

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn  
Badis-Mostaganem  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس  
مستغانم  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par :

**KHERRAF Hanane Yousra et CHERAITIA Souad**

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES**

**Spécialité: Nutrition et pathologies**

THÈME

# BENEFICES THÉRAPEUTIQUES DE L'HUILE DE THON

Soutenu publiquement le 30/06/2021

DEVANT LE JURY

Président	Dr. Mokhtar Meriem	Grade	MCA	U. Mostaganem
Examineur	Dr. Zabouri younes	Grade	MCA	U. Mostaganem
Encadrant	Dr. Keddari soumia	Grade	MCA	U. Mostaganem
Co-encadrant	Melle Bouhend Abla	Grade	Doctorante	U. Mostaganem

*Année universitaire 2020-2021*

## **Remerciements**

*Nous remercions tout d'abord Allah tous puissant qui nous a donné la santé, le courage et la patience afin de pouvoir accomplir ce modeste travail.*

*On tient à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de notre stage et qui nous ont aidées lors de la rédaction de ce mémoire.*

*On voudrait dans un premier temps remercier, notre directrice de mémoire Mme. **KEDDARI S.** maître de conférences A, au département des Sciences Alimentaires à l'université de Mostaganem, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion.*

*Dans second temps, On exprime notre gratitude à Melle. **BOUHEND Abba**, notre Co-encadrante qui nous a beaucoup appris sur les défis à relever dans le monde des laboratoires. Elle a partagé ses connaissances et expériences dans ce domaine, tout en nous accordant sa confiance et une large indépendance.*

*Nous adressons nos remerciements au **Dr. Mokhtar M.**, maître de conférences A au Département des sciences alimentaires, Université Mostaganem, d'avoir accepté de présider le jury.*

*Nos profonds remerciements vont au **Dr.Zabouri Y.** maître de conférences A au Département des Sciences alimentaires, Université de Mostaganem, qui nous fait l'honneur d'examiner ce travail.*

*On tient à témoigner toute notre reconnaissance aux personnes suivantes, pour leur aide dans la réalisation de ce mémoire :*

*-Mme. **HAMED Djahira**, pour nous avoir répondu à nos questions, et pour le partage de son expérience personnelle.*

*-Nos parents, pour leur soutien constant et leurs encouragements.*

*-Toute l'équipe pédagogique de la faculté SNV de l'université de Mostaganem et les intervenants professionnels responsables de notre formation, pour avoir assuré la partie théorique et pratique de celle-ci.*

## *Dédicaces*

*Je dédie d'abord ce travail à mes chers parents que j'adore, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,*

*A mes deux frères, Farouk et Boumediene, et à toute ma famille, pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,*

*Enfin, je dédie ce travail à mon binôme Souad et à toute ma promotion « Nutrition et pathologie 2021 ».*

***Hanane Yousra***

*Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.*

*A l'homme, mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect : mon cher père Mohamed.*

*A ma chère mère qui m'a soutenu et encouragé durant ces années d'études.*

*A mon adorable petite sœur Nabila qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.*

*A mes très chers frères Abdellatif et Sofiane, que Dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout réussite.*

*A mes grands-mères, mes oncles et mes tantes. Que Dieu leur donne une longue et joyeuse vie.*

*A tous les cousins, les voisins et les amis que j'ai connu jusqu'à maintenant.*

*Merci pour leurs amours et leurs encouragements.*

*Sans oublier mon binôme Hanane pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.*

***Souad***

## Résumé

Cette étude a pour but d'évaluer et de comparer quelques activités biologiques de l'huile de thon rouge obtenue par délipidation de la farine de thon par Soxhlet. La première étape consiste à évaluer l'activité antioxydante de l'huile de thon par la méthode de DPPH. L'activité antibactérienne est réalisée selon la méthode de diffusion sur gélose en utilisant des disques de papier whatman imprégnés de l'huile étudiée. L'activité anti-inflammatoire a été évaluée par 3 méthodes, méthode de stabilisation de la membrane, d'inhibition et de la dénaturation des protéines. Selon les résultats obtenus l'huile de thon a un effet anti-radicalaire significatif avec un  $IC_{50} = 0.08$  mg/ml et un effet antimicrobien plus au moins remarquable, il possède une activité inhibitrice modeste vis à vis d'*Escherichia coli* et de *Bacillus cereus*, où le diamètre d'inhibition est de 11mm. L'huile de thon est dotée d'un pouvoir anti-inflamatoire démontré par les 3 techniques testées.

**Mots clés :** Huile de thon, inflammation, stress oxydant, activité antibactérienne.

## Abstract

*The purpose of this study is to evaluate and compare some biological activities of bluefin tuna oil obtained by delipidation of tuna meal by Soxhlet. The first step is to assess the antioxidant activity of tuna oil by the DPPH method. Antibacterial activity is achieved by the agar diffusion method using whatman paper discs impregnated with the test oil. Anti-inflammatory activity was assessed by 3 methods, membrane stabilization method, protein inhibition and denaturation method. According to the results obtained, tuna oil has a significant anti-free radical effect with an  $IC_{50} = 0.08$  mg / ml and a more or less remarkable antimicrobial effect, it has a modest inhibitory activity against *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*. , where the inhibition diameter is 11mm. Tuna oil has an anti-inflammatory power demonstrated by the 3 techniques tested.*

**Keywords:** Tuna oil, inflammation, oxidative stress, antimicrobial activity.

## الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم ومقارنة بعض الأنشطة البيولوجية لزيت التونة ذات الزعانف الزرقاء التي تم الحصول عليها عن طريق تفريغ مسحوق التونة بواسطة Soxhlet. تتمثل الخطوة الأولى في تقييم النشاط المضاد للأكسدة لزيت التونة بطريقة DPPH. يتم تحقيق الفعالية المضادة للبكتيريا عن طريق طريقة انتشار الأجار باستخدام أقراص ورقية مشربة بزيت الاختبار. تم تقييم النشاط المضاد للالتهابات بثلاث طرق ، طريقة تثبيت الغشاء ، تثبيط وتمسخ البروتينات ، ووفقاً للنتائج التي تم الحصول عليها فإن زيت التونة له تأثير كبير مضاد للجنور الحرة مع تركيز  $IC = 0.08$  مجم / مل وأكثر أو أقل. تأثير ملحوظ مضاد للميكروبات ، له نشاط مثبط متواضع ضد الإشريكية القولونية و *Bacillus cereus* ، حيث يبلغ قطر التثبيط 11 مم. قوة مضادة للالتهابات تم إثباتها من خلال 3 تقنيات تم اختبارها.

**الكلمات المفتاحية:** زيت التونة ، الالتهابات ، الإجهاد التأكسدي ، النشاط المضاد للميكروبات .

## **Liste des figures**

**Figure 01** : causes, réponses et conséquences pathologiques de l'inflammation (**Medzhitov, 2008**)

**Figure 02** : Différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs, principales sous populations, cytokines majeures produites et fonctions immunitaires principales (**DeFranco et al., 2009**)

**Figure 03** : Voies métaboliques des différents médiateurs lipidiques (**Shimizu, 2009**)

**Figure 04** : Mécanisme d'action des stéroïdes (**Janeway et al., 2009**)

**Figure 05** : Les radicaux libres et leurs cibles (**Favier, 2003**)

**Figure 06** : la farine de poisson

**Figure 07** : extraction et conservation de l'huile de thon

**Figure 08** : Détermination de la zone d'inhibition par la méthode de diffusion des disques (**Zaiki, 1988**)

**Figure 09** : Protocole de préparation de la suspension (**Kar et al., 2012**)

**Figure 10** : l'activité anti-oxydante de l'huile de thon et de l'EDTA

**Figure 11** : Effet anti radicalaire de l'huile de thon sur la réduction du DPPH

**Figure 12** : Photographies l'activité antimicrobienne de l'huile de thon

**Figure 13** : Pourcentage de la stabilisation de la membrane des globules rouges traités par l'huile de thon et le Diclofenac

**Figure 14** : pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine par l'huile de thon.

**Figure 15**: les pourcentages d'inhibition de la dénaturation de BSA par l'huile de thon et le standard (diclofenac sodique)

## Liste des tableaux

**Tableau 01** : valeurs nutritionnelles pour 100g de thon (Aberoumand et Fazeli, 2019 ; Sardenne *et al.*, 2020)

**Tableau 02** : Les acides gras du thon (%) (Leiwakabessy *et al.*, 2019)

**Tableau 03** : La Composition en acide aminés de 100g de protéines du thon (Xiang *et al.*, 2021)

**Tableau 04** : Les vitamines du thon cru

**Tableau 05** : Les minéraux et oligo-éléments dans 100g de thon (Elkhamisy *et al.*, 2021)

**Tableau 06** : Tableau descriptif des différentes souches bactériennes utilisées pour le test de l'activité antibactérienne de l'huile de thon

**Tableau 07**: activité anti-oxydante de l'huile de thon *in vitro*.

**Tableau 08** : Tableau récapitulatifs des zones d'inhibition (en mm).

**Tableau 09** : activité anti-inflammatoire de l'huile de thon (stabilisation de la membrane des globules rouges humains HRBC) *in vitro*.

**Tableau 10** : activité anti-inflammatoire de l'huile de thon (essai biologique de l'inflammation) *in vitro*.

**Tableaux 11** : activité anti-inflammatoire de l'huile de thon (Inhibition de la dénaturation protéique) *in vitro*.

## Liste des abréviations

<b>ABTS</b> :2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate)	<b>FRAP</b> Ferric Reducing Antioxidant Power
<b>ADN</b> Acide désoxyribonucléique	<b>GSH</b> Glutathion réduit
<b>AINS</b> Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien	<b>GSSG</b> Glutathion oxydé
<b>AP-1</b> Activator Protein-1	<b>HAT</b> Hydrogen Atom Transfert
<b>ATCC</b> American type culture collection	<b>HDL</b> Cholestérol
<b>BHIB</b> BrainHeart Infusion Broth	<b>HETE</b> Hydroxyeicosatétraoïque
<b>BSA</b> Bovine Serum Albumin	<b>Hg</b> Mercure
<b>Ca</b> Calcium	<b>HPETE</b> Hydroperoxyeicosatétraoïque
<b>Cd</b> Cadmium	<b>HRBC</b> Stabilisation de la membrane des globules rouges humains
<b>CD</b> Cluster of Differentiation	<b>IFN</b> Interféron
<b>COX</b> Cyclooxygénase	<b>IFN</b> Interféron
<b>Cu</b> Cuivre	<b>IL</b> Interleukine
<b>DHA</b> Acide Docosahexaénoïque	<b>iNOS</b> Oxyde Nitrique Synthétase inductible
<b>DMSO</b> Diméthylsulphoxyde	<b>K</b> Potassium
<b>DPPH</b> 1,1 Diphényl 2 PycrilHydrazi	<b>LPS</b> Lipopolysaccharide
<b>EDTA</b> Éthylène-diamine-tétra-acétique	<b>Mg</b> Magnésium
<b>EPA</b> Acide Eicosapentaénoïque	<b>MH</b> Muller Hinton
<b>ERN</b> Espèces Réactives de l'Azote	<b>Na</b> Sodium
<b>ERO</b> Espèces Réactives de l'Oxygène	<b>NADH</b> Nicotinamide Adénine Dinucléotide
<b>Fe</b> Fer	
<b>Fl</b> Fluorescéine	

**NADPH** Nicotinamide Adénine  
DinucléotidePhosphate

**NAOH** Hydroxydede sodium

**NF** Norme Française

**NF- $\kappa$ B** Nuclear Factor-kappa B

**NK** Natural Killer

**nNOS** Oxyde Nitrique Synthétase  
neuronale

**NO** Monoxide;azote

**NOS** Oxyde Nitrique Synthétase

**ONOO**Peroxynitrites

**ORA** Oxygen Radical Absorbance  
Capacity

**P** Phosphore

**PAF** Platelet-Activating Factor

**Pb** Plomb

**PBS** Tampon Phosphate Salin

**PG** Prostaglandine

**pH** Potentiel Hydrogène,

**PLA2** Phospholipase A2

**RSA** Radical Scavenging Activity)

**SET** Single Electron Transfert

**SOD** Superoxyde dismutase

**TEAC** Trolox Equivalent Antioxidant  
Capacity

**Th1** Lymphocytes T helper de type 1

**Th2** Lymphocytes T helper de type 2

**TNF** Tumor Necrosis Factor

**TPA** Tétradécanyolphorbolacétate

**TPA** Tétradécanyolphorbol acetate

**TRAP** Total Reactive Antioxidant  
Potential

**Trx** Thiorédoxine

**TxA2** Thromboxane A2

**UV** Ultra-Violet

## **Table des matières**

**Remerciement**

**Dédicace**

**Résumé**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Liste des abréviations**

## **Partie bibliographique**

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I : Généralités sur le thon rouge.....</b>	<b>2</b>
I.1. Origines du thon .....	2
I.2. Biologie du thon rouge .....	2
I.3. Valeurs nutritionnelles.....	2
I.4. Recommandations de consommation.....	3
I.5. Composition biochimique de l'espèce étudiée.....	3
I.5.1. Acide gras oméga 3 .....	3
I.5.2 Protéines.....	5
I.5.3. Les vitamines du thon.....	5
I.5.4. Minéraux et oligoéléments du thon.....	7
I.6. Bénéfices de L'huile de poisson.....	8
I.6.1. Protéger le cœur.....	8

1.6.2. Réduire le cholestérol.....	8
1.6.3. Renforcer les os.....	8
I.6.4. Soulager les douleurs des règles.....	8
<b>I.6.5. Traiter les maladies mentales.....</b>	<b>9</b>
<b>Chapitre II : l'inflammation et le stress oxydant.....</b>	<b>10</b>
II.1. L'inflammation.....	10
II.1.1. Définition.....	10
II.1.2. La réaction inflammatoire.....	11
II.1.2.1.L'initiation : réaction vasculo-exsudative.....	11
II.1.2.2. La réaction cellulaire.....	12
II.1.3. Les cellules de l'inflammation.....	12
II.1.3.1. Les cellules phagocytaires.....	12
II.1.3.2. Les lymphocytes .....	12
II.1.3.3 Les mastocytes, polynucléaires basophiles et éosinophiles.....	12
II.1.3.4. Les fibroblastes .....	13
II.1.3.5. Les cellules endothéliales.....	14
II.1.3.6. Les plaquettes .....	14
II.1.4. Les médiateurs de l'inflammation.....	14
II.1.5. Les enzymes lysosomiaux .....	14
II.1.6. Les anti-inflammatoires.....	14
II.1.6.1. Les anti-inflammatoires stéroïdiens .....	15
II.1.6.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	16

II.1.7. Les modèles d'études de l'inflammation.....	17
II.1.7.1. Du macrophage active au choc septique.....	17
II.1.7.2. L'œdème : un modèle d'inflammation aigue.....	17
II.1.7.3. L'asthme : un modèle d'inflammation chronique .....	17
II.2. Le stress oxydant.....	18
II.2.1. Les sources de radicaux libres.....	18
II.2.2. Les radicaux libres et leurs cibles.....	19
II.2.2.1. Les radicaux libres.....	19
II.2.2.2. Les cibles des ERO et ERN.....	20
a) Les lipides.....	20
b) Les protéines.....	21
c) L'ADN.....	22
II.2.3. Les systèmes antioxydants présents dans l'organisme.....	22
II.2.3.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques .....	22
a) Les superoxydes dismutases.....	22
b) La catalase.....	23
c) Les glutathions peroxydases .....	23
d) La thioredoxine.....	23
II.2.3.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques .....	24
a)Les systèmes antioxydants non enzymatiques endogènes .....	24
b) Les systèmes antioxydants non enzymatiques exogènes.....	24
II.2.3.3. Le monoxyde d'azote.....	25
II.2.4.La capacité anti-oxydante .....	26

II.2.4.1. Les méthodes HAT.....	27
II.2.4.1. Les méthodes SET.....	27

## **Partie pratique**

### **CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES.....30**

III.1. Le matériel biologique.....	30
III.1.1. Préparation des échantillons.....	30
III.1.1.1. Procéder d'obtention de la farine de thon.....	30
III.1.1.2. Extraction des lipides par Soxhlet.....	31
III.2. Etude des propriétés antioxydantes.....	32
III.2.1. Principe de Mesure du pouvoir antioxydant par DPPH (2,2-diphényl-1 picrylhydrazyl).....	32
III.2.2. Procédure.....	33
III.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne du l'huile de thon.....	33
III.3.1. Souches microbiennes testées .....	33
III.3.2. Milieux de cultures utilisées.....	34
III.3.3. Emulsifiant utilisé.....	34
III.3.4. Revivification des souches.....	34
III.3.5. Etude de l'activité antibactérienne de l'huile de thon.....	35
III.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire .....	36
III.4.1. Méthode de stabilisation de la membrane des globules rouges humains.....	36
III.4.1.1. Préparation de la suspension des globules rouges humains (HRBC).....	36
III.4.1.2. Dosage de l'activité de stabilisation de la membrane.....	37
III.4.2. Essai biologique de l'inflammation.....	38

III.4.3. Inhibition de la dénaturation protéique.....	38
III.5. Les analyses statistiques.....	39
<b>CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>40</b>
IV.1. La teneur en matière grasse totale .....	40
IV.2. Etude des propriétés anti-oxydantes .....	40
IV.3.Evaluation de l'activité antimicrobienne .....	43
IV.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	45
IV.4.1. Méthode de stabilisation de la membrane des globules rouges humains.....	45
IV.4.2. Essai biologique de l'inflammation.....	46
IV.4.3. Inhibition de la dénaturation protéique.....	47
<b>Conclusion.....</b>	<b>50</b>

## **Références**

# **Partie bibliographique**

## **Introduction**

La réponse inflammatoire est un processus habituellement bénéfique, son but est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois l'inflammation peut être néfaste, du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, par anomalies des régulations du processus inflammatoire, ou par anomalies quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation (Weill *et al.*, 2003 ; Medzhitov, 2010).

D'un autre côté, la surproduction des espèces réactives d'oxygènes, au-delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques conduit au stress oxydant, qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies inflammatoires, neurodégénératives, cardiovasculaires et cancer (Auddy *et al.*, 2003 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Les bienfaits pour la santé de l'huile de poisson et sa teneur en acides gras polyinsaturés à longue chaîne oméga-3 ont attiré beaucoup d'attention scientifique au cours des quatre dernières décennies. Les huiles de poisson qui contiennent des quantités plus élevées de l'acide eicosapentaénoïque (EPA; 20: 5n-3) que l'acide docosahexaénoïque (DHA; 22: 6n-3), dans un rapport distinctif de 18/12, sont généralement les plus disponibles et sont couramment étudiées. L'huile de thon contenant une plus grande quantité de DHA par rapport à l'EPA est de plus en plus disponible sur le marché.

L'objectif de ce travail est d'explorer les bienfaits de l'huile de thon en étudiant les trois activités, antioxydante, antibactérienne et anti-inflammatoire *in vitro*.

## **Chapitre I : Généralités sur le thon rouge**

### **I.1. Origine du thon**

Le thon est présent dans la Méditerranée, la mer Noire, le Pacifique, l'Atlantique, l'océan Indien et la mer Baltique. Il fait l'objet d'une pêche intensive depuis des temps immémoriaux.

### **I.2. Biologie du thon rouge**

Le thon rouge (*Thunnus Thynnus*) est la plus grande espèce de scombridé. Il possède un corps trapu et très hydrodynamique. Il est aussi le plus grand de tous les thons.

Comme son nom l'indique sa chair est rouge et son sang contient un taux d'hémoglobine assez important pour un poisson. Son cœur est particulièrement volumineux (**Fromentin et Powers, 2005**). C'est un poisson à sang chaud, il nage en permanence afin de maintenir sa température corporelle. Il est doté d'un système de régulation thermique lui permettant également d'élever sa température interne de 10°C par rapport au milieu dans lequel il évolue, ce qui lui permet de fréquenter des eaux dont la température varie de 3 à 30°C.

Le thon rouge est une espèce grégaire, se rencontre au large en banc allant de quelques individus à plus d'une centaine d'individus. Une même femelle ne pondrait pas chaque année, mais tous les deux ou trois ans au mois de juin (**Ravier-Mailly, 2003**).

Son système musculaire est évolué et particulièrement développé. Formé de muscle blanc, mais aussi de muscle rouge dont le rendement métabolique est plus élevé. Il lui permet de parcourir des distances considérables à grande allure pendant de nombreuses heures (**Korsmeyer et Dewar, 2001**).

### **I.3. Valeurs nutritionnelles**

Le thon représente une excellente source de protéines (Tableau 01) : les neufs acides aminés essentiels nécessaires à notre organisme. Ces protéines jouent un rôle clé dans la formation des enzymes digestives, des hormones et des tissus, comme la peau et les os.

Il regorge d'éléments nutritifs, dont le phosphore, le sélénium, les vitamines A et D, ainsi que celles du groupe B, et contient peu de cholestérol.

Le poisson se démarque du thon blanc par sa teneur élevée en acide gras oméga 3 dont l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexanoïque (DHA), deux acides gras de la famille des omégas 3 dotés d'effets protecteurs sur le système cardiovasculaire.

Dans le cadre d'une alimentation variée et équilibrée, la consommation régulière de thon réduirait le risque de mortalité par les maladies cardiovasculaire.

Ces omégas 3 seraient aussi dotés d'effets anti-inflammatoires, utiles dans le traitement de pathologies comme l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis<sup>2</sup> et les maladies inflammatoire de l'intestin. Ils contribuent aussi à la prévention des troubles de l'humeur comme la dépression.

L'acide docosahexaénoïque (DHA) participe au développement et au fonctionnement du cerveau, et a l'entretien des fonctions cognitives et de la vision.

Le thon présente enfin une concentration élevée en sélénium, oligo-éléments dont les propriétés anti oxydantes ont largement été démontrées. Il contribuerait ainsi à prévenir le vieillissement prématuré des cellules causé par les radicaux libres.

**Tableau 01 :** valeurs nutritionnelles pour 100g de thon (Aberoumand et Fazeli, 2019 ; Sardenne *et al.*, 2020)

Carbohydrates	1g
Protéines	30 g
Lipides	10.5 g
Eau	60.85 g

#### **I.4. Recommandations de consommation**

Le Programme National Nutrition Santé recommande de manger du poisson au moins deux fois par semaine. Une portion d'adulte correspond a environ 100g. Les enfants peuvent consommer des portions allant de 10 à 70 g selon leur âge.

#### **I.5. Composition biochimique de l'espèce étudiée**

Le thon appartient à la famille des poissons gras, comme le saumon et la truite, même s'il contient tout de même moitié moins de lipides que ces derniers.

##### **I.5.1. Acide gras oméga 3**

Le thon contient 10 à 30 % de lipides, et cette valeur diffère selon les parties, car, par exemple la partie abdominale contient plus de gras par rapport aux autres parties. Les lipides du thon sont essentiellement constitués d'acides gras de la série oméga 3(tableau 02). La

consommation de ces acides gras particuliers est conseillée en prévention des maladies cardio-vasculaires car ils empêchent la formation de caillots dans le sang. Ils ont également un rôle structurel au niveau du cerveau et du système nerveux.

Le thon contient de plus de cinq fois plus d'ADH que d'AEP. L'acide gras ADH contribue principalement au développement et au fonctionnement du cerveau, ainsi qu'à l'intégrité des fonctions cognitives et de la vue. Le thon séché en bloc contenait 26 types d'acides gras comprenant 11 acides gras saturés, 6 acides gras monoinsaturés et 9 acides gras polyinsaturés (tableau 02). La chair de poisson contient environ 17 à 21 % d'acides gras saturés et 79 à 83 % d'acides gras insaturés. La graisse du poisson contient des AGPI tels que l'EPA, le DHA et l'acide arachidonique qui ne peuvent être synthétisés dans le corps mais à travers les aliments consommés (Leiwakabessy *et al.*, 2019).

**Tableau 02** : Les acides gras du thon (%) (Leiwakabessy *et al.*, 2019)

<b>Total Saturated Fatty Acids</b>	<b>19.94</b>
Lauric acid, C12:0	-
Tridecanoic acids, C13:0	0.06
Myristic acid, C14:0	0.50
Pentadecanoic acid, C15:0	0.20
Palmitic acid, C16:0	10.99
Heptadecanoic acid, C17:0	0.57
Stearic, C18:0	6.46
Arachidic acid, C20:0	0.29
Heneicosanoic acid, C21:0	0.07
Behenic acid, C22:0	0.36
Tricosanoic acid, C23:0	0.11
Lignoceric acid, C24:0	0.33
<b>Total Monounsaturated Fatty Acid</b>	<b>9.35</b>
Palmitoleic acid, C16:1	1.00
Cis-10-Heptadecanoic acid, C17:1	0.19
Elaidic acid, C18:1n9t	0.10
Oleic acid, C18:1 n9c	6.73
Cis-11-Eicosenoic acid, C20:1	0.58
Nervonic acid, C24:1	0.75
<b>Total Polyunsaturated Fatty Acids</b>	<b>14.45</b>
Linoleic acid, C18:2n6c	0.76
Linolenic acid, C18:3 n3	0.11
γLinolenic acid, C18:3 n6	-
Cis-11,14-Eicosadienoic acid, C20:2	0.13
Cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid, C20:3n6	0.08
Arachidonic acid, C20:4n6	1.60
EPA, C20:5n3	1.21

Cis-13,16-Docosadienoic acid C22:2	0.04
DHA, C22:6n3	10.52

### **Protéines**

De tous les poissons, il est le plus riche en protéines. Sa chair est d'ailleurs dense et compacte. Une part de 100 g de thon contient près de 30 g de protéines, davantage que dans la viande (20 à 25 g en moyenne/100 g) (tableau 03). Une simple part de 100g de thon en conserve couvre donc près de la moitié du besoin quotidien en protéines.

Cette particularité est très intéressante pour des adolescents en pleine croissance, pour des sportifs et pour des sujets âgés qui mangent peu.

**Tableau 03 :** La Composition en acide aminés de 100g de protéines du thon (Xiang *et al.*, 2021)

<b>Acide aminé</b>	<b>Abréviation</b>	<b>Rapport (g/100g)</b>
Acide glutamique	Glu	9.6
Acide aspartique	Asp	5.68
Leucine	Leu	5.35
Lysine	lys	5.14
Alanine	Ala	4.27
Arginine	Arg	3.67
Valine	Val	3.42
Histidine	Son	3.09
Glycine	Gly	3.05
Isoleucine	Ile	2.96
Proline	Pro	2.59
Thréonine	Thr	2.58
Serine	Ser	2.54
Phénylalanine	Phe	2.43
Méthionine	Met	1.87
Tyrosine	Tyr	1.78
Cysteine	Cys	0.52
<b>Totale</b>	<b>-</b>	<b>60.10</b>

### **I.5.3. Les vitamines du thon**

#### **☞ Vitamine B3**

Il est riche en vitamine B3 qui contribue à réduire la fatigue, la vitamine B3 participe à de nombreuses réactions métabolisme et contribue particulièrement à la production d'énergie à partir des glucides, des lipides, des protéines et de l'alcool que nous ingérons.

☞ **vitamine B12**

Vitamine B12 impliquée dans le fonctionnement normal de nombreuses fonctions dans l'organisme (système immunitaire, fonction des globules rouges, système nerveux).

☞ **Vitamine D**

Le thon rouge et le thon blanc en conserve sont d'excellentes sources de vitamine D. La vitamine D est étroitement impliquée dans la santé des os et des dents, en rendant disponible le calcium et le phosphore dans le sang, entre autres pour la croissance de la structure osseuse. La vitamine D joue aussi un rôle dans la maturation des cellules, dont celles du système immunitaire.

☞ **Vitamine B1**

Il est riche en vitamine B1 ou Thiamine permet aux cellules de convertir les hydrates de carbone en énergie. La thiamine est essentielle pour le bon fonctionnement du cœur, des muscles et du système nerveux.

☞ **Vitamine B2**

Le thon est riche en vitamine B2 ou Riboflavine joue un rôle dans la croissance, la synthèse des globules rouges et la reproduction.

☞ **Vitamine B5 et B6**

La vitamine B5 ou acide pantothénique joue un rôle dans le métabolisme et dans la formation du cholestérol. Tandis que La vitamine B6 ou pyridoxine participe à la synthèse d'anticorps dans le système immunologique.

**Tableau 04** : Les vitamines du thon cru

Vitamine A et provitamine A	655 µg
Rétinol	655 µg
Thiamine (Vitamine B1)	0,241 mg
Riboflavine (Vitamine B2)	0,251mg
Niacine (Vitamine B3 ou PP) en équivalent en niacine totale	13,004 NE
Niacine (acide nicotinique)	8,654 mg
Acide pantothénique (Vitamine B5)	1,054 mg

Vitamine B6	0,455 mg
Folates totaux	2 µg
Vitamines B12	9,43 µg
Vitamine D	5,7 µg
Vitamine E	1 mg

#### **I.5.4. Minéraux et oligoéléments du thon**

##### **☞ Sélénium**

Le thon est une bonne source de sélénium, un oligoélément au pouvoir antioxydant qui protège les cellules contre le stress oxydatif. Une portion de 100 g couvre à elle seule le besoin quotidien en sélénium.

##### **☞ Fer**

Le thon est une bonne source de fer. Ce minéral est essentiel au transport de l'oxygène et à la formation des globules rouges dans le sang. Il joue aussi un rôle dans la fabrication de nouvelles cellules, d'hormones et de neurotransmetteurs (messagers dans l'influx nerveux). Il est à noter que le fer contenu dans les aliments d'origine animale (dont les poissons) est très bien absorbé par l'organisme, comparativement au fer provenant des végétaux.

**Tableau 05**: Les minéraux et oligo-éléments dans 100g de thon (**Elkhamisy et al., 2021**)

Na	49.6
K	358.4
Mg	81.3
Ca	33.9
P	296.5
Fe	2.77
Cu	0.63
Hg	0.547
Pb	2.035
Cd	1.214

## **I.6. Bénéfices de L'huile de poisson**

L'huile de poisson est très utilisée en alimentation humaine et animale, en industrie pharmaceutique et en Aquaculture. L'huile de poisson connue pour sa richesse en oméga 3 est en général obtenue à partir des tissus biologiques de poissons gras. Le plus souvent disponible sous forme de gélules, elle a été l'objet de nombreuses études.

L'huile de poisson aide à traiter différents problèmes de santé, ses bénéfices les plus importants pour l'organisme sont :

### **I.6.1. Protéger le cœur**

La recherche scientifique a montré que les acides gras oméga-3 contenus dans l'huile de poisson peuvent aider à réduire plusieurs facteurs de risque de maladies cardiaques. L'huile de poisson est liée à une baisse des niveaux de triglycérides et aide à prévenir ou à traiter le durcissement des artères en ralentissant la production de plaque ou de caillots sanguins. Des études suggèrent également que la consommation régulière d'aliments contenant des acides gras oméga-3 peut aider à limiter les risques d'accidents vasculaires cérébraux.

### **1.6.2. Réduire le cholestérol**

Consommer des suppléments d'huile de poisson, ou manger des poissons gras comme le saumon ou le thon deux à trois fois par semaine aurait un impact positif sur le cholestérol. Les oméga-3 aident à réduire les niveaux de triglycérides, ce qui conduit à des niveaux plus élevés de HDL.

### **1.6.3. Renforcer les os**

Les acides gras contenus dans l'huile de poisson ont des effets positifs sur la santé des os chez les animaux. Ils seraient capables d'améliorer l'absorption de calcium par l'organisme tout en diminuant la quantité de calcium perdue dans l'urine.

### **I.6.4. Soulager les douleurs des règles**

Une étude menée sur 41 jeunes femmes a montré un effet bénéfique de l'huile de poisson sur les douleurs menstruelles. Une deuxième étude menée par des chercheurs danois sur 78 femmes pendant quatre mois a confirmé ces résultats : les **suppléments d'huile de poisson**, ainsi que de vitamine B12, aideraient à **diminuer la douleur pendant les règles**.

### **I.6.5. Traiter les maladies mentales**

Les résultats sont encore au stade préliminaire, mais il semblerait que les acides gras permettent de traiter certains troubles mentaux.

- Une première étude a suggéré que les oméga-3 seraient bénéfiques chez **les personnes souffrant de dépression**.
- Une autre a révélé que les patients atteints **d'un trouble bipolaire** ont moins de sautes d'humeur lorsqu'ils consomment des suppléments d'huile de poisson en plus de leur traitement.
- Enfin, quelques essais sur **la schizophrénie** semblent également montrer un effet thérapeutique bénéfique.

## **Chapitre II : l'inflammation et le stress oxydant**

### **II.1. L'inflammation**

#### **II.1.1. Définition**

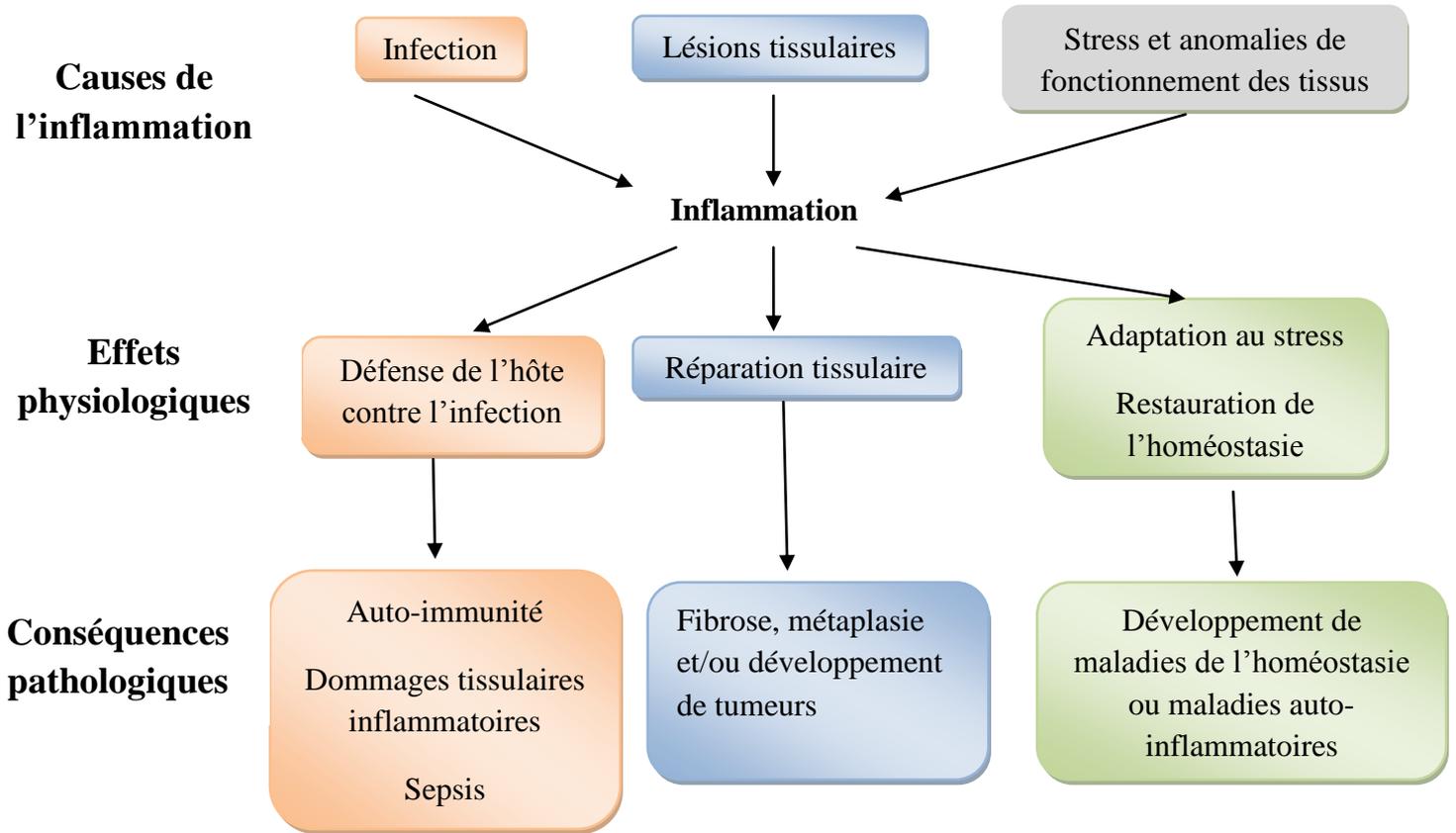
L'inflammation est un mécanisme de défense normal qui protège l'organisme des infections et autres agressions. Ce mécanisme de défense initie la destruction des agents pathogènes, les processus de réparation tissulaire et de restauration de l'homéostasie au niveau des sites infectés ou endommagés (Figure 01) (**Medzhitov, 2008**). Quelque soit l'étiologie, l'ensemble des modifications tissulaires, vasculaires et humorales successives a des lésions cellulaires ou tissulaires, comprend :

- Des phénomènes généraux, qui sont exprimés cliniquement de façon variable, le plus souvent par la fièvre, et localement par des symptômes de rougeur, chaleur et tuméfaction.
- Des phénomènes locaux qui se déroulent dans les tissus vascularisés, préférentiellement dans le tissu conjonctif.

L'inflammation vise à éliminer l'agent pathogène et à réparer les lésions tissulaires. Cependant, l'inflammation peut être néfaste par persistance de lésions trop importantes ou de la substance pathogène, ou par anomalies des régulations du processus inflammatoire.

L'inflammation peut être causée par différentes agressions ou pathologies :

- Agents infectieux : bactéries, virus, parasites, champignons ;
- Agents physiques : traumatismes, chaleur, froids, radiations ionisantes ;
- Agents chimiques : caustiques, toxines, venins ;
- Corps étrangers : exogènes ou endogènes ;
- Défaut de vascularisation : réaction inflammatoire secondaire a une nécrose par ischémie ;
- Anomalie de la réponse immunitaire, allergies, auto-immunité ;
- Tumeurs malignes ou bénignes.



**Figure 01:** Causes, réponses et conséquences pathologiques de l'inflammation (Medzhitov, 2008)

### II.1.2. La réaction inflammatoire

La réaction inflammatoire est un processus dynamique comportant plusieurs étapes successives : la réaction vasculo-exsudative, la réaction cellulaire, la détersion, la phase terminale de réparation et de cicatrisation. Elle fait intervenir les phénomènes d'immunité naturelle ou innée (phagocytose) et spécifique (cellulaire, humorale).

#### II.1.2.1. L'initiation : réaction vasculo-exsudative

Elle se traduit cliniquement par des signes de rougeur, chaleur, tuméfaction et douleur et comporte trois phénomènes : la congestion active, l'œdème inflammatoire et la diapédèse leucocytaire. (Henrotin *et al.*, 2001 ; V Stankov, 2012).

### **II.1.2.2. La réaction cellulaire**

Elle se caractérise par la formation d'un tissu de granulation inflammatoire. La composition de la tissue granulation varie en fonction du temps. L'inflammation aiguë est caractérisée par la présence de polynucléaires neutrophiles (**Hold et El-Omar, 2008 ; Mayol et al., 2013**).

### **II.1.3. Les cellules de l'inflammation**

Les cellules de l'inflammation comprennent à la fois des cellules sanguines circulantes : polynucléaires neutrophiles, monocytes, polynucléaires éosinophiles, basophiles, plaquettes et lymphocytes ; et des cellules résidentes tissulaires : macrophages, histiocytes, mastocytes, cellules endothéliales, fibroblastes.

#### **II.1.3.1. Les cellules phagocytaires**

Les cellules phagocytaires comprennent les polynucléaires neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques. Elles sont capables de reconnaître des micro-organismes et de les ingérer (**DeFranco et al., 2009**).

#### **II.1.3.2. Les lymphocytes**

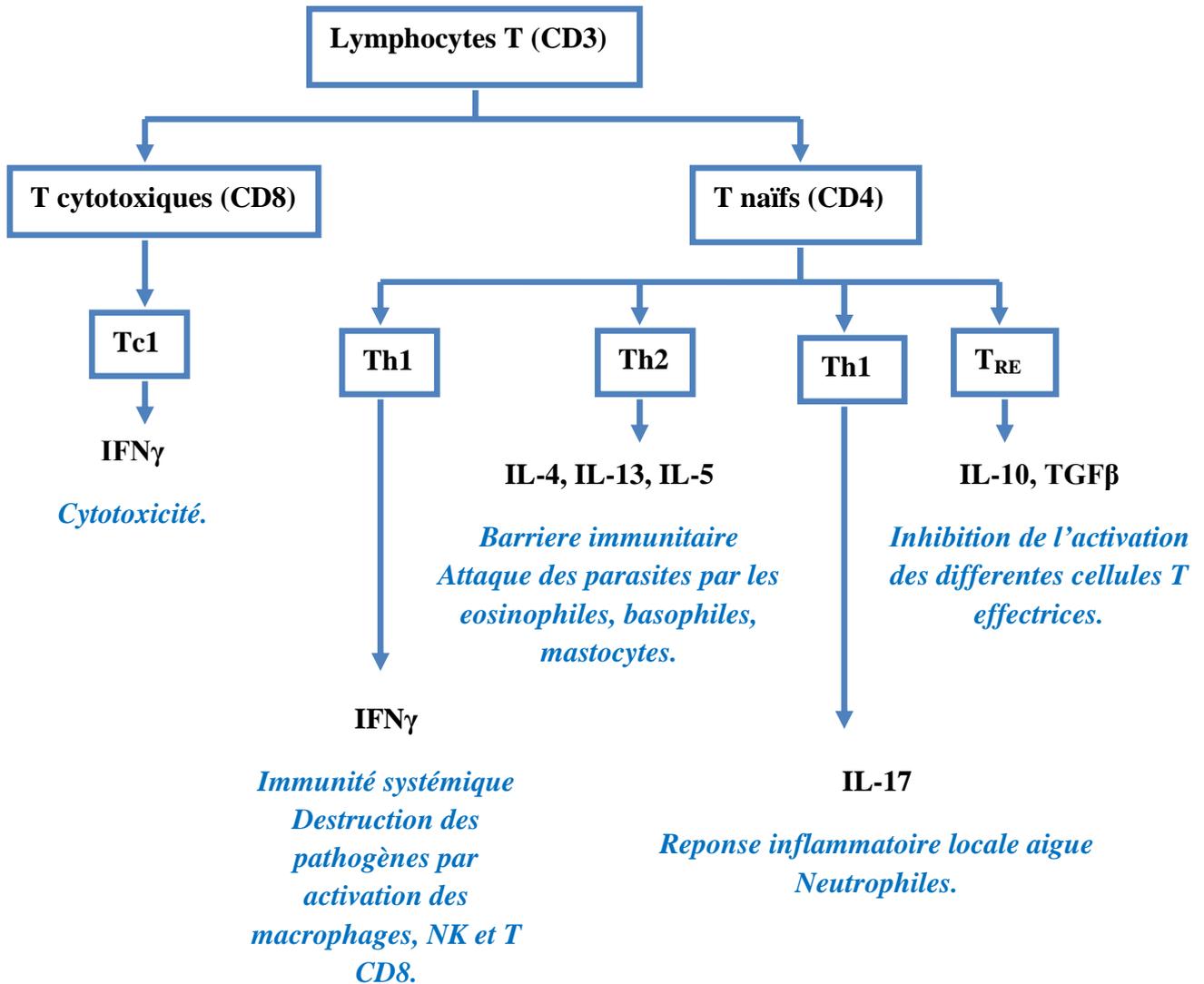
Les lymphocytes, cellules de l'immunité spécifique, humorale et cellulaire, sont de type B (CD20), T (CD3) ou NK (Natural Killer). La différenciation des lymphocytes B aboutit aux plasmocytes qui sont responsables de la sécrétion des anticorps. Les cellules NK ont une action cytotoxique par reconnaissance et destruction des cellules infectées et de certaines cellules tumorales. Les lymphocytes T sont responsables de la sécrétion de cytokines, certains sont dits cytotoxiques (CD8), d'autres auxiliaires ou « helper » (CD4), encore subdivisées en Th1, Th2, Th17 et TREG (**Romagnani, 2006**). Les sous-populations de cellules Th ont des fonctions immunitaires différentes en fonction des cytokines produites et activent ou inhibent par conséquence différents types cellulaires (**DeFranco et al., 2009**) (Figure 02).

#### **II.1.3.3. Les mastocytes, polynucléaires basophiles et éosinophiles**

Les basophiles, mastocytes et éosinophiles jouent un rôle de protection contre les parasites par libération des médiateurs inflammatoires contenus dans leurs granules.

### II.1.3.4 Les fibroblastes

Les fibroblastes jouent à la fois un rôle dans la réaction inflammatoire par production d'enzymes de destruction de la matrice extracellulaire du tissu conjonctif, et un rôle dans la cicatrisation par production des différents constituants de cette même matrice (collagène, fibronectine...).



**Figure 02:** Différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs, principales sous populations, cytokines majeures produites et fonctions immunitaires principales (DeFranco *et al.*, 2009)

#### **II.1.3.5. Les cellules endothéliales**

Les cellules endothéliales jouent un rôle important dans le tonus vasculaire, la vasomotricité, la jonction intercellulaire, l'équilibre fibrino-formation/fibrinolyse, la migration des leucocytes et la réparation post-inflammatoire. L'activation des cellules endothéliales va entraîner le déclenchement des cascades des kinines et de la coagulation, en plus des modifications d'adhérence et de perméabilité qui permettent l'afflux de cellules et de protéines au niveau du site inflammatoire.

#### **II.1.3.6. Les plaquettes**

Les plaquettes participent aux phénomènes de coagulation et de réparation (fibronectine, facteurs de croissance). La granulation des plaquettes par agrégation de leurs récepteurs libère des médiateurs pro-inflammatoires (eicosanoïdes, thromboxane...).

#### **II.1.4. Les médiateurs de l'inflammation**

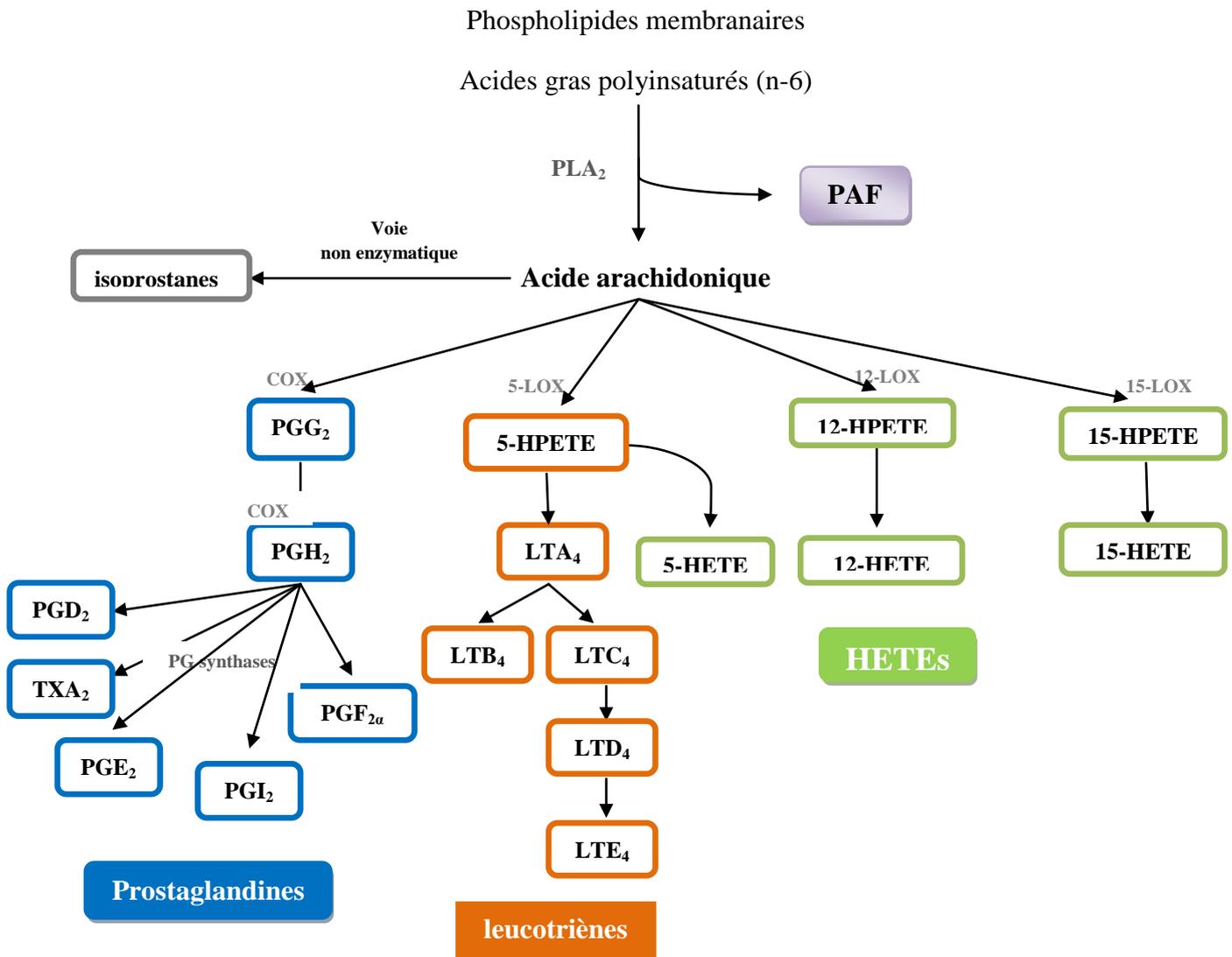
On retrouve un grand nombre de médiateurs chimiques à tous les stades de l'inflammation, dans le plasma sous forme de précurseurs qui acquièrent leurs propriétés après activation (généralement par protéolyse) ainsi que des médiateurs d'origine cellulaire préformés et séquestrés dans des granules intra-cellulaires ou synthétisés suite à un stimulus. La plupart des médiateurs exercent leur action en se fixant aux récepteurs membranaires de cellules cibles. Ils provoquent des réactions en cascade par libération d'autres médiateurs qui peuvent agir eux-mêmes de façon synergique ou antagoniste, entraînant des mécanismes d'amplification ou de résistance à l'action médiatrice initiale (Male *et al.*, 2007 ; Shimizu, 2009)(Figure 03).

#### **II.1.5. Les enzymes lysosomiaux**

Les enzymes lysosomiaux agissent au niveau des vacuoles de phagocytose et interviennent dans la digestion des produits de phagocytose ou sont déversés dans le milieu extracellulaire lors de la lyse des polynucléaires.

#### **II.1.6. Les anti-inflammatoires**

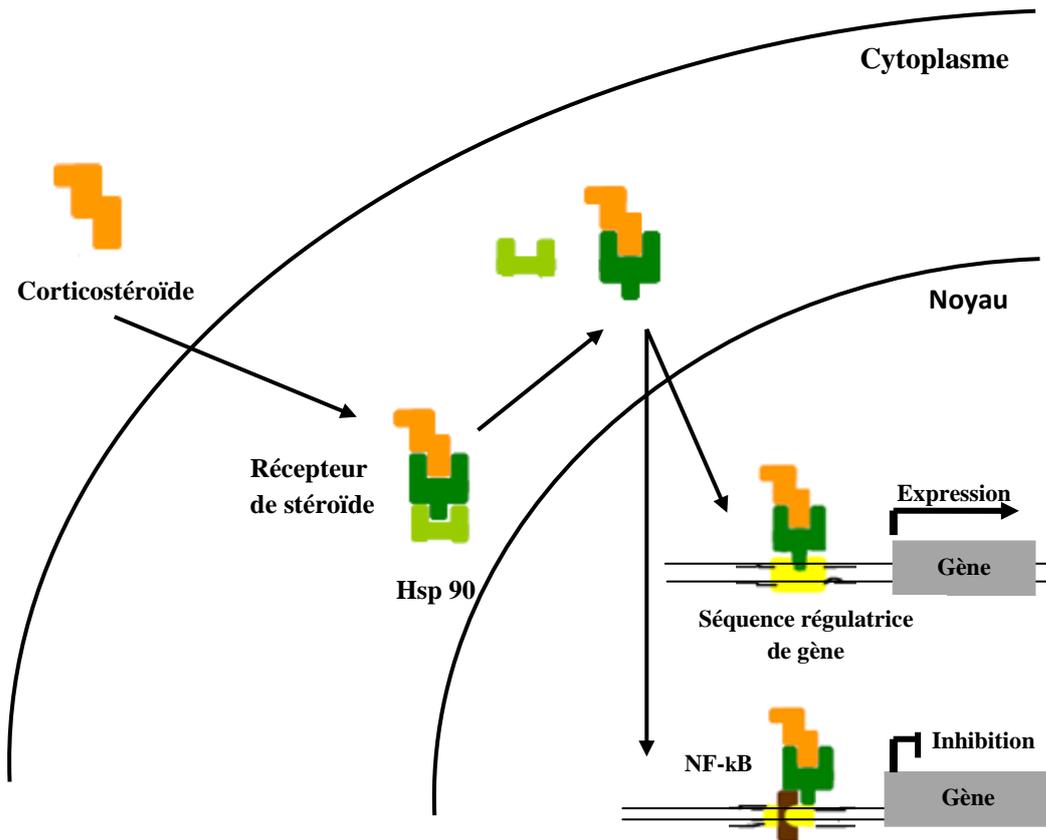
Le but du traitement de l'inflammation est de réduire les effets indésirables comme la douleur sans modifier les effets bénéfiques de réparation. Les anti-inflammatoires ne traiteront pas la cause de la maladie mais ses effets indésirables.



**Figure 03:** Voies métaboliques des différents médiateurs lipidiques (Shimizu, 2009)

### II.1.6.1. Les anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens, également appelés corticostéroïdes, (prednisone, prednisolone, bétaméthasone) sont des dérivés synthétiques des corticostéroïdes naturels, hormones secrétées par les glandes corticosurrénales. Ce sont des anti-inflammatoires puissants largement utilisés pour supprimer les effets délétères des réponses inflammatoires (Janeway *et al.*, 2009). (Figure 04)



**Figure 04:** Mécanisme d'action des stéroïdes (Janeway *et al.*, 2009)

### II.1.6.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) appartiennent à diverses catégories de molécules. Ce sont des inhibiteurs des COX aux propriétés anti-inflammatoires, antalgiques et antipyrétiques (Vonkeman et Van de Laar, 2010). Ils sont principalement utilisés dans les phases aiguës de l'inflammation, en rhumatologie (arthrite, poussée inflammatoire d'une arthrose, tendinite), traumatologie, urologie (coliques néphrétiques) et gynécologie (règles douloureuses).

Cette classe thérapeutique présente cependant des effets indésirables : génération d'ulcères gastro-intestinaux (inhibition de la production de PG gastro-protectrices) et diminution de l'agrégation plaquettaire (inhibition de la production de TxA2). L'aspirine bloque l'activité des

COX de façon irréversible, l'ibuprofène agit par compétition avec l'acide arachidonique ce qui fait de lui un inhibiteur réversible.

## **II.1.7. Les modèles d'études de l'inflammation**

### **II.1.7.1. Du macrophage active au choc septique**

La réponse immunitaire à un agent pathogène est constituée d'une réponse innée et d'une réponse adaptative. La réponse innée est principalement médiée par les cellules comme les neutrophiles et les macrophages, cellules qui vont phagocyter et détruire l'agent pathogène et produire des médiateurs inflammatoires qui permettront de coordonner la réponse de l'hôte. La présentation par les macrophages des antigènes aux lymphocytes T permettra l'activation de la réponse adaptative. La première difficulté de la réponse innée sera donc la reconnaissance d'un pathogène potentiel par un nombre limité de récepteurs. La régulation fine de cette réponse immunitaire sera également d'une grande importance. En effet, l'activation inappropriée ou prolongée des macrophages est en grande partie responsable des pathologies inflammatoires aiguës (choc septique) et chroniques (arthrite rhumatoïde, asthme...).

### **II.1.7.2. L'œdème : un modèle d'inflammation aiguë**

Il existe un grand nombre de modèles *in vivo* d'inflammation aiguë par création d'un œdème. Les souris et les rats sont les espèces animales les plus utilisées, et la création de l'œdème se fait généralement à l'oreille ou à la patte. Différentes substances sont utilisées. Le tétradecanoylphorbol acétate (TPA), l'acide arachidonique (**Young *et al.*, 1984**) et l'huile de croton (Van Arman, 1974) sont classiquement utilisés pour l'œdème à l'oreille. La PLA2 (Neves *et al.*, 1993), le dextran, l'histamine (**Parratt et West, 1958**), la sérotonine, la bradykinine, les PGE<sub>2</sub>, le LTB<sub>4</sub>, l'acide arachidonique, la hyaluronidase sont utilisés pour l'induction de l'œdème à la patte, mais c'est la carragenine (**Winter *et al.*, 1962**) qui est le plus largement utilisée.

### **II.1.7.3. L'asthme : un modèle d'inflammation chronique**

L'inflammation chronique est une inflammation de durée prolongée due à la persistance des facteurs d'agression. Elle peut suivre un épisode d'inflammation aiguë ou débiter de façon insidieuse sous forme d'une réponse de faible intensité. Les facteurs prédisposant sont une agression persistante, une réponse inadéquate de l'hôte ou encore une maladie auto-immune

chronique. L'inflammation chronique est caractérisée par un infiltrat de cellules mononuclées (macrophages, lymphocytes, plasmocytes), une destruction tissulaire et une tentative de cicatrisation par prolifération des fibroblastes, d'une angiogenèse et d'un dépôt de collagène.

## **II.2. Le stress oxydant**

La production de radicaux libres par l'organisme est un mécanisme maîtrisé par les systèmes antioxydants. Dans des conditions physiologiques, la balance entre la production d'oxydants endogènes et l'apport ou la production d'antioxydants est à l'équilibre, les oxydants endogènes produits à faible dose étant utiles à l'organisme (**Valko et al., 2007**).

En effet, les radicaux libres remplissent de nombreuses fonctions utiles dans l'organisme comme :

- ☞ la transduction des signaux, la défense immunitaire, le cycle cellulaire, la phagocytose et l'inflammation.
- ☞ Ils participent aux voies de transduction du signal de plusieurs hormones et facteurs de croissance.
- ☞ Le stress oxydant joue un rôle dans la régulation de l'expression de certains gènes par régulation des facteurs de transcription comme NF- $\kappa$ B et AP-1 (**Kabe et al., 2005**), et à un stade plus élevé, un processus d'apoptose peut être déclenché si les capacités de réparation sont dépassées.

Les radicaux libres sont nécessaires à l'organisme, on parle donc de balance antioxydants/oxydants. Les voies thérapeutiques doivent donc prendre en compte l'effet bénéfique des radicaux libres, car une élimination totale des radicaux libres pourrait être néfaste.

Lors d'un excès d'oxydants (endogènes ou exogènes) ou un déficit en antioxydants, l'excès de radicaux libres entraîne un état de stress oxydant. Le déficit en antioxydants peut provenir d'une carence alimentaire ou d'anomalies génétiques au niveau des systèmes antioxydants endogènes.

### **II.2.1. Les sources de radicaux libres**

Les sources de radicaux libres endogènes sont variées. On retrouve les radicaux libres lors de l'inflammation par la phagocytose et lors de la détoxification. Ils ont une action nécrosante locale, inactivent des anti-protéases, activent la PLA2. Les radicaux libres endogènes

proviennent également de la respiration mitochondriale, de la NADPH oxydase, des peroxyosomes, du cytochrome P450, de la xanthine oxydase, des cyclo- et lipo-oxygénases. On retrouve aussi des radicaux libres ayant un rôle de médiateurs tissulaires, c'est le cas du NO<sup>•</sup>.

Les sources exogènes de radicaux libres sont les toxiques environnementaux (métaux lourds), les radiations ionisantes et UV, les champs électriques, les xénobiotiques pro-oxydants ou encore le tabac et l'alcool.

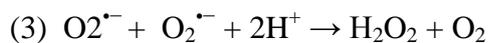
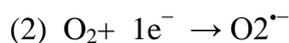
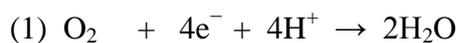
## **II.2.2. Les radicaux libres et leurs cibles**

### **II.2.2.1. Les radicaux libres**

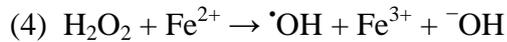
Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique. Dans les phénomènes de stress oxydant, les radicaux libres impliqués ont leur électron célibataire sur l'oxygène ou sur l'azote.

Les radicaux primaires sont soit des dérivés de l'oxygène, on parle d'espèces réactives de l'oxygène ou ERO, soit des dérivés de l'azote, on parle d'espèces réactives de l'azote ou ERN (monoxyde d'azote NO<sup>•</sup>, peroxy-nitrites ONOO<sup>•-</sup>). D'autres espèces réactives non radicalaires peuvent entraîner la formation de radicaux (oxygène singulier 1O<sub>2</sub>, peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Les radicaux secondaires sont issus de la réaction des radicaux primaires avec les composés biochimiques de la cellule (**Delattre, 2007**).

Les espèces réactives de l'oxygène sont représentées par le radical superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), le radical perhydroxyle (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>), le radical hydroxyle (•OH) qui est le plus toxique, le radical peroxyde (RO<sub>2</sub><sup>•</sup>) et le radical alkoxyde (RO<sup>•</sup>) où R est un substrat organique. Elles peuvent être générées en très petite quantité in vivo au cours du métabolisme normal de l'oxygène. La chaîne respiratoire mitochondriale entraîne la réduction de 98% de l'O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O (réaction (1)), la production d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> représentant 2% de la réduction de l'O<sub>2</sub> (réaction (2)) :



La réaction (3) est une réaction de dismutation régulée par les superoxydesdismutases (SOD) qui aboutit à la formation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), il n'est pas un radical mais devient toxique lors de la réaction de Fenton (4) par production d'•OH et d'<sup>-</sup>OH.

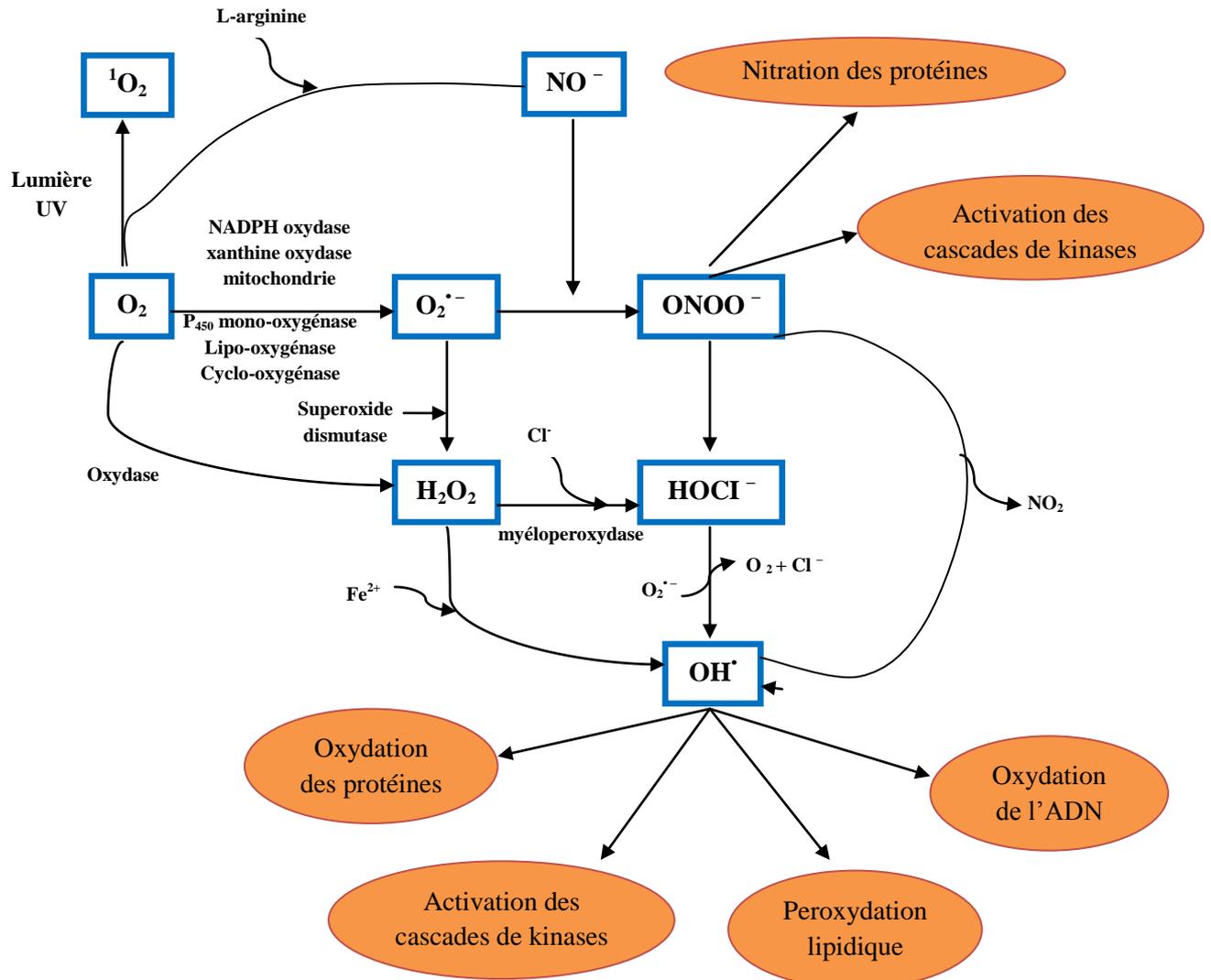


Au cours du stress oxydant, la production accrue de ces espèces radicalaires et moléculaires engendre de nombreuses dégradations oxydatives au niveau des macromolécules biologiques comme l'ADN, les protéines et les lipides (Figure 05). Les lésions qu'elles engendrent, sont impliquées dans plusieurs pathologies (athérosclérose, cancer, maladies neurodégénératives...), dans les phénomènes d'ischémie-reperfusion et dans le vieillissement. Ce sont les antioxydants endogènes et exogènes qui limitent les effets des ERO, et donc qui protègent l'organisme contre le stress oxydant.

### **II.2.2.2. Les cibles des ERO et ERN**

#### **a) Les lipides**

Les acides gras polyinsaturés très abondants dans la nature, sont très sensibles à l'oxydation. On parle alors de peroxydation lipidique qui entraîne la production de nombreux produits primaires (hydro peroxydes) ou secondaires (aldéhydes) aux activités multiples. C'est la production en quantité anormale de ces molécules que l'on retrouve dans différentes pathologies chroniques comme l'athérosclérose. Les acides gras polyinsaturés, estérifiés (phospholipides, esters de cholestérol, triglycérides) ou non sont une cible majeure d'attaque radicalaire. Une autre cible importante est le cholestérol non estérifié qui aboutira à la formation des oxysterols. Parmi les acides gras polyinsaturés, l'acide arachidonique est un substrat majeur pour la formation de médiateurs lipidiques tels que les leucotriènes, les prostaglandines ou encore les isoprostanes (voie non enzymatique) qui sont impliqués dans l'inflammation (**Favier, 2003 ; Rubbo et Radi, 2008**).



**Figure 05:** Les radicaux libres et leurs cibles (Favier, 2003)

## b) Les protéines

Les dommages créés aux protéines entraînent la perte de leurs fonctions biologiques (Rubbo et Radi, 2008), les dommages retrouvés sont :

- l'oxydation des chaînes latérales des acides aminés ;
- l'oxydation de la chaîne polypeptidique suivie d'une fragmentation et ou de la formation de liaisons croisées intra ou inter chaînes (ponts disulfures) ;

- les nitro-tyrosines provenant de l'action des peroxy-nitrites et empêchant les phénomènes de transduction intracellulaire du signal (phosphorylation/déphosphorylation des tyrosines).

### **c) L'ADN**

L'ADN est une molécule très sensible à l'attaque des radicaux libres. Les dommages oxydatifs principaux sont des modifications des bases puriques et pyrimidiques, des cassures simples et double-brin et des sites abasiques oxydes ou non. Les systèmes de réparation de l'ADN contrecarrent ces phénomènes, mais en cas de stress oxydant élevé ou de défaillance du système de réparation, une mutation ponctuelle peut apparaître pouvant aboutir aux premières étapes de la carcinogenèse ou de l'apoptose de la cellule (**Beckman et Ames, 1997**).

## **II.2.3. Les systèmes antioxydants présents dans l'organisme**

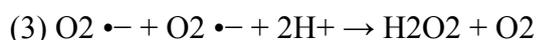
Les systèmes antioxydants présents dans l'organisme sont, soit d'origine endogène, soit exogène. On distingue également les antioxydants enzymatiques des antioxydants non enzymatiques. Les antioxydants peuvent être définis comme des substances qui, à faible concentration, diminuent significativement ou inhibent l'oxydation de leur substrat (**Niki, 2010**). En fonction de leur mécanisme d'action, les antioxydants ont un rôle de prévention, de piégeage, de réparation ou de régénération des antioxydants ainsi que de messenger cellulaire par régulation des antioxydants endogènes.

### **II.2.3.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques**

Les systèmes antioxydants enzymatiques sont d'origine endogène. Ces différentes enzymes sont en interrelation dans la régulation du stress oxydant intracellulaire (**Matés et al., 1999**). En effet, l'action de la SOD conduit à partir de l'ion superoxyde à la formation de peroxyde d'hydrogène qui est lui-même un composé oxydant. C'est donc la catalase et les peroxydases qui devront alors compléter son action.

#### **a) Les superoxydes dismutases**

Les SOD entraînent la dismutation de l'anion superoxyde (réaction (3)) :



Les SOD sont ubiquitaires chez les eucaryotes et représentent une famille de métalloprotéines ou les métaux sont généralement liés à 4 résidus histidine. On distingue différents isoenzymes (**Landis et Tower, 2005**) :

- la SOD à manganèse qui protège la mitochondrie (MnSOD) ;
- les SOD à cuivre et zinc qui protègent le cytosol (cCu-ZnSOD), les cellules endothéliales (ecCu-ZnSOD) ou le plasma sanguin (pCu-ZnSOD).

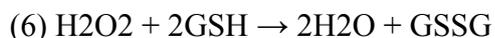
#### **b) La catalase**

La catalase entraîne la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (réaction (5)), elle utilise le fer comme cofacteur. Elle est présentée dans les peroxysomes et les érythrocytes.



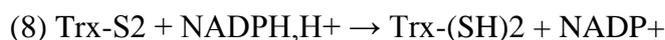
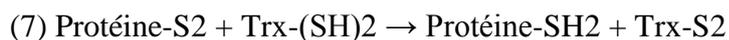
#### **c) Les glutathions peroxydases**

Les glutathions peroxydases à sélénium catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène ou des hydro-péroxydes organiques en eau ou en alcool, tandis que le glutathion réduit (GSH) est transformé en glutathion oxyde (GSSG) (réaction (6)). Chez les eucaryotes, on distingue 5 isoenzymes que l'on retrouve au niveau cytosolique ou mitochondrial. Les hydroperoxydes organiques peuvent être des hydroperoxydes des esters de cholestérol, des phospholipides, des lipoprotéines, et de l'ADN. D'autres peroxydases utilisent le cytochrome c (cytochrome c peroxydases) ou le NADH (NADH peroxydases). Le GSSG retourne à son état réduit GSH sous l'action de la glutathion réductase.



#### **d) La thioredoxine**

La thioredoxine (Trx) est un antioxydant majeur ubiquitaire, qui est responsable du maintien des protéines à l'état réduit dans le milieu intracellulaire (réaction (7)) : on retrouvera donc principalement des groupements thiols libres et peu de ponts disulfures. Elle joue également un rôle dans la régénération des vitamines C et E et dans la régulation redox du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (**Hirota et al., 1999**). La thioredoxine oxydée retourne à son état réduit sous l'action de la thioredoxine réductase (TrxR) (réaction (8)).



### **II.2.3.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques**

Les molécules antioxydantes non enzymatiques (exogènes ou endogènes) ont pour rôle de subir l'oxydation à la place des macromolécules pour être par la suite soit éliminées, soit régénérées par divers mécanismes.

#### **a) Les systèmes antioxydants non enzymatiques endogènes**

Les principaux systèmes antioxydants non enzymatiques endogènes sont le glutathion, la bilirubine, les hormones sexuelles, l'acide urique, le coenzyme Q, la mélanine, la mélatonine et l'acide lipoiq. Le glutathion, le plus important, est un tripeptide implique dans de nombreux processus métaboliques parmi lesquels la communication intercellulaire et la prévention de l'oxydation des groupements thiols. Il joue également un rôle important au niveau cérébral. Il peut intervenir soit par piégeage d'espèces radicalaires soit par participation à l'activité d'enzymes antioxydantes.

#### **b) Les systèmes antioxydants non enzymatiques exogènes**

Les bienfaits d'une alimentation riche en fruits et légumes sont reconnus et attribués à la teneur en antioxydants qui agit par piégeage des radicaux en captant l'électron célibataire (**Balsano et Alisi, 2009**). L'apport d'antioxydants non enzymatiques exogènes par notre alimentation diminuerait le risque de survenue de cancers, de maladies cardiovasculaires et dégénératives.

**i.** La vitamine E correspond à la famille des tocophérols et tocotrienols. La forme la plus active est l' $\alpha$ -tocophérol. C'est le principal antioxydant liposoluble dans le plasma et les érythrocytes chez l'homme. Il est capable de piéger chimiquement l'oxygène singulier  $1O_2$  en s'oxydant en quinone, et de réagir avec le radical hydroxyle. Mais son principal rôle biologique est de réagir avec les  $ROO^{\bullet}$  pour former le radical tocophéryle. L' $\alpha$ -tocophérol est régénéré grâce à la vitamine C et la tocophéryl réductase glutathion dépendante qui sont capables de réduire le radical tocophéryle en  $\alpha$ -tocophérol (**Kamal-Eldin et Appelqvist, 1996**).

ii. La vitamine C ou acide ascorbique est présente le plus souvent sous sa forme ascorbate. C'est le plus important antioxydant dans les fluides extracellulaires. C'est un piègeur très efficace des anions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène, de l'hypochlorite, des radicaux hydroxyles et peroxyles et de l'oxygène singulier. La vitamine C est régénérée par les ascorbates réductases (**Kojo, 2004**).

iii. Les caroténoïdes sont représentés par plus de 600 molécules mais seulement une cinquantaine sont des précurseurs de la vitamine A. Ils sont de très puissants anti-radicalaires (oxygène singulet, ROO<sup>•</sup>, R<sup>•</sup>), et protègent contre la photosensibilisation (**El-Agamey et al., 2004**).

iv. Le zinc et le sélénium ont un rôle antioxydant indirect en assurant la stabilisation de la Cu-ZnSOD et des glutathion peroxydases. Le zinc possède également d'autres propriétés antioxydantes (inhibition de la réaction de Fenton, de la formation des ponts disulfure intramoléculaire, de la peroxydation lipidique).

v. Les vitamines B (B2, B3, B9) sont des cofacteurs nécessaires au cycle du glutathion, à l'activité glutathion réductase, au cycle du NADP, aux réactions d'oxydoréductions cellulaires.

vi. Les polyphénols sont retrouvés sous forme de dérivés glucosidiques dans de nombreux fruits et légumes ; ils se répartissent en flavonoïdes, acides phénoliques, lignanes et stilbènes qui ont un pouvoir antioxydant important (**Urquiaga et Leighton, 2000**).

vii. Les sulfures d'allyle sont des composés soufrés de l'ail qui agissent en tant qu'antioxydant par piégeage des ERO et par augmentation de l'activité des SOD, des catalases et des peroxydases.

### **II.2.3.3. Le monoxyde d'azote**

Mis en évidence au niveau du système cardiovasculaire, le monoxyde d'azote (NO<sup>•</sup>) provient de l'oxydation de l'arginine par action des NO synthases ou NOS (**Alderton et al., 2001**) (réaction (9)).



On retrouve 3 isoformes de NO synthases :

a) La NOS endothéliale (eNOS) qui est constitutive et impliquée dans la régulation de l'homéostasie vasculaire. Le NO<sup>•</sup> produit active les guanylatecyclases des cellules cibles, le GMPc forme agit comme second messenger sur des kinases, phosphatases et canaux ioniques

en favorisant le relâchement des muscles lisses, la vasodilatation, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, l'adhésion leucocytaire, et en modulant l'activité des mastocytes.

b) La NOS neuronale (nNOS) qui est constitutive. Le NO<sup>•</sup> joue le rôle de neurotransmetteur, et joue également un rôle dans la relaxation des muscles lisses du tractus gastro-intestinal, respiratoire et génito-urinaire.

c) La NOS inductible (iNOS) qui est induite lors de l'inflammation et génère de grandes quantités de NO<sup>•</sup>. Le NO<sup>•</sup> produit intervient principalement dans la réaction inflammatoire, l'immunité non spécifique et au cours des processus de réparation tissulaire. L'expression de l'iNOS est induite par des produits bactériens tels que le lipopolysaccharide (LPS) ou les cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6 et IL-1 $\beta$ ). Tout facteur susceptible d'activer NF- $\kappa$ B entraîne l'expression de l'iNOS. (**Kleinert et al., 2004**).

Le NO<sup>•</sup> est un radical libre qui participe à la plupart des grandes fonctions physiologiques de l'organisme. Il est produit par les macrophages, les cellules endothéliales, et certains neurones cérébraux et intervient dans le maintien du tonus vasculaire, de la neurotransmission, de la fonction rénale, et dans le système immunitaire non spécifique. Il a des effets protecteurs vis-à-vis du stress oxydant en limitant la peroxydation lipidique et a une activité anti-inflammatoire par limitation du recrutement leucocytaire, et modulation de la toxicité du TNF $\alpha$ , et du LPS. C'est une molécule clé de la signalisation cellulaire (transduction, transcription, respiration mitochondriale) (**Coleman, 2001**).

Mais dans certaines conditions pathologiques, il exerce une activité pro-inflammatoire qui est due à la surexpression de l'iNOS ce qui lui confère un rôle ambigu. Les pathologies associées à une surproduction de NO<sup>•</sup> sont le diabète, les maladies du système nerveux central, les pathologies gastro-intestinales et pulmonaires, les syndromes d'ischémie reperfusion ainsi que l'athérosclérose. (**Tripathi, 2007**).

#### **II.2.4. La capacité antioxydante**

Un grand nombre de méthodes de mesure de la capacité antioxydante ont été développées ; cependant il existe une grande variabilité entre les études et donc une corrélation difficile entre les résultats. De par la diversité des espèces réactives et les différents mécanismes oxydatifs intervenant au sein de l'organisme, il est donc difficile de déterminer une seule méthode universelle de mesure de la capacité antioxydante que ce soit in vitro ou in vivo (**Niki, 2010**).

La capacité des antioxydants à piéger les radicaux libres a été largement étudiée. Les différentes méthodes d'étude utilisées font intervenir soit une réaction avec un radical libre stable, soit une méthode de compétition, soit une réduction d'ions métalliques. On peut également classer ces méthodes en fonction du type de transfert implique : un atome d'hydrogène (HAT : Hydrogen Atom Transfert) ou un électron (SET : Single Electron Transfert).

#### **II.2.4.1. Les méthodes HAT**

Les méthodes HAT consistent la plupart du temps à mesurer la capacité d'un antioxydant (AH) à stabiliser un radical (X<sup>•</sup>) par le transfert d'un atome d'hydrogène. C'est la cinétique de compétition entre un oxydant et un antioxydant envers une sonde moléculaire oxydable qui est suivi, l'antioxydant ayant pour but de protéger la sonde de l'oxydant (**Prior et al., 2005**).

Parmi les méthodes HAT, on retrouve les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total ReactiveAntioxidantPotential) qui sont relativement semblables. La méthode ORAC est une méthode fluorimétrique largement utilisée permettant la mesure de la capacité antioxydante vis-a-vis des radicaux peroxydes mais pas des ERO. La fluorescéine (FI) joue le rôle de sonde, et c'est l'attaque par un radical peroxyde (ROO<sup>•</sup>) qui va entraîner son oxydation et donc la perte de fluorescence. Cette perte de fluorescence suit une cinétique plus ou moins rapide en fonction de la capacité de l'antioxydant présent. On observe donc une compétition au niveau des réactions suivantes, le radical fixant préférentiellement l'atome d'hydrogène labile de l'antioxydant :



#### **II.2.4.1. Les méthodes SET**

Les méthodes SET sont basées sur la capacité d'un antioxydant à transférer un électron afin de réduire un oxydant. Le suivi de la réaction redox se fait généralement par colorimétrie par la différence de couleur de l'oxydant entre son état réduit et oxyde. La capacité antioxydante correspond donc à la capacité de réduction de l'antioxydant.

On retrouve parmi les différentes méthodes SET, les méthodes DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle), TEAC (Trolox Equivalent AntioxidantCapacity) et FRAP (FerricReducingAntioxidant Power). La méthode TEAC utilise l'ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)) qui nécessite un radical peroxyde ou un autre oxydant pour

donner le radical  $ABTS^{+}$  alors que les deux autres méthodes utilisent directement des radicaux libres stables. La méthode DPPH est une méthode rapide et largement utilisée, cependant la réduction du radical DPPH est suivie en UV-visible ce qui entraîne des interférences de mesure lorsque les antioxydants testés sont colorés et tout particulièrement avec les caroténoïdes (**Prior et al., 2005**).

Les méthodes HAT sembleraient plus adaptées que les méthodes SET puisque les radicaux peroxydes sont les radicaux libres prédominants dans les systèmes biologiques, cependant les autres sources de radicaux ( $\cdot OH$ ,  $O_2^{\cdot -}$ ,  $RO_2^{\cdot}$ ...) sont également impliquées dans le stress oxydant.

# **Partie pratique**

## **CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES**

### **III.1. Le matériel biologique**

Le thon rouge (*thunnus thynnus*) utilisé dans notre travail a été acheté dans les locaux du marché de Mostaganem, entre les mois juin et juillet 2020, à chaque fois ils étaient transportés dans des conditions réfrigérées au laboratoire.

#### **III.1.1. Préparation des échantillons**

##### **III.1.1.1. Procéder d'obtention de la farine de thon**

La farine (figure 06), était préparé à partir de muscle de thon, le principe consiste à séparer l'eau et l'huile de la matière sèche selon la technique de **Guillaume et al (1999)**. Le muscle de thon est tout d'abord lavé, débarrassé de la peau, de l'os, et haché puis placé dans une étuve à 80°C pendant 20 minutes de façon à permettre la libération des huiles et de l'eau. Le mélange est immédiatement pressé pour éliminer la partie liquide (eau et l'huile) de la partie solide, cette partie est réintroduit dans l'étuve à 45°C pendant 24 heures, puis broyer finement avec l'aide d'un blinder et stocker dans le réfrigérateur à -14°C



**Figure 06** : la farine de poisson.

### **III.1.1.2. Extraction des lipides par Soxhlet**

Les lipides sont extraies à partir de la farine dans un extracteur de lipide (Soxhlet) à 50°C pendant 6 heures en utilisant l'hexane comme réactif d'extraction.

Dans chaque cartouche filtrante, 25g de farine de thon ont été introduits, puis placés dans le compartiment supérieur de l'appareil (les siphons). La base de dispositif étant composée de plaque chauffante dont des ballons contenant chacun 250 ml d'hexane sont placés dessus. L'appareil est mis en marche et la température est ajustée à 100°C, et une fois que l'hexane, qui se trouve à l'intérieure des ballons est atteint son point d'ébullition, la température est baissée à 50°C et l'extraction dure environ 6 heures. L'extraction est achevée lorsque le solvant dans lequel les cartouches sont imbibées devient transparent.

Après que les ballons soient récupérés, et refroidis à température ambiante, la matière grasse est récupérée par évaporation de l'hexane dans un évaporateur rotatif à 40°C pendant 20 minutes (Figure 07). Une fois refroidi, les ballons contenant la matière grasse sont pesés à l'aide d'une balance analytique, et le produit final est conservé dans un flacon en plastique.

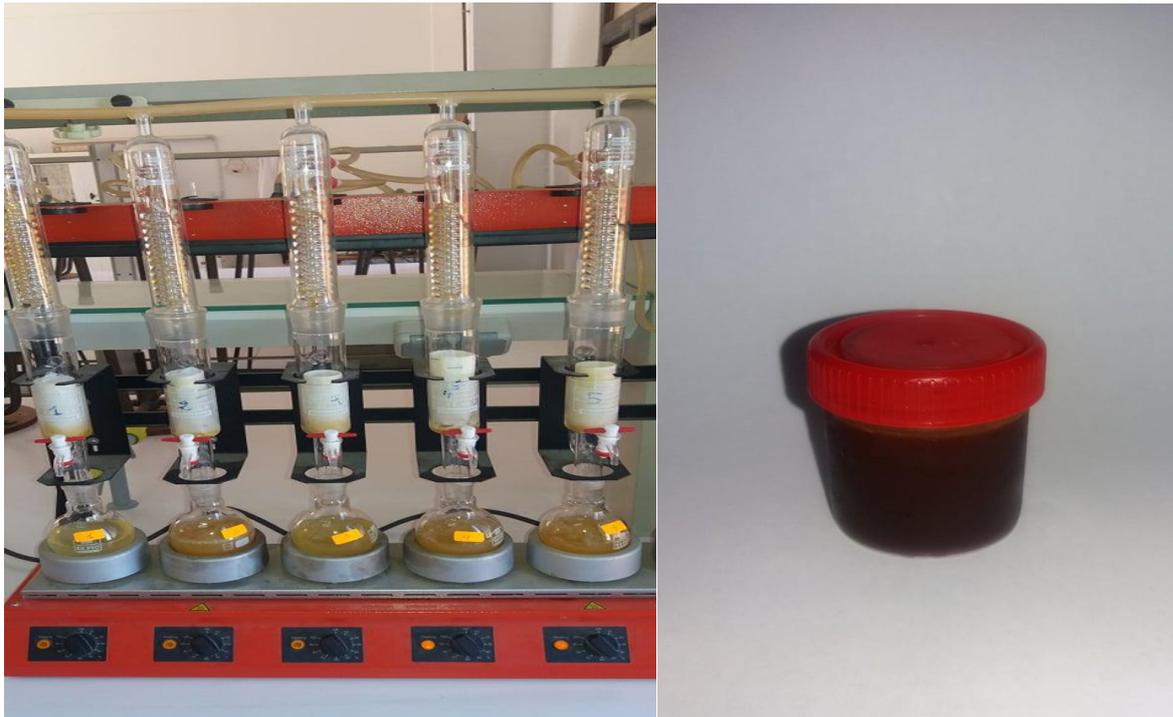
La teneur en matière grasse totale de l'échantillon est calculée ainsi :

$$\text{Matière grasse \%} = [(M2-M0)/M1] \times 100$$

*M0* : Masse en gramme du ballon vide.

*M1* : Masse en gramme de la prise d'essai.

*M2* : Masse en gramme de ballon après extraction et séchage.



**Figure 07 :** Extraction et conservation de l'huile de thon

## III.2. Etude des propriétés antioxydantes

### III.2.1. Principe de Mesure du pouvoir antioxydant par DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

La mesure de l'activité antiradicalaire a été testée selon la méthode de **Blois (1958)** telle qu'elle a été décrite par **Brand-Williams (1958)** et modifiée par **Brand-Williams et al. (1995)**. Le principe de cette méthode est basé sur la mesure du piégeage des radicaux libres de DPPH en solution dans le méthanol.

L'addition d'un antioxydant dans une solution de DPPH conduit à une décoloration de ce dernier qui est directement proportionnelle à la capacité antioxydante du produit ajouté. Cette décoloration peut être suivie par spectrophotométrie en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm. Elle fournit donc un moyen pratique de mesurer l'activité antioxydante de l'huile de thon.



### **III.2.2. Procédure**

On a commencé par préparer une série de dilution dans des tubes à essais à partir d'une solution mère de 2mg de lipides/huile de thon, dans 2ml de DMSO (diméthylsulfoxyde), ensuite, on a pris 200µl de chaque échantillon dans des tubes à essais, lui ajoutant 200µl d'une solution de DPPH préparé en avance (2.96mg de DPPH dans 50ml de 99% méthanol puis recouvert d'aluminium) puis on a ajouté 600µl de méthanol. Pour chaque échantillon, un blanc est réalisé dans le solvant de solubilisation. Incuber la suspension pendant 30 min à l'abri de la lumière et à température ambiante, puis lire l'absorbance à 517 nm. Pour valider les résultats chaque essai est répété trois fois. Et on a pris l'EDTA comme témoin.

Les résultats d'absorbance obtenus ont été convertis en taux de pouvoir anti-radicalaire (% RSA ou Radical Scavenging Activity) de DPPH selon l'équation suivante :

$$AA\% = \frac{(\text{Abs controle} - \text{Abs échantillon})}{\text{Abs controle}} \times 100$$

AA : activité antioxydante ;

Abs : absorbance à la longueur d'onde 517nm.

Comme témoin, on a pris l'EDTA :

On a préparé une série de dilution à partir d'une solution mère de 2mg EDTA dans 2ml d'eau tamponné (1200µl NaOH (1N) + l'eau distillé jusqu'à atteindre 2ml). En suite, on a ajouté 200µl de chaque échantillon dans des tubes à essais, lui ajoutant 200µl de la solution de DPPH et 600µl de méthanol. Cela est aussi suivi par 30 minutes dans l'obscurité et une lecture d'absorbance à 517nm.

### **III.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne du l'huile de thon**

#### **III.3.1. Souches microbiennes testées**

L'activité antibactérienne de l'huile de thon est testée sur six souches microbiennes qui sont responsables de pathologies humaines graves et connues pour leur résistance à divers agents antimicrobiens. Deux souches bactériennes gram-positives (*Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Staphylococcus aureus* ATCC 33862) et trois souches bactériennes gram-négatives (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae*), de plus d'une levure (*Candida albicans* ATCC 10231) (Tableau 6).

**Tableau 06** : Tableau descriptif des différentes souches bactériennes utilisées pour le test de l'activité antibactérienne de l'huile de thon.

Souches bactériennes	Type de GRAM
<i>Escherichia coli</i>	Gram négatif
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positive
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram négatif
<i>Bacillus cereus</i>	Gram positive
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram négatif
<i>Candida albicans</i>	Candidat

### **III.3.2. Milieux de cultures utilisées**

Le milieu BrainHeart Infusion Broth (BHIB) a été utilisé comme milieu pour la revivification des souches. Et La gélose de Muller Hinton (MH) a été utilisée pour le repiquage des colonies (culture et isolement de colonies non exigeantes) et pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens.

### **III.3.3. Emulsifiant utilisé**

L'émulsifiant utilisé c'est le Diméthylsulfoxyde (DMSO), qui est un solvant organique polaire, miscible à l'eau et utilisé pour la dilution de l'huile de thon testée et pour avoir une meilleure diffusion de l'huile dans le milieu. Le DMSO est inerte sur l'activité antimicrobienne.

### **III.3.4. Revivification des souches**

Les souches microbiennes testées ont été revivifiées dans un milieu de culture liquide ; le Brain Heart Infusion Broth (BHIB) et sont ensuite incubés à 37°C pendant 24h.

Les souches testées sont repiquées dans un milieu sélectif. Ce repiquage sert à sélectionner les souches à tester. À partir des cultures contenues dans le BHIB, un repiquage des souches sur les milieux sélectifs a été effectué suivi d'une incubation à 37°C pendant 24h.

### **III.3.5. Etude de l'activité antibactérienne de l'huile de thon**

Pour le test de l'activité antimicrobienne de l'huile de thon on a opté pour la méthode de diffusion sur gélose en utilisant des disques de papier whatman imprégnés de l'huile étudié. Cette méthode est la plus utilisée de par sa facilité d'emploi, sa fiabilité et sa reproductibilité malgré que ces résultats soient considérés comme étant qualitatifs. Elle a été décrite par plusieurs auteurs (**Boussaada et al., 2008 ; Djenane et al., 2011 ; Sfeir et al., 2013**).

Cette méthode communément appelée aromagramme est réalisée comme suit :

- Des boîtes de Pétri contenant la gélose de Mueller Hinton (15m/boite) ont étéensemencées de manière aseptique avec 100 µL de suspension microbienne dont la turbidité a été ajustée à 10<sup>6</sup> UFC/ml. Puis laisser sécher pendant 5 à 10minutes ;
- Imprégné un disque stérile de papier Whatman (6mm de diamètre) avec 10 à 15 µl d'une préparation d'huile de thon additionnée de DMSO à raison de 5% (V/V) Laisser le disque sécher pendant quelques instants ;
- Déposer le disque au milieu de la boite de pétri ;
- Incuber les boites de pétri à 37°C pendant 24h.

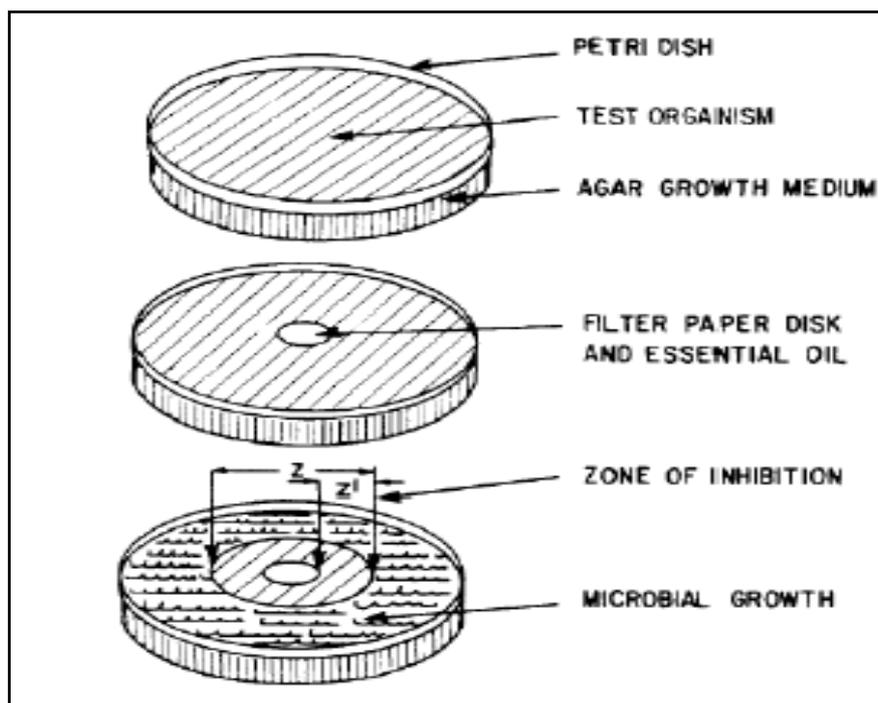
La lecture des résultats s'est faite 24 heures après l'incubation, par la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour de chaque disque (figure 08) à l'aide d'une règle en (mm) (**Zaika, 1988**). Selon (**PONCE et al., 2003**), les résultats sont exprimés en fonction du diamètre de la zone d'inhibition comme suit :

Non sensible (-) ou résistante à l'huile si le diamètre est inférieur à 8mm ;

Sensible (+) à l'huile si le diamètre est compris entre 9 à 14mm ;

Très sensible (++) à l'huile si le diamètre est compris entre 15 à 19mm ;

Extrêmement sensible (+++) à l'huile si le diamètre est supérieur 20mm.



**Figure 08:** Détermination de la zone d'inhibition par la méthode de diffusion des disques (Zaika, 1988).

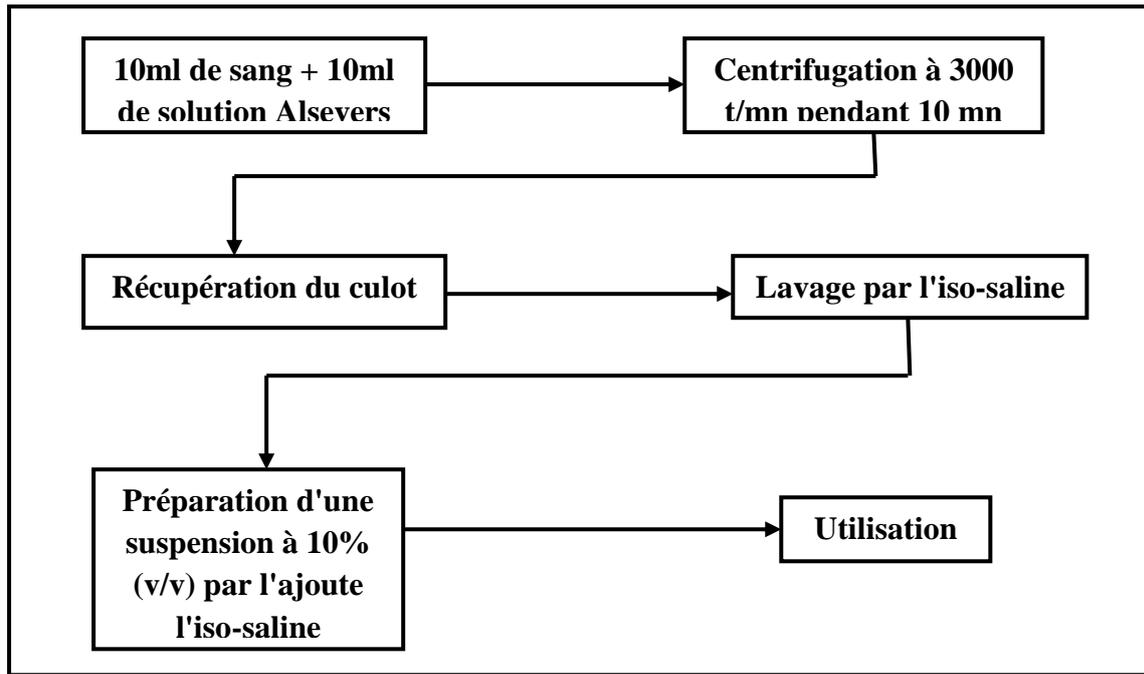
### III.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

#### III.4.1. Méthode de stabilisation de la membrane des globules rouges humains

##### III.4.1.1. Préparation de la suspension des globules rouges humains (HRBC)

Le sang a été recueilli auprès d'un volontaire humain en santé et a été mélangé avec un volume égal de solution Alsevers stérilisée (dextrose 2%, citrate de sodium 0.8%, Acide citrique 0.05%, chlorure de sodium 0.42% et l'eau distillé). Cette solution de sang a été centrifugée à 3000 tr/min à 10 min et les cellules emballées ont été séparées. Les cellules emballées ont été lavées avec l'eau physiologique/l'iso-saline (0.85%, pH 7.2) et centrifugées une autre fois et le culot a été garder. Une suspension (HRBC) a été préparée avec l'eau physiologique 10% (v/v) et cellules de sang (culot gardé) (Kar *et al.*, 2012).

Le protocole de cette préparation est résumé dans la figure 09 :



**Figure 09:** Protocole de préparation de la suspension (Kar *et al.*, 2012).

#### III.4.1.2. Dosage de l'activité de stabilisation de la membrane

L'activité anti inflammatoire in vitro de l'huile de thon a été effectuée selon la méthode de stabilisation de la membrane des globules rouges humains, les solutions suivantes ont été utilisées (Govindappa *et al.*, 2011; Kar *et al.*, 2012):

- **La solution d'essai:** composé de 1ml tampon phosphate salin (PBS), 2ml d'eau physiologique 0.36%, 0.5ml de la suspension (HRBC) qu'on a préparé et 1ml de solutions de concentrations variées l'huile de thon avec du DMSO (0.37, 0.75, 1.5, et 3 mg/ml)
- **Le test de contrôle:** composé de 1 ml de tampon phosphate et 2 ml d'eau et 0,5 ml de globules rouges humains 10% v/v dans une solution saline isotonique.
- Le diclofénac sodique a été utilisé comme médicament de référence.

Tous les mélanges d'essai ont été incubés à 37°C pendant 30 min. puis centrifugé à 3000 tr/min pendant 20 min. Le liquide surnageant a été séparé et la teneur en hémoglobine a été estimée par un spectrophotomètre à 560nm. Le pourcentage d'hémolyse a été estimé en supposant que l'hémolyse produite dans le contenu était 100% (Govindappa *et al.*, 2011).

Le pourcentage de stabilisation ou de protection de la membrane HRBC a été calculé en utilisant la formule suivante:

$$\text{Pourcentage de protection} = [100 - (\text{Densité optique de l'échantillon} / \text{Densité optique du Contrôle})] \times 100$$

#### **III.4.2. Essai biologique de l'inflammation**

On a préparé une série de dilution à partir d'une solution mère de 12.5mg de lipides dans 5ml de DMSO (des concentrations de 2500, 1200, 600, 300, 150 et 50 µg/ml). Ensuite, dans des tubes à essais, on a ajouté 2ml de chaque échantillon à 200µl de blanc d'œuf et 2.8 ml PBS d'un pH 6.4. Ensuite, les tubes sont incubés à 37°C pendant 15 minutes et chauffés au bain marie pendant 5 minutes à 70°C. Après refroidissement, la densité optique est obtenue à 660nm. On a utilisé l'eau distillé à la place des lipides et le diclofenac comme test de contrôle.

Le pourcentage de l'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 \times [V_t / V_c - 1]$$

$V_t$ : absorbance d'échantillon

$V_c$ : absorbance du contrôle

#### **III.4.3. Inhibition de la dénaturation protéique**

Le dosage de dénaturation des protéines a été effectué selon la méthode décrite par **Gambhire et al (2009)**. Avec quelques modifications comme décrit dans **Gunathilake et al (2018)**. Le mélange réactionnel (5 ml) consistait de 0,2 ml d'albumine bovine à 5%, 4,78 ml de solution saline tamponnée au phosphate (PBS, pH 6,4) et 0,02 ml de l'extrait, et le mélange a été mélangé, et a été incubé dans un bain-marie (37°C) pendant 15 min, puis le mélange réactionnel a été chauffé à 70°C pendant 5 min. Après refroidissement, la turbidité a été mesurée à 660 nm à l'aide d'un spectromètre. La solution tampon phosphate était utilisé comme contrôle. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé en utilisant la formule suivante:

$$\% \text{ inhibition} = 100 \times (1 - A2/A1)$$

A1: l'absorbance du control ;

A2: l'absorbance de l'échantillon.

### **III.5. Les analyses statistiques**

Les analyses statistiques de l'activité anti-oxydante, et des trois méthodes de l'activité anti-inflammatoire ont été faites en utilisant ANOVA.

## **CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION**

### **IV.1. La teneur en matière grasse totale**

La valeur nutritionnelle moyenne a été étudiée sur des échantillons de muscle dorsal et ventral de thon rouge. Le dosage des lipides totaux (ou matière grasse totale) a été réalisé par extraction directe en continu (Méthode de Soxhlet). La récupération de la matière grasse est effectuée par rotavapeur.

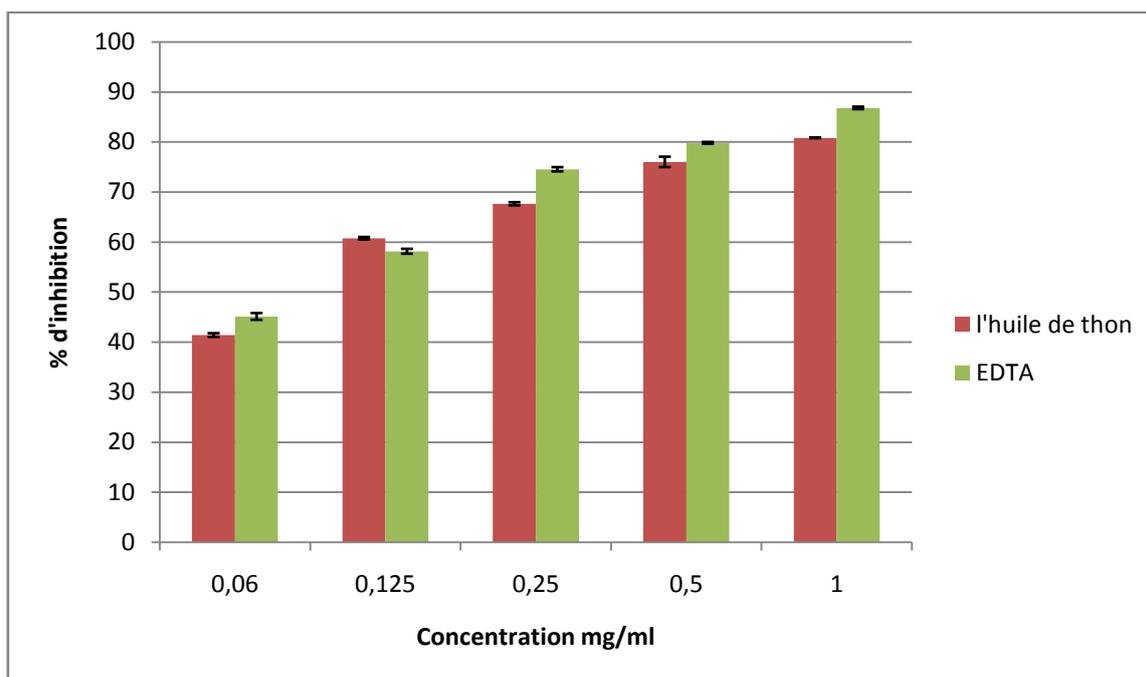
On a enregistré un pourcentage de 30.86% pour la teneur en matière grasse totale de l'échantillon.

La composition chimique du muscle de thons noirs, thons jaunes et marlins bleus est caractérisée par une forte teneur en protéines (de l'ordre de 24%) et une très faible teneur en lipides (entre 0 et 2%) (**Dromer *et al.*, 2014**). Ces espèces rentrent donc dans la catégorie des poissons maigres. Par ailleurs, le thon rouge est classé parmi les poissons gras, contenant 6.28 lipide/ 100 g de chair.

### **IV.2. Etude des propriétés anti-oxydantes**

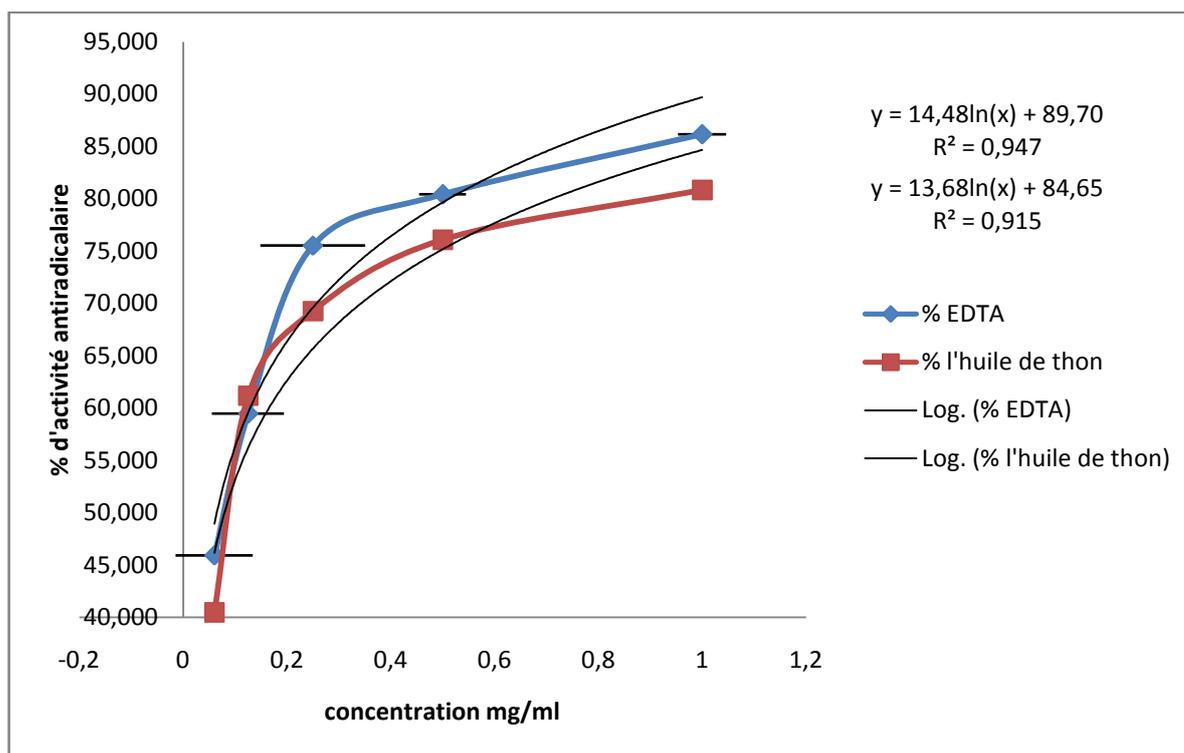
L'activité anti-oxydante *in vitro* de l'huile de thon a été évaluée selon le test au DPPH. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 10, elle illustre respectivement l'activité anti-oxydante de l'huile de thon et de l'EDTA, traduite par le pourcentage d'inhibition (%) en fonction des différentes concentrations (0.06, 0.125, 0.25, 0.5 et 1 mg /ml).

L'huile de thon réduit la concentration du radical libre, Dont son pourcentage d'inhibition est de  $80.78 \pm 0.05\%$  et celui de l'EDTA est de  $86,78 \pm 0.2\%$  à une concentration de 1mg/ml(Fig.10). On note que l'efficacité anti-oxydante augmente avec l'augmentation de la concentration de l'huile de thon.



**Figure 10 :** L'activité anti-oxydante de l'huile de thon et de l'EDTA

Il faut savoir que l'IC<sub>50</sub> est la concentration nécessaire pour éliminer 50% des radicaux libres, c'est le paramètre utilisé pour mesurer l'activité de l'extrait à piéger le radical libre (Cuvelier *et al.*, 1992). La valeur C<sub>50</sub> des échantillons a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibitions calculées en fonctions de cinq concentrations différentes d'échantillons préparés et est exprimé en mg/ml. L'équation de régression pour l'huile de thon est :  $y = 15.006\ln(x) + 90.565$ , et celle EDTA est :  $y = 11.838\ln(x) + 76.261$   $R^2 = 0.9791$  (Figure 11).



**Figure 11:** Effet anti radicalaire de l'huile de thon sur la réduction du DPPH

L'huile de thon a une activité anti-radicalaire importante. En plus, on a déduit que cette huile a exercé une bonne activité vis-à-vis du radical DPPH, en dépassant les 80% à la concentration de 1mg/ml. Ce constat s'est confirmé par la valeur d'IC50 enregistrée et qui est de 0.08 mg/ml. Nos résultats sont en accord avec les résultats de la référence prise, l'EDTA qui est de 0.06 mg/ml.

Les analyses statistiques ont été considérées hautement significatives. Les valeurs ont été exprimées en moyenne ± écart type dans le tableau 07, <sup>a-j</sup> différentes lettres dans la même ligne montre une différence significative.

**Tableau 07:** Activité anti-oxydante de l'huile de thon *in vitro*.

Concentrations	0.06	0.125	0.250	0.5	01
Huile de thon	41,397±0.362 <sup>j</sup>	60,733±0.25 <sup>h</sup>	67,62±0.311 <sup>f</sup>	76,003±1.033 <sup>b</sup>	80,783±0.051 <sup>b</sup>
EDTA	45,11±0.678 <sup>i</sup>	58,137±0.486 <sup>g</sup>	74,523±0.421 <sup>e</sup>	79,79±0.18 <sup>c</sup>	86,78±0.25 <sup>a</sup>

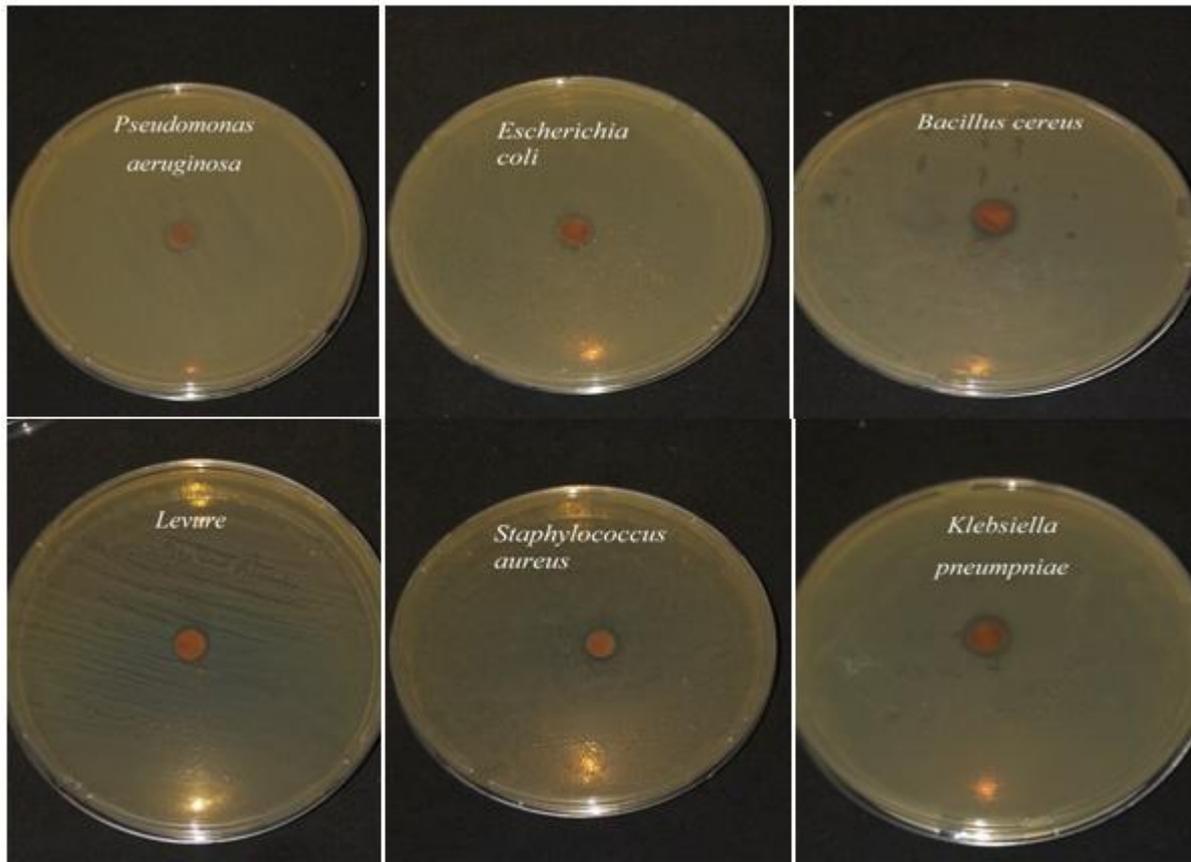
### IV.3.Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'étude de l'activité antimicrobienne a été faite par la méthode de diffusion sur un milieu gélosé molle, Mueller-Hilton en utilisant des disques de papier Whatman imprégnés de l'huile de thon.

L'activité antimicrobienne de l'huile de thon a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant l'huile à tester vis-à-vis de 6 souches microbiennes testées. Deux bactéries Gram positif (+) : *B. cereus* ATCC 10876 et *S. aureus* ATCC 33862, et trois bactéries Gram négatif (-) *P.aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 et *K. pneumoniae* ATCC 13883 ainsi qu'une levure *C. albicans* ATCC 10231. Les résultats de cette évaluation sont présentés dans le tableau 08 et par la figure 12.

**Tableau 08** : Tableau récapitulatifs des zones d'inhibition (en mm).

Souches bactérienne	Diamètre des zones d'inhibition en mm
<i>Escherichia coli</i>	11
<i>Staphylococcus aureus</i>	09
<i>Klebsiella pneumpniae</i>	10
<i>Bacillus cereus</i>	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
<i>Candida albicans</i>	09



**Figure 12** : Photographies l'activité antimicrobienne de l'huile de thon

D'après les résultats obtenus, on remarque que l'huile de thon exerce des propriétés antimicrobiennes allant d'une activité faible à une activité modeste sur les souches testées, et ceci en se basant sur la loi de **Barros et Coll (2007)**, qui définit la relation entre le diamètre d'inhibition enregistré et le pouvoir microbien.

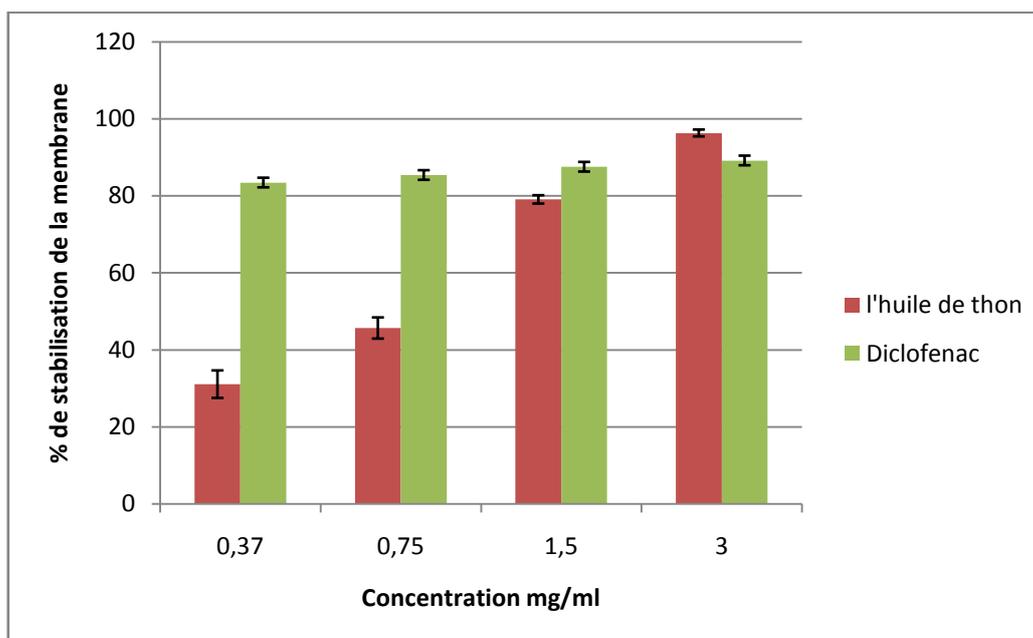
- ✓ Diamètre inférieurs à 7mm, aucune activité antimicrobienne.
- ✓ Diamètre de 7 à 9.9mm activité antimicrobienne faible.
- ✓ Diamètre de 10 à 11.9 activité antimicrobienne modeste
- ✓ Diamètre de 12 à 15 activités antimicrobiennes élevées.

En comparant nos résultats avec ceux obtenus dans l'étude fait par **Zaiki, (1988)**, on constate que l'huile de thon a un pouvoir antimicrobien contre les souches utilisées, dont les diamètres enregistrés ont été entre 9mm et 11mm.

#### IV.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

##### IV.4.1. Méthode de stabilisation de la membrane des globules rouges humains

L'effet protecteur de l'huile de thon comparé avec l'effet de l'anti-inflammatoire diclofénac contre l'hémolyse des globules rouge induite par la chaleur est illustré dans la figure 13 et le tableau 09.



**Figure 13:** Pourcentage de la stabilisation de la membrane des globules rouges traités par l'huile de thon et le Diclofenac.

**Tableau 09 :** Activité anti-inflammatoire de l'huile de thon (stabilisation de la membrane des globules rouges humains HRBC) *in vitro*.

Concentrations (mg/ml)	0,37	0,75	1,5	3
Huile de thon	31,103±2.118 <sup>e</sup>	45,683±2.64 <sup>d</sup>	79,077±8.686 <sup>c</sup>	96,323±0.955 <sup>a</sup>
Diclofenac	83,457±3.568 <sup>bc</sup>	85,41±2.748 <sup>bc</sup>	87,553±1.08 <sup>bc</sup>	89,19±0.893 <sup>b</sup>

<sup>a-j</sup>différentes lettres dans la même ligne montre une différence significative.

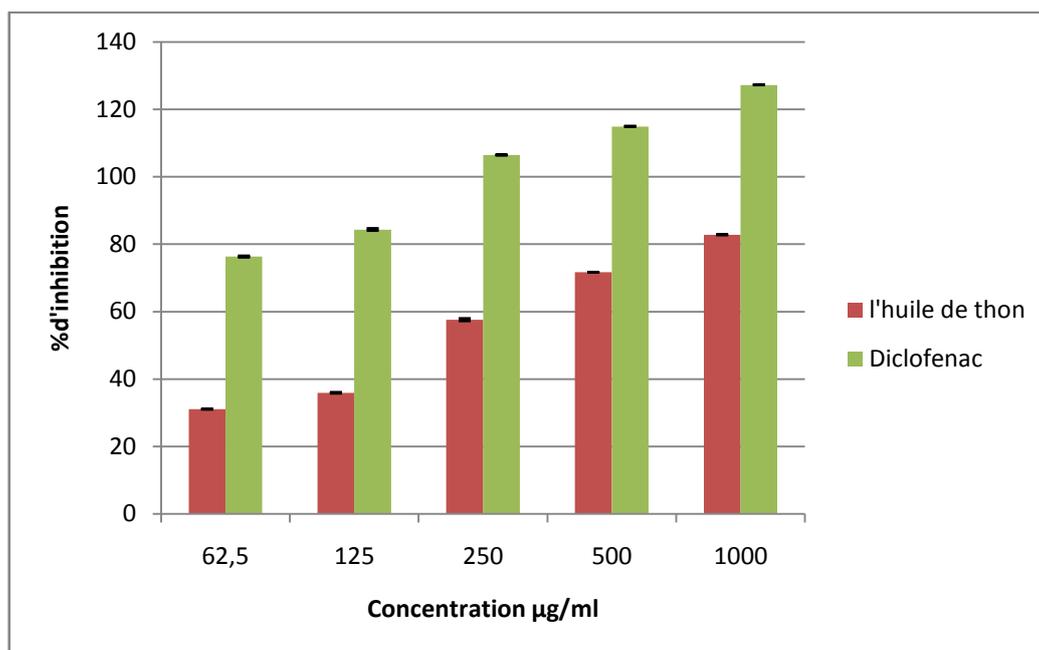
D'après les résultats représentés dans la figure 13 et le tableau 09, on observe que l'huile de thon présente une inhibition élevée de l'hémolyse des globules rouges à différentes concentrations. En effet, l'inhibition maximale est de  $96.32 \pm 0.95\%$  avec l'huile de thon à la dose de 3mg/ml, alors que la solution standard du Diclofenac présente une inhibition maximale de  $(89.19 \pm 0.89 \%)$  à la même concentration. Cette inhibition est concentration-dépendante.

Des résultats similaires ont été observés à partir de nombreux extraits de plantes telle que l'extrait de *Pistacialentiscus L.* Une stabilisation significative de la membrane de 69.49 % à la concentration de 3000  $\mu\text{g/ml}$  (**Bouyoucef et al., 2017**).

La stabilisation membranaire HRBC a été utilisée comme méthode pour étudier l'activité anti-inflammatoire in vitro car la membrane érythrocytaire est analogue à la membrane lysosomale (**Shenoy et al., 2010**) et sa stabilisation implique que l'extrait peut bien stabiliser ces dernières. La stabilisation du lysosomal est importante pour limiter la réponse inflammatoire en empêchant la libération de constituants lysosomaux des neutrophiles activés, tels que les enzymes bactériennes et les protéases, qui provoque une inflammation et des dommages supplémentaires des tissus lors de la libération extracellulaire. Les enzymes lysosomales libérées lors de l'inflammation provoquent divers troubles. On dit que l'activité extracellulaire de ces enzymes est liée à une inflammation aiguë ou chronique. Les médicaments non stéroïdiens agissent soit en inhibant ces enzymes lysosomales, soit en stabilisant la membrane lysosomale (**Rajendran, 2008**).

#### **IV.4.2. Essai biologique de l'inflammation**

Les résultats de l'inhibition de la dénaturation de l'albumine par l'huile de thon ont été démontrés par la figure 14. Une inhibition maximale de  $(82.77 \pm 0.1\%)$  a été observée à 1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$ . Le Diclofenac, un médicament anti-inflammatoire standard, a montré une inhibition maximale de  $(127.24 \pm 0.07 \%)$  à la même concentration.



**Figure 14 :** Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine par l'huile de thon.

**Tableau 10 :** Activité anti-inflammatoire de l'huile de thon (essai biologique de l'inflammation) *in vitro*.

Concentrations µg/ml	62.5	125	250	500	1000
L'huile de thon	31,047±0.065 <sup>j</sup>	35,91±0.165 <sup>i</sup>	57,587±0.38 <sup>h</sup>	71,683±0.021 <sup>g</sup>	82,773±0.107 <sup>e</sup>
Diclofenac	76,307±0.227 <sup>f</sup>	84,337±0.337 <sup>d</sup>	106,447±0.14 <sup>c</sup>	114,9±0.11 <sup>b</sup>	127,24±0.072 <sup>a</sup>

<sup>a-j</sup>différentes lettres dans la même ligne montre une différence significative.

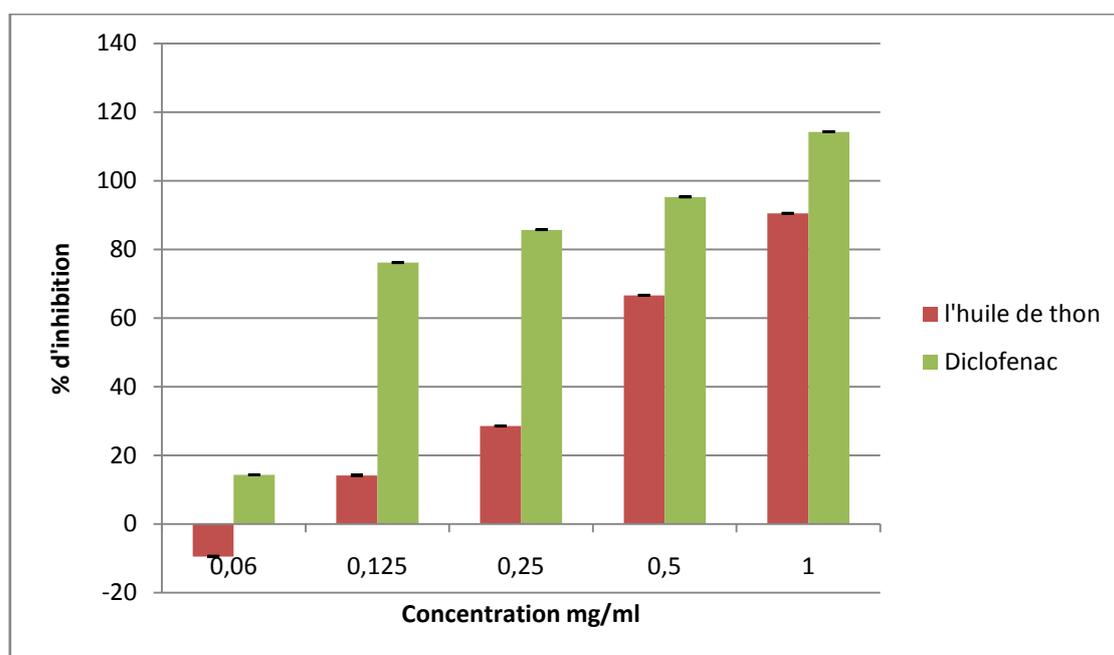
Ces résultats impliquent que l'huile de thon a un pouvoir inhibiteur de la dénaturation de l'albumine.

#### IV.4.3. Inhibition de la dénaturation protéique

Selon **Rathire et al., (2013)**, la méthode de la dénaturation protéique est la plus convenable pour l'évaluation de l'activité anti inflammatoire *in vitro*.

L'activité anti inflammatoire de l'huile de thon par l'inhibition de la dénaturation de la BSA est effectuée selon la méthode de **Gambhire *et al.*** Avec quelques modifications comme décrit dans **Gunathilake *et al.***

Les résultats d'inhibition de la dénaturation de BSA par l'huile de thon et le standard sont représentés dans la figure15 et le tableau 11.



**Figure 15:** les pourcentages d'inhibition de la dénaturation de BSA par l'huile de thon et le standard (diclofenac sodique).

**Tableaux 11 :** activité anti-inflammatoire de l'huile de thon (Inhibition de la dénaturation protéique) *in vitro*.

Concentrations mg/ml	0.06	0.125	0.250	0.5	01
Huile de thon	-9,455±0.092 <sup>i</sup>	14,165±0.163 <sup>h</sup>	28,525±0.064 <sup>g</sup>	66,645±0.021 <sup>f</sup>	90,495±0.035 <sup>c</sup>
EDTA	14,31±0.042 <sup>h</sup>	76,145±0.064 <sup>e</sup>	85,7±0.014 <sup>d</sup>	95,29±0.085 <sup>b</sup>	114,25±0.042 <sup>a</sup>

<sup>a-j</sup> différentes lettres dans la même ligne montre une différence significative.

On remarque d'après les résultats présentés par la figure 18 et le tableau 11 que l'huile de thon à la concentration de 1 mg/ml, a donné une meilleure inhibition de la dénaturation de BSA d'une valeur de  $90,49 \pm 0,035\%$ . Lorsqu'on le compare à ceux obtenus pour le Diclofenac sodium, un médicament anti-inflammatoire utilisé comme standard qui exerce un pourcentage d'inhibition de  $114,25 \pm 0,042\%$  à la même concentration.

On peut conclure que l'huile de thon possède un effet anti-inflammatoire marqué *in vitro* contre la dénaturation des protéines, et que d'autres études définitives sont nécessaires pour déterminer les mécanismes et les électeurs derrière ses actions anti-inflammatoires.

La dénaturation des protéines est un processus dans lequel les protéines perdent leur structure tertiaire et leur structure secondaire par application d'une contrainte externe ou d'un composé, tel qu'un acide ou une base forte, un sel inorganique concentré, un solvant organique ou de la chaleur. La plupart des protéines perdent leur fonction biologique lorsqu'elles sont dénaturées (**Leelaprakash et Mohan Dass, 2011**).

La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation. La production d'auto-antigènes dans les maladies inflammatoires peut être due à la dénaturation des protéines *in vivo*. Le mécanisme possible de la dénaturation consiste à l'altération des liaisons électrostatique, hydrogène, hydrophobe et disulfure qui maintiennent la structure tridimensionnelle des protéines.

Les analyses statistiques des 3 méthodes de l'activité anti-inflammation (stabilisation de la membrane, essai biologique de l'inflammation et l'inhibition de la dénaturation protéique) ont été faites en utilisant ANOVA. Les résultats sont hautement significatifs considérant que la valeur P (probabilité) = 0 (<0.05).

## **CONCLUSION**

L'huile de la plupart des poissons, tout comme les fruits de mer et certaines algues, est une source d'acide eicosapentaénoïque (AEP) et d'acide docosahexaénoïque (ADH), 2 acides gras de type oméga-3. Ces derniers ont un large éventail d'effets biologiques sur la santé que ce soit anti-inflammatoire, antioxydants, cardiovasculaire ou immunologique.

Parmi ces huiles de poissons, on trouve l'huile de thon, qui a été démontré dans plusieurs études d'avoir ces effets biologiques. Cette huile, dans sa composition, contient une importante quantité d'oméga 3.

Ce travail a porté sur l'exploration de quelques activités biologiques de l'huile de thon rouge, à savoir l'activité antioxydant, antimicrobienne et anti inflammatoire *in vitro*.

Dans un premier temps, l'huile de thon a montré une bonne activité antioxydante, soit une capacité de piégeage de radicaux libres très importante et un excellent effet inhibiteur de la peroxydation lipidique, ainsi, il peut être considéré comme un puissant candidat doté de pouvoir réducteur.

L'activité antimicrobienne est évaluée par la méthode de diffusion sur gélose en utilisant des disques de papier whatman imprégnés de l'huile étudié. Le résultat obtenu montre que l'huile de thon possède un pouvoir antimicrobien contre les souches utilisées. Ce pouvoir est plus au moins modeste.

Concernant l'activité anti-inflammatoire de l'huile de thon, qui a été effectuée selon 3 méthodes, la méthode de stabilisation de la membrane des globules rouges humains, d'inhibition de la dénaturation des protéines et essai biologique de l'inflammation. Et d'après les résultats, l'huile de thon présente une activité anti inflammatoire importante.

En conclusion, l'huile de thon est une source prometteuse d'agents antioxydants, anti inflammatoire et antimicrobienne. Les mécanismes exacts et l'étendue de ces actions ne sont pas encore complètement élucidés.

## Références

1. Aberoumand, A & Fazeli, a (2019). Comparison of analysis and the nutritional value of fresh common carp, frozen and southern canned tuna. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 13(1), 593-597.
2. Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G., 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J* 357, 593-615.
3. Auddy B., Ferreira M., Blasina F., Lafon L., Arredondo F., Dajas F., Tripathi P.C., Seal T., Mukherjee B. Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative diseases. *J. Ethnopharmacol.* 2003; 84(2-3):131–138.
4. Balsano, C., Alisi, A., 2009. Antioxidant effects of natural bioactive compounds. *Curr. Pharm. Des.* 15, 3063-3073.
5. Barros L, Ferreira MJ, Queirós B, Ferreira I, Baptista P (2007) Total phenols, ascorbic acid,  $\beta$ -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry* 103 (2) : 413–419
6. Beckman, K., Ames, B., 1997. Oxidative decay of DNA. *J. Biol. Chem.* 272, 19633-19636.
7. Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 26: 1199-1200.
8. Boussaada O., Ammar S., Saidana D., Chriaa J., Chraif I., Daami M., Helal A.N. et Mighri Z. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of volatile components from capitula and aerial parts of *Rhaponticum acaule* DC growing wild in Tunisia. *Microbiological Research.*, 163: 87-95.
9. Bouyouce, H et Ait-Idir, N.2017. Etude de l'activité anti-inflammatoire, in vitro, des extraits des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* L. sur la stabilité membranaire du globule rouge.
10. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity *Food Sci. Technol.-Lebensm.-Wiss. Technol.*, 28 (1) (1995), pp. 25-30.
11. Christelle Ravier-mailly et al., « Long-term fluctuations in bluefin tuna trap catches: are they environmentally driven? », *Archimer, archive institutionnelle de l'Ifremer*.

12. Coleman, J., 2001. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int. Immunopharmacol.* 1, 1397-1406.
13. Cuvelier, Richard & Berset (1992) Comparison of the Antioxidative Activity of Some Acid-phenols: Structure-Activity Relationship, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56:2, 324-325
14. DeFranco, A.L., Robertson, M., Locksley, R.M., 2009. *Immunité: La réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires*. De Boeck Université.
15. Delattre, J., 2007. *Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques*, 2 ed. Tec & doc. Médicales internationales, Londres, Paris, New York.
16. Djenane D., Yanguela J., Amrouche T., Boubrit S., Boussad S. et Roncales P. (2011). Chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in minced beef. *Food Science and Technology International.*, 17: 505-515.
17. Dromer C., Reynal L., Etienne M., Mathieu H., Pau C. Auteurs PARM : Eugène S., Régina F. (2014). Etude de la qualité des captures de la pêche associée au DCP ancrés. R.INT.RBE/BIODIVENV.
18. El-Agamey, A., Lowe, G.M., McGarvey, D.J., Mortensen, A., Phillip, D.M., Truscott, T.G., Young, A.J., 2004. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 430, 37-48.
19. Elkhamisy, B. S. M., M. Ahmed, F. Youssef and G. Ghoneim. "Physico-chemical, microbiological and organoleptic assessment for the stored frozen products of tuna." (2021).
20. Favier, A., 2003. Le stress oxydant. Intéret conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique* 108-115.
21. Fromentin, J.-M. & Powers, J. E. Atlantic bluefin tuna: population dynamics, ecology, fisheries and management. *Fish. Fish.* 6, 281–306 (2005).
22. Gambhire, M.; Juvekar, A.; Wankhede, S. Evaluation of the anti-inflammatory activity of methanol extract of *Barleria cristata* leaves by in vivo and in vitro methods. *Int. J. Pharmacol.* 2009, 7, 1–6.

23. Gandhidasan R, Thamaraichelvan A, Baburaj S. Anti inflammatory action of Lanneacoromandelicaby HRBC membrane stabilization. *Fitoterapia* 1991; Voll LXII; No1; 81- 83.
24. Gerard J Tortora, Sandra Reynolds, eds. *Principles of Anatomy and Physiology*. Harper Collins College Publishers, 1993, 7th edition: pp 695.
25. G. Leelaprakash, S. Mohan Dass « Activité anti-inflammatoire in vitro de l'extrait méthanolique d' *Enicostemma Axillare* », *Int. J. Drug Dev. & Res.*, juillet-sept. 2011, 3(3):189-196
26. Govindappa, N. Bharath, H. B. Shruthi, T. S. Sadananda and P. Sharanappa, Antimicrobial, antioxidant and in vitro anti-inflammatory activity and phytochemical screening of *Crotalaria pallida* Aiton, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2011, 5(21), 2359-2371.
27. Guillaume J, Kaushik S, Bergot P, Métailler R. 1999. *Nutrition et alimentation des poissons et crustacés*. Paris (France): INRA.
28. Gunathilake, K.D.P.P.; Ranaweera, K.K.D.S.; Rupasinghe, H.P.V. Influence of boiling, steaming and frying of selected leafy vegetables on the in vitro anti-inflammation associated biological activities. *Plants* 2018, 7, 22.
29. Henrotin, Y., Deby-Dupont, G., & Reginster, J. Y. (2001). Les médiateurs biochimiques de l'inflammation. *Revue médicale de Liege*, 56(6), 433-42.
30. Hirota, K., Murata, M., Sachi, Y., Nakamura, H., Takeuchi, J., Mori, K., Yodoi, J., 1999. Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.* 274, 27891-27897.
31. Hold, G. L., & El-Omar, M. E. (2008). Genetic aspects of inflammation and cancer. *Biochemical Journal*, 410(2), 225-235.
32. Janeway, C.A., Murphy, K., Walport, M., 2009. *Immunobiologie*. De Boeck.
33. Kabe, Y., Ando, K., Hirao, S., Yoshida, M., Handa, H., 2005. Redox regulation of NF- $\kappa$ B activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 395-403.
34. Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L.A., 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31, 671-701.

35. Kar, B., Kumar, R.S., Karmakar, I., Dola, N., Bala, A., Mazumder, U.K., 2012. Antioxidant and in vitro anti-inflammatory activities of mimusopselengi leaves. *Asian Pac J Trop Biomed* 2(2), 976-80.
36. Kleinert, H., Pautz, A., Linker, K., Schwarz, P.M., 2004. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.* 500, 255-266.
37. Koechlin-Ramonatxo, C., Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 2006. 20(4): p. 165-177
38. Kojo, S., 2004. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 11,1041-1064.
39. Korsmeyer, K., Dewar, H., 2001. Tuna metabolism and energetics. *Fish Physiol.* 19, 35–78.
40. Landis, G.N., Tower, J., 2005. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech. Ageing Dev.* 126, 365-379.
41. Leiwakabessy, J. and Wenno, M.R., 2019. Penambahan asap cair mampu mempertahankan profil asam lemak ikan tuna kering blok. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 22(3), pp.520-525.
42. Male, D., Brostoff, J., Roth, D.B., Roitt, I., 2007. *Immunologie*, Nouv. ed. ed. Elsevier Masson, Issy-les-Moulineaux.
43. Matés, J.M., Perez-Gomez, C., Nunez de Castro, I., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 32, 595-603.
44. Mayol, K. Cavalié, F. & Davoust-Nataf, N. (2013). *Les médiateurs de l'inflammation*. Anonyme.
45. Medzhitov, R., 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428-435.
46. Niki, E., 2010. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 503-515.
47. Parratt, J.R., West, G.B., 1958. Inhibition by various substances of oedema formation in the hind-paw of the rat induced by 5-hydroxytryptamine, histamine, dextran, egg-white and compound 48/80. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 13, 65-70.

48. Ponce, A.G. & Fritz, R. & Valle, CE & Roura, S.I.. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on native microbial population of organic Swiss Chard. *LWT - Food Science and Technology*. 36. 679-684.
49. Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4290-4302.
50. RajendranVadivu, Lakshmi K S. In vitro and in vivo anti-inflammatory activity of leaves of *Symplocos cochinchinensis* (Lour) Moore ssp *Laurina*. *Bangladesh J Pharmacol* 2008; 3: 121-124.
51. Ravier-Mailly Christelle, Fromentin Jean-Marc (2003). Long-term fluctuations in bluefin tuna trap catches: are they environmentally driven? *Collective Volume of Scientific Papers*, 55(3), 1208-1216.
52. Romagnani S. (2006). Immunological tolerance and autoimmunity. *Internal and emergency medicine*, 1(3), 187–196.
53. Rubbo, H., Radi, R., 2008. Protein and lipid nitration: role in redox signaling and injury. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 1318-1324.
54. Sardenne, F., Bodin, N., Médieu, A., Antha, M., Arrisol, R., Le Grand, F., Bideau, A., Munaron, J.M., Le Loc'h, F., Chassot, E., 2020. Benefit-risk associated with the consumption of fish bycatch from tropical tuna fisheries. *Environ. Pollut.* 267, 115614.
55. Scano, P., Rosa, A., Pisano, M. B., Piras, C., Cosentino, S., & Dessì, M. A. (2013). *Lipid components and water soluble metabolites in salted and dried tuna (Thunnus thynnus L.) roes*. *Food Chemistry*, 138(4), 2115–2121.
56. Sfeir J., Lefronçois C., Baudoux D., Derbré S. et Licznar P. (2013). In Vitro Antibacterial Activity of Essential Oils against *Streptococcus pyogenes*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*: 1-9.
57. Shenoy S, Shwetha K, Prabhu K, Maradi R, Bairy KL, Shanbhag T. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Tephrosia purpurea* in rats. *Asian Pac J Trop Med* 2010; 3(3): 193-5.
58. Shimizu, T., 2009. Lipid Mediators in Health and Disease: Enzymes and Receptors as Therapeutic Targets for the Regulation of Immunity and Inflammation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 49, 123-150.
59. Tripathi, P., 2007. Nitric oxide and immune response. *Indian J. Biochem. Biophys.* 44, 310-319.

60. Urquiaga, I., Leighton, F., 2000. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biol. Res* 33, 55-64.
61. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44-84.
62. Vonkeman, H.E., Van de Laar, M.A.F.J., 2010. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: adverse effects and their prevention. *Semin. Arthritis Rheum.* 39, 294-312.
63. V Stankov, S. (2012). Definition of inflammation causes of inflammation and possible anti-inflammatory strategies. *The open inflammation journal*, 5(1).
64. Weill, B., Batteux, F. & Dhainaut, J. (2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. Eds, De Boeck Université (Paris), 12-23.
65. Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W., 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111, 544-547.
66. Xiang, X.-W.; Zhou, X.-L.; Wang, R.; Shu, C.-H.; Zhou, Y.-F.; Ying, X.-G.; Zheng, B. Protective Effect of Tuna Bioactive Peptide on Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice. *Mar. Drugs* **2021**, *19*, 127.
67. Young, J.M., Spires, D.A., Bedord, C.J., Wagner, B., Ballaron, S.J., De Young, L.M., 1984. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. *J. Invest. Dermatol.* 82, 367-371.
68. Zaika, L.L. (1988) Spices and Herbs: Their Antimicrobial Activity and Its Determination. *Journal of Food Safety*, 9, 97-118.