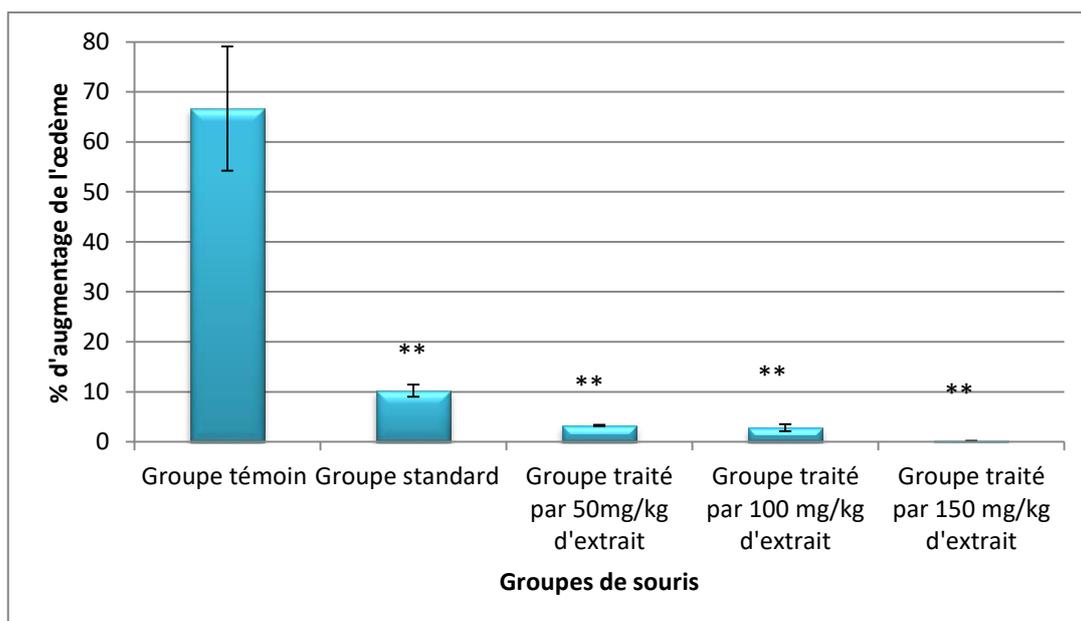
#### **IV.5. Activités biologiques *In Vivo* de l'extrait DMSO de *H. pluvialis***

##### **IV.5.1. Activité anti-inflammatoire**

L'étude de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait DMSO de *H. pluvialis* a été réalisée par mesure du volume de l'œdème induit par injection de la carragénine dans la patte postérieure gauche de la souris ce qui provoque une expression maximale de la cyclooxygénase-2 (COX-2) (Nantel et al., 1999).

L'injection de 0,1mL d'une solution de carragénine à 1 % (P/V) au niveau de la patte postérieure gauche des souris, provoque une inflammation visible dans les quelques heures qui suivent. Le volume de l'œdème augmente progressivement pour devenir maximal au bout de cinq heures. Les signes de l'inflammation (rougeur, gonflement et déformation de la patte) sont apparus chez tous les groupes quelques heures après son induction par la carragénine.

Ces symptômes (exprimés en % d'augmentation de l'œdème par rapport au témoin) sont très significativement ( $P < 0.01$ ) diminués chez les groupes de souris traitées par 5mg/Kg poids vif de diclofénac de sodium ( $10.25 \pm 1.21\%$ ) ou par l'extrait algal utilisé à 50 ( $3.26 \pm 0.13\%$ ), 100 ( $2.8 \pm 0.7\%$ ) ou 150 mg/Kg de poids vif ( $0.2 \pm 0.01\%$ ) par rapport au groupe de souris témoin ( $66.66 \pm 12.42\%$ ) (fig.30).



**Figure 30:** Taux d'augmentation de l'œdème (en % par rapport au témoin) en fonction des groupes de souris. Les valeurs représentent la moyenne de 5 déterminations  $\pm$  SD.

(\*\* ( $P < 0.01$ ) : différence très significative).

L'extrait DMSO de la microalgue *H. pluvialis* et le médicament anti-inflammatoire (diclofenac de sodium) s'opposent à l'augmentation du volume de l'œdème de la patte de la souris induit par la carragénine à 1% (P/V) qui est un mucopolysaccharide sulfaté provenant d'une Rhodophyceae ; elle provoque une inflammation typiquement liée à l'activation de la cyclooxygénase (Di Rosa, 1972; Elion Itou et al., 2014).

Plusieurs travaux ont mis en évidence l'effet anti-inflammatoire de l'astaxanthine (Lee et al., 2013; Ranga Rao et al., 2014 ; Wen et al., 2017). L'inflammation est biphasique car chez l'animal, la carragénine agit en 2 phases :

- Phase 1 : induction de la synthèse de médiateurs chimiques tels que l'histamine et la sérotonine qui entretiennent l'inflammation (Di Rosa, 1972). Cette phase est sensible aux antagonistes de synthèse des prostaglandines tels que les anti-inflammatoires naturels ou de synthèse.

- Phase 2 : induction de la synthèse de prostaglandines principalement, de protéases et de lysosomes (Della Loggia et al., 1968 ; Alcaraz et Jimenez, 1988 ; Reto et al., 2014).

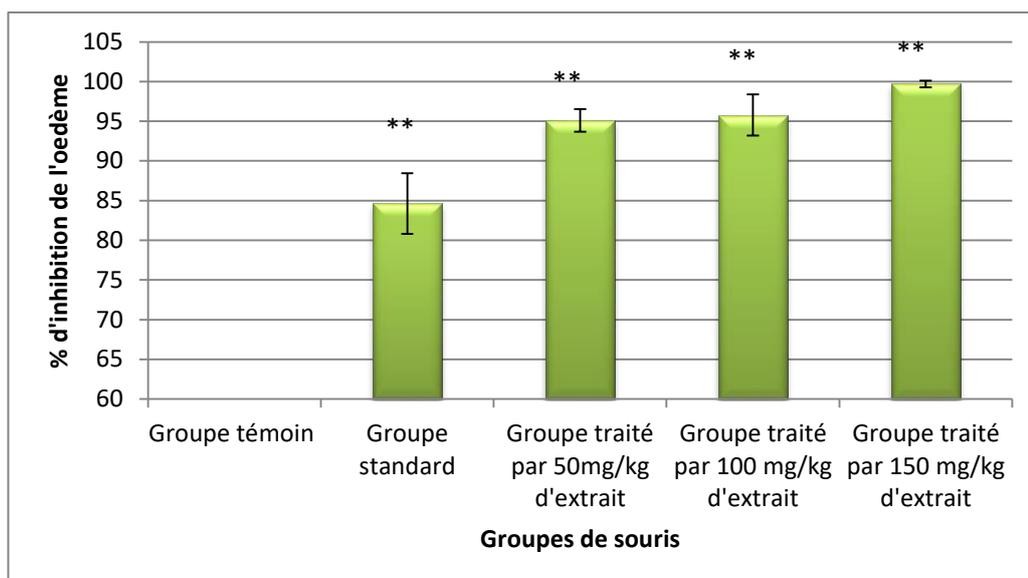
Selon Yatasaye (2004), l'enzyme membranaire, la phospholipase A2 (PLA2), activée sous l'effet de divers stimuli, déclenche la libération de l'acide arachidonique qui peut être métabolisé selon 2 voies :

-La voie de la lipooxygénase : aboutit aux lipoxynes (inhibitrices des lymphocytes T cytotoxiques) et aux leucotriènes (chimiotactiques, bronchoconstrictrices, vasomotrices et accroissent la perméabilité capillaire).

-La voie de la cyclooxygénase qui permet la formation de prostaglandines (PG) comme la PGI2 (prostacycline) et les PG D, E, F ; ainsi qu'au thromboxane A2. Les prostaglandines ont une action locale sur les lieux même de leur formation, et leur distribution ubiquitaire dans l'organisme rend compte des nombreuses propriétés des AINS (Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens).

Afin d'estimer le rôle de l'extrait DMSO de *H. pluvialis* sur l'inhibition de l'inflammation chez les souris, les pourcentages d'inhibition de la formation de l'œdème par rapport au groupe contrôle ont été calculés et reportés sur la [figure 31](#).

Les résultats obtenus montrent clairement qu'un traitement des souris par le diclofénac de sodium (5mg/Kg poids vif) ou par d'extrait algal à différentes doses (50, 100 et 150 mg/kg) par voie orale a un effet hautement significatif ( $P < 0.01$ ) sur la réduction du volume de l'œdème par rapport au groupe témoin. Des pourcentages d'inhibition supérieurs à 95% chez les groupes traités par 50 et 100 mg/kg d'extrait algal ont été obtenus ; alors que la concentration de 150 mg/kg d'extrait algal inhibe presque totalement la formation de l'œdème ( $99.69 \pm 0.31\%$ ).



**Figure 31:** Inhibition de l'œdème (en % par rapport au témoin) en fonction des groupes de souris. Les valeurs représentent la moyenne de 5 déterminations  $\pm$  SD.

(\*\* ( $P < 0.01$ ) : différence très significative).

L'inflammation est caractérisée par la libération de cytokines pro-inflammatoires tels que le facteur TNF- $\alpha$ , les interleukines (IL-1 $\beta$ , IL-6) et d'autres médiateurs inflammatoires, y compris l'oxyde nitrique (NO) et la prostaglandine E2 (PGE2), ceux-ci sont synthétisés par l'oxyde nitrique synthétase et la cyclooxygénase (COX) respectivement.

Ces médiateurs et cytokines inflammatoires sont impliqués dans plusieurs maladies tels que le rhumatisme articulaire, l'asthme, athérosclérose...etc. (Simons *et al.*, 1996; Guslandi, 1998; Ritchlin *et al.*, 2003).

En inhibant la cyclooxygenase, et par conséquent, le blocage de la synthèse des prostaglandines et du thromboxane A2 à partir de l'acide arachidonique, tous les AINS exercent une action anti-inflammatoire (Samaké, 2002; Yatasaye, 2004 ; Fournier *et al.*, 2008).

L'activité anti-inflammatoire observée dans ce travail serait liée à sa forte teneur en astaxanthine produite suite à l'exposition de la microalgue à la carence en azote associée à une forte intensité lumineuse.

L'étude *In Vivo* réalisée par [Sindhu et sherief \(2011\)](#) sur l'effet anti-inflammatoire de l'astaxanthine produite par *aristeus alcocki* a montré que des concentrations de 0.5 et 1mg/kg de poids vif inhibent l'inflammation à 47.83 et 67.11% respectivement ; et qu'à la concentration de 1 mg /kg de poids vif, l'astaxanthine a un effet anti-inflammatoire plus important que celui du diclofenac de sodium.

Des études antérieures ([Mercié et al., 1998](#); [Sarker et al., 2008](#)) ont attribué les propriétés anti-inflammatoires de l'astaxanthine à l'inhibition du facteur de transcription nucléaire kappa ou NF-kB (*nuclear factor kB*) qui est un régulateur essentiel des gènes impliqués dans la réponse à l'infection, à l'inflammation et au stress. D'autres auteurs ([Mino et al., 1998](#); [Guastadisegni et al., 2002](#); [Lee et al., 2013](#)) incriminent également l'inhibition de la production des cytokines et des chimiokines inflammatoires, la suppression des activités de l'iNOS (nitric oxide synthase) et des cyclooxygénases (COX) avec comme conséquence la diminution de l'accumulation de l'oxyde nitrique (NO) et de prostaglandine E2 (PGE2) qui sont produits par les macrophages immunitaires dans les sites inflammatoires.

L'effet anti-inflammatoire de l'astaxanthine est aussi attribué à une diminution de la production de ROS/RNS (*Reactive oxygen species/ reactive-nitrogen species*) qui jouent un rôle crucial dans l'inflammation ([Satoh et al., 2016](#)).

[Lee et al. \(2003\)](#) ont étudié *In Vitro* et *In Vivo* l'effet régulateur de la production de l'oxyde nitrique (NO), de la prostaglandine (PGE2), du facteur TNF- $\alpha$  et des interleukines (IL-1 $\beta$ ), ainsi que l'expression l'iNOS (nitric oxide synthase) et de la cyclooxygénase 2 par l'astaxanthine. Ces auteurs ont montré que ce caroténoïde inhibe l'expression et la production de ces médiateurs pro-inflammatoires et des cytokines dans les macrophages RAW264.7 dans lesquels l'inflammation est induite par des lipopolysaccharides bactériens (LPS).

Une étude réalisée par [Chan et al. \(2012\)](#) a montré que l'administration de 0.01 et 0.05% d'astaxanthine à des rats diabétiques diminue les concentrations plasmatiques des IL-6, TNF- $\alpha$  et de la protéine réactive C (CRP).

Les travaux de [Miyachi et al. \(2015\)](#) sur l'effet de l'astaxanthine sur l'inflammation chronique induite par le lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* O55 sur des kératinocytes

gingivaux humains ont montré que le facteur  $\kappa$ B/p65 et le taux des cytokines inflammatoires (IL-6 et facteur TNF- $\alpha$ ) ont été réduit.

Kuedo *et al.* (2016) ont étudié l'effet de l'astaxanthine extraite à partir de *Litopenaeus Vannamei* sur l'œdème induit par injection de la carragénine dans la patte des souris. Ces auteurs ont montré que l'astaxanthine a un effet important sur l'inhibition de la formation de l'œdème, et sur la sensation de la douleur. Son effet est comparable à celui de l'indométhacine. Cependant, cette dernière a des effets secondaires indésirables sur le système cardiovasculaire et le système gastro-intestinal. Ainsi, ce puissant antioxydant peut être utilisé comme alternative aux anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).

Somolonoc *et al.* (2018) ont étudié l'effet synergétique de l'astaxanthine, du lycopène de la tomate et de l'acide carsonic à faibles concentrations sur la libération de médiateurs inflammatoires synthétisés par des macrophages chez la souris. Ils ont observé qu'une supplémentation du régime alimentaire des souris par l'astaxanthine inhibe la sécrétion de NO, PGE2 et TNF- $\alpha$  une heure après injection de la carragénine.

Les radicaux libres peuvent aussi agir comme des messagers secondaires ; ce qui provoque la production d'autres médiateurs impliqués dans la réponse inflammatoire. De plus, Garcia *et al.* (1996) ont montré que l'activation du métabolisme de l'acide arachidonique par les ROS libère des prostaglandines et des cytokines telles que IL-1, IL-6 et TNF (*Tumor necrosis factor*). L'astaxanthine, par son fort pouvoir antioxydant réduit la production de radicaux libres lors de l'inflammation (Guerin *et al.* 2003).

L'inflammation ne joue pas seulement un rôle dans les maladies inflammatoires, mais aussi dans la progression du cancer. Plusieurs étapes inflammatoires se sont révélées capables de provoquer le cancer, telles que la maladie inflammatoire de l'intestin dans le cancer colorectal, la gastrite induite par *H. pylori* dans le cancer gastrique, ou prostatite qui peut induire le cancer de la prostate. En outre, une alimentation riche en antioxydants et anti-inflammatoires tel que les caroténoïdes peut réduire le risque de développer des maladies neuro-dégénératives liées à l'âge, comme la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson (Guerin *et al.*, 2003; Ranga Rao *et al.*, 2014; Raposo *et al.*, 2015; Satoh *et al.*, 2016).

#### IV.5.2. Activité antalgique

Les contractions abdominales induites par injection intrapéritonéale d'acide acétique chez la souris est la méthode utilisée pour évaluer l'effet antalgique de l'extrait de *H. pluvialis*. Cette injection provoque un syndrome douloureux qui se traduit par des contorsions caractéristiques de type de mouvements d'étirement des pattes postérieures et de la musculature dorso-ventrale. Le nombre d'étirements est comptabilisé pendant 15 minutes à partir de la cinquième minute d'injection d'acide acétique (Dialo et Diof, 2000).

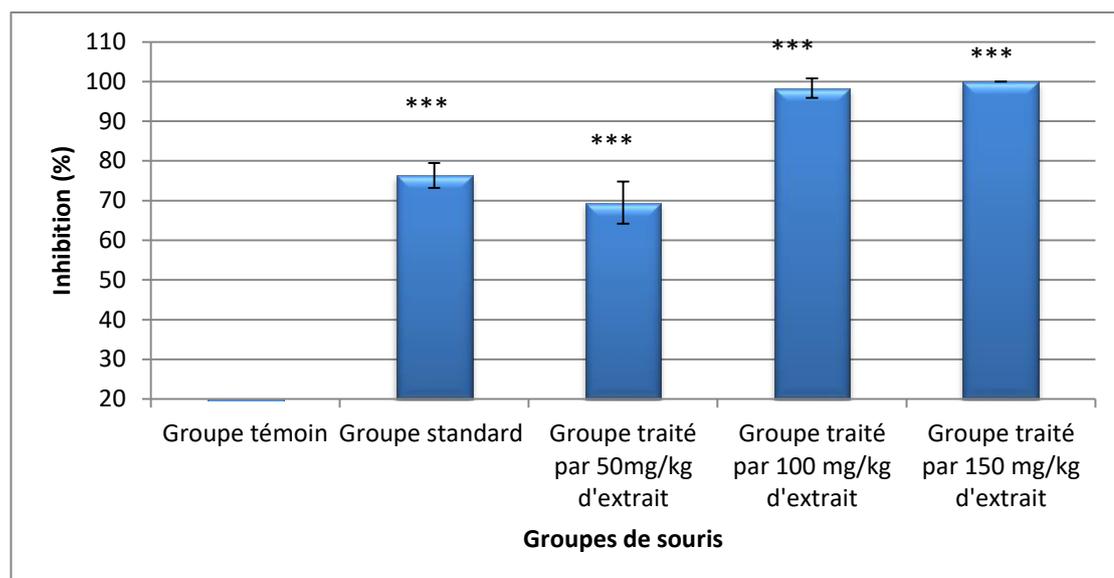
Après injection intrapéritonéale d'acide acétique  $34.75 \pm 6.85$  crampes abdominales ont été comptabilisées au bout de 15 minutes chez le lot témoin.

La douleur provoquée par injection de l'acide acétique est expliquée par la libération de la sérotonine, de l'histamine, de la bradykinine, de la substance P et des prostaglandines ( $PGE2\alpha$ ,  $PGF2\alpha$ ). Ces médiateurs chimiques stimulent les neurones nociceptifs périphériques et induisent l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Fredirico et al., 2009 et Wantana et al., 2009).

Selon Kouakou et al. (2010), le mécanisme d'apparition de la douleur résulte d'une lésion tissulaire responsable d'une augmentation de la libération de nombreux médiateurs chimiques tels que: l'histamine, la prostaglandine et la sérotonine, dans le liquide intrapéritonéal, qui vont stimuler les récepteurs nociceptifs situés au niveau péritonéale.

Les résultats obtenus dans ce travail montrent qu'un traitement des souris par l'ibuprofène ou l'extrait DMSO de *H. pluvialis* à différentes concentrations réduit ( $P < 0.001$ ) les spasmes par rapport au groupe témoin (fig. 32).

Dans le lot standard, l'ibuprofène a réduit de  $76.31 \pm 3.12\%$  les contorsions par rapport au groupe contrôle. Dans une expérience analogue, Olive (2006) a attribué cet effet à une inhibition de la synthèse des prostaglandines endogènes par blocage des cyclo-oxygénases 1 et 2. Par ailleurs, une activation des structures noradrénergiques et sérotoninergiques centrales jouerait aussi un rôle dans l'effet analgésique de l'ibuprofène.



**Figure 32:** Inhibition des contorsions (% par rapport au témoin) provoquées par injection intrapéritonéale d'acide acétique chez les différents lots de souris. Les valeurs représentent la moyenne de 5 déterminations  $\pm$  SD.

(\*\*\* ( $P < 0.001$ ): différence très hautement significative).

L'administration orale de 50, 100 ou 150 mg/kg de poids vif d'extrait DMSO de *H. pluvialis* aux souris diminuent très significativement ( $P < 0.01$ ) le nombre de spasmes par rapport au groupe témoin. Les pourcentages d'inhibition des spasmes calculés chez ces trois groupes sont de  $69.49 \pm 5.31$ ,  $98.33 \pm 2.48$  et  $100 \pm 0\%$ , respectivement.

Kuedo *et al.* (2016) ont attribué l'effet de l'astaxanthine produite par l'algue rouge *Litopenaeus vannamei* sur la sensation de la douleur chez la souris à une inhibition du processus inflammatoire par l'astaxanthine et à une réduction de la production de cytokines inflammatoires. Les propriétés antioxydantes de l'astaxanthine sont aussi impliquées dans l'effet analgésique qu'elle exerce.

Chui *et al.* (2017) ont étudié l'effet analgésique de l'astaxanthine sur la douleur névropathique induite par la vincristine chez la souris, un traitement antimitotique utilisé chez les cancéreux, et ont remarqué que la diminution de la sensation de la douleur était astaxanthine-dose dépendante et résultait de l'inhibition de l'activation et la production de cytokines TNF- $\alpha$  et MCP.

Hernandez-Ortega et al. (2010) ont attribué l'effet analgésique des caroténoïdes de piments à l'inhibition de la production locale de prostaglandines par les caroténoïdes.

En outre, une alimentation riche en antioxydants et composés dérivés de fruits, légumes et extraits des plantes peut réduire le risque de développer des maladies neuro-dégénératives liées à l'âge, comme la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson (Joseph et al., 2007).

#### **IV.5.3. Activité gastroprotectrice**

Les affections gastro-intestinales sont une des causes les plus importantes de morbidité et les produits pharmaceutiques utilisés pour traiter ces maladies peuvent produire de nombreux effets indésirables. De ce fait, les composés naturels qui possèdent une activité antiulcéreuse peuvent être d'une importance particulière.

Le degré de protection de la muqueuse gastrique par l'astaxanthine extraite à partir de la microalgue *H. pluvialis* contre les ulcérations causées par un agent ulcérogène (éthanol absolu) a été évalué dans ce travail en procédant à des observations macroscopique des lésions externes et microscopique des lésions tissulaires et cellulaires occasionnées.

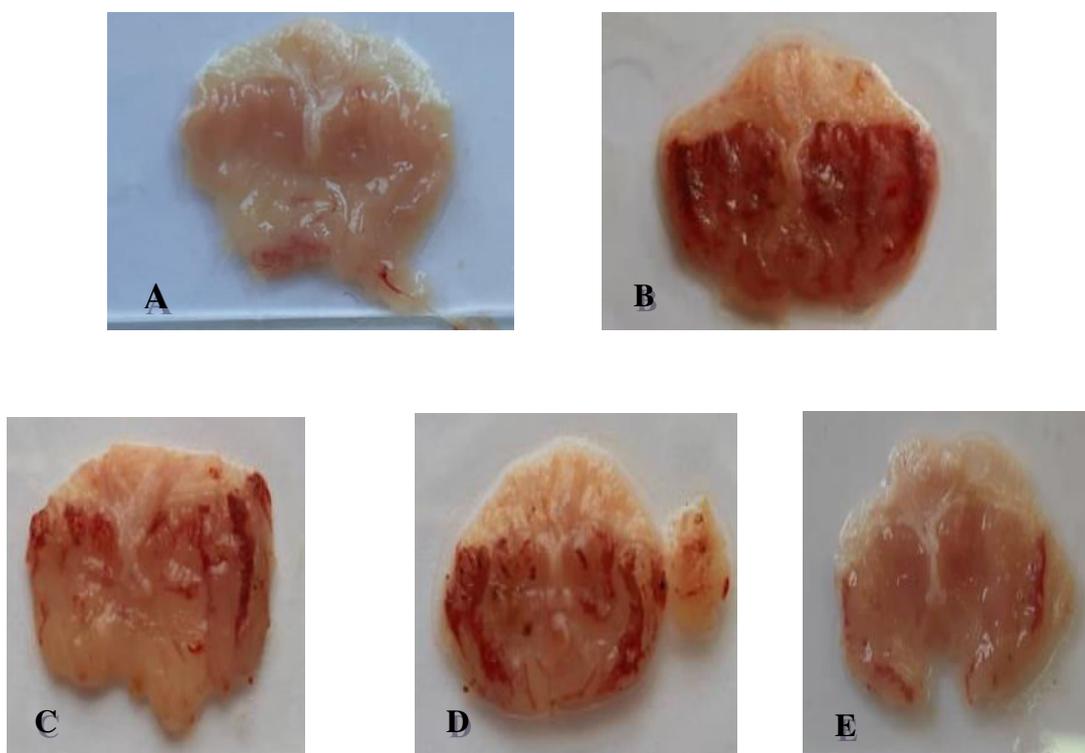
L'effet préventif de l'extrait algal contre l'ulcération induite par l'éthanol absolu est déterminé par l'estimation des indices d'ulcère après l'analyse d'images des estomacs des souris des différents lots par le logiciel Image J et des coupes histologiques des estomacs.

##### **IV.5.3.1. Observation macroscopique**

L'examen macroscopique montre que l'estomac des souris non éthanol-ulcérées et non traitées à l'extrait algal ou à l'oméprazole (fig.33A) a un aspect normal sans aucune lésion par rapport au groupe témoin (souris éthanol-ulcérées mais non traitées avec l'extrait algal) (fig.33B) où il y a présence de lésions gastriques caractéristiques dans la portion glandulaire de l'estomac, représentées par des ulcérations, rougeur de la muqueuse, œdèmes, hémorragies, et des érosions.

Les lésions gastriques observées sur les estomacs des souris éthanol-ulcérées mais prétraitées par l'oméprazole (fig. 33C) ou par l'extrait algal à des concentrations de 250 µg/kg de poids vif (fig. 33D) ou 500 µg/kg de poids vif (fig. 33E) sont moins importantes et les

ulcérations sont réduites par rapport au groupe de souris éthanolo-ulcérées et non traitées (fig.33B).



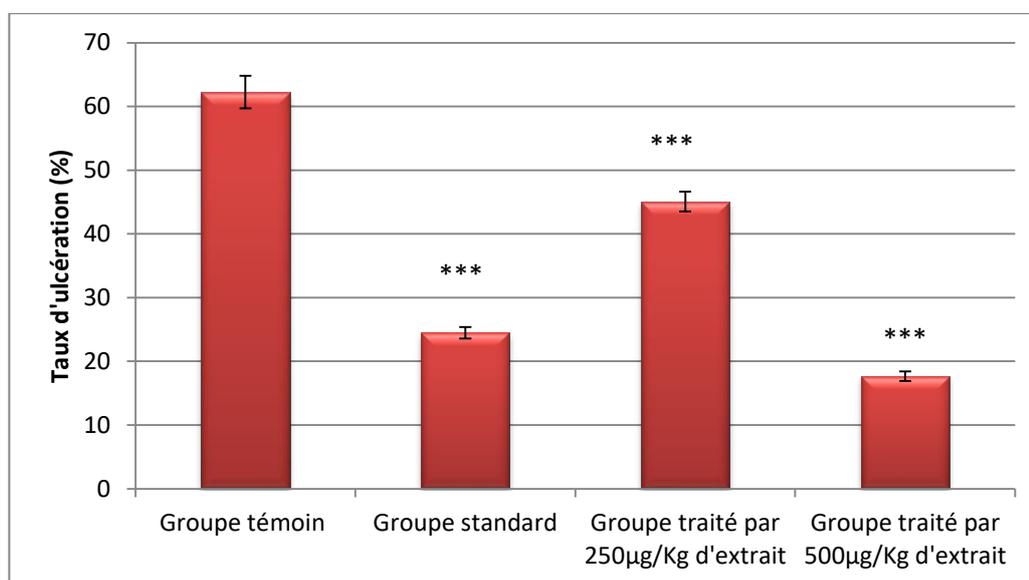
**Figure 33:** Photographies originales d'estomacs de souris : non éthanolo-ulcérées et non traitées à l'extrait algal (A), éthanolo-ulcérées mais non traitées avec l'extrait algal (témoin) (B), éthanolo-ulcérées traitées soit par 30mg d'oméprazole /kg poids vif (C), soit par 250µg (D) ou 500µg € d'extrait de *H. pluvialis* /kg poids vif.

#### IV.5.3.1.1. Détermination du degré d'ulcération (taux d'ulcération)

L'effet anti-ulcère de l'extrait DMSO de *H. pluvialis* contre les lésions gastriques induites par l'éthanol absolu a été évalué après estimation de la surface des lésions présentes au niveau de la muqueuse gastrique en utilisant le logiciel Image J. Les pourcentages d'ulcération calculés sont reportés sur la figure 34.

Les observations ont montré que les souris du groupe témoin ont montré des lésions importantes avec une muqueuse rouge, des stries hémorragiques et ulcère vrais, avec un pourcentage d'ulcération de  $62.25 \pm 2.56\%$ . Toutefois, ces lésions ont été réduites d'une manière très hautement significative ( $P < 0.001$ ) chez le groupe de souris traitées par l'oméprazole (pourcentage d'ulcération de  $24.49 \pm 0.89\%$ ) ou par l'extrait DMSO de l'algue où

des pourcentages d'ulcérations de  $45.08 \pm 1.54$  et  $17.68 \pm 0.75\%$  ont été calculés chez les groupes traités par 250 et 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de poids vif de l'extrait DMSO algal, respectivement.

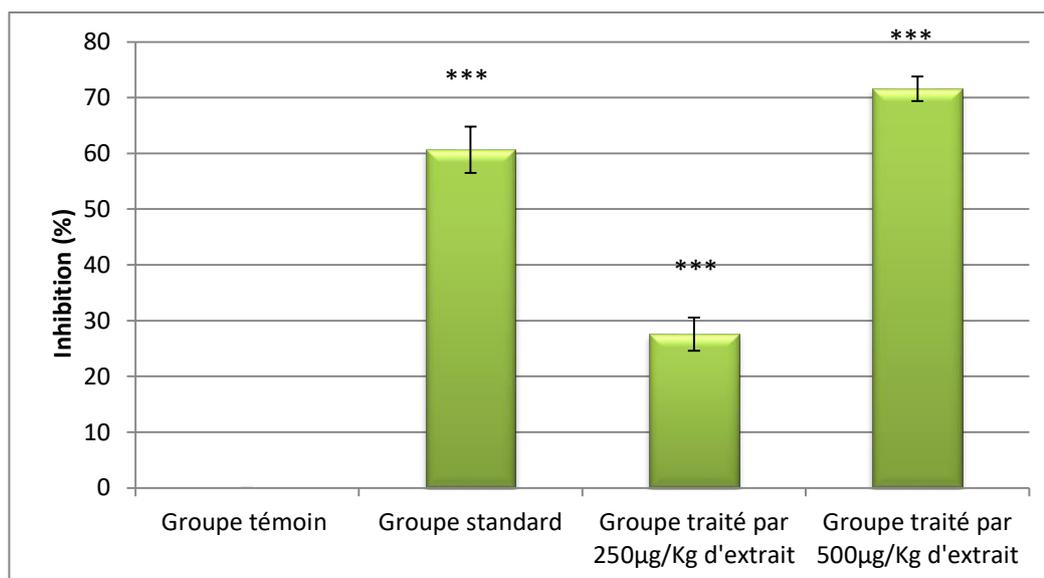


**Figure 34:** Taux d'ulcération gastrique (en %) éthanolo-induite par instillation. Les valeurs représentent la moyenne de 5 déterminations  $\pm$ SD.

(\*\*\* ( $P < 0.001$ ): Différence très hautement significative)

#### IV.5.3.1.2. Détermination du degré de protection d'ulcération (taux d'inhibition)

Les souris prétraitées par l'oméprazole ou par l'extrait DMSO de *H. pluvialis* ont exhibé une protection très hautement significative ( $P < 0.001$ ) contre l'ulcère induit par injection d'éthanol absolu aux animaux par rapport au groupe témoin (éthanolo-ulcéré et non traité par l'extrait algal ou par l'oméprazole). Des pourcentages d'inhibition d'ulcération respectifs de l'ordre de  $60.65 \pm 4.15$ ,  $27.58 \pm 2.59$  et  $71.59 \pm 2.19\%$  ont été enregistrés chez les groupes traités par l'oméprazole ou par d'extrait algal à des concentrations de 250 ou 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de poids vif (fig. 35).



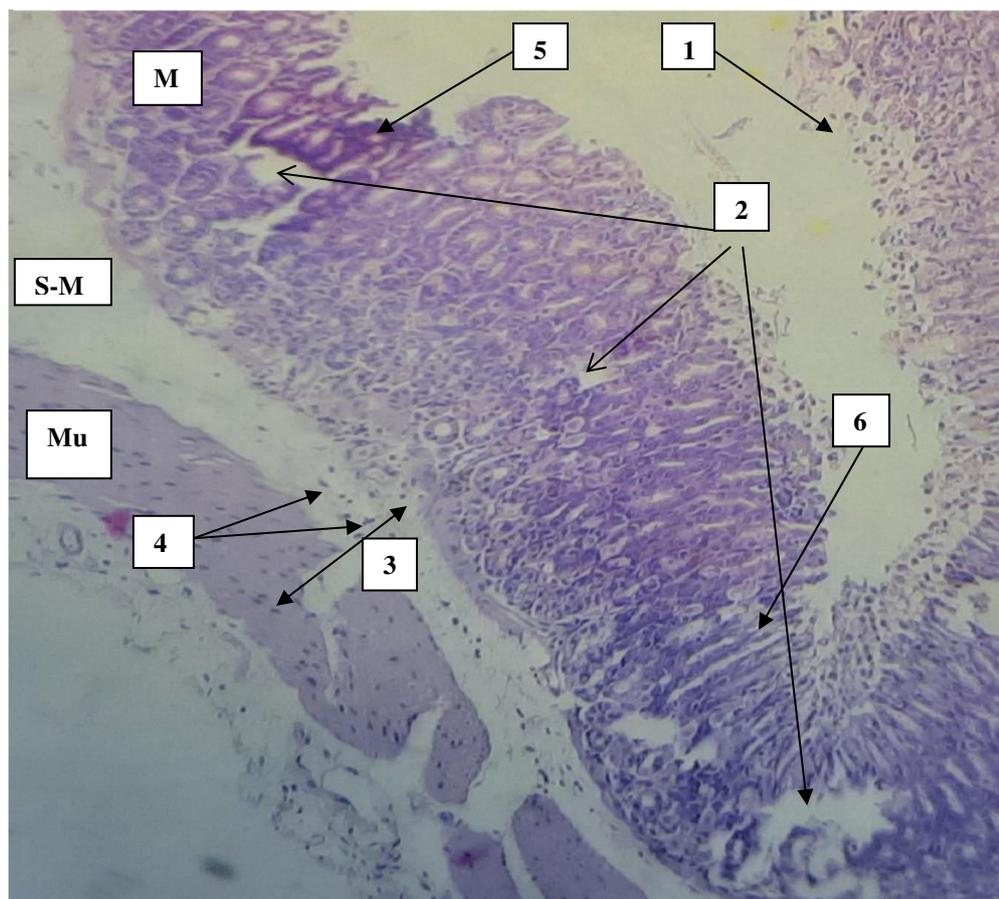
**Figure 35:** Taux d'inhibition (en % par rapport au témoin) des ulcérations gastriques éthanolo-induites chez les différents lots de souris. Les valeurs représentent la moyenne de 5 déterminations  $\pm$ SD.

(\*\*\* ( $P < 0.001$ ): Différence très hautement significative)

#### IV.5.3.2. Observation microscopique

L'étude histocytopathologique permet de confirmer les résultats des observations macroscopiques concernant l'aspect de la muqueuse gastrique, notamment la desquamation épithéliale, l'endommagement des glandes de la muqueuse, les paramètres de la sous-muqueuse (œdème et infiltration de leucocytes) et de la musculature. L'apparition d'hémorragie est un autre paramètre qui s'ajoute à l'analyse.

L'étude histologique d'un estomac d'une souris éthanolo-ulcérée non traitée par l'extrait algal ou l'oméprazole (groupe témoin) a montré des graves dommages au niveau de la muqueuse gastrique, ainsi que dans la musculature avec la présence d'une très forte desquamation épithéliale, une destruction des glandes, une très forte inflammation de la sous-muqueuse et une importante infiltration de leucocytes et des hémorragies (fig. 36).



**Figure 36:** Microphotographie de l'aspect histologique d'estomac de souris éthanol-ulcérée mais non traitée par l'oprémazole ou l'extrait de *H. pluvialis* (groupe témoin).

(**M** : muqueuse ; **S-M** : sous-muqueuse ; **Mu** : Musculeuse- **1** : desquamation épithéliale ; **2** : endommagement des glandes ; **3** : œdème ; **4** : infiltration de leucocytes ; **5** : hémorragie ; **6** : effilochage).

Après administration orale d'éthanol aux souris, il a été constaté que des plaies gastriques sont induites par l'effet toxique direct et indirect de ce dernier suite aux différents mécanismes physiopathologiques. L'éthanol absolu est l'une des substances ulcérogéniques les plus dangereuses, non seulement, il a une action corrosive sur la muqueuse gastrique mais il provoque aussi la nécrose cellulaire soit en entraînant un manque du flux sanguin gastrique, soit en oxydant la membrane plasmique des cellules. De plus, l'alcool érode la muqueuse et provoque sa congestion ; tout comme il induit une nécrose cellulaire (Sherwood, 2006; Apfelbaum et Roman, 2009).

Expérimentalement, le modèle d'ulcère gastrique éthanolo-induit se caractérise par l'apparition de bandes hémorragiques allongées, d'œdèmes sous-muqueux étendus, d'une friabilité de la muqueuse, d'une infiltration de cellules inflammatoires et d'une perte de cellules épithéliales.

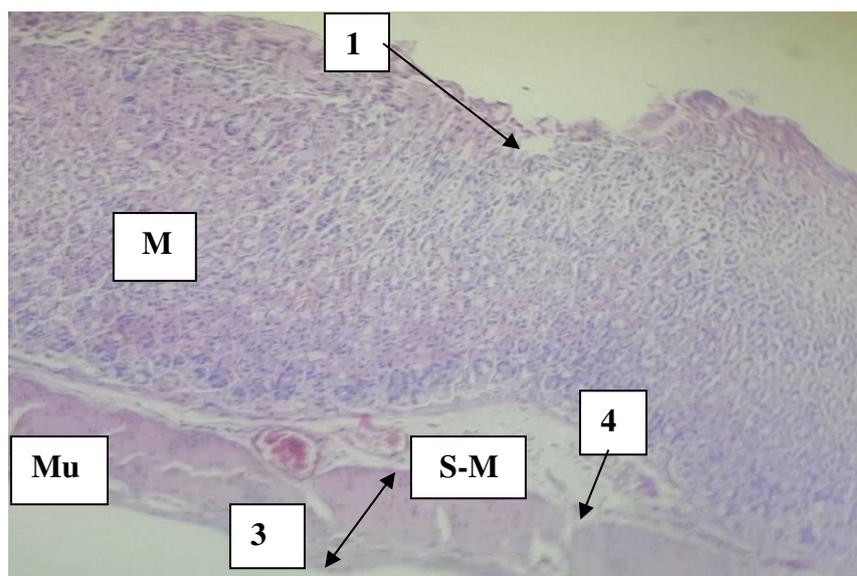
Par ailleurs, l'éthanol induit également l'augmentation de la diffusion acide, la libération d'histamine, l'efflux de sodium et de potassium, l'afflux de calcium ainsi que la production de radicaux libres et des leucotriènes ; tous induisant l'apparition de lésions gastriques (Balan *et al.*, 2015).

L'étude histologique d'un estomac d'une souris éthanolo-ulcérée et prétraitée par l'oméprazole (groupe standard) a montré une légère desquamation épithéliale, une faible hémorragie, des glandes intactes, une faible infiltration de leucocytes et une inflammation de la sous-muqueuse réduite par rapport au groupe témoin (fig.37).

Par son effet anti-sécrétoire, l'oméprazole offre une certaine protection à la muqueuse gastrique. Il a été largement utilisé comme inhibiteur de la pompe à protons dans le traitement des troubles liés à la sécrétion d'acide gastrique (Li *et al.*, 2004b).

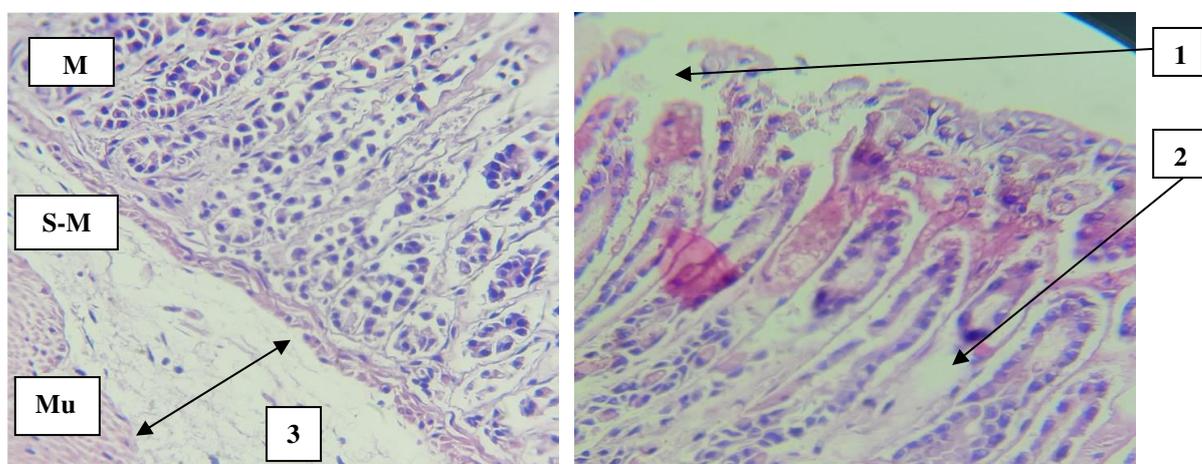
L'étude histologique d'estomac de souris traitées par 250 µg d'extrait DMSO de *H. pluvialis* /kg de poids vif avant éthanolo-induction d'ulcère montre une légère desquamation épithéliale, un léger endommagement des glandes, une inflammation de la sous-muqueuse, une faible infiltration de leucocytes et une légère hémorragie (fig.38).

Toutefois, l'aspect histologique d'estomac des souris du groupe traité par 500 µg d'extrait DMSO de *H. pluvialis* /kg de poids vif avant éthanolo-induction d'ulcère a montré une légère desquamation épithéliale, les glandes sont conservées, une faible inflammation de la sous-muqueuse, aucune infiltration de leucocytes et de faibles hémorragies (fig. 39).



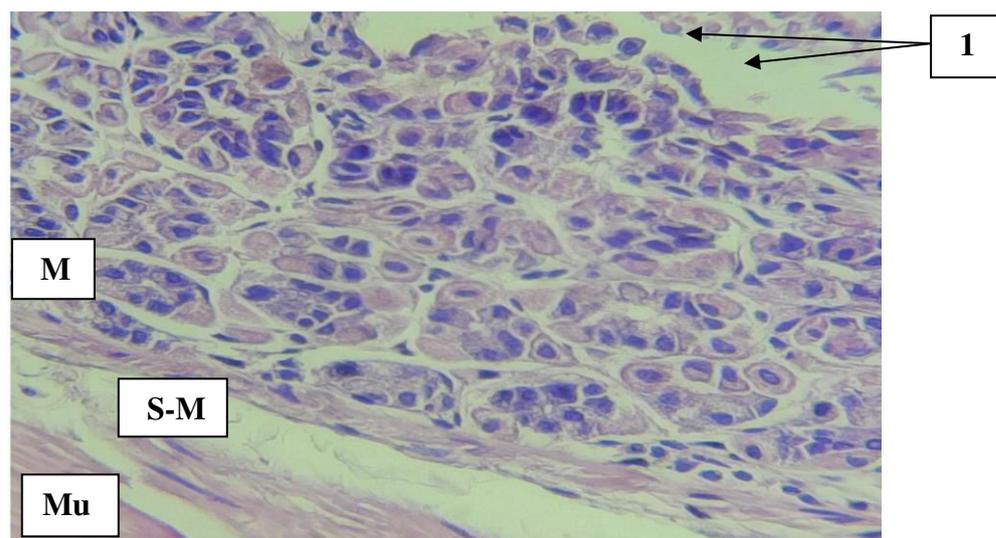
**Figure 37:** Microphotographie de l'aspect histologique d'estomac de souris prétraitée par l'oméprazole avant éthanolo-induction d'ulcère chez le groupe standard.

(M: muqueuse ; S-M: sous-muqueuse ; Mu : Musculaire- 1: desquamation épithéliale ; 3: œdème ; 4: infiltration de leucocytes).



**Figure 38:** Microphotographie de l'aspect histologique d'estomac de souris du groupe prétraité par 250 µg d'extrait DMSO de *H. pluvialis* /kg de poids vif avant éthanolo-induction.

(M: muqueuse ; S-M: sous-muqueuse ; Mu : Musculaire- 1 : desquamation épithéliale, 2 : endommagement des glandes ; 3 : œdème ; 4 : infiltration de leucocytes).



**Figure 39:** Microphotographie l'aspect histologique d'estomac de souris du groupe prétraité par 500 µg d'extrait DMSO de *H. pluvialis* /kg de poids vif avant éthanolo-induction d'ulcère.

(**M** : muqueuse; **S-M** : sous-muqueuse ; **Mu** : Musculeuse- **1** : desquamation épithéliale).

Ces résultats indiquent une excellente cytoprotection de la muqueuse gastrique par l'extrait DMSO de *H. pluvialis* qui est riche en astaxanthine accumulée par la microalgue lors de son exposition au stress lumineux associé à la carence en azoté.

L'analyse microscopique des coupes histologiques des estomacs des souris qui ont reçu 250 ou 500 µg d'extrait DMSO de *H. pluvialis* / kg de poids vif montre que ce caroténoïde n'a aucun effet cytotoxique et que l'architecture de la muqueuse n'a pas été altérée. Ceci confirme que les lésions présentes au niveau de la muqueuse gastrique sont uniquement dues à l'administration de l'agent irritant l'éthanol.

Les observations montrent que la dose de l'extrait algal utilisée influence de manière importante l'aspect histologique de l'estomac. La dose de 500 µg/kg permet d'assurer une bonne protection des glandes de la muqueuse, de diminuer l'œdème de la sous muqueuse de manière importante grâce à son effet anti-inflammatoire et permet aussi d'éviter l'infiltration des leucocytes.

Des résultats similaires ont été obtenus par [Murata et al. \(2012\)](#) et [Kim et al. \(2005a, b\)](#) qui ont démontré chez des rats et des souris qu'un traitement à l'astaxanthine diminue

significativement les ulcères gastriques induits par éthanol, la sécrétion d'acide chlorhydrique ou la prise de médicament.

Nichikawa *et al.* (2005) ont étudié l'effet du  $\beta$ -carotène et des astaxanthines de la microalgue *H. pluvialis*, de la levure *Phaphia Rhodozyma* et l'astaxanthine synthétique sur la prévention des ulcères gastriques chez des rats stressés. Ces auteurs ont trouvé que les rats traités par le  $\beta$ -carotène et les astaxanthines avant le stress sont protégés contre l'ulcère gastrique par rapport au groupe contrôle. De plus, l'index d'ulcère était particulièrement faible chez le groupe traité par l'astaxanthine extraite à partir des kystes de *H. pluvialis*.

Les Travaux de Kim *et al.* (2005a) ont montré que l'administration orale d'astaxanthines extraite de la levure *Xanthophylomyces dendrorhous* chez le rat a un bon effet thérapeutique sur l'ulcère gastrique induit par le naproxen, un anti-inflammatoire non stéroïdien. L'élimination des radicaux libres et l'amélioration de la circulation sanguine locale de l'ulcère sont les principaux mécanismes de cet effet.

D'après ces mêmes auteurs (Kim *et al.* (2005a), la libération des espèces réactives d'oxygène est un facteur pathogène de dommages gastriques induits par l'éthanol ; l'astaxanthine est un piègeur de radicaux libres qui agit comme agent préventif potentiel de l'ulcère. En outre, le pré-traitement à l'astaxanthine a entraîné une augmentation significative des activités des enzymes à effet antioxydant tels que le superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase

Kim *et al.* (2005b) ont démontré chez le rat, qu'une administration orale d'astaxanthine produite par la levure *Xanthophylomyces dendrorhous* assure une protection significative contre les lésions gastriques induites par l'éthanol, et inhibe la peroxydation lipidique dans la muqueuse gastrique. Ainsi, l'examen histologique a montré que les lésions de la muqueuse gastrique induit par éthanol disparaissent nettement après traitement des rats avec l'extrait algal.

En outre, cette même équipe de chercheurs attribue le potentiel gastroprotecteur de l'astaxanthine à la régulation de la sécrétion gastrique d'acide chlorhydrique. Par ailleurs, Packer (1995), a montré que l'astaxanthine de *H. Pluvialis* possède des propriétés antioxydante et antiulcéreuse.

Kamath *et al.* (2008) ont expliqué le rôle de l'astaxanthine de *H. pluvialis* dans la protection de l'ulcère gastrique par une remédiation des lésions des muqueuses induites par éthanol, une régulation de la sécrétion des acides gastriques, une augmentation des taux de catalase, de superoxyde dismutase et de glutathion peroxydase dans le suc gastrique et une élimination des radicaux libres.

#### IV.5.4. Toxicité aigüe

Les résultats de l'évaluation de la toxicité aigüe de l'extrait DMSO de *H. pluvialis* ont montré qu'une administration orale d'une dose unique de 500mg/kg de poids vif de cette substance s'est avérée non toxique.

L'ensemble des souris utilisées dans l'expérience sont restées en vie et n'ont présenté aucun signe de toxicité et aucun effet secondaire (hyperactivité, agressivité, sédation...) n'a été enregistré chez les souris durant les 24 heures d'observation.

Etant donné que la dose de 500mg/Kg n'a produit aucun signe clinique de toxicité chez toutes les souris, donc cet extrait algal de *H. pluvialis* présente une large gamme d'utilisation avec une DL50 bien supérieure à 500mg/Kg de poids vif.

L'astaxanthine a montré des effets bénéfiques divers avec une excellente tolérance ainsi qu'une grande sécurité d'utilisation, son innocuité a été déterminée par plusieurs travaux sur des modèles animaux et des essais sur l'homme (Spiller *et Dewell*, 2004 ; Satoh *et al.* (2009).

C'est ainsi que l'innocuité et les bienfaits de la microalgue *H. pluvialis* ont été mis en évidence par Satoh *et al.* (2009) qui, à l'issue d'une administration journalière de doses répétées de 12000 mg/Kg de *H. pluvialis* pendant une période de 12 semaines chez dix sujets volontaires souffrant de problèmes de mémoires liés à l'âge, n'observèrent aucune anomalie chez ces personnes dont les fonctions cognitives et psychomotrices ont été plutôt améliorées.

Une étude de la toxicité aigüe de l'astaxanthine de *H. pluvialis* réalisée par John *et al.* (2008) sur des rats a démontré que la DL<sub>50</sub> de ce caroténoïde est supérieure à 12000 mg/kg de poids corporel. Regnier *et al.* (2015) ont démontré un potentiel thérapeutique de l'astaxanthine de *H. pluvialis* dans la protection des cellules contre le stress oxydatif sans

aucune toxicité. En 2010, la FDA a attribué le statut GRAS (Generally Recognized As Safe) à l'astaxanthine produite par *H. pluvialis* (Yang et al, 2013).

À la base de ces résultats, des doses inférieures à 500 mg/kg de poids corporel de l'extrait DMSO de *H. pluvialis* ont été sélectionnées pour une évaluation *In Vivo* de quelques activités biologiques de l'extrait DMSO de *H. pluvialis* isolée.

## Conclusion et perspectives

*Haematococcus pluviialis* est une Chlorophycée exploitée industriellement pour sa capacité à synthétiser et à accumuler une molécule à haute valeur ajoutée: l'astaxanthine (3,3'-dihydroxy- $\beta$ ,  $\beta$ -carotène-4,4'-dione), un caroténoïde de la famille des xanthophylles. Ce pigment est utilisé, par exemple, comme colorant alimentaire. Les propriétés antioxydantes importantes de cette molécule lui valent également des applications dans le domaine de la santé humaine comme nutraceutique, et sont estimées avoir un rôle dans la prévention des cancers, maladies cardiovasculaires, maladies dégénératives...etc.

Dans le présent travail, 18 isolats de microalgues ont été obtenus, 3 ont été identifiés comme étant la souche d'intérêt et un seul a été choisi pour être étudié en raison de sa pureté et sa capacité de division. L'étude de la cinétique de sa croissance sur milieu BBM additionné de différentes concentrations de nitrate de sodium a montré que le bouillon BBM à 0.5mg/L de  $\text{NaNO}_3$  est le milieu optimal qui permet d'obtenir une biomasse importante et ce après huit jours de culture.

L'étude de l'influence de quelques conditions de stress sur l'accumulation d'astaxanthine par cette espèce algale a montré que la carence du milieu de culture en azote en association à un fort stress lumineux (200  $\mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$ ) a abouti à une production maximale d'astaxanthine ( $67.25 \pm 2.28$  mg/L) par rapport aux autres conditions.

L'extrait DMSO obtenu à partir des kystes de *H. pluviialis* soumise au stress lumineux associé à la carence nutritionnelle a montré des propriétés antioxydantes très élevées vérifiées par les différentes méthodes d'analyse : DPPH ( $\text{IC}_{50}=24.56$   $\mu\text{g/mL}$ ), blanchissement de  $\beta$ -carotène ( $99.12 \pm 2.36\%$  à une concentration de 200  $\mu\text{g/mL}$ ), capacité antioxydante totale ( $295.45 \pm 19.58$   $\mu\text{g Eq AA/g}$  à 100  $\mu\text{g/mL}$ ), la méthode de FRAP ( $218.4 \pm 5.08$  mM  $\text{Fe}^{+2}/\text{g}$ ) et la méthode FTC (48.42% d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique après 96heures d'incubation).

L'étude *in vivo* de la toxicité aigüe de L'extrait DMSO de *H. pluviialis* a montré qu'il n'a aucun signe clinique de toxicité chez toutes les souris ayant reçu 500mg/Kg d'extrait DMSO.

L'extrait algal testé pour son activité anti-inflammatoire *In Vivo* a été efficace dans la réduction de l'inflammation provoquée par injection de la carragénine. Ces résultats confirment qu'il peut contribuer à la réduction de l'inflammation. Les résultats ont également montré que cet extrait a un effet analgésique efficace comparable à celui de l'ibuprofène.

L'effet cytoprotecteur de l'extrait DMSO de *H. pluvialis* quant à l'ulcère gastrique a été démontré. Les lésions observées chez le groupe témoin ne se sont pas retrouvées dans les estomacs prétraités par l'extrait DMSO de cette chlorophycée.

La microalgue *H. pluvialis* isolée a montré plusieurs activités biologiques intéressantes liées à sa richesse en astaxanthine ; ce qui lui confère un intérêt industriel très important au vu des débouchés que ce microorganisme offre. Par conséquent, la poursuite de ce travail s'avère primordiale étant donné les retombées socio-économiques que cela pourrait générer. Ainsi, les perspectives envisageables pour valoriser au mieux ce travail seraient les suivantes :

- À l'échelle de laboratoire, purifier l'astaxanthine de *H. pluvialis* et explorer les mécanismes de son activité biologique.
- Etudier les modalités de culture industrielle de *Haematococcus pluvialis* et optimiser la production d'astaxanthine.
- Optimiser et évaluer le coût de l'efficacité de l'extraction et de la purification de l'astaxanthine.
- Evaluer le niveau d'utilisation actuelle et future de l'astaxanthine dans la filière « colorants » et « antioxydants » au niveau du pays.

## Références bibliographiques

### -A-

1. **Abounda S. (2005)**. Effet de la cuisson à eau et de la friture sur la teneur en  $\beta$ -carotène de deux variétés de Patates Douce (*Ipomea batatas*) des provinces du Littoral et du centre du Cameroun. *Mémoire de Maîtrise, Université de Douala Cameroun*, 7-8.
2. **Abou-Shanab R.A., Hwang J.H., Cho Y., Min B. et Jeon B.H. (2011)**. Characterization of microalgal species isolated from fresh water bodies as a potential source for biodiesel production, *Journal of Applied Energy*, 88 : 3300–3306.
3. **Aissaoui M. (1995)**. Carotenoidogenese chez une microalgue, *Haematococcus pluvialis*. Aspects analytiques, applications nutritionnelles et perspectives, thèse de doctorat en Sciences biologiques et fondamentales appliquées. Psychologie, Rennes 1.
4. **Alcaraz M.J. et Jimenez M.J. (1988)**. Flavonoïde and anti-inflammatory agent. *Journal of Fitoterapia* 59: 25-38.
5. **Aliyu A.B., Ibrahim M.A., Ibrahim H., Musa A.M., Lawal A.Y. Oshanimi J.A., Usman M., Abdulkadir I.E., Oyewale A.O., Amupitan J.O. (2012)**. Free radical scavenging and total antioxidant capacity of methanol extract of *Ethulia conyzoides* growing in Nigeria, *Romanian Biotechnological Letters*, 17(4) : 7458-7465.
6. **Alves Barbosa-Silveira A., Okada K et de Campos-Takaki G.M. (2015)**. Cultural conditions and antioxidant activity of astaxanthin produced by *Mucor circinelloides* f. *circinelloides*.
7. **Alves Da Costa Cardoso L. (2008)**. Identification de facteurs opératoires influents en vue d'une production microbienne optimale de *Torularhodine* et de sa fonctionnalisation enzymatique, à partir d'étude cinétique. Thèse de doctorat, institut polytechnique de Lorraine, Nancy université, pp 2.
8. **Anarjan N. et Tan C.P. (2013)**. Chemical stability of astaxanthin nanodispersions in orange juice and skimmed milk as model food systems. *Journal of Food Chemistry*, 139 : 527–531.
9. **Anitha S. et Narayanan J.S. (2012)**. Isolation and Identification of Microalgal Strains and Evaluation of Their Fatty Acid Profiles for Biodiesel Production, *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 3(4):939-944.
10. **Apfelbaum M. et Roman M., (2009)**. Diététique et nutrition. Edition Marian, Paris, pp: 251.
11. **Armstrong G.A. (1999)**. Carotenoid genetics and biochemistry. In: Comprehensive natural products chemistry. *Elsevier*, p 321-352.

### -B-

12. **Balan T., Sani M.H.M., Ahmad S.H.M., Suppaiah V., Mohtarrudin N. et Zakaria Z.A. (2015)**. Antioxidant and anti-inflammatory activities contribute to the prophylactic effect of semi-purified fractions obtained from the crude methanol extract of *Muntingia calabura* leaves against gastric ulceration in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 164 : 1–15.
13. **Barros MP., Marin DP., Bolin AP., de Cássia Santos Macedo R., Campoio TR. et Fineto CJR. (2012)**. Combined astaxanthin and fish oil supplementation improves glutathione-based redox balance in rat plasma and neutrophils. *Chemico- Biological Interactions*; 197: 58-67.

14. Bast A., Haenen G.R., Van Den Berg R. et Van Den Berg H. (1998). Antioxidant effects of carotenoids. *Internat. Journal Vit. Nutr. Res.* 68 : 399-403.
15. Becker E. W., (1994). *Microalgae Biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge.
16. Bektas T, Dimitra D, Atalay S, Munevver S, Moschos P. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller. *Food Chemistry*, 90: 333-340.
17. Bell J.G., McEvoy, J., Tocher D.R. et Sargent J.R. (2000). Depletion of  $\alpha$ -tocopherol and astaxanthin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects autoxidative defense and fatty acid metabolism. *Journal of Nutrition*, 130 : 1800-1808.
18. Bennedsen M., Wang X., Willén R., Wadström T. et Andersen LP. (1999). Treatment of *H. pylori* infected mice with antioxidant astaxanthin reduces gastric inflammation, bacterial load and modulates cytokine release by splenocytes, *Immunology Letters*, 70, 185-189.
19. Benzie I.F.F. et Strain J.J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power "The FRAP Assay", *Journal of Analytical Biochemistry*. 239 : 70 –76.
20. Berberoglu H., Gomes P.S. et Pilon L. (2009). Radiation characteristics of *Botriococcus braunii*, *Clorococcum litorale* and *Chlorella sp.* used for CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production. *Journal of quantitative spectroscopy and radiative transfer*. 110, 1897-1893.
21. Bertrand, 2007. *Haematococcus pluvialis* flotow. <https://forum.mikroskopie.com/topic/5149-haematococcus-pluvialis-flotow> page consultée le 12/02/2017.
22. Bischoff H.W .et Bold H.C. (1963). Phycological studies of some soil algae from Enchanted Rock and Related algal species, University of Texas publications 6318:1- 95
23. Borowitzka MA. (2013). High-value products from microalgae their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*, 25: 743-756.
24. Borowitzka M.A., Huisman J.M. et Osborn A. (1991). Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis*1. Effects of nutrients on growth and cell type. *Journal of Applied Phycology*. 3: 295–304.
25. Boussiba S., Fan L. et Vonshak A. (1992). Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*, in *Carotenoids PartA: Chemistry, Separation, Quantitation, and Antioxidation*, Enzymology (AcademicPress), 386–391.
26. Boussiba S., Bing W., Yuan J. -P., Zarka A. et Chen F. (1999). Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Journal of Biotechnology Letters*, 21, 601–604.
27. Boussiba S. et Vonshak A. (1991). Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Plant Cell Physiology*, 32(7): 1077–1082.
28. Braune W. et Ekelund N.G.A. (1990). Phototactic response in *Haematococcus lacustris* and its modification by light intensity and the carotenoid biosynthesis inhibitor Norflurazon. *Journal of Archives Microbiology* 154: 448-452.
29. Brinda B. R., Sarada R., Kamath B. S., Ravishankar G. A. (2004). Accumulation of astaxanthin in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis* - cultural and regulatory aspects. *Current Science*. 87, 1290–1294.
30. Britton G., Liaasen-Jensen S. et Pfander H. (1995). *Carotenoids spectroscopy*, p 360. Birkhäuser, Basel.

31. **Burchardt L., Balcerkiewicz S., Kokocinski M., Samardakiewicz S. et Adamski Z. (2006).** Occurrence of *Haematococcus pluvialis* Flotow emend. Willeina small artificial pool on the university campus of the collegium biologicum in Poznan (Poland). *Biodiversity Research and Conservation*. 1, 163–166.
32. **Butler T.O., McDougall G. J., Campbell R., Stanley M.S. et Day J.D. (2018).** Media Screening for Obtaining *Haematococcus pluvialis* Red Motile Macrozooids Rich in Astaxanthin and Fatty Acids, *Journal of Biology*, 7(2) : 1-15.

-C-

33. **Cadoret J-P. et Bernard O. (2008).** La production de biocarburant lipidique avec des microalgues : promesses et défis. *Journal de la société biologique*, 202 (3) : p. 201-211.
34. **Chai C., Fang J., Lin Y., Tong H., Gong Y., Wang Y., Liu M. Wang Y., Qian Q., Cheng Z. et Chu C. (2011).** Encoding a carotenoid isomerase is involved in photoprotection in rice. *Journal of Plant molecular Biology*(75) :211-221.
35. **Chan K., Pei-Jain P. et Mei-chin Y. (2012).** Anticoagulatory and Anti-inflammatory Effects of Astaxanthin in Diabetic Rats, *Journal of Food Science*, 77 (2) : 123-146.
36. **Chanforan C. (2010).** Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation: études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate. Thèse de Doctorat en Sciences, université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.
37. **Chekanov K., Lobakova E., Selyakh I., Semenova L., Sidorov R., Solovchenko A. (2014).** Accumulation of Astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain bml from the white seacoastalrocks (Russia). *Journal of Marine Drugs*. 12: 4504–4520.
38. **Chen G, Wang B, Han D, Sommerfeld M, Lu Y, Chen F, Hu Q (2015).** Molecular mechanisms of the coordination between astaxanthin and fatty acid biosynthesis in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of Plant* 81 : 95-107.
39. **Chien, Y.-H., Pan, C.-H., Hunter, B. (2003).** The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin. *Journal of Aquaculture*, 216 : 177-191.
40. **Choi YE., Yun YS., Park JM. et Yang JW. (2011).** Multistage operation of airlift photobioreactor for increased production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 1081-1087.
41. **Christwardana M. and Hadiyanto H. (2017).** The Effects of Audible Sound for Enhancing the Growth Rate of Microalgae *Haematococcus pluvialis* in Vegetative Stage, *HAYATI Journal of Biosciences* 24 : 149-155.
42. **Chung YC., Chang CT., Chao W-W., Lin CF. et Chou ST. (2002).** Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 : 2454–2458.
43. **Chui YB., Songbo X., Yang L., Wenxuan L. Dengwen L., Min L. Hongbo R., Luo R. Jun Z. (2017).** Analgesic Effect of Astaxanthin in Mice with Vincristine-Induced Neuropathic Pain and Its Mechanism, *Journal of Guangdong Ocean University*, 8 (10) 2927-2938.
44. **Cifuentes, A.S., González, M.A., Vargas, S., Hoeneisen, M. and González, N. (2003).** Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in

*Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biological Research*. 36: 343–357.

45. Comhaire F.H., El Garemy., Mahmoud A., Eertmans F. et Schoonjans F.(2005). Combined conventional/antioxidant Astaxanthin treatment for male infertility: a double blind randomized trial. *Asian Journal of Androl.* 7 : 257–262.
46. CRBM, (2006). Centre de recherche sur les biotechnologies marines de Rimouski. Étude d'opportunité des biotechnologies marines sur la production et l'utilisation des microalgues, 292 p., In Sodim.org, [http://www.sodim.org/pdf/710,86\\_Potentiel\\_microalgues.pdf](http://www.sodim.org/pdf/710,86_Potentiel_microalgues.pdf) (Page consultée le 15 mai 2016).

**-D-**

47. Dapkevicius A., Venskutonis R., Van Beek TA. et Linssen PH. (1998). Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 77: 140 - 146.
48. Davies B.H. (1976). Carotenoids. In: Goodwin Tw, Chemistry and Biochemistry of Plants Pigments, Vol. 2. 2nd Edition. London: Academic Press. pp: 38-165.
49. Della Loggia A., Tubaro A., Dri P., Zilli C. et Del N. (1968). The role of flavonoids in the anti-inflammatory activity of Chamomilla recutita. *Clinical and Biological Research*, 213: 481-486.
50. Demirbas T. (2000). Energy conversion management and mechanisms of liquefaction and pyrolysis reactions of biomass. *Journal of Energy conversion and management*. 41: 633–646.
51. De Reviere B. (2002). Biologie et phylogénie des algues. Tome 1, Ed. Belin, p 352.
52. Dialo B. et Diouf A. (2000). Etude de l'activité analgésique du *pilostigma reticulatum* (Nguiguiguis), *Odonto-Stomatologie Tropicale*, (92) : 1-11.
53. Ding, S.Y., Chee, W.S., Yong, Y.Y., Bee, P.L. et Lee, Y.K. (1994). Production strategies of astaxanthin by growing of *Haematococcus lacustris* cells. In: Algal Biotechnology in the Asia Pacific Region, Ed. Phang, S.M. Lee, Y.K. Borowitzka, M.A. and Whitton, B.A. University of Malaya, Kuala Lumpur: 28–32.
54. Di Mascio, P., Murphy, M. E., Sies, H. (1991). Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *American Journal of Clinical Nutrition*, 53: 194-200.
55. Di Rosa M. (1972). Biological Properties of Carrageenan. *US National Library of Medicine National Institutes of Health*, 24(2):89-102.
56. Donald G. et Martin L. (2002). Annual sight and life sur les troubles dus à la carence en vitamine A (TCVA) 172.
57. Dore J. R., et Cysewski G. R. (2003). *Haematococcus* algae meal as a source of natural astaxanthin for aquaculture feeds. *Cyanotech Corporation*. Hawaii.
58. Domínguez-Bocanegra A.R., Guerrero Legarreta I., Martínez Jerónimo F., et Tomasini Campocoso A. (2004). Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioresource Technology*, 92 : 209–214.
59. Dragos N., Bercea V., Bica A., Drunga., Nicoara A., Coman C. (2008). Astaxanthin Production from a new strain of *Haematococcus pluvialis* Grown in Batch Culture, Institute of Biological Research, Cluj-Napoca, Romania, Department of Biology, Babes-Bolyai University, Cluj-Napoca, Romania, 15: 22-85

60. Dragos N., Bercea V., Bica A., Druga B., Nicoara A., Coman C. (2010). Astaxanthin production from a new strain of *Haematococcus pluvialis* grown in batch culture. *Ann. Roman. Soc. Cell Biol.* 15 : 353–361.

-E-

61. Ejebe DE., Siminialayi IM., Emudainowho JOT., Ofesi U., Morka L. (2010). Analgesic and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of the leaves of *Helianthus Annus* in Wistar rats. *Asian Pac Journal Trop* ; 3(5): 341-347.
62. Elgarem Y., Lignell A., et Comhaire F.H. (2002). Supplementation with Astaxanthin (Astarox) improves semen quality in infertile men, in *Proceedings of the 13th International Carotenoid Symposium* (Honolulu, HI), 180–197.
63. Elion Itou R.D.G., Sanogo R., Etou Ossibi A.W., Nsondé Ntandou F.G., Ondélé R., Pénemé B.M., Okiémy Andissa N., Diallo D., Ouamba J.M., Abena A.A. (2014). Anti-inflammatory and analgesic effects of aqueous extract of stem bark of *Ceiba pentandra* Gaertn. *Journal of Pharmacology and Pharmacy*, 5 : 1113-1118.

-F-

64. Falkowski P.G. et Raven J.A. (1997). *Aquatic Photosynthesis*. Blackwell Science.
65. Fan L., Vonshak A. et Boussiba S. (1994). Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 30 (5) : 829–833.
66. Faridi B., Zellou A., Touati D., Alaoui K. et Cherrah Y. (2014). Toxicité aiguë et activité anti-inflammatoire des graines de *Delphinium staphysagria*, *Toxicologie, Phytothérapie, Springer-Verlag*, 1-6.
67. Febregas J., Dminguez A., Garcia-Alvarez D., Lamela T. et Otero A. (1998). Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies in *Hematococcus pluvialis*. *Journal of biotechnologyleters*, 20 : 623-626.
68. Febregas J., Dminguez A., Maseda A. et Otero A. (2003). Interaction irradiance and nutrient availability during astaxanthin accumulation and degradation on *Hematococcus pluvialis*, *Journal of applied microbiology and biotechnology*, 61, 545-551.
69. Fraser P.D., Shimada H., Misawa N. (1998). Enzymic confirmation of reactions involved in routes to astaxanthin formation, elucidated using a direct substrate in vitro assay. *European Journal of Biochemistry*, 252: 229–236.
70. Frederico A.V., Higor F.L. et Elson A.C. (2009). Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory effects of the acetone extract from *Anacardium occidentale* L., Brazil. *Journal of Pharmaceut Science*, 45: 437-442.
71. Focsan A.L., Polyakov N.E. et Kispert L.D. (2017). Photo Protection of *Haematococcus pluvialis* Algae by Astaxanthin: Unique Properties of Astaxanthin Deduced by EPR, Optical and Electrochemical Studies, *antioxydants*, 6(4) : 1-17.
72. Fournier E., Leal S. et Ziltener J.L. (2008). Anti-inflammatoires non stéroïdiens : utilisation en médecine du sport. *Revue Medicale suisse*, 4 : 1702-1705.

**-G-**

73. Gacheva G., Dimitrova P., et Pilarski P. (2015). News train *Haematococcus pluvialis* Rozhen-12- growth, biochemical characteristics and future perspectives. *Genetics and Plant Physiology* 5 : 29–38.
74. Galasso C., Orefice I., Pellone P., Cirino P., Miele R., Ianora A., Brunet C. et Sansone C. (2017). On the neuroprotective role of astaxanthin : new perspectives ?, *Marine drugs*, 216-247.
75. Garcia J., Carabaño R., Perez Alba L. et De Blas C. (1996). Effect of fibre source on neutral detergent fibre digestion and caecal traits in rabbits. *Proc. 6th World Rabbit Congress*, Toulouse, France, 9-12, 1, 175-180.
76. Giannelli L, Yamada H, Katsuda T, Yamaji H. (2015). Effects of temperature on the astaxanthin productivity and light harvesting characteristics of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 119 : 345-350.
77. Gramza-Michalowska A. et Stachowiak B. (2010), The antioxidant potential of carotenoid extract from *Phaffia Rhodozyma*, *Journal of Acta Scientiarum Polonorum, Technoogia Alimentaria*, 9(2): 171-188.
78. Grewe C.B. et Griehl C. (2012). The carotenoid astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*, in *Microalgal Biotechnology: Integration and Economy*, 129–144.
79. Grima E.M., Sevilla J. M. F., Pérez J. A. S. et Camacho, F. G. (1996). A study on simultaneous photosynthesis to limitation and photo inhibition in dense microalgal cultures taking in to account incident and average irradiances, *journal of biotechnology*, 45: 59–69.
80. Grung M., D'Souza F.M.L., Borowitzka M. et Liaaen-Jensen S. (1992). Algal Carotenoids 51. Secondary Carotenoids 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S, 3'S) astaxanthin esters. *Journal of Applied Phycology*, 4: 165-171.
81. Goto S., Kogure K., Abe K., Kimata Y., Kitahama K., Yamashita E. et Terada H., (2001). Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Journal of Biochimica et Biophysica Acta*, 1512 : 251-258.
82. Gouveia L., Veloso V., Reis A., Fernandes H., Novais J. et Empis J. (1993). Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 57: 157–163.
83. Gu Z. Deming C. Yongbin H. Zhigang C. et Feirong G. (2007). Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides* LWT, *Journal of Food Science and Technology*, 41(6) : 1082-1088.
84. Guastadisegni C., Nicolini A., Balduzzi M., Ajmone-Cat M.A., et Minghetti, L. (2002). Modulation of PGE2 and TNF-by nitric oxide and LPS-activated RAW 264.7 cells. *Journal of Cytokine*, 19 : 175-180.
85. Guerin M., Huntley M. E., Olaizola M. (2003). *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Journal of Trends Biotechnol.* 21 : 210-216.
86. Gülçin İ., Elias R., Gepdiremen A., Boyer L. et Köksal E. (2007). A comparative study on the antioxidant activity of fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.) extracts. *African Journal of Biotechnology*, 6(4): 410-418.
87. Guslandi M. (1998). Nitric oxide and inflammatory bowel diseases. *European Journal of Clinical Investigation*. 28: 904-907.

-H-

88. Hagen C., Grunewald K., Schmidt S. et Muller J. (2000). Accumulation of secondary carotenoids in flagellates of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) is accompanied by an increase in per unit chlorophyll productivity of photosynthesis. *European Journal of Phycology*, 35, 75- 82.
89. Hagen C., Siegmund S. et Bbraune W. (2002). Ultra structural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (volvocales, chlorophyta) during aplanospore formation. *European Journal of phycology*, 3 : 217–226.
90. Halldal P. et French S.C. (1980). Algal growth in crossed gradients of light intensity and temperature. *Plant Physiology*. 33: 249-252.
91. Harker M. et Young A.J. (1995). Inhibition of astaxanthin synthesis in the green alga, *Haematococcus pluvialis*. *Journal of European Journal of Phycology*, 30: 179-187.
92. Harker, M., Tsavalos, A. J. and Young, A. (1996). Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioresource Technology*, 55: 207-214.
93. Harker M. et Hirschberg J. (1997). Biosynthesis of ketocarotenoids in transgenic cyanobacteria expressing the algal gene for B-C-4-oxygenase, *crtO*. *Journal of FEBS Lett.* 404: 129-134.
94. He P., Duncan J. et Barber J. (2007). Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*: effects of cultivation parameters. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49 : 447–451.
95. Hernandez-Ortega J, de Gortari P, Garduno-Gutierrez R, Amaya MI, Leon-Olea M, Coffeen U, Pellicer F. (2010). Expression of the dopaminergic D1 and D2 receptors in the anterior cingulate cortex in a model of neuropathic pain. *Journal of Molecular pain*, 7: 97-120.
96. Higuera-Ciapara I., Félix-Valenzuela L. et Goycoolea F.M. (2006). Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Critical Reviews Food Science and Nutrition*; 46: 185-196.
97. Hong M., Hwang S., Chang W., Kim B., Lee J. et Sim S. (2015). Enhance of autotrophic astaxanthin production from *Haematococcus pluvialis* under high temperature via heat stress-driven haber-weiss reaction. *Journal of Applied microbiology biotechnology*, 99(12):5203-15.
98. Hong M.E., Choi Y. et Sim S.J. (2016). Effect of red cyst cell inoculation and iron (II) supplementation on autotrophic astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under outdoor summer conditions, *Journal of biotechnology*, 218 : 25-33.
99. Hu Q. (2004). Environmental effects on cell composition In: **Richmond, A.** Handbook of Microalgal Culture - Biotechnology and Applied Phycology Blackwell Publishing Ltd, 566.
100. Huangfu J., Liu J., Sun Z., Wang M., Jiang Y.; Chen Z.Y. et Chen F. (2013). Anti-ageing effects of astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* on fruit flies under oxidative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6 : 7800–7804.
101. Hussein G., Sankawa U., Goto H., Matsumoto K., et Watanabe H. (2006). Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *Journal of Natural Products*. 69 : 443-449.

**-I-**

- 102. Imamoglu E, Dalay MC, Sukan FV. (2009).** Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green *alga Haematococcus pluvialis*, *Journal of New Biotechnology*, 26(3):199-204.

**-J-**

- 103. Jacobsson L.S., Yuan X.M., Ziedén B., Olsson A.G. (2004).** Effects of  $\alpha$ -tocopherol and astaxanthin on LDL oxidation and atherosclerosis in WHHL rabbits. *Journal of Atherosclerosis*, 173 : 231-237.
- 104. Jeeji Bai N., Beena Nair B. et Shashirekha V. (2017).** Conditions promoting astaxanthin production in *Haematococcus*, *Haematococcaceae*, *Chlorophyceae*, with special reference to *H. pluvialis*, *Journal of Phykos* 47 (2) : 25-38.
- 105. Johansen J.S., Harris A.K., Rychly D.J. et Ergul A. (2005).** Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Journal of Cardiovasc. Diabetol.*, 4 (5) : 254-275.
- 106. John S., Stewart J.S. et Lingnell A. (2008).** Safety assessment of astaxanthin-rich microalgae biomass: acute and subchronic toxicity studies in rats. *Journal of Food Chemistry and Toxicology*, 46 : 3030–3036.
- 107. Jorge R.M., Leite J.P.V., Oliveira A.B. et Tagliati C.A. (2004).** Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenusilici folia*. *Journal of Ethnopharmacology*, 94 : 93–100.
- 108. Joseph SB., Castrillo A., Laffitte BA., Mangelsdorf DJ., Tontonoz P. (2007).** Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Natural Medecine*, 9:213–219.
- 109. Jyonouchi H. Hill R.J., Tomita Y. et Good R.A. (1991).** Studies of immunomodulating actions of carotenoids. Effets of beta-carotène and astaxanthin on murine lymphocyte functions and cell surface marker expression in *in vitro* culture system, *Nutrition and Cancer*, 16(2):93-105.
- 110. Jyonouchi H. (1994).** Immunomodulating actions of carotenoids: enhancement of *in vivo* and *in vitro* antibody production to T-dependent antigens. *Nutr. Cancer*, 21: 47–58.
- 111. Ju Z.Y., Deng D.F. et Dominy W. (2012).** A defatted microalgae (*Haematococcus pluvialis*) meal as a protein ingredient to partially replace fishmeal in diets of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931). *Journal of Aquaculture*, 354 (355) : 50-55.

**-K-**

- 112. Kang C.D. et Sim S.J. (2008).** Direct extraction of astaxanthin from *Haematococcus* culture using vegetable oils. *Journal of Biotechnology Letters*, 30: 441-444.
- 113. Kang C. D., Lee J. S., Park T. H. et Sim S. J. (2005).** Comparison of heterotrophic and photoautotrophic induction on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 68: 237-241.

114. **Kakizono T., Kobayashi M. et Nagai S. (1992)**. Effect of carbon/nitrogen ratio on encystment accompanied with astaxanthin formation in green alga, *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Ferment. Bioeng.* 74(6): 403-405.
115. **Kamath B.S., Srikanta BM., Shylaja Mallaiah Dharmesh SM., Sarada R., Gokare Aswathanarayana Ravishankar GA. (2008)**. Ulcer preventive and antioxidative properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*, *European Journal of Pharmacology*, 590 : 387–395.
116. **Karppi J., Rissanen TH., Nyssönen K., Kaikkonen J., Olsson AG., Voutilainen S., Salonen JT. (2007)**. Effects of astaxanthin supplementation on lipid peroxidation. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research.* 77(1):3-11.
117. **Kavitha G., Kurinjimalar C., Thevanathan R. et Rengasamy R. (2015)**. Impact of UV-B Radiation on *Haematococcus pluvialis* Flotow Isolated from Himachal Pradesh under Laboratory Conditions. *Journal of Academia and Industrial Research*, 3(11) : 22-29.
118. **Kelin K. et Tepe B. (2008)**. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Journal of bioresource technology.* 99 : 4096-4104.
119. **Kidd P. (2011)**. Astaxanthin, cell membrane nutrient with diverse clinical benefits and anti-aging potential. *Alternative Medicine Review*, 355-364.
120. **Kim J. H., Kim Y. S., Song G.G., Park J.J. et Chang H. I. (2005a)**. Protective effect of astaxanthin on naproxen-induced gastric antral ulceration in rats. *European Journal of Pharmacology*, 514 :53-59.
121. **Kim J.H., Choi S.K., Choi S.Y. Kim H.K. et Chang H.I. (2005b)**. Suppressive effect of astaxanthin isolated from the *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant on ethanol-induced gastric mucosal injury in rats, *journal of bioscience, biotechnology, biochemistry*, 69 (7) : 1300-1305.
122. **Kim J.H., Affan M.A., Jang J., Kang M.H., Ko A.R. et Jeon S.M. (2015)**. Morphological, molecular, and biochemical characterization of astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus* sp. KORDI03 (Haematococcaceae, Chlorophyta) isolated from Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25 : 238–246.
123. **Klochkova T. A., Kwak M. S., Han J. W., Motomura T., Nagasato C. et Kim G. H. (2013)**. Cold-tolerant strain of *Haematococcus pluvialis* (Haematococcaceae, Chlorophyta) from Blom strandhalvoya (Svalbard). *Journal of Algae* 28 : 185–192.
124. **Kobayashi M., Kakizono T., et Nagai S. (1991)**. Astaxanthin Production by a Green Alga, *Haematococcus pluvialis* Accompanied with Morphological Changes in Acetate Media, *Journal of Engineering, Hiroshima University, Kagamiyama Higashi-hirshima 724, Japan*, 71(5): 335-339.
125. **Kobayashi M., Kurimura Y., Sakamoto, Y. et Tsuji Y. (1997)**. Selective extraction of astaxanthin and chlorophyll from the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Biotechnology Technology*, 11 : 657–660.
126. **Koller M., Muhr A., et Braunegg G. (2014)**. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Journal of Algal Research*, 6 : 52–63.
127. **Kornprobst J.M. (2005)**. Substances naturelles d'origine marine : chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologies, Ed. TEC et DOC, Lavoisier, Londre, Paris, New York, P1830.
128. **Koster R., Anderson M. et De Beer E. (1959)**. Acetic acid for analgesic screening. *Journal of Fed Proc*, 18, 412.

129. Kouakou- siransi G. Irie Nguessan G. Dalily I. Mohou B., Kamenan A., Kouakou L. et Kablan Brou J. (2010). Etude de l'activité analgésique de l'extrait méthanolique des feuilles de *Gossypium hirsutum* Linn (Malvaceae). *Journal of pharmaceutical and biological science*, 11 (1) : 6-12.
130. Kouakou-Siransy G., Sahpaz S., Irié-Nguessan G., Datte YJ., Kablan J., Gressier B. et Bailleul F. (2010). Oxygen species scavenger activities and phenolic contents of four West African plants. *Journal of Food Chemistry*, 118(2): 430–435.
131. Kuedo Z., Sangsuriyawong A., Wanwimol Klaypradit W., Varomyalin Tipmanee V. et Chonpathompikunlert P. (2016). Effects of Astaxanthin from *Litopenaeus Vannamei* on Carrageenan-Induced Edema and Pain Behavior in Mice, *Journal ofMolecules*, 21 (382) : 1-14.
132. Kumaran A. et Karunakaran R.J. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Journal of Food Chemistry*, 97.
133. Kurashige M., Okimasu E., Inoue M et Utsumi K.(1990). Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin, *Physiological Chemistryand Physics and Medical, NMR*. 22 : 27-38.

-L-

134. Laloo D., Prasad S. K., Krishnamurthy S. et Hemalatha S. (2013). Gastroprotective activity of ethanolic root extract of *Potentilla fulgens* Wall. Ex Hook. *Journal of Ethnopharmacology*, 146 : 505-514.
135. Laurienzo P. (2010). Marine Polysaccharides in Pharmaceutical Applications: An Overview, *Marine Drugs* 8(9) : 2435-2465.
136. Lee Y.K. et Ding S.Y. (1994). Cell cycle accumulation of astaxanthine in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 30: 445-449.
137. Lee S., Se-Kyung B., K Lee., Seung N., Hee-Jun N, Kwon-Soo H, Jeong-A H., Sung-Vin., Kwang Chang., Young-Guen K., Sung Ki Lee2. et Young-Myeong K. (2013) . Astaxanthin Inhibits Nitric Oxide Production and Inflammatory Gene Expression by Suppressing I $\kappa$ B Kinase-dependent NF- $\kappa$ B Activation, *Journal of Molecules and Cells.*, 16 (1): 97-105.
138. Lee S.J., Bai S.K., Lee K.S., Namkoong S., Na H.J. et Ha K.S. (2003). Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I $\kappa$ B kinase-dependent NF- $\kappa$ B activation. *Journal of Molecules and Cells.*, 16 : 97-105.
139. Leite MF., de Lima AM., Massuyama MM. et Otton R. (2010). Astaxanthin restores the enzymatic antioxidant profiles in salivary gland of alloxan-induced diabetic rats, *Archives of Oral Biology*, 55 : 479-485.
140. Li W., Hellsten A., Jacobsson L.S., Blomqvist H.M., Olsson A.G. et Yuan X.M. (2004a). Alpha-tocopherol and astaxanthin decrease macrophage infiltration, apoptosis and vulnerability in atheroma of hyperlipidaemic rabbits. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 37 : 969-978.
141. Li XQ., Andersson TB., Ahlstrom M. et Weidolf L. (2004b). Comparison of inhibitory effects of the proton pump-inhibiting drugs omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, pantoprazole, and rabeprazole on human cytochrome P450 activities. *Journal of Drug Metabolism and Disposition*, 32(8):821-827.
142. Li M., Wu W., Zhou P., Xie F., Zhou Q. et Mai K. (2014). Comparison effect of dietary astaxanthin and *Haematococcus pluvialis* on growth performance, antioxidant

- status and immune response of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*, *Journal of Aquaculture*, 434 :227-232.
143. Liang J., Tian Y.X., Yang F., Zhang J.P. et Skib LH. (2009). Antioxidant synergism between carotenoids in membranes. Astaxanthin as a radical transfer bridge, *Journal of Food chemistry*, 15(4) : 1437-1442.
144. Lim B.P.A., Nagao J., Terao K., Tanaka T., Suzuki K. et Takama K. (1992). Antioxidant activity of xanthophylls on peroxy radical-mediated phospholipid peroxidation. *Journal of Biochim. Biophys. Acta*. 1126 (2) : 78-184.
145. Lin S.F., Chen Y.C., Chen R.N., Chen L.C., Ho H.O. et Tsung Y-H. (2016). Improving the Stability of Astaxanthin by Microencapsulation in Calcium Alginate Beads. *Journal of pone*, 11(4):11-19.
146. Lin W.N., Kapupara K., Wen Y.T., Chen Y.H., Pan H. et Tsai R., (2020a). *Haematococcus pluvialis*-Derived astaxanthin is a potential neuroprotective agent against optic nerve ischemia. *Marine drugs*, 18 (85), 1-12.
147. Lin X., Matsumoto T., Takuwa M., Chaikh Ali M.S.E., Hirabayashi T., Kondo H et Fujino H., (2020b). Protective effects of astaxanthin supplementation against ultraviolet-induced photoaging in hairless mice. *Biomedicines*, 8 (18), 1-14.
148. Liu X. et Osawa T. (2007). Cis astaxanthin and especially 9-cis astaxanthin exhibits a higher antioxidant activity in vitro compared to the all-trans isomer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 357 : 187–193.
149. Liu Q. et Yao H.Y. (2007). Antioxidant activities of barley seeds extracts. *Journal of Food Chemistry* 102 : 732–737.
150. Liyana-Pathirana C.M. et Shahidi F. (2006). Importance of insoluble bound phenolics to antioxidant properties of wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 : 1256.
151. Lorenz R.T. A., (1999). Technical Review of *Haematococcus* Algae; NatuRose™, Technical Bulletin, *Cyanotech Corporation*, 1–12.
152. Lorenz R.T., (2000). NatuRose™ Natural astaxanthin (*Haematococcus* algae meal) as a carotenoid and vitamin source for Salmonids. *NatuRose™ Technical Bulletin*, 055 : *Cyanotech Corporation*.
153. Lotan T. et Hirschberg J. (1995). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding P-C-4-oxygenase, that converts P-carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis*, *Journal of FEBS Letters*, 364: 125-128.
154. Lu Y.P., Liu S.Y., Sun H., Wu X.M., Li J.J. et Zhu L. (2010). Neuroprotective effect of astaxanthin on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced neurotoxicity *in vitro* and on focal cerebral ischemia *in vivo*. *Journal of Brain Research*, 1360 : 40–48.

-M-

155. Macedo M.F., Miller A.Z., Dionísio A., Saiz-Jimenez C. (2009). Biodiversity of cyanobacteria and green algae on monuments in the Mediterranean Basin: an overview. *Microbiology* (Reading, England), 155 (11) : 3476–90.
156. Maoka T., Tokuda H., Suzuki N., Kato H. et Etoh H. (2012). Anti-oxidative, anti-tumor-promoting, and anti-carcinogenesis activities of nitroastaxanthin and nitrolutein, the reaction products of astaxanthin and lutein with peroxynitrite. *Journal of Marine Drugs*, 10 : 1391–1399.

157. **Marin D.P., Bolin A.P., Macedo R., Sampaio S.C. et Otton R. (2011).** ROS production in neutrophils from alloxan-induced diabetic rats treated in vivo with astaxanthin. *Int Immunopharmacol.* 11 : 103-109.
158. **Mariod A.A., Ibrahim R.M., Ismail M., Ismail N. (2009).** Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seed cake. *Journal of Food Chemistry*, 116 : 306–312.
159. **Markoua G. et Nerantzis E. (2013).** Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advances.* 31 : 1532-1542.
160. **Martin HD., Jager C., Ruck C., Schmidt M. (1999)** Anti- and prooxidant properties of carotenoids. *Journal fur Praktische Chemie*, 341: 302–308.
161. **Masojidek, J., Koblizek, M., Kopecky, J. et Torzillo, G. (2004).** The xanthophyll cycle in green algae (Chlorophyta): Its role in the photosynthetic apparatus. *Plant Biology*, 6: 342–349.
162. **Mata-Gomez E.G., Montanez J.C., Méndez-Zawala A., Aguiar C.N. (2014).** Biotechnological production of carotenoids by yeasts, an overview, *Microbial cell Factories* 13-12.
163. **Mino T., Sugiyama E., Taki H., Kuroda A., Yamashita N., Maruyama M., and Kobayashi M. (1998).** Interleukin-1 and tumor necrosis factors synergistically stimulate prostaglandin E2-dependent production of interleukin-11 in rheumatoid synovial fibroblasts. *Journal of Arthritis. Rheum.* 11: 2004– 2013.
164. **Miki W. (1991).** Biological functions and activities of animal carotenoids, *Journal of Pure Appl. Chem.*, 63 :141-146.
165. **Mirón S.A., García Camacho F., Contreras Gómez A., Grima E. M. et Chisti Y. (2000).** Bubble-column and airlift photobioreactors for algal culture, *aiiche journal*, 46: 1872-1887.
166. **Miyachi M., Tomonori M., Kazunari A. et Izumi M. (2015).** Anti-inflammatory effects of astaxanthin in the human gingival keratinocyte line NDUSD, *Journal of Clinical Biochemistry*, 56 (3): 171–178.
167. **Miyawaki H., Takahashi J., Tsukahara H. et Takehara I. (2008).** Effects of astaxanthin on human blood rheology. *Journal of Clin. Biochem. Nutr.*, 43 : 69–74.
168. **Morais H., Abram A. et Ferreira F. (2008).** Carotenoids Biosynthesis – a review, *revista lusofona*, 7 : 22-42.
169. **Murata K., Oyagi A. et Takahira D., 2012.** Protective effects of astaxanthin from *Paracoccus carotinifaciens* on murine gastric ulcer models, *Phytotherapy research*, 26 :1126-1132.

-N-

170. **Nagaraj S., Arulmurugana P., Rajarama M. G., Sundararajb R. et Rengasamy R. (2012).** Enhanced production of astaxanthin at different physico-chemical parameters in the green alga *Flotow*, *Phykos* 42 (1): 59– 71.
171. **Naguib Y.M. (2000).** Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of agricultural food and chemistry*, 48(4):1150-1154.
172. **Nantel E., Denis D., Gordon R., Northey A., Cirino M., Metters K.M. et Chan C.C. (1999).** Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 In carrageenan-induced inflammation. *Journal of Pharmacology*, 128: 853–859.

173. Nishigaki I., Dmitrovskii A.A., Miki W., Yagi K. (1994). Suppressive effect of astaxanthin on lipid peroxidation induced in rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 16 : 161-166.
174. Nishikawa Y., Minenaka Y., Ichimura M., Tatsumi K., Nadamoto T. et Murabi K. (2005). Effects of astaxanthin and vitamin C on the prevention of gastric ulcerations in stressed rats. *Journal of nutrition science and vitaminol*, 51: 135-141.
175. NREL (National Renewable Energy Laborator) (1998). A Look Back at the U.S.Department of Energy's Aquatic Species Program – Biodiesel from Algae. Close Out Report, 580(24), 328 p.  
[http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/biodiesel\\_from\\_algae.pdf](http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/biodiesel_from_algae.pdf).

-O-

176. Olive G. (2006), Traitement analgésique/antipyrétique : ibuprofène ou paracétamol ? Mise au point, *Journal of Thérapie*, 61 (2): 151–160.
177. Olivier J. et Palou A. (2000). Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of chromatography A.V*, 881(1-2):543-55.
178. Orosa M., Valero J. F., Herrero C. et Abalde J. (2001). Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light conditions. *Journal of Biotechnology Letters*, 23 :1079–1085.
179. Orosa M., Franqueira D., Cid A. et Abalde J. (2005). Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioresource Technology*, 96 : 373–378.

-P-

180. Packer J. E., Mahood J. S., Mora-Arellano V. O., Slater T. F., Willson R. L. et Wolfenden B. S. (1981). Free radicals and singlet oxygen scavengers: reaction of a peroxy-radical with beta-carotene, diphenyl furan and 1,4-diazobicyclo (2,2,2)-octane. *Journal of Biochemical and Biophysical Research Communications*. 98 :901-906.
181. Palozza P. et Krinsky N. I. (1992). Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 297 : 291-295.
182. Parisi V., Tedeschi M., Gallinaro G., Varano M., Saviano S. et Piermarocchi S. (2008). Carotenoids and antioxidants in age-related maculopathy italian study: multifocal electroretinogram modifications after one year. *Ophthalmology*, 115, 324-333.
183. Park J.S., Chyun J.H., Kim Y.K., Line L.L. et Chew B.P. (2010). Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Journal of Nutrition and Metabolism*. 7 : 1–10.
184. Pashkow F.J, Watumull D.G. et Campbell C.L. (2008). Astaxanthin: a novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. *The American Journal of Cardiology*, 101: 58-68.
185. Peterson A. A., Vogel F., Lachance R.P., Fröling M., Antal M.J. et Tester J.W., (2008). Thermochemical biofuel production in hydrothermal media: a review of sub- and supercritical water technologies. *Journal of Energy and Environmental Science*, 1 : 32-65.

186. Prescott L.M., Harley J.H. et Klein D.A. (2003). Microbiologie, 2<sup>ème</sup> édition, De Boeck p 571.
187. Prieto P., Pineda M. et Aguilar M., (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Journal of Anal. Biochem*, 269 : 337–341.
188. Prior RL., Wu X. et Schaich K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10):4290–4302.
189. Proctor V.W. (1957). Some controlling factors in the distribution of *Haematococcus pluvialis*. *Ecology* 38 : 457–462.
190. Proschold T. et Frederik L. (2007). Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches" In Brodie J. et Jane L. (2007). Unravelling the algae - the past, present and future of algal systematics. *CRC Press, Taylor & Francis Group*.

-R-

191. Ranga Rao A., Sarada R. et Ravishankar G.A. (2007). Stabilization of astaxanthin in edible oils and its use as an antioxidant. *Journal of Science Food Agriculture*, 87 : 957–965.
192. Ranga Rao A., Sarada R., Baskaran V. et Ravishankar G. A. (2009). Identification of Carotenoids from Green Alga *Haematococcus pluvialis* by HPLC and LC-MS (APCI) and Their Antioxidant Properties, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(11) : 1333–1341.
193. Ranga Rao A., HarshvardhanReddy A., et AradhyavS.M. (2010). Antibacterial properties of *Spirulina platensis*, *Haematococcus pluvialis*, *Botryococcus braunii* microalgal extracts. *Journal of Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. 4 : 809–819.
194. Ranga Rao A.R. (2011). Production of astaxanthin from cultured green alga *Haematococcus pluvialis* and its biological activities. Ph.D Thesis, University of Mysore, pp: 310.
195. Ranga Rao A., Baskaran V., Sarada R. et Ravishankar G.A. (2013). *In vivo* bioavailability and antioxidant activity of carotenoids from micro algal biomass—A repeated dose study. *Journal of Food Research International*, 54 : 711–717.
196. Ranga Rao A., Siew Moi P., Sarada R. et Ravishankar G. A. (2014). Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications-A Review, *Journal of marine Drugs*, 12: 128-153.
197. Raposo M.F.J., Morais A.M.M.B. et Morais R.S.C. (2012). Effects of spray drying and storage on astaxanthin content of *Haematococcus pluvialis* biomass. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28 : 1253–1257.
198. Raposo MFJ., Costa de Morais RMS. et Bernardo de Morais AMM. (2013). Bioactivity and Applications of Sulphated Polysaccharides from Marine Microalgae, *Journal of Marine Drugs* 11 : 233-52.
199. Raposo M.F., Bernardo de Morais A.M.M, et Costa de Morais R.M.S. (2015), Carotenoids from Marine Microalgae: A Valuable Natural Source for the Prevention of Chronic Diseases, *Journal of Marine Drugs*, 13 : 5128-5155.
200. Recht L., Zarka A. et Boussiba S. (2012). Patterns of carbohydrate and fatty acid changes under nitrogen starvation in the microalgae *Haematococcus pluvialis* and

- Nanno chloropsis* sp. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 94 : 1495–1503.
201. Régnier P., Bastias J., Rodriguez-Ruiz V., Caballero-Casero N., Caballo C., Sicilia D., Fuentes A., Maire M., Crepin M., Letourneur D., Gueguen V., Rubio S. et Pavon-Djavid G. (2015). Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* Prevents Oxidative Stress on Human Endothelial Cells without Toxicity, *Journal of Marine Drugs*, 13 : 2857-2874.
202. Renstrøm B., Borch G., Skulberg O.M., et Liaaen-Jensen S. (1981). Optical purity of (3S,3'S)- astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Phytochemistry* 20 : 2561–2564.
203. Reto M., Almeida C., Rocha J., Sepodes B. et Figueira M.E. (2014). Green Tea (*Camellia sinensis*): Hypocholesterolemic Effects in Humans and Anti-Inflammatory Effects in Animal. *Pharmacology & Pharmacy*, 5: 1113-1118.
204. Ritchlin C. T., Haas-Smith S. A., Li P., Hicks D. G., et Schwarz E. M. (2003). Mechanisms of TNF- $\alpha$ - and RANKL mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *Journal of Clinical Investigation*, 111 : 821–831.
205. Rmiki NE., Schoefs B. et Lemoine Y. (1999). Carotenoids and stress in higher plants and algae. Ed. Handbook of plant and crop stress. Marcel Dekker, New York, 465–482.
206. Rock, C. L. (2009). Carotenoids and cancer. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG.

-S-

207. Saha S. K., McHugh E., Hayes J., Moane S., Walsh D. et Murray P. (2013). Effect of various stress regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioresource Technology*. 128 : 118–124.
208. Sahu A.N et Laloo D. (2011). Antioxidant activities of three Indian commercially available Nagakesar: An *in vitro* study. *Journal of Chemistry Pharmacology Research*, 3(1):277-283.
209. Sanchez-Moreno C. (2002). Method used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Journal of Food Science and Technology International*, 8:121-137.
210. Sandmann G., Woods W.S. et Tuveson R.W. (1990). Identification of carotenoids in *Erwinia herbicola* and in a transformed *Escherichia coli* strain. *FEMS Microbiology Letters*, 71 : 77-82.
211. Santhosé I. B., Elumalai S. et Rajesh Kanna G. (2012). Airlift Photobioreactor Cultivation of a New Strain of *Haematococcus pluvialis* Collected from High Altitude Regions of Himalayas, *International Journal of Science and Research*, 3 (10) : 2289-2292.
212. Santos M.F. et Mesquita, J.F. (1984). Ultrastructural study of *Haematococcus lacustris* (Girod.) Rostafinski (Volvocales). Some aspects of carotenogenesis. *Cytologia*, 49 : 215–228.
213. Samaké L. (2002). Prescription des anti-inflammatoires au niveau d'un Centre de Santé Communautaire, cas de l'ASACOMA. Thèse de pharmacie, Bamako, FMPOS.

214. Sarada R., Tripathi U., Ravishankar G. A. (2002). Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Journal of Process Biochemistry*, 37 : 623–627.
215. Sarada R., Vidhyavathi R., Usha D. et Ravishankar G.A. (2006). An efficient method for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54 : 7585–7588.
216. Satoh A., Tsuji S., Okada Y., Murakami N., Urami M., Nakagawa K., Ishikura M., Katagiri M., Koga Y., et Shirasawa T. (2009). Preliminary clinical evaluation of toxicity and efficacy of a new astaxanthin rich *Haematococcus pluvialis* extract, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 44 : 280–284.
217. Schmidt I., Schewe H., Sören S., Jin C., Buckingham J., Hübeline M., Sandmann G. et Jens Schrader J. (2010). Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 89:555–571.
218. Shah M.M.R., Liang Y., Cheng J.J. et Daroch M. (2016). Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products, *Frontiers in Plant Science*, 7: 531-545.
219. Sharma N. K., Rai A.K., Singh S. et Brown R.M. (2007). Airborn algae: their present status and relevance, *Journal of Phycology*, 43(4) : 615–627.
220. Sherwood T. (2006). *Physiologie humaines*. 2ème édition. De Boeck: Paris. pp : 452-462.
221. Shimada KK., Fujikawa KY. et Nakamura T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on autooxydation of soybean oil in cyclodextrin, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40 : 945-948.
222. Sialve B. et Steyer J-P. (2013). Les microalgues, promesses et défis, *Journal of Innovations Agronomiques*, 26 :25-33.
223. Sineshchekov O.A. Litvin F.F. et Keszthlyi L. (1990). Two components of photoreceptor potential in phototaxis of the flagellated green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Biophysics*. 57: 33-39.
224. Sila A. (2015). Récupération de biomolécules d'origine aquatique en vue d'une valorisation comme ingrédients fonctionnels dans les domaines alimentaire et pharmaceutique, thèse de doctorat, école polytechnique, université de Lille. p 102.
225. Simo R. (2001). Production of atmospheric sulfur by oceanic plankton: biogeochemical, ecological and evolutionary links. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(6): 287-94.
226. Simons R. K., Junger W. G., Loomis W. H., et Hoyt D. B. (1996). Acute lung injury in endotoxemic rats is associated with sustained circulating IL-6 levels and intrapulmonary CINC activity and neutrophil recruitment--role of circulating TNF- $\alpha$  and IL- $\beta$ ?, *Journal of Shock*, 6: 39–45.
227. Sindhu P. et Sherief M. (2011). Extraction, Characterization, Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Carotenoids from the Shell Waste of Arabian Red Shrimp *Aristeus alcocki*, *Journal of The Open Conference Proceedings*, 2: 95-10.
228. Spiller G.A. et Dewell A. (2004). Safety of an Astaxanthin-Rich *Haematococcus pluvialis* Algal Extract: A Randomized Clinical Trial, *Journal of Medicinal Food*, 6(1) : 2458-2469.
229. Spolaore P., Jonnas-Cassan C., Duran E. et Isambert A. (2006). Commercial applications of microalgae, *Journal of bioscience and bioengineering*, 101 : 87-96.

230. Solomonov Y., Nurit H. et Rachel L. (2018). The Combined Anti-Inflammatory, Effect of Astaxanthin, Lyc-O-Mato and Carnosic Acid In Vitro and In Vivo in a Mouse Model of Peritonitis. *Journal of Nutr Food Sci*, 8 : 1-12.
231. Suzuki Y., Ohgami K., Shiratori K., Jin X.H., Ilieva I. et Koyama Y. (2006). Suppressive effects of astaxanthin against rat endotoxin-induced uveitis by inhibiting the NF-kappaB signaling pathway. *Journal of Exp Eye Res.* 82 : 275-281.

-T-

232. Taiz L. et Zeiger E., (2006). Plant physiology - fourth edition. *Sinauer, Associates*, p.764.
233. Tanaka T., Morishita Y., Suzui M., Kojima T., Okumura A. et Mori H. (1994). Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by the naturally occurring carotenoid astaxanthin. *Journal of Carcinogenesis*, 15: 15–19.
234. Tanaka T., Makita H., Ohnishi M., Mori H., Ssatoh K. et Hara A. (1995). Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin. *Cancer Res.* 55, 4059 – 4064.
235. Tam LT., Hoang DH., Ngoc Mai DT., Hoai Thu NT., Lan Anh HT. et Diem Hong D. (2012). Study on the effect of salt concentration on growth and astaxanthin accumulation of microalga *Haematococcus pluvialis* as the initial basis for two phase culture of astaxanthin production, 34(2) : 213-223.
236. Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M. et Polissiou M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller. *Journal of Food Chemistry*, 90 : 333-340.
237. Terazawa S., Nakajima H., Shingo M., Niwano T. et Imokawa G., (2012) Astaxanthin attenuates the UVB-induced secretion of prostaglandin E2 and interleukin-8 in human keratinocytes by interrupting MSK1 phosphorylation in a ROS depletion-independent manner. *Journal of Exp Dermatol*, 21(1) : 11-17.
238. Tjahjono A.E., Kakizono T., Hayuma Y., Nishio N. et Nagai S. (1994). Isolation of resistant mutants against carotenoid biosynthesis inhibitors for a green alga *Haematococcus pluvialis* and their hybrid formation by protoplast fusion for breeding of higher astaxanthin producers. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 77: 352–357.
239. Tocquin P., Fratamico A. et Franck F. (2011). Screening for a low-cost *Haematococcus pluvialis* medium reveals an unexpected impact of a low N:Pratio on vegetative growth *Journal of Applied Phycology*.23(3) :365-373.
240. Torres-Carvajal L.K., González-Delgado A.D., Barajas-Solano A.F., Suarez-Gelvez J.H. et Urbina-Suarez N.A. (2017). Astaxanthin Production from *Haematococcus pluvialis*: Effects of Light Wavelength and Salinity, *Contemporary Engineering Sciences*, 10 (35), 1739-1746.
241. Torzillo G., Goksan T., Isik O. et Gokpinar S. (2005). Photon irradiance required to support optimal growth and interrelations between irradiance and pigment composition in the green algae *Haematococcus pluvialis*. *European Journal of Phycology*, 40 (2) :233- 240.
242. Tripathi U., Venkateshwaran G., Sarada R. et Ravishankar G. A. (2001). Studies on *Haematococcus pluvialis* for improved production of astaxanthin by mutagenesis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17 : 143–148.

243. **Trung V., Son T., Phuc N. et Truc M. (2017).** Growth, Carotenoid Production, Antioxidant Capacity and Lipid Accumulation of *Haematococcus* sp. Under Different Light Intensities. *American Journal of Plant Biology*. 2 (4) : 142-147.
244. **Tso M.O. et Lam T.T. (1996).** Method of retarding and ameliorating central nervous system and eye damage, US patent, Board of trustees of the University of Illinois, United States of America, 552-573.
245. **Turkez H., Geyikoglu F. et Yousef M.I. (2012).** Beneficial effect of astaxanthin on 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced liver injury in rats. *Journal of Toxicol. Ind. Health*, 29 : 591–599.
246. **Turkez H., Geyikoglu F., Yousef MI, Togar B., Gurbuz H. et Celik K. (2014).** Hepatoprotective potential of astaxanthin against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in cultured rat hepatocytes. *Journal of Toxicol Ind Health*. 30(2) : 101-112.

-U-

247. **Uchiyama K., Naito Y., Hasegawa G., Nakamura N., Takahashi J. et Yoshikawa T. (2002).** Astaxanthin protects beta-cells against glucose toxicity in diabetic db/db mice. *Journal of Redox Rep.*, 7 : 290-293.

-V-

248. **Van Den Berg H., Faulks R., Granado H.F., Hirschberg J., Olmedilla B., Sandmann G., Southon S. et Stahl W. (2000).** The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80 : 880-912.
249. **Vidhyavathi R., Venkatachalam L., Sarada R., Ravishankar G.A. 2008.** Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, 59 : 1409-1418.
250. **Visioli F. et Artaria C. (2017).** Astaxanthin in cardiovascular health and disease : Mmechanisms of action, therapeutic merits, and knowledge gaps. *Food fonction*, 8, 39-63.

-W-

251. **Wan M., Zhang J., Hou D., Fan J., Li Y. et Huang J. (2014).** The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light–dark cyclic cultivation. *Journal of Bioresource Technology*, 167 : 276 283.
252. **Wang X., Willén R. et Wadström T. (2000).** Astaxanthin-rich algal meal and vitamin C inhibit *Helicobacter pylori* infection in BALB/cA mice. *Journal of Antimicrob Agents Chemother*, 44: 2452-2457.
253. **Wang J.J., Chen Z.Q. et Lu W.Q. (2012).** Hypoglycemic effect of astaxanthin from shrimp waste in alloxan-induced diabetic mice. *Journal of Medicinal Chemistry Research*, 21(9) : 2363-2367.

254. Wang J., Han D., Sommerfeld MR., Lu C. et Hu Q. (2013). Effect of initial biomass density on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* in an outdoor photobioreactor, *Journal of Applied Phycology*, 25(1) : 253-260.
255. Wantana R., Tassanee N. et Subhadhirasakul S. (2009). Antinociceptive, antipyretic, and anti-inflammatory activities of *Putranjiva roxburghii* Wall. leaf extract in experimental animals. *Journal of Natural Medicine*, 63 : 290–6.
256. Wayama M., Ota S., Matsuura H., Nango N., Hirata A. et Kawano S. (2013). Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *journal.pone*. 618.
257. Wen X., Xiao L., Zhong Z., Wang L., Li Z., Pan X. et Liu X. (2017). Astaxanthin acts via LRP-1 to inhibit inflammation and reverse lipopolysaccharide-induced M1/M2 polarization of microglial cells. *oncotarget*, 8, 69370-69385.
258. Whyte JNC. et Sherry KL. (2001). Pigmentation and Composition of Flesh of Atlantic Salmon Fed Diets Supplemented with the Yeast *Phaffia rhodozyma*, *Journal of North American Journal of Aquaculture*, 63(1) : 52-57.
259. Winter C.A., Risley G.A. et Nuss G.W. (1962). Carrageenan- induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 3, 544–547.

-Y-

260. Yang J., Guo J. et Yuan J. (2008). *In vitro* antioxidant properties of rutin. *Journal of LWT*, 41 : 1060- 1066.
261. Yang Y., Seo J.M., Nguyen A., Pham T.X., Park H.J. et Park Y. (2011). Astaxanthin-rich extract from the green alga *Haematococcus pluvialis* lowers plasma lipid concentrations and enhances antioxidant defense in apolipoprotein E knockout mice. *Journal of Nutrition*. 141 : 1611-1617.
262. Yang Y., Kim B. et Lee J.Y. (2013). Astaxanthin Structure, Metabolism, and Health Benefits. *Journal of Hum. Nutrition Food Science*, 1003(1) : 1-12.
263. Yao J., Kim H.S., Kim J.Y., Choi Y. et Park J. (2020). Mechanical stress induced astaxanthin accumulation of astaxanthin on a chip. *Lab on a chip*, 3 (20), 647-654.
264. Yasui Y., Hosokawa M., Mikami N., Miyashita K. et Tanaka T. (2001). Dietary astaxanthin inhibits colitis and colitis-associated colon carcinogenesis in mice via modulation of the inflammatory cytokines. *Journal of Chemico-Biological Interactions*, 193: 79-87.
265. Yattasaye A. (2004). Analyse de la prescription des anti-inflammatoires non stéroïdiens dans les centres de santé de référence du District de Bamako. cas des communes I, IV, et V FMPOS.
266. Ye Q., Huang B., Zhang X., Zhu Y. et Chen X., (2012). Astaxanthin protects against MPP(+)-induced oxidative stress in PC12 cells via the HO-1/NOX2 axis. *Journal of BMC Neuroscience*, 13, 156.
267. Yong, Y.Y.R. et Lee, Y.K. (1991). Do carotenoids play a photoprotective role in the cytoplasm of *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta)?, *Journal of Phycologia*, 30 : 257–61.
268. Yoshida H., Yanai H., Ito K., Tomono Y., Koikeda T. et Tsukahara H. (2010). Administration of natural astaxanthin increases serum HDL-cholesterol and adiponectin in subjects with mild hyperlipidemia. *Journal of Atherosclerosis*. 209: 520-523.

269. Yuan J.P., Peng J., Yin K. et Wang J.H. (2011). Potential health-promoting effects of astaxanthin: a high-value carotenoid mostly from microalgae. *Molecular Nutrition and Food Research* 55: 150165.
270. Yuan C., Du L., Jin Z. et Xu X. (2013). Storage stability and antioxidant activity of complex of astaxanthin with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Carbohydrate Polymers.*, 91, 385–389.

-Z-

271. Zakaria, Z.A., Abdul Hisam, E.E., Rofiee, M.S., Norhafizah M., Somchit, M.N., Teh, L.K. et Salleh, M.Z. (2011). In vivo antiulcer activity of the aqueous extract of Bauhinia purpurea leaf. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 1047– 1054.
272. Zhao X., Zhang X., Fu L., Zhu H. et Zhang B. (2016). Effect of extraction and drying methods on antioxidant activity of astaxanthine from *Haematococcus pluvialis*. *Journal of food and bioproducts processing*, 99, 197–203.
273. Zhang X., Pan L., Wei X., Gao H., et Liu J. (2007). Impact of astaxanthin-enriched algal powder of *Haematococcus pluvialis* on memory improvement in BALB/c mice. *Journal of Environ. Geochem. Health* 29, 483–489.
274. Zhang D.H. et Lee Y.K. (2001). Two-step process for ketocarotenoid production by a green alga, *Chlorococcum* sp. Strain MA-1. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 55:537–540.
275. Zhekisheva M., Boussiba S., Khozin-Goldberg I., Zarka A. et Cohen Z. (2002). Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. *Journal of Phycology*, 38: 325–331.
276. Zeng X., Danquah M.K., Chen X.D. et Lu Y. (2011). Microalga bioengineering from CO<sub>2</sub> fixation to biofuel production, *Renewable and Sustainable Energy Review*, 15:3252-3260.

**Annexe 1 :** Croissance de la microalgue isolée sur bouillon BBM à différentes concentrations de nitrates de sodium (0, 0.15, 0.25, 0.50 et 0.75 g/l) à 25±02°C et à une intensité lumineuse de 40 photons/m<sup>2</sup>/s en fioles Erlenmeyer pendant dix jours.

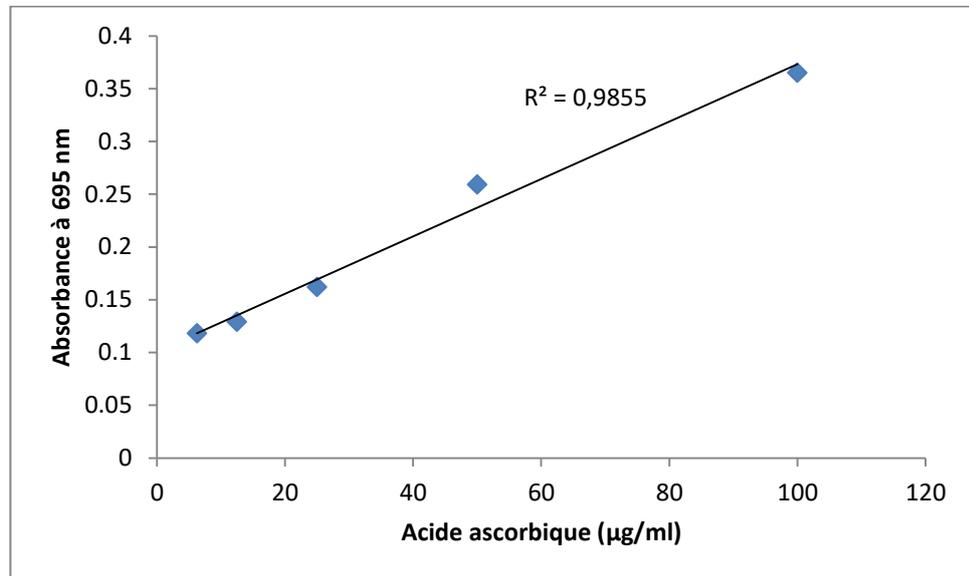
Jour	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nombre de cellules décomptées	221±35	242±32	261±21	264±28	265±24	259±29	248±34	267±65	275±38	272±31
	243±32	275±45	344±36	384±42	606±144	995±80	1269±129	1409±134	1585±126	1612±215
	266±48	399±35	589±48	1095±98	1589±89	1995±126	2925±116	3489±198	3762±101	3769±213
	235±32	395±34	692±46	1295±86	1826±104	2595±115	3852±198	4756±73	5062±165	5189±143
	247±25	420±28	620±58	1386±103	1930±68	2850±245	4060±215	4890±65	5175±234	5282±156

**Annexe 2 :** Quantités d'astaxathine accumulées par la microalgue *H. pluvialis* sur les différents milieux de stress à  $25\pm 02^{\circ}\text{C}$  et sous luminosité de  $200\ \mu\text{Moles photons/m}^2/\text{s}$  pendant 14 jours.

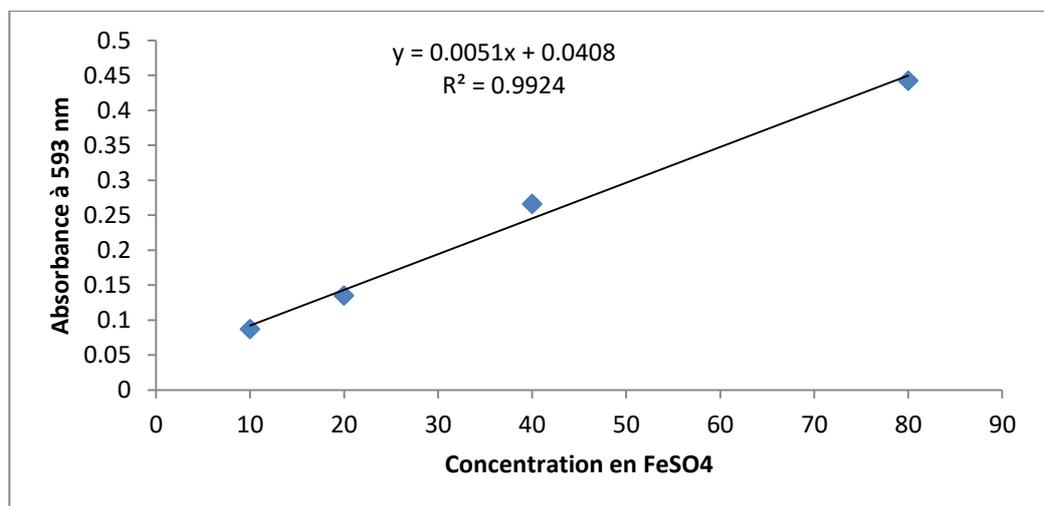
Type de milieu	Quantité d'astaxathine accumulée (mg/L)
Milieu BBM ordinaire	$23,12\pm 3,57$
Milieu BBM sans source d'azote (0% de $\text{NaNO}_3$ )	$67,25\pm 2,28$
Milieu BBM sans source de phosphore (0% de $\text{PO}_3$ )	$51,58\pm 5,14$
Milieu BBM sans source d'azote et de phosphore (0% de $\text{NaNO}_3$ et 0% de $\text{PO}_3$ ).	$39,63\pm 5,32$
Milieu BBM à 16 mM de chlorure de sodium	$29,23\pm 4,15$
Milieu BBM à 32 mM de chlorure de sodium	$38,56\pm 2,39$
Milieu BBM à 64 mM de chlorure de sodium	$13,48\pm 6,12$

### Annexe 3

#### Tests *In Vitro* : courbes d'étalonnage



**Figure 1:** courbe étalon de l'acide ascorbique pour la mesure de la capacité antioxydante totale.



**Figure 2 :** Courbe d'étalonnage de sulfate de fer à 593 nm.

## Annexe 4

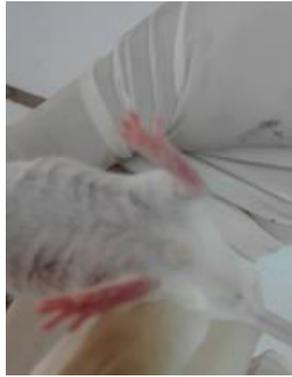
### Tests *In Vivo*



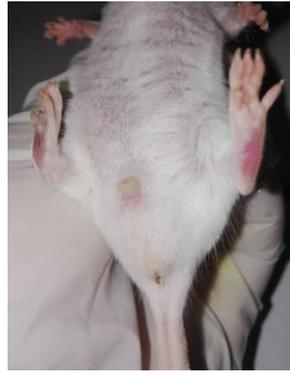
**Figure 3 :** Administration orale de l'extrait de *H. pluvialis* aux souris



**Figure 4 :** Injection de la carragénine dans la patte postérieure gauche de la souris.



« A »



« B »



« C »



« D »



« E »



« F »

**Figure 5** : Représentation photographique de la patte gauche (oedémateuse) des souris du groupe contrôle (A), le groupe de référence (B), le groupe traité par 50 mg/kg d'astaxanthine (C), le groupe traité par 100 mg/kg d'astaxanthine (D) et le groupe traité par 150 mg/kg d'astaxanthine (E).



**Figure 6:** Injection intra-péritonéale de 0,2 ml de l'acide acétique à 1 % à la souris.



**Figure 7:** Spasmes réalisées par les souris injectés par l'acide acétique.



**Figure 8** : Sacrifice et récupération des estomacs des souris.