



HAL
open science

Caractérisation structurale et fonctionnelle des métabolites de l'algue verte *Ulva Rigida* au moyen d'une approche protéomique

Amel Zehlila

► **To cite this version:**

Amel Zehlila. Caractérisation structurale et fonctionnelle des métabolites de l'algue verte *Ulva Rigida* au moyen d'une approche protéomique. Neurosciences [q-bio.NC]. Normandie Université; Université de Tunis El Manar, 2017. Français. NNT : 2017NORMR101 . tel-01738707

HAL Id: tel-01738707

<https://theses.hal.science/tel-01738707>

Submitted on 20 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



REPUBLIQUE TUNISIENNE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

UNIVERSITE TUNIS EL MANAR

FACULTE DES SCIENCES DE TUNIS



THÈSE

En vue de l'obtention du
Doctorat en Sciences Biologiques
Option Neurosciences

Présentée par

Amel ZEHLILA

*Caractérisation structurale et fonctionnelle des
métabolites de l'algue verte *Ulva rigida* au moyen
d'une approche protéomique*

Soutenue le 30/06 /2017 devant le jury composé de :

Pr. Olfa Masmoudi	Président	Faculté des sciences de Tunis
Dr. Alice Carrier	Rapporteur	Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille
Pr. Ferid Limam	Rapporteur	Technopole Borj-Cedria
Pr. Pascal Cosette	Examineur	Université de Rouen
Pr. Mohamed Amri	Directeur de Thèse	Faculté des sciences de Tunis
Dr. Thierry Jouenne	Directeur de Thèse	Université de Rouen

Année Universitaire : 2016/2017

THÈSE EN CO - TUTELLE INTERNATIONALE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité

ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de L'Université de Rouen Normandie
et de la Faculté des Sciences de Tunis

***Caractérisation structurale et fonctionnelle des métabolites
de l'algue verte *Ulva rigida* au moyen d'une approche
protéomique***

Présentée et soutenue par
Amel ZEHLILA

Thèse soutenue publiquement le (30/06/2017)
devant le jury composé de

France / Alice CARRIER	Chargée de recherche au CNRS / Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille	Rapporteur
Tunisie / Ferid LIMAM	Professeur / Centre de Biotechnologie Technopole Borj Cedria	Rapporteur
France / Pascal Cosette	Professeur / Université de Rouen	Examineur
Tunisie / Olfa Masmoudi	Professeur / Faculté des Sciences de Tunis	Examineur
France / Thierry JOUENNE	Directeur de recherche au CNRS / Université de Rouen	Directeur de thèse
Tunisie / Mohamed AMRI	Professeur / Faculté des Sciences de Tunis	Codirecteur de thèse

Thèse dirigée par

M. Thierry Jouenne

M. Mohamed Amri

Université de Rouen Normandie

Université de Tunis el Manar

Université de Rouen Normandie



Logo École Doctorale



Logo Laboratoire



Faculté des Sciences de Tunis



Logo École Doctorale



Logo Laboratoire



UR/11ES09

*Ce que l'on apprend par l'effort
reste toujours ancré plus longtemps.*

De Luc Lecompte / Le Dentier d'Enée

Préambule

Ces travaux de recherche ont été réalisés dans le cadre d'une co-tutelle internationale de thèse entre la Faculté des Sciences de Tunis et l'Université de Rouen.

Une première partie de ces travaux a été réalisée au sein du Laboratoire de Neurophysiologie, Physiopathologie Cellulaire et Valorisation des BioMolécules, unité de recherche UR/11ES09, à la faculté des Sciences de Tunis, sous la direction de Mr. Mohamed AMRI (professeur de l'enseignement supérieur).

La deuxième partie de la thèse a été entreprise au sein du Laboratoire Polymères Biopolymères Surfaces, UMR 6270 à l'Université de Rouen, sous la direction de Mr. Thierry JOUENNE (Directeur de recherche au CNRS) et en collaboration avec la plateforme protéomique PISSARO IRIB.

Je tiens à remercier tous les organismes qui ont contribué financièrement à la réalisation de ces travaux durant toutes les années de ma thèse à nommer le Ministère de l'Enseignement Supérieur et l'unité de recherche UR/11ES09 en Tunisie ainsi que le laboratoire PBS et la plateforme PISSARO en France.

Dédicace

A mes très chers parents, aucune dédicace ne saurait témoigner de mon Affection et de ma reconnaissance éternelle pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon éducation, mes études et mon bien être. A travers ce modeste travail, j'espère que vous trouverez l'expression de mon Amour infini.

A mon cher petit frère. Un grand Merci pour ta joie de vivre, ton support et tes encouragements continus.

A tous ceux qui me sont très chers et que ma réussite leur tient à cœur..

Remerciements

La reconnaissance est la mémoire du cœur. La thèse est un long chemin à parcourir certes accompagné de personnes généreuses et encourageantes. Alors je leur dis Merci de m'avoir permis d'arriver au bout de ce chemin...

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement les membres du jury de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail.

*J'exprime, ici, ma profonde gratitude au professeur **Mohamed Amri**, mon directeur de thèse, et également le Directeur de l'unité de recherche UR/11ES09 à la Faculté des Sciences de Tunis, pour la grande opportunité qu'il m'a octroyée de vivre une grande expérience professionnelle et humaine à ses côtés, ainsi que pour sa disponibilité, sa sympathie, sa modestie, son écoute et ses conseils précieux tout au long de ma formation doctorale. Je le remercie, plus particulièrement, pour m'avoir permis une initiation au monde de l'enseignement supérieur.*

*Je tiens, par la même occasion, à remercier mon co-directeur de thèse docteur **Thierry Jouenne**, directeur du laboratoire «Polymères, Biopolymères, Surfaces», Directeur de recherche CNRS, et responsable de l'équipe « Biofilms, Résistance, Interactions Cellules Surfaces » pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ces années de mastère et de thèse en m'accueillant au sein de son laboratoire. Toujours disponible malgré ses nombreuses charges, je le remercie pour ses connaissances, sa qualité d'encadrement, sa gentillesse et ses conseils instructifs. Cela a été un honneur de travailler sous sa direction.*

*Je remercie le Docteur **Guy-Alain Junter**, ancien directeur de l'UMR6270 qui m'a accueillie au sein du laboratoire lors de mes premières années de recherches.*

*Mes plus sincères remerciements vont au professeur **Pascal Cosette**, professeur à l'université de Rouen qui a contribué en grande partie à l'avancement de ces travaux de thèse. Je le remercie plus particulièrement pour la confiance et le soutien qu'il m'a accordé tout au long de ces années, pour son aide précieuse et d'avoir su également me motiver dans les moments difficiles. Qu'il sache que sa rigueur et ses qualités scientifiques et humaines seront une source d'inspiration pour la suite de ma carrière. Je lui suis également redevable pour avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examineur. Tous les mots ne peuvent témoigner de ma profonde gratitude et de ma reconnaissance sans limites envers lui.*

*J'adresse également mes remerciements au professeur **Olfa Masmoudi**, professeur à la faculté des Sciences, pour son soutien, ses grandes qualités d'écoute, sa disponibilité et sa gentillesse à mon égard durant toutes ces années de recherche. Je la remercie tout particulièrement pour l'aide précieuse qu'elle m'a apportée pour la réalisation de certaines manipulations et pour la confiance qu'elle a bien voulu*

m'accorder en m'initiant au monde de l'enseignement supérieur. Je tiens à lui exprimer ma gratitude et ma reconnaissance et je suis également très honorée qu'elle ait accepté de présider mon jury de thèse.

*Je souhaite également remercier Docteur **Alice Carrier** et Professeur **Ferid Limam**, pour avoir pris le temps de lire et d'évaluer ce travail, ils m'ont fait l'honneur de participer au jury et d'être les rapporteurs de ma thèse. Qu'ils veuillent bien trouver ici, l'expression de mon profond respect et de mes vifs remerciements.*

*Je voudrais souligner l'aide précieuse que professeur **Limam** m'a apportée. Je le remercie sincèrement pour son accueil bienveillant au sein de son Laboratoire des Substances Bioactives à Borj Cedria, pour tous ses conseils et remarques pertinents et surtout pour m'avoir facilité la réalisation de certaines manipulations.*

*Et je ne peux pas omettre d'adresser ma profonde reconnaissance au professeur **Emmanuelle Dé** et au docteur **Annick Schauman** pour leur implication, leur contribution au bon déroulement de mes recherches, leur aide précieuse et leurs encouragements illimités.*

*J'adresse également mes remerciements à **Julie Hardouin** pour avoir passé mes échantillons en spectrométrie de masse et pour ses conseils et sa bonne humeur légendaire.*

A tous les permanents du laboratoire PBS, Merci d'avoir rendu mes journées fastidieuses plus agréables avec leurs mots gentils et leurs friandises.

*Un remerciement spécial au Docteur **David Vaudry** et à ma collègue doctorante **Seyma** qui m'a aidée à réaliser quelques manipulations dans l'unité U982 (Rouen, France), aussi au Docteur **Manuel Fréret** de la faculté de Médecine de Rouen.*

*A tous les doctorants et docteurs que j'ai côtoyés durant ces longues années de thèse et qui sont devenus de véritables amis **Senda, Salma, Hadhemi, Yosra, Seyma, Ikram, Mouna, Hayfa, Imen, Ahmed, Tassadit, Yacine**,Merci d'avoir fait partie de cette grande aventure. Je n'oublie pas ceux et celles pour qui l'aventure vient de commencer, je leur souhaite le meilleur.*

***Sandra et Tonio**, Merci pour votre aide, vos conseils et pour tous les beaux moments partagés ensemble dans les couloirs, la cafette et les bureaux...*

*A ma seconde famille rouennaise, tous les mots du monde ne peuvent résumer ce que vous avez fait pour moi et ne peuvent témoigner de ma gratitude envers vous mes chers **Clémence et Ali, Cyrine et Amine**. **Amine**, Merci d'être toujours et inlassablement à mes côtés !*

*Avant de terminer, je n'oublie pas de remercier toutes mes amies et collègues qui m'ont appuyée et qui ont égayé mon quotidien pendant ces quelques années de ma vie **Nesrine, Rafeh, Rima, Leila, Ferdaws, Yasmine, Pascale, Monia, Ines, Khaoula, Lilia**, ...*

*A mes copines de cœur **Selima** et **Asma**, nous avons vécu des moments forts en émotion, nous avons partagé des souvenirs, des plus merveilleux. Merci de faire partie de ma vie. J'espère que notre amitié demeurera pour toute la vie.*

Merci à ma grande famille et à mes proches, grands et petits pour leur soutien et pour avoir cru en moi.

*Enfin, j'exprime ma profonde reconnaissance et ma sincère gratitude à mon cher petit frère **Aymen** et à mes très chers parents **Ezzedine** et **Samira** pour leurs sacrifices durant mes longues années d'étude, pour leur présence rassurante et surtout pour tout l'amour qu'ils m'ont procuré. Je les remercie de m'avoir soutenue et épaulée durant toute cette période et sans qui, rien de tout cela n'aurait été possible. Que dieu leur préserve longue vie.*

A tous ceux qui m'ont aidée d'une manière ou d'une autre et qui n'ont pas été cités, qu'ils reçoivent ici l'expression de mes meilleurs sentiments.

Résumés

Résumé

Les molécules naturelles de différentes origines et essentiellement celles issues des algues marines conçoivent une panoplie de principes bioactifs naturels à fort potentiel thérapeutique. Actuellement, plusieurs recherches sont consacrées à l'isolement de nouveaux composés bioactifs à partir des ressources marines qui renferment des effets bénéfiques prometteurs pour la santé. Parmi les ressources marines, les composés bioactifs présents dans de nombreuses espèces d'algues ont des propriétés nutritionnelles et pharmaceutiques particulièrement intéressantes. Cette thèse s'intéresse aux effets bénéfiques de l'algue *Ulva rigida*. Elle concerne plus particulièrement les activités des extraits protéiques de l'algue verte *Ulva rigida*.

En effet, dans la présente étude, nous avons étudié l'effet préventif d'un extrait de protéine (PE) d'*Ulva rigida* contre les dommages cellulaires induits par les UVB. Nous avons démontré qu'un traitement des astrocytes corticaux avec 50 µg de PE induit un fort effet glioprotecteur et supprime les effets nocifs des rayonnements UVB, augmentant en particulier la viabilité cellulaire. D'autres essais supplémentaires nous ont permis d'affirmer que cet extrait stimule l'activité de la catalase et de la superoxyde dismutase et inhibe la production de marqueurs de stress, tels que le H₂O₂ ou la peroxydation lipidique. Par ailleurs, la digestion protéolytique ou le traitement thermique de l'extrait d'algue ont inhibé cet effet préventif, plaidant pour le rôle prédominant de la fraction protéique. Par la suite, des études protéomiques ont permis d'identifier plusieurs protéines de l'extrait, parmi lesquelles la calmoduline s'est avérée représenter un contributeur important aux activités de protection observées à la fois sur des cultures d'astrocytes que sur des neurones en grain.

Dans un premier temps, nous avons confirmé que la lyophilisation semblait être le meilleur traitement de pré-extraction de l'algue permettant le meilleur effet protecteur. En effet, la première partie de cette thèse a porté sur l'optimisation de l'extraction de 4 extraits de l'algue traités différemment notamment le traitement par lyophilisation, le traitement à l'étuve, le

séchage au soleil ou le broyage frais. Notre étude a montré que les 4 extraits possèdent une teneur différente en protéines selon le type de traitement. Le traitement par lyophilisation semble être celui qui protège le plus les biomolécules actives, notamment les protéines de l'algue *Ulva* avec, bien évidemment, un meilleur rendement en protéines, dans le même contexte, le même traitement favorise une meilleure activité antioxydante que les autres traitements étant donné que la lyophilisation est l'approche couramment appliquée pour éviter les instabilités physiques et chimiques des molécules.

Lors de la deuxième **partie**, nous avons porté l'accent sur l'évaluation de l'effet protecteur de l'extrait protéique de l'algue *Ulva rigida* contre le stress oxydatif induit par les UV- B sur des cultures de cellules gliales. Nous avons démontré pour la première fois que l'extrait PE protège les astrocytes de rat en culture contre les effets néfastes des rayonnements UV- B, en augmentant la viabilité cellulaire et en diminuant la libération de la LDH. L'exposition des astrocytes aux rayons UV provoque des modifications au niveau de la morphologie cellulaire et une augmentation de la mort cellulaire en fonction du temps d'exposition. Cet effet a été complètement annulé grâce à l'extrait. Ce dernier empêche l'oxydation entraînée par le stress et l'altération des constituants cellulaires, ce qui est au moins en partie, attribuable à l'activation de systèmes antioxydants endogènes tels que la SOD et la catalase. En outre, l'extrait protéique de l'algue supprime également les dommages oxydatifs des biomolécules en baissant le niveau du MDA, rétablissant l'équilibre du calcium intracellulaire et réduisant la teneur en H₂O₂.

Par la suite et afin de déterminer la nature de l'effet antioxydant et protecteur sur les cellules stressées nous avons pu déterminer l'implication de la fraction protéique de l'extrait ulva dans cette action protectrice. Dans **ce troisième volet**, l'effet du chauffage, des hydrolases et l'action de la trypsine sur l'activité de l'extrait, et la capacité des produits de dégradation de ce dernier à empêcher l'effet des radiations UVB ont été évalués. Les résultats ont montré que le traitement thermique de la fraction protéique, l'action des hydrolases, et en particulier l'action de protéase

la trypsine abolissent efficacement l'activité biologique de l'algue contre les radiations UV-B. Ceci nous permet d'élucider l'implication des protéines de l'algue dans l'action de l'extrait sur le contrôle du métabolisme oxydatif des cellules en culture.

L'investigation protéomique a permis d'abord de déterminer le profil protéique de l'algue au moyen de l'électrophorèse monodimensionnelle et ensuite une identification des protéines de l'extrait par la méthode Label Free et moyennant la spectrométrie de masse (Orbitrap). Plusieurs dizaines de protéines présentes ont été identifiées à partir des 4 extraits de la même algue. Les résultats ont révélé la présence de 3 protéines abondantes et communes aux 4 extraits de l'algue. Les principales protéines identifiées à partir de l'extrait lyophilisé sont la calmoduline et la cystéine synthase. Elles sont caractérisées par le PSM le plus abondant.

Dans cette dernière partie et en accord avec les premiers résultats, d'autres expériences de fractionnement de l'extrait protéique selon le poids moléculaire nous ont permis d'isoler une protéine d'intérêt. En effet, son identification par spectrométrie de masse a donc permis de proposer la calmoduline comme principal contributeur à l'origine de ces effets préventifs.

Pour finir nous avons confirmé les effets glioprotecteur et neuroprotecteur de la protéine algale identifiée et de son homologue commerciale et enfin nous avons déterminé leurs effets doses.

Etant donné que cette calmoduline algale peut être produite en grandes quantités, elle représente une source précieuse de protection qui ouvrira la voie pour des applications futures.

Mots clés : *ulva rigida, radiations UV-B, cellules en culture d'astrocytes de rats, glioprotection, protéines, calmoduline.*

Abstract

Natural molecules from different origins present a high therapeutic potential. Among them, molecules extracted from marine algae are particularly interesting. Several studies are currently being devoted to the isolation of new bioactive compounds from marine resources that have promising health benefits. Among the marine resources, the bioactive compounds present in many species of algae have particularly interesting nutritional and pharmaceutical properties. This thesis deals with the beneficial effects of the alga *Ulva rigida*. It relates more particularly to the activities of the protein extract of the green alga *Ulva rigida*.

In this study, we studied the preventive effect of a protein extract (PE) of *Ulva rigida* against UVB-induced cell damage. We have demonstrated that treatment of cortical astrocytes with 50 µg of PE induces a strong glioprotective effect and suppresses the harmful effects of UVB radiation, in particular increasing cell viability. Other extra tests allowed us to say that this extract stimulates the activity of catalase and superoxide dismutase and inhibits the production of stress markers such as H₂O₂ or lipid peroxidation. Moreover, the proteolytic digestion or the heat treatment of the algal extract inhibited this preventive effect, arguing for the predominant role of the protein fraction. Subsequently, proteomic studies have identified several proteins in the extract, of which calmodulin has been shown to be an important contributor to the protective activities observed on both astrocyte and neuron cultures.

Initially, we confirmed that freeze-drying seemed to be the best pre-extraction treatment of the algae, allowing the best protective effect. Indeed, the first part of this thesis focused on the optimization of the extraction of 4 seaweed extracts treated differently in particular the treatment by lyophilization, oven treatment, sun drying or fresh grinding. Our study showed that the 4 extracts have a different protein content depending on the type of treatment. The lyophilization treatment seems to be the one that most protects the active biomolecules, in particular the proteins of the *Ulva* alga with, of course, a better yield of proteins. In the same context, the same treatment

promotes a better antioxidant activity than the other treatments, since lyophilization is the commonly applied approach to avoid the physical and chemical instabilities of the molecules.

In the second part, we focused on the evaluation of the protective effect of the protein extract of the alga *Ulva rigida* against the oxidative stress induced by UV-B on glial cell cultures. We have demonstrated for the first time that PE extract protects rat astrocytes in culture against the harmful effects of UV-B radiation, increasing cell viability and decreasing LDH release. The exposure of astrocytes to UV rays induces changes in cell morphology and an increase in cell death as a function of exposure time. This effect was completely canceled with the extract. The latter prevents stress-induced oxidation and alteration of cellular constituents, which is at least in part due to the activation of endogenous antioxidant systems such as SOD and catalase. In addition, the protein extract of the algae also suppresses the oxidative damage of biomolecules by lowering the level of MDA, restores intracellular calcium balance and reduces the H₂O₂ content.

Subsequently, in order to determine the nature of the antioxidant and protective effect on the stressed cells, we were able to determine the involvement of the protein fraction of the ulva extract in this protective action. **In this third part**, the effect of heating, hydrolases and the action of trypsin on the activity of the extract and the ability of the degradation products of the latter to prevent the effect of UVB radiation were evaluated. The results showed that the heat treatment of the protein fraction, the action of hydrolases, and in particular the protease action of trypsin, effectively abolish the biological activity of the algae against UV-B radiation.

This allows us to elucidate the involvement of the algal proteins of the extract on the control of the oxidative metabolism of the cells in culture.

The proteomic investigation made it possible to determine the protein profile of the alga by means of the one-dimensional electrophoresis and an identification of the proteins of the extract by the Label Free method and by means of mass spectrometry (Orbitrap). Several tens of proteins

present were identified from the 4 extracts of the same alga. The results revealed the presence of 3 abundant proteins and common to the 4 extracts of the alga. The main proteins identified from the lyophilized extract are calmodulin and cysteine synthase. They are characterized by the most abundant PSM.

In this last part and in agreement with the first results, other experiments of fractionation of the protein extract according to the molecular weight allowed us to isolate a protein of interest. Indeed, its identification by mass spectrometry has therefore made it possible to propose calmodulin as the main contributor to the origin of these preventive effects.

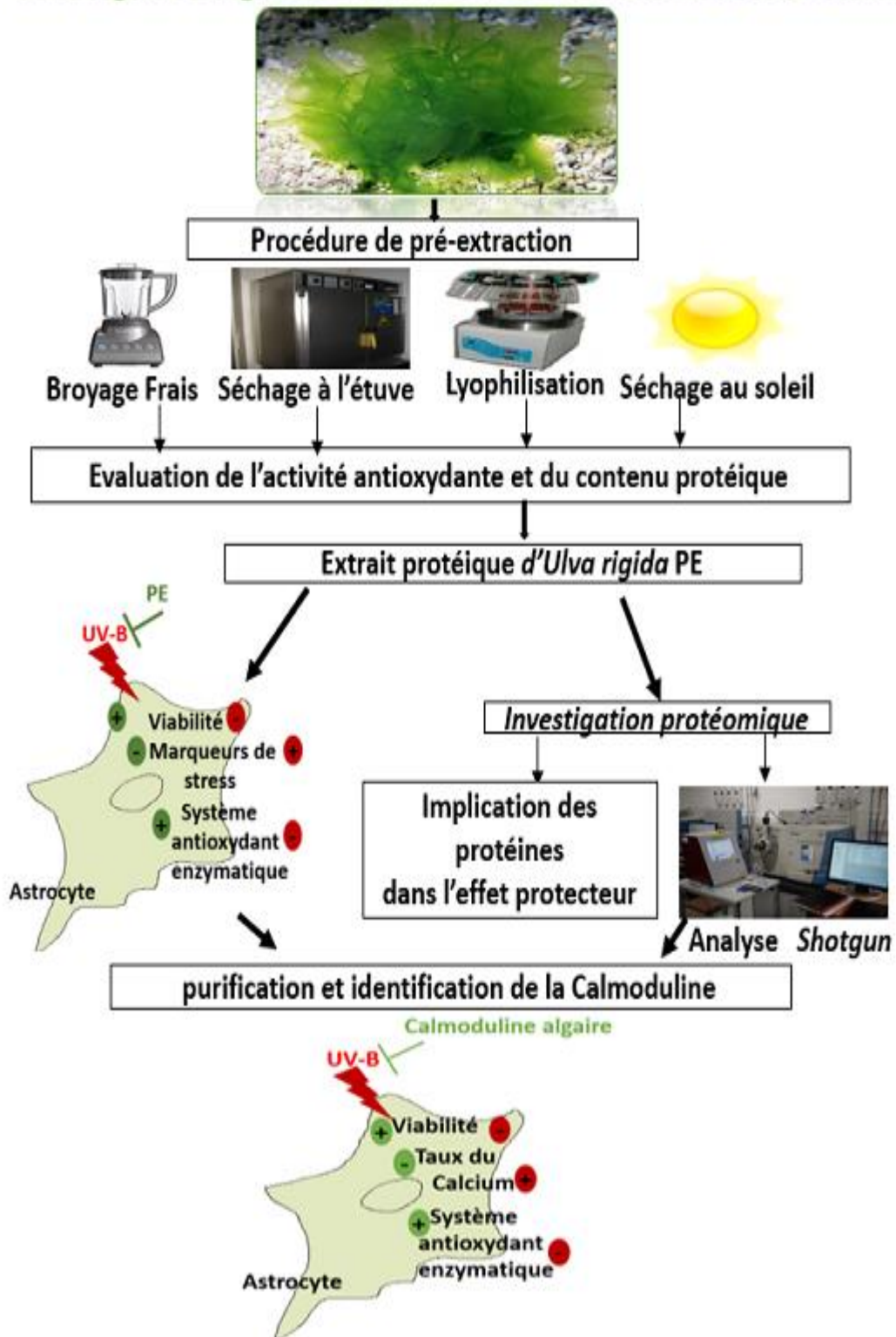
Finally, we confirmed the glioprotective and neuroprotective effects of the identified algal protein and its commercial counterpart and finally the determination of their dose effect.

Since this algal calmodulin can be produced in large quantities, it is a valuable source of protection that will pave the way for future applications.

Key words : *ulva rigida, UV-B rays, Rat cortical astrocytes, cell culture, glioprotection, proteins, calmodulin.*

Résumé graphique

Ulva rigida C Agardh récoltée sur les côtes de Bizerte, Tunisie



Liste des abréviations

2-DE	Electrophorèse bidimensionnelle
AA	Acide aminé
AG	Acide gras
APAF-1	Facteur d'activation de protéase apoptotique 1
Bax	protéine Bcl-2-associated X
Bcl-2	Famille <i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	Bovin Serum Albumin
[Ca²⁺]	Concentration intracellulaire en calcium
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DPPH	Radical diphényl picryl-hydrazyl
DTT	DiThioThréitol
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique
FDA	Fluorosceine de diacétate
GFAP	protéine glio-fibrillaire acide
GPx	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
HO°	Radical hydroxyle
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HEPES	N-2-HydroxyEthylPypérazine-N'-EthaneSulfonique
IEF	Focalisation Isoélectrique
LDH	Lactate déshydrogénase
LC-MS	Chromatographie en phase liquide couplée à la MS/MS
m/z	masse/charge
MALDI-TOF	Matrix-Associated Laser Desorption/Ionisation Time Of Fly
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
NO	Monoxyde d'azote

O₂^{°-}	Radical superoxide
PBS	Phosphate buffered saline, tampon phosphate salin
PC	Protéine commerciale
PE	Ulva rigida protein extract
PP	Protéine purifiée
PSM	Peptide Spectrum Match
ROS	Substances oxygénées réactives
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel electrophoresis
SH	groupements thiols
SOD	Superoxydes dismutases
SVF	Sérum de veau foetal
TBP	TriButyl Phosphine
TCA	Trichloroacetic Acid
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TEMED	N, N, N', N-TetraMéthyle Ethylène Diamine
TFA	Trifluoroacétic Acid
U. rigida	Ulva rigida
UV	Ultra Violet
8-OH-dG	8-hydroxy-2'-déoxyguanosine

Liste des figures

Figure 1. Photographie de l'algue verte <i>Ulva rigida</i>	12
Figure 2. Images microscopiques d' <i>Ulva rigida</i> C.Agardh.	13
Figure 3. Carte représentative de la distribution mondiale de l'algue verte <i>Ulva rigida</i>	14
Figure 4. Figure représentative du cycle de reproduction chez <i>Ulva</i>	15
Figure 5. Figure représentative de la structure du disaccharide principal dans <i>Ulva rigida</i>	20
Figure 6. Figure représentant les formes actives de l'oxygène dans la cellule et le système de défense antioxydant enzymatique.	31
Figure 7. Figure représentant les différents systèmes antioxydants et leur localisation dans la cellule.	33
Figure 8. Figure représentante des conséquences du stress oxydant sur les biomolécules cellulaires.	38
Figure 9. Les différents rayonnements UV et leur impact nocif sur la cellule.....	41
Figure 10. Mécanismes d'action des radiations UVB dans le processus de l'apoptose cellulaire.	43
Figure 11. L'hétérogénéité morphologique des astrocytes : représentation d'un astrocyte protoplasmique et d'un astrocyte fibrillaire.	46
Figure 12. Figure représentative des principales fonctions des astrocytes.....	48
Figure 13. Modulation de la synthèse de la cystéine par le complexe de la cystéine synthase.....	54
Figure 14. Schéma correspondant à la structure de la calmoduline liée aux ions Ca^{2+}	56
Figure 15. Figure récapitulative de quelques protéines de défense au stress selon leur localisation cellulaire.....	61
Figure 16. Principe de l'analyse protéomique.....	66
Figure 17. Différents composants d'un spectromètre de masse de type MS.....	67
Figure 18. Différents composants d'un spectromètre de masse de type Tandem MS/MS.....	68
Figure 19. Récolte de l'algue <i>Ulva Rigida</i> des zones rocheuses.....	78
Figure 20. Observation microscopique de l'algue <i>Ulva rigida</i>	79
Figure 21. Photo du montage du radiomètre et de la lampe réalisé au sein du laboratoire de radiométrie à l'INSAT.....	86
Figure 22. Protocole expérimental utilisé dans l'évaluation de l'effet protecteur de l'extrait sur les cultures d'astrocytes.....	90
Figure 23. Différentes étapes du fractionnement via les filtres centrifuges Microcon. (Merck, Millipore)	96

Figure 24. Protocole de purification des protéines à partir des gels en polyacrylamide.	98
Figure 25. Gel SDS-PAGE à 12% d'acrylamide à partir des extraits protéiques.	106
Figure 26. Evaluation des propriétés antioxydantes des extraits de l'algue à différentes concentrations.....	107
Figure 27. Le pouvoir réducteur des extraits de l'algue <i>Ulva rigida</i> à différentes concentrations.	108
Figure 28. Effet de l'exposition aux rayonnements UV-B sur la survie cellulaire en fonction du temps.	110
Figure 29. Effets des concentrations graduées de PE sur la viabilité des cellules astrocytaires en l'absence (-) ou la présence (+) d'une irradiation UVB.	112
Figure 30. Effets des concentrations graduées de PE sur la cytotoxicité des cellules astrocytaires en l'absence (-) ou la présence (+) d'une irradiation UVB.....	113
Figure 31. Images microscopiques illustrant l'effet de l'extrait protéique d' <i>Ulva</i> sur les changements induits par les UV-B dans la morphologie des astrocytes de rats en culture.	114
Figure 32. L'Effet de PE sur la teneur en H ₂ O ₂ des cellules astrocytaires en l'absence ou la présence de radiations UVB.	115
Figure 33. Effet de PE sur les activités de la catalase et de la SOD dans la culture des astrocytes en l'absence ou en présence de rayonnements UVB.	116
Figure 34. Effet de PE sur la peroxydation des lipides dans la culture des astrocytes en l'absence ou en présence de rayonnements UVB.....	118
Figure 35. Effet de PE sur le dosage du calcium des cellules astrocytaires en l'absence ou présence de rayonnements UVB.	119
Figure 36. Analyse de l'ontologie de 38 protéines identifiées d' <i>Ulva rigida</i>	129
Figure 37. Fractionnement de l'extrait protéique selon le poids moléculaire et évaluation de l'activité protectrice des différentes fractions.	131
Figure 38. Gel SDS-PAGE à 12% d'acrylamide à partir de l'extrait protéique PE.	132
Figure 39. Vérification de la pureté des protéines électro-éluées sur un gel SDS-PAGE.....	132
Figure 40. Test d'activité des deux protéines purifiées.	133
Figure 41. Dosage protéique de la protéine purifiée.	134
Figure 42. Identification de la calmoduline par MALDI-TOF.....	135
Figure 43. L'alignement des séquences de la calmoduline algale identifiée et de la calmoduline Bovine commerciale.....	135
Figure 44. Identification confirmée par western blotting.....	136

Figure 45. Identification de la calmoduline confirmée après immunoprécipitation à partir de l'extrait PE.....	137
Figure 46. Suivi de la viabilité cellulaire dans des cultures astrocytaires en fonction de différentes doses de la calmoduline algale (blanc) et de la calmoduline commerciale (gris).....	137
Figure 47. Evaluation de la cytotoxicité des astrocytes et de la concentration en calcium.....	138
Figure 48. Images microscopiques illustrant l'effet de la calmoduline algale commerciale sur les changements induits par les UV-B dans la morphologie des astrocytes de rats en culture.	139
Figure 49. Effets des concentrations graduées de PP (A) et de PC (B) sur la viabilité des neurones en grain en absence (-) ou en présence (+) d'une irradiation UVB.....	140
Figure 50. Figure comparative de l'effet de l'extrait PE sur la cytotoxicité des levures (blanc) et des astrocytes en culture (noir) en l'absence ou présence de rayonnements UVB.....	150
Figure 51. Prédiction des interactions de la calmoduline avec ses partenaires fonctionnels..	154
Figure 52. Evaluation de l'effet de la calmoduline algale (PP) et commerciale (PC) sur les activités de la catalase et de la SOD des cultures astrocytaires.....	156
Figure 53. Action glioprotectrice de l'extrait protéique PE de l'algue verte <i>Ulva rigida</i> récoltée sur les côtes de Bizerte ainsi que de la calmoduline purifiée de ce même extrait contre les effets délétères des UV-B.....	161

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition en acide amines totaux chez <i>Ulva Rigida</i>	18
Tableau 2. Tableau représentatif des principaux analyseurs de masse	69
Tableau 3. Implication de la protéomique dans l'étude du stress oxydatif appliqué au modèle astrocytaire	73
Tableau 4. Composition du tampon d'extraction des protéines	81
Tableau 5. Composition des gels de concentration et de séparation pour une électrophorèse monodimensionnelle (SDS PAGE).....	82
Tableau 6. Composition du PBS (Phosphate Buffer Saline).....	86
Tableau 7. Composition du tampon de lyse.....	88
Tableau 8. Composition du gel de concentration SDS-PAGE 7%.....	92
Tableau 9. Composition du tampon de migration	93
Tableau 10. Composition de la solution de coloration et de décoloration	93
Tableau 11. Composition du tampon d'électro-élution	97
Tableau 12. Variation de la teneur en protéines du précipité éthanolique de <i>Ulva rigida</i> en fonction du type de traitement.	104
Tableau 13. Variation de la teneur en protéines des extraits protéiques d' <i>Ulva rigida</i> en fonction du type d'extraction et en fonction des tampons.	105
Tableau 14. Suivi de la concentration en protéines de l'extrait PE après hydrolyse à la température et à la trypsine.....	120
Tableau 15. Evaluation de l'effet de l'extrait PE sur la cytotoxicité cellulaire en absence ou présence des irradiations UV-B.....	121
Tableau 16. Evaluation de l'effet des ulvanes d' <i>Ulva armoricana</i> sur la cytotoxicité cellulaire en absence ou présence des irradiations UV-B.....	123
Tableau 17. Evaluation de l'effet de la température, des hydrolases et l'action de la trypsine sur l'activité de l'extrait PE.....	124
Tableau 18. Résumé des protéines identifiées à partir d' <i>Ulva rigida</i> et communes aux quatre extraits traités différemment.....	126
Tableau 19. Résumé des protéines identifiées à partir de l'extrait protéique d' <i>Ulva rigida</i>	127
Tableau 20. Identification de la calmoduline par LTQ Orbitrap.	134

Table des matières

Introduction générale.....	1
Etude Bibliographique.....	5
I- Généralités sur les algues	6
1. Définition et structure d'une algue	6
2. Classification des algues.....	7
2.1. Les algues vertes.....	7
2.2. Les algues rouges	7
2.3. Les algues brunes	8
3. Les algues marines : applications	8
II- <i>Ulva Rigida</i>	11
1. Identification et caractéristiques	11
a- <i>Classification</i>	11
b- <i>Description</i>	12
c- <i>Habitat et Distribution</i>	13
d- <i>Reproduction</i>	14
2. Composition Biochimique	16
2.1. <i>Les protéines et aminoacides</i>	16
2.2. Les lipides et acide gras.....	18
2.3. Les polysaccharides et fibres alimentaires	19
2.4. Les vitamines et les minéraux.....	21
2.5. Les pigments et les composés phénoliques	22
2.6. L'eau	23
2.7. La cendre	23
3. Applications et effets biologiques.....	24
3.1. Utilisation alimentaire	24
3.2. Utilisation thérapeutique.....	25
a- <i>Activité anti-hyperglycémiant</i> e	25
b- <i>Antigenotoxicité in vivo et in vitro</i>	25
c- <i>Activité antimicrobienne et antifongique</i>	26
d- <i>Activité immunomodulatrice</i>	26
e- <i>Activités préventives anti-obésité, anti-athérosclérose et anti-hypercholestérolémie</i>	27
f- <i>Activités antioxydante et anticytotoxique</i>	27
3.3. Possibilité de nanofibres	28
3.4. Production de biocarburants	28
3.5. Autres utilisations	29

III-	Le stress oxydatif.....	29
1.	Définitions.....	29
2.	Les oxydants et leur origine.....	30
3.	Les antioxydants.....	32
3.1.	Le système à enzymes	33
a-	<i>La superoxyde dismutase (SOD, EC : 1.15.1.1)</i>	33
b-	<i>La catalase (CAT, EC 1.11.1.6)</i>	34
c-	<i>La glutathion peroxydase (GPx, CE 1.11.1.9)</i>	35
3.2.	Les antioxydants non enzymatiques	36
a-	<i>Les piègeurs de radicaux libres : antioxydants</i>	36
b-	<i>Les substances régénérantes</i>	37
4.	Conséquences du stress oxydant.....	37
4.1.	Conséquences sur les lipides et les acides gras	38
4.2.	Conséquences sur la mitochondrie et Apoptose.....	39
4.3.	Oxydation des protéines	39
4.4.	Dénaturation de l'ADN	40
5.	Les radiations UV-B.....	40
IV-	Les astrocytes	44
1.	Caractéristiques morphologiques et anatomiques des astrocytes	45
2.	Les fonctions astrocytaires	46
2.1.	La microarchitecture du système nerveux central	46
2.2.	Contrôle de l'homéostasie ionique et métabolique	47
2.3.	Contrôle de la synaptogenèse et maintien des synapses.....	49
2.4.	L'angiogenèse, l'induction de la barrière hémato-encéphalique et leur maintien	49
2.5.	Gliotransmission et modulation de la neurotransmission.....	50
3.	Astrocytes et pathologies.....	51
V-	Protection cellulaire : système à protéines	52
1.	La cystéine synthase	52
2.	La calmoduline	55
3.	L'actine	58
4.	Les HSP.....	59
5.	Rôle des peptides et des acides aminés dans la protection cellulaire	62
VI-	La protéomique.....	63
1.	Différentes méthodologies de la protéomique	64
2.	La spectrométrie de masse.....	66
3.	Implication de la protéomique dans l'étude du stress oxydatif	71
	Objectifs du travail.....	75

Matériel et méthodes	77
I- Optimisation de l'extraction et évaluation de l'activité antioxydante	78
1. Récolte de l'algue	78
2. Identification de l'algue	78
3. Préparation des extraits.....	79
3.1. Méthode de lyophilisation	79
3.2. Méthode de séchage à l'étuve	79
3.3. Méthode de séchage au soleil	79
3.4. Méthodes d'extraction	80
3.4.1. Précipitation des protéines à l'éthanol absolu.....	80
3.4.2. Précipitation des protéines au sulfate d'ammonium	80
3.4.3. Précipitation des protéines au DOC/TCA.....	81
4. Détermination de la quantité en protéines et de leur profil électrophorétique	81
4.1. Détermination de la quantité totale en protéines	81
4.2. Détermination du profil protéique par électrophorèse.....	81
4.2.1. Electrophorèse monodimensionnelle	81
4.2.2. Révélation au nitrate d'argent	82
5. Détermination de l'activité anti-oxydante.....	83
5.1. La capacité de neutralisation des radicaux libres (DPPH scavaging assay)	83
5.2. Dosage du pouvoir réducteur	83
II- Evaluation de l'effet protecteur de l'extrait sur les cultures d'astrocytes.....	84
1. Conditions d'utilisation des animaux.....	84
2. Culture cellulaire d'astrocytes corticales de rat	84
3. Irradiation	85
4. Test de survie	86
5. Test de Lactate déshydrogénase (LDH).....	87
6. Mesure des marqueurs du stress oxydatif	87
6.1. Récupération des protéines intracellulaires.....	87
6.2. Dosage des activités enzymatiques antioxydantes	88
6.3. Dosage de la peroxydation lipidique.....	88
6.4. Dosage du peroxyde d'hydrogène	89
6.5. Mesure du taux de calcium	89
III- Evaluation de l'implication de la fraction protéique de l'extrait dans la protection cellulaire et investigation protéomique	90
A- Evaluation de l'implication de la fraction protéique de l'extrait dans la protection cellulaire	90
1. Dénaturation de l'extrait	90
1. 1. Traitement thermique.....	91

1.2. Digestion aux Hydrolases	91
1.3. Digestion par la protéase	91
B- Analyse Protéomique	92
1. La méthode Label Free	92
1.1. Concentration des protéines sur gel SDS-PAGE et coloration au bleu de coomassie	92
1.2. Préparation des échantillons à la spectrométrie de masse	93
1.3. Etape de la LC-MS/MS	94
.....	94
IV- Purification et identification.....	95
1. Electrophorèse monodimensionnelle	95
2. Fractionnement de l'extrait selon le poids moléculaire.....	95
3. Détermination des bandes actives.....	96
3.1. Electroélution des protéines	96
3.2. Dialyse et Vérification de la pureté par SDS PAGE	97
3.3 Test d'activité	97
4. Dosage de la concentration en protéines dans l'éluat.....	98
5. Identification de la protéine par spectrométrie de masse	99
6. Aligement de la protéine identifiée avec la commerciale.....	99
7. Vérification de l'identité de la protéine	99
7.1. Western blot.....	99
7.2. Immuno-précipitation	100
8. Application sur des cultures d'astrocytes.....	100
9. Evaluation de l'effet neuroprotecteur sur une culture des neurones en grain	101
Analyse statistique.....	102
Résultats.....	103
Chapitre I: Optimisation de l'extraction et évaluation de l'activité antioxydante	104
1. Détermination de la teneur totale en protéines.....	104
1.1. Différents types de traitement de l'algue et dosage des protéines.....	104
1.2. Différentes techniques d'extraction	105
1.2.1. Détermination de la concentration protéique selon le type d'extraction.....	105
1.2.2. Détermination du profil protéique par électrophorèse monodimensionnelle	106
2. Determinacion de l'activité antioxydante	106
2.1. Capacité de piégeage du radical DPPH•	106
2.2. Pouvoir réducteur des extraits.....	107
Chapitre II: Evaluation de l'effet glioprotecteur de l'extrait protéique d'Ulva rigida PE contre la mort cellulaire induite par les rayonnements UV-B.....	110
1. Effet des rayonnements UV-B sur la survie cellulaire	110
2. Effet de l'extrait protéique d'ulva PE sur la survie astrocytaire.....	111

3. Effet de l'extrait protéique d'ulva sur la cytotoxicité des astrocytes.....	112
4. Effet de PE sur la morphologie des astrocytes en culture	114
5. Effet de l'extrait protéique d'ulva sur la capacité d'élimination du peroxyde d'hydrogène..	115
6. Effet de l'extrait protéique d'ulva sur les activités des enzymes antioxydantes.....	116
7. Effet de l'extrait protéique d'ulva sur la peroxydation lipidique	117
8. Effet de l'extrait protéique d'ulva sur le taux de libération du calcium	118
Chapitre III : Evaluation de l'implication de la fraction protéique dans la protection cellulaire	120
A- Validation de l'implication de la fraction protéique dans l'effet protecteur observé	120
1. Effet de PE sur les cellules de levure	120
2. Dénaturation de l'extrait PE	121
B- Investigation Protéomique	125
1. La méthode shot gun	125
Chapitre IV: Purification d'une calmoduline et étude de son effet cellulaire	130
1. Fractionnement de l'extrait selon le poids moléculaire.....	130
2. Identification de la calmoduline comme un important contributeur à l'activité de protection	131
2.1. Détermination d'une bande active.....	131
2.2. Dosage de la concentration protéique sur gel	133
2.3. Identification par spectrométrie de masse	134
2.4. Alignement avec la protéine commerciale	135
2.5. Vérification de l'identité de la protéine	136
3. Evaluation de l'effet de la calmoduline alguaire et commerciale sur des cultures astrocytaires	137
3.1. L'effet des protéines sur la survie cellulaire	137
3.2. L'effet des protéines sur la cytotoxicité cellulaire et le niveau du calcium	138
3.3. Effet des protéines sur la morphologie des cellules	139
4. Evaluation de l'effet de la calmoduline alguaire et commerciale sur des neurones en grain...	140
Discussion.....	142
1. Optimisation de l'extraction et implication dans l'activité antiradicalaire	143
2. Effet glioprotecteur de l'extrait PE	146
3. Validation de l'effet protecteur des protéines	150
3.1. Effet de PE sur les cellules de <i>Saccharomyces Cerevisae</i>	150
3.2. Effet de la digestion de l'extrait sur la protection cellulaire.....	151
3.3. Investigation protéomique	153
4. Identification de la calmoduline comme principal acteur de l'extrait protéique	155
Conclusion générale Et Perspectives.....	159
Références Bibliographiques.....	164
Annexes	183

Introduction générale

Les recherches traitant du stress oxydatif ont largement été développées depuis plusieurs années à des fins cliniques étant donné son rôle prépondérant dans le développement des pathologies, en particulier les maladies neurodégénératives et les troubles cardio-vasculaires, ainsi que dans le diabète et les cancers (Agarwal A. 2003). Une exposition prolongée au rayonnement UV induit un stress cellulaire, impliqué dans le développement du cancer de la peau, le vieillissement prématuré de la peau ou les cataractes (Plaza M. 2008).

D'autres facteurs, tels que les produits chimiques, l'alcool, le tabac, ont également été présentés pour promouvoir la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), impliqués dans la mort cellulaire par apoptose. Pour expliquer cela, le stress oxydatif perturbe l'équilibre physiologique, et conduit à la production excessive des ROS, notamment l'anion superoxyde [$O_2^{\bullet-}$], le radical hydroxyle [OH^{\bullet}], l'oxygène singulet [O_2^{\bullet}] et le peroxyde d'hydrogène [H_2O_2], qui participent à l'oxydation des composants cellulaires tels que les lipides, les protéines et l'ADN conduisant à leur altération (Valko M. 2007) (Davies K.J. 2000). Plusieurs recherches ont consolidé ces données parmi lesquelles l'analyse post-mortem de cerveaux de patients atteints de maladies neurodégénératives qui révèle une augmentation de l'oxydation de ces composants, essentiellement au niveau des zones endommagées. (Hamdi Damak Y.2013)

Ces données s'accompagnent aussi d'une baisse au niveau de l'expression et de l'activité des enzymes antioxydantes (superoxydes dismutases, catalase et glutathion peroxydases) reconnues comme étant les défenses endogènes enzymatiques, et également d'une baisse au niveau des défenses non enzymatiques tel que le glutathion (GSH). Pour faire face à ces situations, les cellules, entre autres les astrocytes, produisent ces défenses endogènes non enzymatiques et enzymatiques (Sheih I.C. 2009), afin de neutraliser et/ou de moduler la production des ROS.

Les astrocytes, étant la population la plus abondante des cellules gliales, sont connus pour être impliqués dans plusieurs rôles dont l'histogénèse du SNC, la régulation de l'homéostasie du SNC et la communication intercellulaire. Ces astrocytes sont également connus pour leur rôle de soutien trophique aux neurones et leur participation à la protection et la défense contre le stress oxydatif, ainsi que la mort cellulaire. (Valko M. 2007) Ceci s'effectue grâce aux changements importants morphologiques et phénotypiques que ces cellules gliales sont capables d'établir (le processus d'astroglie) et aux niveaux élevés de molécules scavenger des ROS, telles que les vitamines E, C et les enzymes antioxydantes telles que les Mn- Cu et Zn superoxydes dismutases, présentes dans ces cellules astrogliales (Lotharius J. 2005) (Resende R. 2008). Des études faites récemment dans notre laboratoire prouvent l'implication des astrocytes dans la promotion de la survie neuronale contre un stress oxydatif induit suite au traitement des

neurones en grain du cervelet par un milieu conditionné d'astrocytes. C'est pour cette raison que les astrocytes protecteurs pourraient représenter une alternative pour éviter des lésions neuronales et pour maintenir l'équilibre antioxydant dans le cerveau.

En dépit du fait que les astrocytes sont connus par leur nature plus résistante aux dommages oxydatifs que les neurones (Chen Y. 2001), un stress cellulaire intense peut modifier à la fois leur fonctionnalité et leur viabilité et induire l'apoptose (Lu M. 2008), ce qui provoque des lésions cérébrales graves (ischémie, maladies neurogénéralives...). En outre, une exposition prolongée à l'irradiation UVB se traduit par une diminution de la viabilité cellulaire et cet effet néfaste est associé à l'accumulation des anions superoxide, l'hyperpolarisation du potentiel de la membrane mitochondriale, la suppression de la respiration mitochondriale, la libération du cyto-c, et à l'activation des caspases 9 et 8 engageant ainsi les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose (Jing L. 2015).

Par ailleurs, avec les niveaux croissants de l'appauvrissement de la couche d'ozone atmosphérique, au cours des deux dernières décennies, les niveaux de rayonnement ultraviolet (Valente I.M.P.), atteignant la surface de la Terre, augmentent d'un taux de 1,5% pour chaque perte de 1% de la couche d'ozone sans compter le développement des sources UV artificielles. (De Oliveira Miguel N. C. 2003; Korać Radava R. 2011) Tout ceci contribue à l'augmentation du stress lié aux UV auquel de nombreux organismes doivent faire face.

Réduire la production excessive des ROS et protéger les organismes contre les dommages oxydatifs du stress est ainsi devenu un objectif primordial de recherche pour maintenir l'équilibre de l'état oxydatif, la santé et le bien-être des humains et des animaux.

Dans ce domaine, un grand intérêt est porté aux produits naturels obtenus à partir d'organismes marins, et en particulier les algues. Fait intéressant : les composés bioactifs d'algues peuvent agir comme des alternatives aux molécules médicamenteuses, disposant d'un grand avantage par rapport aux médicaments classiques avec une biodisponibilité élevée et souvent une meilleure spécificité (Samarakoon K. 2012). Récemment, plusieurs composés d'algues, y compris les polyphénols, les polysaccharides et les protéines, ont été présentés comme des antioxydants puissants qui protègent les cellules contre les radicaux libres et retardent la progression de nombreuses maladies chroniques (Yildiz G. 2012). Parmi ces algues, l'activité antioxydante d'*Ulva rigida*, une algue appartenant au genre *Ulva* et riche en éléments nutritifs, a été rapportée et en particulier son précipité éthanolique présentant un niveau élevé de composés bioactifs (par exemple, les polysaccharides et les protéines) (Mezghani S. 2013a) qui protègent les cellules

HeLa en bloquant la mort cellulaire par voie apoptotique engendrée par l'agent toxique le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Mezghani S. 2015).

Par ailleurs, les études in vivo ont montré que l'administration orale de l'extrait éthanolique d'*Ulva rigida* a amélioré le statut anti-oxydant chez des modèles animaux d'athérosclérose (Godard M. 2009b), et a protégé contre les dommages de l'ADN associés au diabète (Celikler S. 2009b).

D'autres activités relatives à cette algue ont été répertoriées dans la bibliographie.

Sa large distribution mondiale et ses nombreuses applications font d'*Ulva rigida* une algue modèle. De plus, l'espèce *Ulva* présente un fort potentiel biotechnologique lié à une productivité élevée de sa biomasse avec des coûts réduits lorsqu'elle est cultivée dans un système d'aquaculture multi-trophique intégrée (Guerrero S. 2012; Winberg P.C. 2009).

Ainsi, le projet de ce présent travail consiste à évaluer un éventuel effet glioprotecteur d'un extrait d'*Ulva rigida* contre les UV-B induisant la mort cellulaire dans les cellules astrogliales de rat puis à caractériser la ou les fractions mises en jeu dans cet effet observé.

Au cours de ce travail, plusieurs paramètres liés au stress oxydatif ont été étudiés, par exemple, les enzymes antioxydantes, la peroxydation des lipides, la production du H₂O₂ et le taux du calcium intracellulaire. Différentes expériences ont suggéré que la fraction protéique est fortement impliquée dans cet effet protecteur. Nous avons, par conséquent effectué une analyse protéomique sur l'extrait et identifié la calmoduline qui pourrait être impliqué en majeure partie dans cette glioprotection. L'application de cette protéine à activité biologique a été réalisée sur des cultures d'astrocytes corticaux ainsi que sur des cellules de neurones en grain afin de valider son implication dans cet effet protecteur à intérêt thérapeutique important.

Etude Bibliographique

I- Généralités sur les algues

1. Définition et structure d'une algue

Les côtes marines ainsi que les océans possèdent les plus grandes richesses sur cette terre parmi lesquelles les algues. Ces entités constituent exclusivement la masse végétale des eaux marines. Elles sont définies comme étant des organismes photosynthétiques simples, typiquement autotrophes, pluri ou unicellulaires et sont considérées comme source de vie dans l'océan puisqu'elles y produisent l'oxygène. Elles sont considérées parmi les organismes végétaux les plus anciens sur ce monde.(Cabioc'H J. 1992)

Elles peuvent se développer dans l'eau ou dans des milieux très humides. En effet, elles habitent tous les écosystèmes aquatiques, tels que des océans, des lacs, des rivières et même des glaciers, ainsi que des systèmes terrestres y compris les roches et autres surfaces dures.(Floc'h J. Y. 2010)

Pour survivre et se développer les algues ont besoin de lumière afin de réaliser la photosynthèse, d'eau pour leur nutrition ainsi que leur reproduction sexuée, d'éléments nutritifs, du dioxyde de carbone, de l'azote, du phosphate ainsi que du fer. (Raven P. H. 2007)

Une cellule algale est composée par une paroi partiellement cellulosique, un petit noyau et des plastes pigmentés qui confèrent au thalle de l'algue sa couleur rouge, brune, verte ou bleue.(Garon-Lardiere S. 2004)

Les algues sont caractérisées par leur thalle, qui est un appareil végétatif uni- ou pluricellulaire, ne possédant ni racine, ni tige et ni feuille. Ces thalles présentent une taille variable de moins d'un micromètre comme pour l'algue bleue *Prochlorococcus* à plusieurs dizaines de mètres dans le cas des *Macrocystis*. On distingue donc les macros et les micros algues. (Floc'h J. Y. 2010; Garon-Lardiere S. 2004)

Les macroalgues sont au nombre de 25 000 espèces dont seulement 50 sont exploitées à ce jour. Elles possèdent généralement un appareil végétatif clairement distinguable à l'œil nu et sont fixées sur un substrat rocheux à travers des crampons qui sont souvent recouverts de sécrétions riches en polysaccharides, Ces macroalgues peuvent, elles-même, constituer un substrat pour de nombreuses communautés animales. La partie foliacée du thalle des macroalgues appelée fronde peut être sous forme de filaments, cordons ou lanières.(Floc'h J. Y. 2010) (Faller H. 2011)

Par opposition aux macroalgues, les microalgues sont microscopiques. Sous ce terme on peut regrouper des organismes variés à savoir des procaryotes ou des cyanobactéries et des eucaryotes.

Les microalgues vivent dans des milieux fortement aqueux, la plupart d'entre elles peuvent posséder un ou plusieurs flagelles lui conférant ainsi une mobilité flagellaire., Elles peuvent aussi former une fine pellicule gluante ou biofilm, constitué par des algues, des sécrétions adhésives et des microorganismes.(Reinjenders M. 2014) (Faller H. 2011)

2. Classification des algues

Les algues sont très diversifiées et constituent un ensemble hétérogène dans la mesure où elles n'appartiennent pas toutes à une même voie d'évolution mais à des groupes phylogénétiques très différents. (Cabioc'H J. 1992)

Cette diversification est illustrée par les variations importantes dans leurs physiologie et métabolisme, reflet d'une grande diversité génétique. (Floc'h J. Y. 2010)

De ce fait, on distingue les organismes eucaryotes uni- ou pluricellulaires avec une pigmentation rouge relative aux algues rouges, une pigmentation jaune relative aux algues brunes, les algues vertes à pigmentation verte et les organismes procaryotes à savoir les bactéries bleues ou cyanobactéries communément appelées algues bleues.

Seulement 3 types de pigments donnent aux algues leurs couleurs : les chlorophylles, les caroténoïdes et les phycobiliprotéines.(Floc'h J. Y. 2010; Garon-Lardiere S. 2004)

2.1. Les algues vertes

Les algues vertes ou ulvophytes sont un ensemble d'algues dont les pigments essentiels à la photosynthèse sont les chlorophylles a et b. Les plastes de ces algues sont colorés en vert par ces pigments, auxquels des caroténoïdes sont quelquefois associés. Elles regroupent des organismes variés n'appartenant pas à un même groupe évolutif. Elles sont présentes en majorité dans les eaux douces et dans les mers et les océans cependant quelques espèces peuvent être retrouvées sur terre. Les algues vertes sont très riches en calcium et en protéines, possèdent un pouvoir nutritionnel élevé en plus de la présence de vitamines et d'antioxydants. Elles possèdent aussi un pouvoir gélifiant important.(Garon-Lardiere S. 2004; Laplace C. 2015)

Toutefois, tous les végétaux aquatiques de couleur verte ne doivent obligatoirement pas être catalogués comme des algues vertes.

2.2. Les algues rouges

Appelées aussi Rhodophytes, les algues rouges représentent un taxon très varié. Elles sont généralement pluricellulaires et sont retrouvées en milieu marin.

Ces algues sont colorées en rouge du fait de la présence dans leurs plastes d'un pigment appelé la phycoérythrine. Ce pigment s'associe à d'autres pigments comme la chlorophylle a « le centre réactionnel de la photosynthèse », la phycocyanine et l'allophycocyanine. (Cabioc'H J. 1992; Perez R. 1997)

La pigmentation est aussi fonction de la longueur d'onde de la lumière absorbée par l'algue. Ainsi, l'abondance des algues rouges en profondeur est expliquée par la capacité de la phycoérythrine à absorber la lumière à cette profondeur. Ces algues sont riches en substances gélifiantes telles que les carraghénanes largement utilisés dans l'industrie.(Floc'h J. Y. 2010)

2.3. Les algues brunes

Elles sont aussi nommées *Phaeophyceae* ou Phéophycées. Il existe 1500 espèces différentes d'algues brunes; ce sont les algues marines les plus abondantes. On les retrouve surtout au niveau des côtes rocheuses à faible profondeur.

Elles possèdent toutes une structure pluricellulaire et leur couleur jaunâtre à brune est due à l'abondance de la xanthophylle et de la fucoxanthine, qui dominent les autres pigments comme la chlorophylle a et c. Elles sont riches en alginates et en phlorotannins à propriétés antioxydantes.(Garon-Lardiere S. 2004; Wijesinghe W.A.J.P. 2011)

3. Les algues marines : applications

Qu'elles soient rouges brunes ou vertes, les algues marines comptent, de nos jours, près de 30000 espèces différentes, correspondant à 18% du règne végétal connu. (Faller H. 2011; Garon-Lardiere S. 2004)

Compte tenu de toute cette richesse et de toute cette diversité, de nombreuses applications ont été trouvées aux algues à travers les siècles. A l'heure actuelle, on ne cesse d'identifier de nouvelles espèces et de nouvelles propriétés à ces organismes, ce qui leur confère un potentiel biotechnologique important.

On porte de plus en plus d'intérêt aux algues, du fait de la facilité de leur culture (elles croissent même dans les eaux usées), et de leur récolte rapide. De plus, les algues se développent 100 fois plus rapidement que les végétaux supérieurs.(Lu Y. 2009)

Outre ces vastes domaines d'application, les algues constituent aussi notre principale source d'oxygène (90% de la production sur terre) grâce à leur activité photosynthétique élevée.(Garon-Lardiere S. 2004)

Longtemps les algues marines ont été également utilisées comme source d'alimentation par de nombreuses populations notamment les asiatiques qui sont encore les premiers consommateurs d'algues ; chaque japonais consomme ainsi en moyenne 1,6 kg d'algues (poids sec) par an.(Fleurence F. 1999) Cette consommation semble prendre de plus en plus d'ampleur dans les pays occidentaux en raison de leur intérêt nutritionnel ; elles sont riches en fibres, protéines et minéraux.(Chouikhi A. 2013) Les fibres incluent les agars-agars, les carraghénanes, les ulvanes, les alginates et les xylanes, ... qui possèdent des propriétés prébiotiques et texturantes utilisées largement dans l'industrie agro-alimentaire.(Chouikhi A. 2013; Michel C. 1999)

Les minéraux sont essentiellement le calcium, le magnésium, le sélénium et l'iode. Les algues ont la propriété de concentrer dans leurs cellules ces éléments, ce qui suscite l'intérêt des industries travaillant dans le domaine de la diététique et de la cosmétique.(Garon-Lardiere S. 2004)

Le taux en protéines varie selon l'espèce, son stade physiologique et selon les variations saisonnières. Elles peuvent atteindre jusqu'à 50% du poids de la matière sèche chez les algues les plus nutritives, notamment les algues rouges. Les algues vertes ont des teneurs en protéines allant jusqu'à 26% et sont utilisées (comme les ulves) dans l'alimentation des poissons en aquaculture. Les teneurs protéiques des algues brunes sont par contre faibles variant entre 8 et 15 % du poids sec.(Faller H. 2011; Fleurence J. 2010; Fleurence F. 1999)

Par ailleurs, les algues sont largement reconnues comme source de métabolites à intérêt pharmacologique et thérapeutique, car elles renferment des molécules actives à propriétés antioxydantes, anti-cancéreuses, anti-âge, cytoprotectrices, immunomodulatrices, anti-inflammatoires, anticoagulantes, antibactériennes, antidiabétiques, antifongiques, antipaludiques, antiplaquettaires, anti-protazoaires, antituberculeuses et antivirales. (Chouikhi A. 2013; Taboada M. C. 2012)

Ces différentes activités sont dues à la présence de composés phénoliques, de caroténoïdes, de tanins, d'acide alginique, de polysaccharides sulfatés, de vitamines, d'acides gras polyinsaturés, de fucoxanthines, d'alcaloïdes, de phycobiliprotéines,

Plusieurs études ont été réalisées in vitro et in vivo pour montrer ces activités comme l'effet des fucoxanthines (famille des caroténoïdes) extraites des algues brunes telle que l'*Undaria pinnatifida*, *Laminaria japonica*, *Laminaria religiosa* et *Petalonia binghamiae*.(Harper M.K. 2001) Ces dernières ont démontré un pouvoir antioxydant et anti-cancéreux, inhibant des cellules de neuroblastome et des cellules cancéreuses du côlon. (Funahashi H. 2001)

Les algues rouges telle que *Kappaphycus striatum*, *Chondrus crispus*, *Gigartina pistillata* sont riches en carraghénanes qui en plus d'être des antigènes forts, présentent une activité antivirale contre la grippe B, le virus des oreillons, l'herpès Simplex, le VIH et différents vecteurs de MST. Ces carraghénanes, qui sont des polysaccharides sulfatés, présentent également des propriétés anticoagulantes, antitumorales et immunomodulatrices. (Faller H. 2011; Yasuhara B. L. 2010)

Parmi les propriétés des chlorophycées, on citera une activité antimicrobienne et antifongique chez *Caulerpa racemosa* et *Ulva lactuca*. Ces dernières inhibent la croissance des bactéries Gram négatif *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* et *Enterobacter aerogenes* et de la bactérie Gram positif *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*. (Chouikhi A. 2013; Villarreal-Gomez L.J. 2010)

L'une des applications récentes des algues vertes est leur utilisation comme système d'expression de protéines recombinantes à but thérapeutique.

Parmi celles-ci, on trouve notamment le système model *Chlamydomonas reinhardtii* et l'algue verte *Dunaliella salina*. (Lu Y. 2009)

Dans le domaine de la cosmétique, les algues sont largement utilisées pour leurs propriétés texturantes en particulier les carraghénanes.

Les algues sont aussi susceptibles d'être utilisées en tant que principe actif pour des gels tonifiants et gommants, des crèmes antirides de massage, ou de protection solaire. où Les molécules algaires actives sont alors l'acide alginique, les phlorotannins, les fucoïdanes et les fucoxanthines. (Faller H. 2011; Perez R. 1997)

L'exploitation industrielle des algues s'étend aussi à l'alimentation animale car elles sont riches en oligo-éléments. Ainsi, les macroalgues stimulent la production laitière, le système immunitaire et améliorent la texture de la nourriture des poissons en aquaculture. (Chouikhi A. 2013)

En agriculture, les macroalgues brunes et vertes sont utilisées en tant qu'engrais naturel organique afin d'augmenter la croissance des plantes, améliorer le rendement, et augmenter la résistance au stress grâce à leur propriétés antioxydantes. Elles sont également employées pour conditionner le sol en lui assurant une meilleure porosité et de ce fait une meilleure rétention d'eau. Elles permettent, en outre, une meilleure conservation des semences grâce aux fortes concentrations en agar qui a la propriété de les enrober et de les protéger des bactéries et des champignons. (Chouikhi A. 2013; Floc'h J. Y. 2010; Perez R. 1997)

La production des hydrocarbures par les micro-algues a également sollicité énormément d'intérêt au cours des dernières années. Les termes algorithme « Biorefinery of microalgae biomass » désignent des productions renouvelables et durables de la biomasse entre autres les hydrocarbures et biocarburants. (innovante 2012)

Généralement, les microalgues présentant une forte teneur en lipides et un temps de doublement rapide, sont les plus employées ; en effet les triacylglycérides et les acides gras constituent la source des biocarburants. Il existe des algues capables de produire plus de 80% de leur poids sec en acide gras. Avec un taux de croissance élevé, les algues produisent des huiles naturelles semblables au pétrole brut traditionnel au niveau moléculaire. Ces huiles sont ensuite transformées en essence, gazole et kérosène. Cependant, à nos jours ces biotechnologies ne sauraient concurrencer le pétrole traditionnel.(Reinjenders M. 2014) (Faller H. 2011)

Si l'utilisation des algues marines s'est énormément développée et touche aujourd'hui tous les domaines, elles sont aussi une source potentielle de toxicité et de nuisance pour la faune et la flore. En effet, alors que les macro-algues ne présentent que peu de danger pour l'homme, les micro-algues, sont toxiques et sont responsables de troubles gastro-intestinaux et/ou neurologiques du fait de la présence de toxines telles que l'acide okadaïque, les saxitoxines et les ichtyotoxines.(Faller H. 2011)

II- *Ulva Rigida*

Le genre *Ulva*, appelée aussi laitue de mer, a été sélectionné «Algue de l'Année 2015» selon l'Institut de chimie inorganique et analytique en Allemagne. Ce sont des algues vertes trouvées dans les océans du monde entier. Elles peuvent se présenter sous forme de rubans ou tubulaires, et peuvent atteindre une taille de 20 à 30 cm.(Wichard T. 2015)

1. Identification et caractéristiques

a- *Classification*

Le nom complet est *Ulva rigida* C.Agardh, 1823. C'est une algue verte faisant partie avec d'autres espèces du genre *Ulva*, lui-même appartenant à la famille des *Ulvaceae*, l'ordre des *Ulvales*, la classe des *Ulvophyceae* incluse dans la division *Chlorophyta*.(Botany 2001)

b- Description

Elle se distingue par un thalle très mince (moins d'un dixième de millimètre d'épaisseur), en forme de feuille, de couleur vert émeraude et translucide qui peut virer à la transparence en cas de stress. Ce thalle, présentant un stipe très court, est rigide à la base et plus délicat à proximité des bords de croissance. Ce stipe, appelé aussi crampon par lequel l'algue se fixe à son support, est constitué par de petits rhizoïdes rigides. (Botany 2001; mediterraneo 2015; SmithsonianTropical research institute 2009)

Ulva Rigida peut se retrouver sous forme de touffes ou le plus souvent de lames solitaires. Ces dernières peuvent être plates ou ébouriffées avec de petites dents microscopiques sur les bords. Ce sont ces bords crénelés qui la distingue de l'espèce *Ulva lactuca*.(Botany 2001)

Elles peuvent également être ou non perforées. Leur taille est variable, en moyenne de 30 à 40 cm, et peut même atteindre 1 mètre si elles se trouvent dans des zones eutrophisées.



Figure 1. Photographie de l'algue verte *Ulva rigida*.

(1076 × 861) (mediterraneo 2015)

Sur le plan microscopique, les lames sont composées de deux cellules d'épaisseur ; les deux couches peuvent être séparées facilement en couches de cellules simples ce qui les distingue de l'espèce similaire *U. fasciata*. Cette dernière ne présente que peu ou pas de rhizoïdes, à, cellules plus grandes, et ne se sépare pas facilement en deux couches de cellules.(Botany 2001)

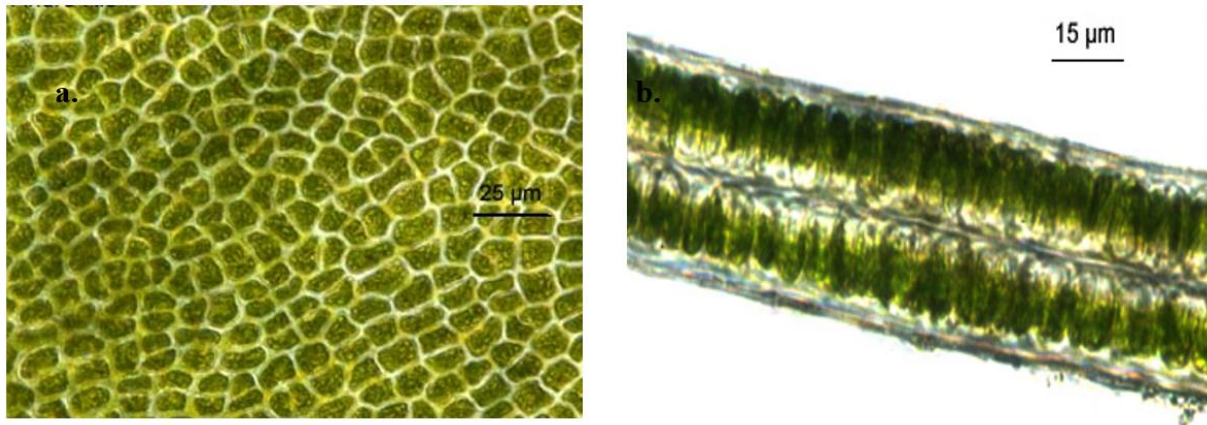


Figure 2. Images microscopiques d'*Ulva rigida* C.Agardh.

(Le goff T.)

- a. Aspect microscopique général des cellules rectangulaires étroitement disposées.
- b. Coupe transversale montrant une lame constituée de 2 couches de cellules superposées.

Au niveau des marges dentelées, chaque dent est constituée de 3 à 7 cellules, de forme arrondie et de diamètre approximatif 25µm. En vue de surface, les cellules sont plutôt sous forme carrée à rectangulaire, étroitement plaquées d'une manière ordonnée ou aléatoire et dont le diamètre varie entre 20 et 36 µm. (SmithsonianTropical research institute 2009)

c- *Habitat et Distribution*

Ulva rigida est généralement fixée sur des roches dans des zones intertidale et sublittorale. Elle est retrouvée également en abondance dans les zones abritées et peu profondes, des endroits bien illuminés tels que les lagunes saumâtres et les ports. Elle se développe aussi dans les zones enrichies en eau douce et de ruissellement riches en éléments nutritifs même polluées. En effet, c'est une algue très résistante à l'eutrophisation. (Botany 2001; Lami R. 2008; mediterraneo 2015)

Sa distribution est commune et elle est largement présente dans le monde comme le montre la carte suivante. (SmithsonianTropical research institute 2009)

Au niveau de la mer Méditerranée *U. Rigida* est la plus répandue des espèces du genre *Ulva*. (mediterraneo 2015)

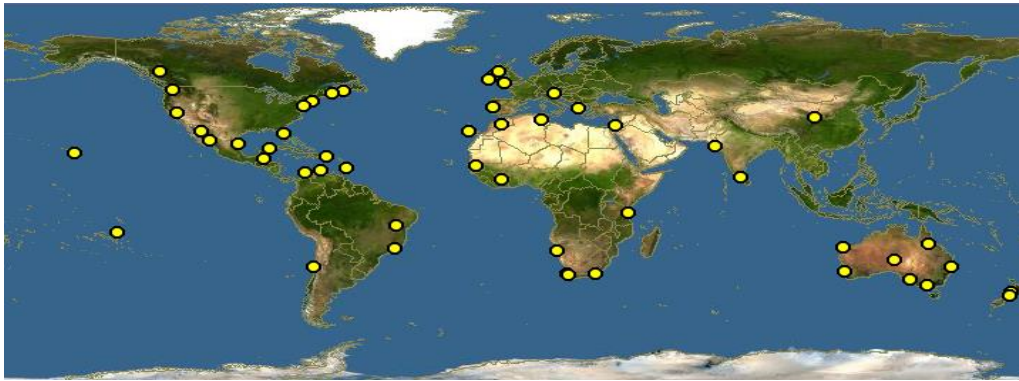


Figure 3. Carte représentative de la distribution mondiale de l'algue verte *Ulva rigida*.

(facility 2013)

d- Reproduction

Généralement la reproduction des algues s'effectue par multiplication végétative. Néanmoins, au cours de son cycle, qui atteint son apogée au printemps et en été, *Ulva* peut enchaîner une alternance de deux générations où tous les individus possèdent une morphologie presque identique mais différent en nombre de chromosomes. (Faller H. 2011; mediterraneo 2015)

On distingue d'abord la reproduction asexuée qui consiste en la division du thalle. Cette fragmentation génère des organismes identiques appelés sporophytes marqués par une diploïdie. A la suite d'une méiose, on observe une production de zoospores quadriflagellés qui donnent naissance à des pieds mâles et femelles ou gamétophytes mâles et femelles haploïdes eux même producteurs de gamètes biflagellés. (Faller H. 2011; Garon-Lardiere S. 2004; Pettett P. 2009)

C'est ainsi que provient la reproduction sexuée qui se traduit par l'union de deux de ces gamètes et la production d'un zygote à 2N. (Garon-Lardiere S. 2004)

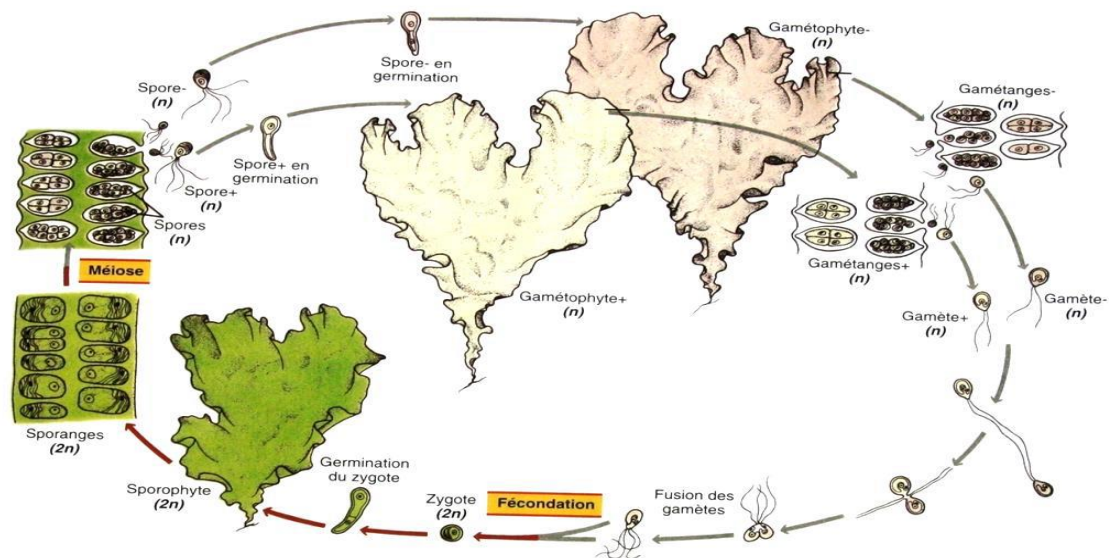


Figure 4. Figure représentative du cycle de reproduction chez *Ulva*.

(Raven P. H. 2007)

Par ailleurs, il est connu que chez les espèces *Ulva*, jusqu'à 60 % de leur biomasse est consacrée à la reproduction grâce à la grande capacité photosynthétique de leur cellules reproductrices. (Botany 2001) Ceci dit, ceci dépend de signaux environnementaux tels que la photopériode, la température, le pH, la salinité, la disponibilité des nutriments et la déshydratation et de facteurs saisonniers puisque cette reproduction atteint son maximum au printemps. (biofuels 2015; Pettett P. 2009) Notons à titre d'exemple le cas de l'algue verte *Ulva Spiralis*, dont le taux de croissance devient maximal sous une température optimale de 15°C, un pH optimal de 7.5, des conditions optimales de lumière variant entre 150 et 200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ et en présence de concentrations optimales d'azote et de phosphore de 7.4 mg N . $\text{gDW}^{-1} \text{ d}^{-1}$ et 0.6 g / m^3 , respectivement. (biofuels 2015) Chez *Ulva Rigida*, la température optimale à son développement est située aux alentours de 17°C tandis que la valeur optimale de lumière incidente pour une bonne croissance de l'algue varie entre 400 et 500 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Ce taux de croissance se voit diminué lors d'une carence en phosphore. (Casabianca M.L. 2002)

Il est à noter également que plusieurs études ont rapporté que la reproduction est aussi dépendante du cycle lunaire. ((Pettett P. 2009) En effet, cette observation, espèce-dépendante a été faite par Christie et Evans et par Luning chez *Ulva Intestinalis* et *Ulva Pseudocurvata*. (Christie A.O. 1962; Luning K. 2008)

D'une façon générale, il est important de pouvoir contrôler la production de la biomasse algale afin d'éviter les effets nuisibles que cela pourrait apporter à l'environnement via l'apparition du

phénomène de la marée verte. (biofuels 2015) De plus, il a été rapporté qu'*Ulva* constitue environ 25% de la production d'algues vertes mondiale (Padua M. 2004).

2. Composition Biochimique

La biodiversité extraordinaire du monde marin se traduit par de nombreux composés biologiquement actifs. Les organismes marins tels que les plantes, les animaux et les algues sont parfois exposés à des conditions extrêmes de température, pH, salinité, pression, lumière et autres ce qui rend leur survie dans ces habitats complexes un véritable défi quotidien. (Hamed I. 2014; Ilknur Z. 2015)

Pour survivre, elles produisent une variété de substances naturelles, bénéfiques et présentant des avantages potentiels et multiples. Ce sont des protéines, des peptides, des acides aminés, des acides gras, des stérols, des polysaccharides, des oligosaccharides, des composés phénoliques, des pigments photosynthétiques, des vitamines et des sels minéraux. Il est à noter que les constituants bioactifs marins diffèrent d'un organisme à un autre et d'une espèce à l'autre, du fait de leurs conditions de vie différentes. D'une façon générale, elles sont riches en hydrates de carbone, en polysaccharides, en matières azotées et polyphénoliques, en acides aminés et en protéines, qui ont une large application dans les industries de l'alimentation humaine et animale et autres. (Ilknur Z. 2015; Satpati G. 2011)

C'est dans ce contexte, que plusieurs études ont porté sur l'identification et l'analyse des composés des algues, dont l'algue verte *Ulva Rigida* afin de mieux les valoriser industriellement.

2.1. Les protéines et aminoacides

Au total, 25 espèces d'algues vertes, 90 d'algues brunes et 350 d'algues rouges ont montré un intérêt commercial. (Santhanam N. 1990)

Plusieurs études se sont focalisées sur la composition biochimique d'*ulva rigida*. Le contenu en protéines varie considérablement d'une étude à une autre. Satpati a rapporté un taux faible équivalent à 6,64% sur une récolte du Lac Chilka en Inde, tandis que Taboada, sur la même espèce récoltée en Espagne, a trouvé une valeur de 17, 8%. (Satpati G. 2011; Taboada C. 2009) En Turquie, la teneur en protéines varie selon la station de récolte et selon les saisons, on note que sa valeur a été enregistrée entre 4,81% et 21,21% avec le niveau le plus élevé en période d'été à Lapseki (21,21%) et le plus bas aussi en été à Havuzlar (4,81%). Une augmentation de la teneur en protéines a été observée au niveau de certaines stations en raison de la pollution ainsi que suite à une baisse de la température de l'eau de mer. (İrkin C. L. 2014)

Une étude faite en 2001 par Rouxel et col. sur *U. Rigida*, récoltée sur les côtes françaises, a montré également que le taux de protéines varie en fonction des saisons (entre 11,3% et 23,6%) et atteint son maximum pendant le mois de décembre (23,6%). (Rouxel C. 2001b). A l'opposé, une autre étude a mis en évidence des teneurs en protéines plus élevées entre février et mai avec une valeur moyenne de 4,6% seulement (valeur obtenue par dosage Bradford). (Ivanova V. 2013)

Les variations saisonnières de la teneur en protéines ont également été signalées pour d'autres espèces, y compris *Ulva lactuca*.(Padua M. 2004; Shuuluka D. 2013)

Une étude faite en Tunisie sur la même espèce, a rapporté quant à elle un contenu total en protéines variable de 9,37% à 14,5% selon le solvant d'extraction.(Mezghani S. 2013a)

Enfin, récemment Ilknur a observé une différence au niveau de la composition en protéines suite à l'ajout de différentes concentrations de NaNO_3 et de $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ à une culture d'*ulva rigida*. On note une augmentation de 23,87% à 25,73% prouvant que les concentrations en nitrate et carbone influent sur la composition chimique de l'algue.(Ilknur Z. 2015)

Toutefois, aucune étude ne s'est focalisée sur la caractérisation des protéines d'*Ulva Rigida*. C'est la proportion et la disponibilité des acides aminés d'une protéine qui déterminent sa qualité nutritionnelle.(Taboada C. 2009) La composition en acides aminés (aa) et leurs teneurs respectives chez *Ulva Rigida* est résumée dans le tableau 1 (Taboada C. 2009).(Shuuluka D. 2013) On remarque que l'acide aspartique et l'acide glutamique constituent les deux résidus les plus abondants ; ils participent à l'arôme, à la saveur et aux propriétés organoleptiques des algues.(Mabeau S. 1992) *Ulva rigida* est aussi riche en leucine, phénylalanine, valine, glycine et alanine. Elle contient aussi un niveau élevé d'arginine qui constitue le précurseur de l'oxyde nitrique, à effet antiathérogène et vasodilatateur. (Taboada C. 2009)

L'algue est cependant pauvre en tyrosine ainsi qu'en histidine et méthionine qui sont des acides aminés basiques généralement peu présents dans les algues.(Shuuluka D. 2013)

Le profil en acides aminés chez *U. rigida* est relativement proche de celui retrouvé chez les légumineuses, chez le soja et l'ovalbumine ; ce qui confirme la valeur nutritionnelle de l'algue.(Fleurence J. 1999) Plus de 30% de la teneur totale en a.a. d'*U. rigida* sont apportés par les protéines essentielles de l'algue contre 33,6% chez les plantes légumineuses et 37% chez *U. lactuca* et *U. pertusa*.(Shuuluka D. 2013) Sa teneur en a.a. a été comparée à celle de la caséine qui est une protéine de référence au niveau nutritionnel.(Taboada C. 2009)

Tableau 1. Composition en acide amines totaux chez *Ulva Rigida*

Acide aminé	g d'A.A/100 g protéine (Shuuluka et al)gg	g d'A.A/ Kg protéine (Taboada et al)
Isoleucine	3.1±0.2	37.21
Leucine	5.2±0.2	66.34
Lysine	3.7±0.3	34.85
Méthionine	1.5±0.2	20.34
Cystéine	1.1±0.1	9.99
Phenylalanine	3.3±0.2	47.83
Tyrosine	2.2±0.2	37.83
Threonine	5.0±0.3	31.66
Valine	5.6±0.4	45.40
Histidine	1.4±0.2	16.21
Acide Aspartique	13.0±1.1	76.32
Acide Glutamique	9.4±1.0	97.92
Proline	3±0.4	24.30
Serine	6.1±0.8	33.96
Glycine	7.8±0.2	49.82
Alanine	12.3±0.7	60.50
Arginine	4.6±0.5	90.88
Ammonia	1.2±0.1	-

2.2. Les lipides et acide gras

Les lipides ne représentent que 1-5% de la matière sèche chez les algues. Ces dernières sont riches en acides gras polyinsaturés particulièrement les acides oméga 3 et oméga 6 qui jouent un rôle important dans la prévention des maladies cardio-vasculaires, l'arthrose et le diabète.(Ivanova V. 2013)

Le contenu total en lipides chez *Ulva rigida* présente des différences selon les études, allant de 0,79 à 12%.(Ilknur Z. 2015; Ivanova V. 2013; Satpati G. 2011)

Cette teneur en lipides est fonction de facteurs environnementaux, des techniques de culture, de la composition du milieu de culture et des espèces. (Ilknur Z. 2015)

D'après la littérature, l'espèce *Ulva* présente un taux de lipides totaux moyen variant de 0.17 à 7.87 %.(Ilknur Z. 2015)

Le contenu en acide gras est très faible (9 g kg^{-1}) chez *U. rigida* (Taboada C. 2009). D'une façon générale, la composition en acides gras des algues est caractérisée par une faible teneur en acides gras saturés (AGS)(Satpati G. 2011), ce qui leur confère une protection contre les maladies cardiovasculaires même si les travaux de Ivanova et coll contredisent cette affirmation.(Ivanova V. 2013; Satpati G. 2011)

Les taux d'AGS chez *Ulva* varient de 32 % à 47% (Ilknur Z. 2015) . Dans la plupart des cas l'acide palmitique (C16 : 0) est prédominant suivi par l'acide béhénique (C22 : 0) et l'acide stéarique (C18 :0). Ces algues possèdent aussi des traces d'acides myristique (C14 : 0) et d'acide pentadécanoïque (C15 :0).(Ilknur Z. 2015)

Au niveau des A.G monoinsaturés du thalle d'*ulva rigida* on retrouve l'acide oléique (C18 : 1) (Kim M. 1996) et l'acide palmitoléique (C16 : 1).(Ilknur Z. 2015)

Parmi les acides gras insaturés, on citera l'acide linoléique (C 18: 2), majoritaire, l'acide eicosapentaénoïque (C20 : 5), et l'acide α -linoléique (C18 : 3) (Ivanova V. 2013; Satpati G. 2011). Les acides gras polyinsaturés (PUFAs) sont également retrouvés en abondance.(Satpati G. 2011)

D'après toutes ces données, on peut donc conclure qu'*U.rigida* constitue une source potentielle de lipides simples et de glycolipides.(Satpati G. 2011)

Cependant cette teneur en acides gras varie aussi selon l'espèce, l'habitat, la lumière, la salinité, la pollution et les conditions environnementales. (Chirapart 2006; Kim M. 1996).

Une autre classe de lipides provenant de sources marines concerne les stérols dont le principal composé chez *U. rigida*, comme le cas de toutes les ulvales, est le fucostérol, suivi par de petites quantités de cholestérol. Cette composition en stérols dépend également des conditions environnementales (température de la mer) et varie considérablement selon les saisons. (Popov S. 1985)

2.3. Les polysaccharides et fibres alimentaires

Les algues sont généralement riches en carbohydrates (jusqu'à 22% de la matière sèche pour *U. rigida*)(Satpati G. 2011). *U. rigida* est caractérisée par un pourcentage élevé de fibres alimentaires polysaccharidiques résistantes aux enzymes digestives humaines endogènes.(Lahaye M. 1995; Yaich H. 2015)

D'après Taboada, ces glucides comprennent 119 g kg^{-1} de fibres insolubles et 426 g kg^{-1} de polysaccharides solubles. (Taboada C. 2009) Lahaye et col. ont rapporté un pourcentage de 38% de fibres (18,5% solubles et 19,5 insolubles). (Lahaye M. 1995) Ce pourcentage atteint une valeur maximale de 50,1% selon une étude récente effectuée sur la même algue récoltée au Chili. (Pezoa-conte R. 2015)

Une caractéristique particulièrement intéressante chez *U.rigida* est sa richesse en polysaccharides, surtout au niveau de la paroi cellulaire. Ces polysaccharides algaires sont facilement isolés et sont utiles pour leurs propriétés fonctionnelles et / ou biologiques comme ingrédients bioactifs potentiels dans les aliments mais aussi dans la fabrication du compost, du papier, pour leur capacité de gélification ou leurs activités anti-virales. (Yaich H. 2015) Les principaux polysaccharides d'*ulva rigida* sont les ulvanes qui sont des polysaccharides sulfatés dont la composition et la structure dépendent des conditions d'extraction. Parmi les principaux constituants des ulvanes on note le sulfate, le rhamnose, la xylose, l'acide glucuronique et l'acide iduronique. De faibles proportions de galactose, glucose et protéines font aussi partie de la composition de ces ulvanes. (Lahaye M. 1995)

D'après Ray et Lahaye, il existe trois principaux types de polysaccharides solubles extraits d'*U.rigida*. Le premier type, qui est majoritaire, est constitué de polysaccharides acides dont la composition chimique en xylose (10,2 à 12,3%), acide uronique (18,4 à 22,6%), le rhamnose (23,8 à 26,3%) et de sulfate (de 38,4 à 41,9%) est similaire à celle retrouvée chez *ulva lactuca*. Ces fractions polysaccharidiques acides appartiennent toujours à la famille des glucuronoarabinoxylane sulfatés. Ces fractions d'ulvanes diffèrent par leur degré d'association aux autres polymères de la paroi cellulaire (Ray B. 1995) et sont composés de la répétition des fragments disaccharidiques suivants :

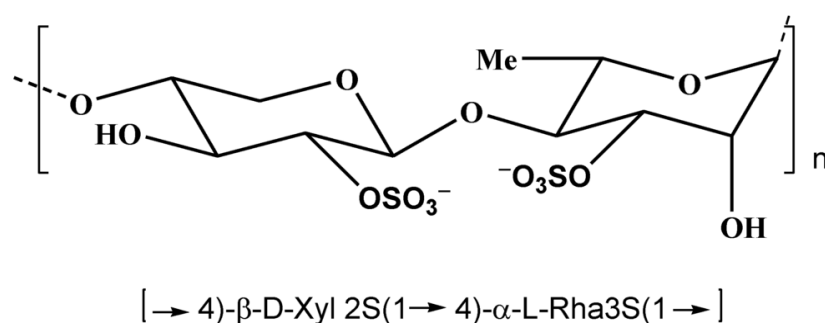


Figure 5. Figure représentative de la structure du disaccharide principal dans *Ulva rigida*.

(Fedorov S. N. 2013)

La deuxième catégorie de polysaccharides solubles concerne des polymères basiques riches en acide uronique (β -1,4-glucuronane) et qui ne sont solubles que dans des milieux très alcalins. Le troisième type de polysaccharides est composé de polymères neutres, riches en glucose et en xylose.(Ray B. 1995)

Ainsi, les trois catégories de polysaccharides présents dans la paroi cellulaire d'*Ulva rigida* sont représentés par une fraction soluble dans l'eau (ulvane) et deux autres principalement hémicellulosiques (glucuronanes et glucoxyanes).(Ray B. 1995)

L'une des propriétés les plus importantes de ces polysaccharides est leur capacité à former un gel en présence d'ions borate et calcium ; ils sont incapables de gélifier en absence de l'un de ces ions. En outre, cette gélification dépend du pH du milieu, de la température et de la concentration relative en ions.(Lahaye M. 1996)

Au niveau monosaccharides *U. rigida* contient une très petite quantité d'acides mannuronique et guluronique. En revanche, la teneur en glucose est élevée et représente 183 mg / g de matière sèche. Le rhamnose est le deuxième monosaccharide en terme d'abondance dans *U. rigida*. Des concentrations relativement élevées d'acide glucuronique et de xylose ont été aussi trouvées. Ces trois monomères proviennent probablement des ulvanes.(Pezoa-conte R. 2015)

2.4. Les vitamines et les minéraux

Les vitamines sont nécessaires pour le corps humain afin de pouvoir assurer diverses fonctions physiologiques. *U. rigida* comme la plupart des algues est source de vitamines du groupe B (B1, B2 et B12) (Hamed I. 2014). Cette algue pourrait représenter une source essentielle de vitamine B12 pour les humains, en particulier pour les végétariens stricts, qui sont couramment déficients en cette vitamine.(Watanabe F. 1999) La vitamine A est néanmoins la plus abondante, bien que la vitamine E et la vitamine C soient présentes en grandes quantités également. .(Taboada C. 2009)

U rigida est beaucoup moins riche en vitamines B6 (<0.1 mg kg⁻¹) et B3 (<5 mg kg⁻¹) (Taboada C. 2009) comme *Ulva lactuca*.(Macartain P. 2007; Sirbu R. 2006) Ceci dit, la composition en vitamines varie en fonction de nombreux facteurs, dont l'espèce, la zone géographique, la saison, et les paramètres environnementaux.(Norziah M.H. 2000)

Les algues sont très riches en minéraux essentiels et en oligo-éléments tels que le calcium, le sodium, le potassium et le magnésium. (Hamed I. 2014) La plupart de ces minéraux sont très abondants dans les algues comparativement à leur teneur dans les autres aliments. L'analyse de

la composition minérale d'*ulva rigida* a montré un contenu équilibré en sodium et en potassium respectivement 15,9 et 15,6 g kg⁻¹), ce qui est intéressant d'un point de vue nutritif. La concentration en magnésium est équivalente à 20,94 g kg⁻¹. (Taboada C. 2009) Les algues sont une des sources végétales les plus importantes en calcium puisque leur contenu en Ca et P dépasse celui des pommes, des oranges, des carottes et des patates. (Hamed I. 2014) En effet, la concentration en calcium est de l'ordre de 5,24 g kg⁻¹. (Taboada C. 2009) Ceci se révèle très intéressant si on considère que c'est un élément minéral indispensable du fait de son implication dans la formation des os et dans le développement et l'entretien de tissus calcifiés dentaires. (Hamed I. 2014)

L'une des caractéristiques les plus marquées des algues marines est leur forte teneur en iode, qui est un nutriment important dans la régulation du métabolisme et de la croissance. L'iode intervient dans la production des hormones thyroïdiennes thyroxine et de triiodothyronine, qui régulent un grand nombre de processus physiologiques chez l'homme ; une carence peut entraîner le crétinisme, l'apparition d'un goitre, et des déficiences mentales. (Hamed I. 2014; Taboada C. 2009)

Ulva rigida est également riche en fer (2 à 7 g kg⁻¹) (Taboada C. 2009) et cette teneur atteint même 77 g kg⁻¹ selon Sirbu et coll ce qui en fait un excellent aliment pour l'apport en fer. (Sirbu R. 2006)

Cette variation au niveau des teneurs est certainement due à des variations climatiques géographiques et de la physiologie de l'algue. (Mabeau S. 1992)

2.5. Les pigments et les composés phénoliques

Les pigments photosynthétiques sont des composés bioactifs qui sont capables de capter l'énergie solaire. La couleur des algues est due à la présence ou absence de pigments. (Hamed I. 2014) La couleur verte est due aux pigments chlorophylliens représentés par quatre types de chlorophylles qui diffèrent par de légères modifications structurales. (Sirbu R. 2006) On distingue, surtout la chlorophylle **a** dont la présence est nécessaire à la photosynthèse chez toutes les algues photosynthétiques et la chlorophylle **b**. Dans un rapport des formes **a** et **b** de 4:3, le contenu en chlorophylle chez *Ulva rigida* est de 0,77 mg/g. (Satpati G. 2011; Sirbu R. 2006)

Outre la chlorophylle on trouve aussi des pigments caroténoïdes. Ceux-ci se caractérisent par une structure chimique complexe, et confèrent une couleur jaune-rougeâtre aux algues. (Sirbu R. 2006)

Selon Satpati, le taux de la chlorophylle **a** est de 13%, celui de la chlorophylle **b** de 7.5% et celui des caroténoïdes de 4.5%. La teneur en chlorophylle a été évaluée à 21%. (Satpati G. 2011)

Les composés phénoliques sont généralement trouvés dans les écosystèmes terrestres, les plantes marines, les micro et macroalgues.(Trigui M. 2013) Ils sont susceptibles de présenter différentes activités biologiques y compris des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes. Il existe au moins 8000 polyphénols bioactifs différents.(Bravo L. 1998)

Le contenu phénolique total chez *U. rigida* est de l'ordre de 9mg PHG g⁻¹ (mg d'équivalent d'acide phloroglucinol par g d'extrait d'algue sèche). Néanmoins, ce taux varie considérablement selon le type et la polarité des solvants d'extraction. En effet, la teneur la plus élevée en phénols a été obtenue suite à une extraction dans l'acétate d'éthyle (cette valeur atteignant les 19mg PHG g⁻¹), suivie par la fraction chloroformique puis par le butanol et l'eau. Ce taux subit aussi l'influence saisonnière puisque les extraits de fin de l'hiver et de début du printemps (Février et mars) ont montré une plus forte teneur phénolique que celles recueillies pendant les autres mois. (Trigui M. 2013)

2.6. L'eau

Les algues sont généralement constituées à 90% d'eau, localisée dans la vacuole de la cellule, ainsi que dans le cytoplasme et la paroi cellulaire.(Faller H. 2011) Il a été rapporté qu'*Ulva rigida* contient entre 76% et 83,56% d'eau. (Ilknur Z. 2015; Satpati G. 2011) Cette valeur est variable en fonction des nutriments présents dans le milieu. Une diminution de la teneur en eau a été enregistrée en présence d'une source de carbone, alors que l'ajout de nitrate dans le milieu l'augmente considérablement. (Ilknur Z. 2015)

2.7. La cendre

Les teneurs en cendres dans les algues sont plus élevées que dans les plantes terrestres. La teneur en cendre chez *Ulva rigida* change d'une étude à une autre et varie entre 11 et 35% Ces valeurs montrent des différences significatives selon l'habitat et le milieu chez le genre *Ulva*, cette teneur est espèce dépendante (Ilknur Z. 2015; İrkin C. L. 2014)

La composition biochimique d'*Ulva rigida* varie donc en fonction de la distribution géographique et des saisons et des principaux facteurs environnementaux comme la température de l'eau, la salinité, la lumière, les nutriments et les minéraux disponibles. (Messyas B. 2010)

3. Applications et effets biologiques

Les ressources marines et notamment l'algue *ulva rigida* offrent des molécules bioactives qui peuvent être utilisées dans de nombreux domaines industriels tels que les industries pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires et autres.

3.1. Utilisation alimentaire

Le plus grand intérêt pour ces organismes demeure en raison de leur propriétés nutritionnelles.(Shalaby E.A. 2011)

La principale utilisation des algues dans le monde concerne le domaine alimentaire, ce dernier représente en effet environ 75% de leur utilisation (Faller H. 2011). Elles sont susceptibles d'être exploitées pour l'alimentation humaine et animale.(Silva M. 2013)

Alors que dans les pays Asiatiques (Chine, Corée et Japon), l'algue fait partie de l'alimentation depuis des millénaires, elle a été introduite plus récemment dans l'alimentation des occidentaux.

De par leurs propriétés nutritionnelles remarquables, les *Ulva* sont aussi utilisées dans la fabrication des compléments alimentaires aussi bien au Japon, en Chine et dans d'autres pays sud-asiatiques qu'en Amérique du Nord et du Sud et en Océanie. Elles se trouvent aussi incluses dans une grande variété de plats tels que les salades, les soupes, les biscuits, et les repas traditionnels. (Silva M. 2013) En France, *Ulva* fait partie des quelques macroalgues autorisées à être utilisées dans l'industrie alimentaire. (Mabeau S. 1992)

Elles sont également utilisées en Europe pour l'alimentation des volailles afin d'améliorer la qualité du jaune d'œuf ou la couleur de leur viande. (Indergaard M. 1991)

Une étude intéressante suggère que l'incorporation d'*Ulva rigida*, (jusqu'à 10%) dans le régime alimentaire pour les juvéniles lours de mer (ou bars), est bénéfique dans la mesure où il n'a pas de conséquences négatives sur les performances de croissance, l'efficacité alimentaire et la composition corporelle du poisson. Ceci dit, la réponse des poissons aux algues semble être spécifique à l'espèce. Ainsi l'apport d'*ulva spp* dans l'alimentation des poissons à tête de serpent est favorable à leur croissance. L'ajout d'*Ulva pertusa* (à un niveau de 5% du poids corporel) améliore l'assimilation des aliments et le dépôt des protéines musculaires chez les alevins de daurade rouge.(Valente I.M.P. 2006)

Par ailleurs, l'utilisation de 5 à 15% d'*ulva rigida* dans l'alimentation de la carpe en substitution à la farine de blé induit de meilleures performances au niveau croissance et une concentration plus élevée en protéines chez les alevins de carpes. L'utilisation de concentrations élevées d'*Ulva*

rigida dans l'alimentation des poissons est donc une piste intéressante pour la pisciculture. (Diler I. 2007)

3.2. Utilisation thérapeutique

Les algues connaissent un intérêt grandissant en tant que source de molécules bioactives. Les propriétés et activités biologiques présentées par ces molécules sont vastes telles que les activités antibactérienne, anti-inflammatoire, antiproliférative, antivirale, antifongique, antinéoplasique, anti-cancéreuse, anti-obésité, antidiabétique, antihypertenseur, hypolipémiante et antioxydante. (Cabrita M.T. 2010; Xu N 2004) (Cabrita M.T. 2010) Chez le genre *Ulva*, ces activités diffèrent d'une espèce à une autre. (Silva M. 2013)

Ulva rigida fait partie des espèces à partir de laquelle ont été isolés des métabolites biologiquement actifs tels que l'acide gallique et des stérols (isofucoesterol et 24-nor-22-dehydrocholesterol). (Yildiz G. 2012) (Kerr R.G. 1991)

Silva et al ont rapporté une activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique et des activités antimutagénique, antioxydante et anticancéreuse des extraits éthanolique et dichlorométhanique chez *U. rigida*. (Silva M. 2013) Ces extraits auraient même une activité cytotoxique contre des lignées cellulaires cancéreuses du côlon et du sein. (Medeiros J. 1999)

a- Activité anti-hyperglycémiant

Les études expérimentales et cliniques démontrent que le stress oxydatif causé par l'hyperglycémie joue un rôle majeur dans les signes cliniques du diabète sucré, celui-ci est généralement accompagné par une augmentation de dommages oxydatifs. Cet effet a été contrecarré par l'administration pendant 30 jours d'un extrait éthanolique d'*ulva rigida* chez des rats diabétiques accompagné d'une augmentation du poids corporel et du taux d'insuline dans le sang. Cet effet pourrait être dû à une régénération des cellules β des îlots du pancréas et/ou à une augmentation de la libération d'insuline. (Celikler S. 2009b)

b- Antigenotoxicité in vivo et in vitro

Ces mêmes rats diabétiques montrent un accroissement de la fréquence des micronoyaux dans les érythrocytes polychromatiques de leur moelle osseuse, signe d'une lésion chromosomique. Le traitement avec l'extrait d'*U. rigida* inhibe significativement la formation de micronoyaux après 3 et 30 jours de traitement. (Celikler S. 2009b)

Par ailleurs, des essais faits sur des lymphocytes humains ont démontré un effet antigénotoxique et anti-clastogène des extraits d'*ulva rigida* lors d'un traitement à la mytomycine-C responsables

de différentes aberrations chromosomiques au niveau de l'ADN. (Celikler S. 2008) Le potentiel chimio-protecteur et antigénotoxique d'*Ulva rigida* observé dans cette étude est d'une grande importance et pourrait être exploité dans la radioprotection et dans toute condition pathologique chez l'homme.

c- *Activité antimicrobienne et antifongique*

La description des caractéristiques antimicrobiennes de différents extraits d'*ulva rigida* (via une extraction par le méthanol, l'acétone, le diethyl ether, ou l'éthanol) a été effectuée dans une étude réalisée par Tuney et al. Les résultats diffèrent selon l'espèce bactérienne (*Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) ou de levure (*Candida sp.*). Il a été observé une activité antimicrobienne significative dans l'extrait à l'éther diéthylique ainsi que, dans une moindre mesure, dans l'extrait éthanolique. (Tuney I. 2006)

Plusieurs études ont aussi noté une grande variation au niveau de la production de molécules de défense chez les plantes terrestres. Cette variation est en relation directe avec des facteurs physiques (température, lumière...) et des facteurs biologiques, comme le cycle de vie et la pression des herbivores. (Trigui M. 2013)

d- *Activité immunomodulatrice*

Cette activité a été mise en évidence sur des macrophages de modèles murins RAW264.7 dont la stimulation avait été effectuée par l'ajout de polysaccharides extraits d'*ulva rigida*. Les macrophages sont des cellules multifonctionnelles impliquées dans les réponses immunitaires innées et adaptatives. Ils participent à la réalisation des processus inflammatoires importants, dans l'élimination des agents pathogènes et, en fonction des stimuli, ils peuvent aussi participer à la libération des cytokines anti-inflammatoires et à éliminer les débris cellulaires. Il est donc intéressant de pouvoir modifier le fonctionnement de ces macrophages par stimulation sélective ou suppression de leur activité cellulaire. Ces polysaccharides pourraient donc être utilisés en clinique lors d'un dysfonctionnement causé par une pathologie et où la fonction des macrophages doit être renforcée. Les résultats de cette étude indiquent que les polysaccharides sulfatés (ulvanes) modulent l'activité des macrophages RAW264.7 in vitro en induisant la libération de molécules inflammatoires telles que l'oxyde nitrique et les prostaglandines et en stimulant l'expression des gènes NOS-2 et COX-2. (José M. L. 2007)

e- Activités préventives anti-obésité, anti-athérosclérose et anti-hypercholestérolémie

L'obésité est un phénomène submergeant sur le plan mondial qui se définit par un trouble métabolique chronique causé par un déséquilibre entre la consommation d'énergie et les dépenses. De nombreux problèmes de santé trouvent leur origine suite à l'accumulation excessive de graisse tels que l'hypertension artérielle, le diabète de type 2, le taux de cholestérol sanguin élevé, l'athérosclérose et l'apnée du sommeil. L'étude des effets exercés par *Ulva* sur des hamsters hypercholestérolémiques, a montré une réduction significative des taux du cholestérol dans le plasma, le cholestérol non-HDL et des triglycérides. Ceci a également permis la diminution de la formation des produits de la peroxydation lipidique et le taux d'anion superoxide et surtout une diminution de 70% de l'accumulation du gras au niveau de l'aorte ce qui limite le développement de l'athérosclérose. (Godard M. 2009b) D'une façon générale, il a été démontré que les populations consommant beaucoup de produits marins et en particulier d'algues comme les japonais et les habitants d'Alaska, souffrent moins de maladies cardiovasculaires. (Kinsella J.E. 1989)

f- Activités antioxydante et anticytotoxique

Toutes les activités précédentes décrites chez *Ulva* sont en relation directe avec ses propriétés antioxydantes. En effet, les antioxydants sont en mesure de protéger le corps humain de plusieurs maladies telles que le cancer, l'inflammation, le diabète, les maladies neurodégénératives et les maladies cardiovasculaires générés par la réaction des espèces réactives de l'oxygène (ROS) avec des molécules biologiques. Ces radicaux libres causent de nombreux dommages au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides. (Trigui M. 2013) Les antioxydants synthétiques généralement utilisés pour prévenir ces dommages comme le butylhydroxyanisole, le butylhydroxytoluène, le butylhydroquinone tertiaire, et le gallate de propyle sont sous réglementation stricte dans la plupart des pays, en raison de leurs effets secondaires et des risques potentiels sur la santé humaine. Le potentiel antioxydant d'*Ulva rigida* est soumis à des variations saisonnières significatives selon Trigui et al, atteint un maximum d'activité à la fin de l'hiver (février et mars) et présente une régression pendant les mois de juillet et d'août. Trigui a relié cette activité à la présence de composés phénoliques dont le taux suit exactement les mêmes variations à travers les saisons. (Trigui M. 2013) Une autre étude de Godard et al, a attribué cet effet antioxydant aux ulvanes, l'ajout d'*Ulva* dans l'alimentation des hamsters athérosclérotiques diminue le stress oxydatif. (Godard M. 2009b)

Une troisième étude a montré la grande capacité d'un extrait méthanolique d'*ulva rigida* à scavenger les ROS. En outre, ces travaux ont mis en évidence l'absence de corrélation entre

l'activité antioxydante de l'algue et son contenu phénolique total, ce qui suggère que les polyphénols joueraient un rôle mineur dans la capacité à chélater les produits du stress oxydatif. D'autres composés, tels que les polysaccharides, les protéines et l'acide organique pourraient contribuer à ces propriétés.(Yildiz G. 2012)

Mezghani et al ont rapporté une activité anticytotoxique de l'extrait brut ainsi que de la fraction éthanolique contre les dommages causés par l'ajout du H₂O₂. Ainsi, la mort apoptotique des cellules HeLa déclenchée par H₂O₂ est inhibée par *Ulva rigida* (Mezghani S. 2013a)

Dans un papier plus récent, Mezghani et al. ont approfondi leurs investigations et ont démontré que le précipité éthanolique d'*U. rigida* inhibe l'apoptose au début de son processus en stimulant l'expression du gène anti-apoptotique Bcl-xL et en prévenant le clivage de la molécule pro-apoptotique Bax, préservant ainsi le potentiel de la membrane mitochondriale.(Mezghani S. 2015)

3.3. Possibilité de nanofibres

L'intérêt que portent les scientifiques aux nanofibres d'origine naturelle est lié à leur nombreuses utilisations dans le domaine médical en particulier les pansements, la vectorisation de médicaments ou encore les échafaudages tissulaires. En outre, ces polymères naturels possèdent une grande compatibilité avec les tissus et présentent donc peu de risques de rejet. Ils peuvent être actifs à différents stades du cycle de vie des cellules avec lesquels ils communiquent. Parmi ces matrices, on trouve les polypeptides, les protéines et les polysaccharides. (Greiner A. 2007; Lee K. Y. 2009),(Lee K. Y. 2009) C'est dans ce contexte que les polysaccharides anioniques sulfatés d'*ulva rigida* ont été utilisés pour la fabrication de nanofibres uniformes en présence de différentes concentrations de PVA (polyvinyl alcohol) et ce par électrofilage ou assemblage ionique. Ce complexe à diamètre très étroit de 84 nm, présente une structure cristalline hautement ordonnée, des propriétés physicochimiques intéressantes (faible dissolution dans l'eau et absence de dégradation par les enzymes digestives humaines) et de nombreuses propriétés biologiques (activités anticoagulante, antioxydante et anti-thrombotique). Toutes ces caractéristiques pourraient conduire à de nouvelles applications biomédicales.(Toskas G. 2011)

3.4. Production de biocarburants

Au cours des dernières années, de nombreuses études se sont focalisées sur la production d'énergie alternative aux combustibles habituels à partir d'une matière première comme la biomasse, et ce en raison de sa contribution dans la réduction des émissions de CO₂ dans l'atmosphère.(Karray R. 2015) Contrairement à la biomasse terrestre, la biomasse marine

constituée essentiellement d'algues ne nécessite pas d'eau douce ou d'engrais pour croître. (Ross A.B. 2008)

Par rapport aux microalgues, les macroalgues permettent une production plus élevée de biocarburant en raison de leur volume. De plus, leur riche composition chimique constitue une plate-forme de bioraffinerie à base de lipides et de biomasse lignocellulosique.

C'est dans ce contexte qu'une étude récente a montré la production de biogaz à partir d'*Ulva rigida* avec un rendement allant jusqu'à 626.5 mL/g COD_{int}. Le taux de production de biocarburant varie en fonction de la nature des prétraitements des algues (chimique, enzymatique ou mécanique). Après une digestion anaérobie, l'hydrolyse enzymatique apporte le meilleur rendement en biogaz car elle permet une meilleure réduction des sucres. (Karray R. 2015)

3.5. Autres utilisations

Outre leurs utilisations alimentaire et thérapeutique et leur implication dans la production du biocarburant, les *Ulva* peut être utilisées pour la dépollution des eaux usées, des eaux industrielles et de la mariculture. Ainsi, *U. rigida* a prouvé son efficacité en tant que biofiltre dans le traitement des effluents de mariculture. (Silva M. 2013)

Cette algue pourrait aussi être utilisée dans le domaine cosmétique par exemple pour la production de substances anti-âge et des écrans solaires grâce à leur qualité protectrice contre les rayons UV solaires. (Pescheck F. 2010)

III- Le stress oxydatif

1. Définitions

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées activées. Ces derniers correspondent à des molécules oxydantes très réactives et à forte instabilité en raison d'un électron non apparié sur leurs couches externes. (Favier A. 2003)

Même dans des conditions physiologiques normales, ces molécules hautement réactives dérivées de l'oxygène sont constamment produites par les organismes sous forme de radicaux libres primaires à savoir le radical superoxyde O_2^- , le radical hydroxyle OH^\cdot et le monoxyde d'azote NO. Ces radicaux libres peuvent aussi générer des dérivés non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et l'ion peroxydite $ONOO^-$. Ainsi, sont réunis sous le nom de ROS, les radicaux libres primaires et leurs dérivés. Un état de déséquilibre entre la production de ROS et

l'aptitude des systèmes de défense à éliminer ces radicaux libres dans la cellule, définit le stress oxydatif.

Ces systèmes de défense sont constitués d'abord d'enzymes naturellement présentes dans les cellules appelées SOD, catalase ou peroxydase. En conditions physiologiques ces enzymes antioxydantes assurent l'élimination des radicaux libres primaires et empêchent donc l'oxydation des constituants cellulaires par ces derniers, préservant ainsi l'intégrité cellulaire. (Lacan D. 2001) (Goudable J. 1997) Néanmoins, ce système est parfois altéré suite à l'apparition de nombreux facteurs stressants qui peuvent avoir une origine environnementale (tabagisme, alcool, médicaments) ou dus à un mode de vie donné (exposition à des polluants chimiques ou à des radiations solaires) ou encore de source endogène (vieillesse, inflammation, altérations mitochondriales ou génétiques). (Lacan D. 2001)

L'accumulation de radicaux libres dans les cellules conduit à une oxydation des protéines, lipides, sucres et ADN, responsable de la formation de radicaux libres secondaires qui sont la cause d'une réaction d'oxydation en chaîne pouvant conduire à de nombreuses pathologies telles que l'ischémie, les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires, voire entraîner la mort cellulaire. Ces cascades de réactions d'oxydation peuvent être ralenties par des antioxydants secondaires (Vitamine E, C, polyphénols...) apportés par l'alimentation. (Goudable J. 1997) (Brack M. 2011) (Desport J.C. 2002)

2. Les oxydants et leur origine

Les oxydants correspondent aux substances oxygénées réactives (ROS) appelées communément radicaux libres. On distingue deux grandes classes de radicaux libres, à savoir les radicaux libres primaires qui sont formés directement à partir de l'oxygène et les radicaux libres secondaires ou organiques générés par l'action des radicaux libres primaires (figure 6).

Dans les conditions physiologiques normales, les ROS sont naturellement formées par la cellule avec un taux allant de 2 à 6%. En effet, ces espèces jouent un rôle de messagers secondaires capables, notamment, de réguler le phénomène d'apoptose ou d'activer des facteurs de transcription. L'oxygène subit donc une réduction mono électronique et conduit au radical superoxyde O_2^\bullet . Ce dernier est le plus abondant dans la cellule et il est particulièrement dangereux du fait qu'il participe à la formation du radical hydroxyle (OH^\bullet). (Lacan D. 2001), (Gardès-Albert M. 2004)

Ces ROS peuvent avoir différentes origines à savoir le réticulum endoplasmique, la membrane plasmique, les peroxysomes et le cytoplasme mais c'est surtout la mitochondrie qui est le principal lieu de leur production (jusqu'à 90%) au niveau de la chaîne respiratoire. (Valko 2007), (Balaban R.S. 2005) Les principaux sites de production des ROS sont les complexes I et III de la chaîne respiratoire.(Balaban R.S. 2005)

Les radicaux libres primaires sont les oxydants les plus dangereux, directement formés à partir d' O_2 pour générer le radical superoxyde (O_2^\bullet), le radical hydroxyle (OH^\bullet), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou encore l'oxygène singulet (O_2^1).

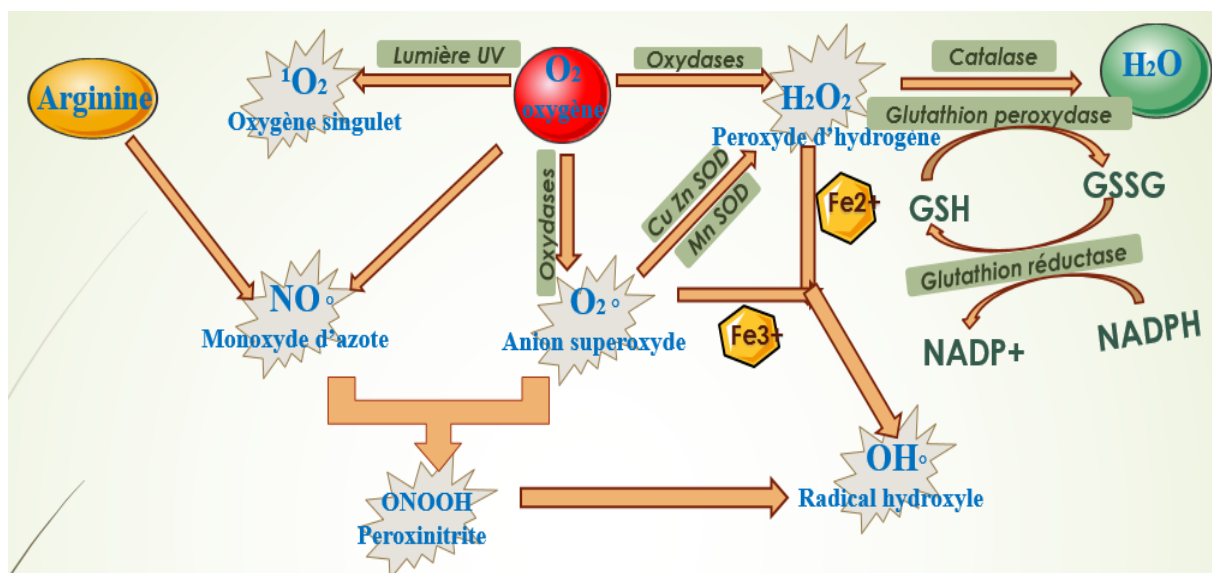


Figure 6. Figure représentant les formes actives de l'oxygène dans la cellule et le système de défense antioxydant enzymatique.

GSH, glutathion; GSSG, oxidized glutathion; SOD, superoxide dismutase.

Le $O_2^{\bullet-}$ incapable de traverser les membranes cellulaires, se transforme rapidement en H_2O_2 par la réaction catalysée par la superoxide dismutase SOD. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est une forme active de l'oxygène qui n'est pas très réactive et la cellule peut en supporter des concentrations relativement importantes. Ce dernier peut diffuser rapidement de la mitochondrie jusqu'au cytoplasme où il donne naissance à l' OH^\bullet et au radical hydroxyle (OH^\bullet), selon la réaction de Fenton en présence du fer ferreux. Le radical hydroxyle OH^\bullet est un oxydant très puissant puisqu'il attaque toutes les cibles cellulaires (acides nucléiques, acides gras et protéines) et crée des dégâts très importants. En plus, il peut traverser les membranes et agit loin de son site de

formation. Ceci entraîne la formation de radicaux libres secondaires. (Lacan D. 2001),(Goudable J. 1997)

L'oxygène singulet est une forme excitée de l'oxygène. Il est formé par action de la lumière sur l'oxygène. Il joue un rôle mineur dans la panoplie des effets toxiques des formes actives de l'oxygène.(Gardes-Albert M. 2006)

Les radicaux libres secondaires se forment suite à la réaction entre un R.L. primaire avec un composant cellulaire (acides nucléiques, lipides membranaires, protéines). L'action d'un R.L. primaire tels que O_2^\bullet ou OH^\bullet sur un acide gras insaturé de la membrane cellulaire provoque la formation du radical peroxy ($R-OO^\bullet$) (Lacan D. 2001)

Le stress oxydant peut être mis en évidence soit par le dosage de l'un des marqueurs de stress tels que le MDA (l'un des dérivés finaux de la peroxydation lipidique), ou le taux des protéines carbonylées, soit par la mesure de l'activité des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase, la catalase ou finalement le dosage des antioxydants secondaires qui sont des éléments de faible poids moléculaire tels que les vitamines A, C et E, la GSH et l'acide urique. (Gardes-Albert M. 2006)

3. Les antioxydants

Les antioxydants sont des molécules capables de neutraliser et de limiter l'accumulation des ROS à des concentrations toxiques au niveau de la cellule et de l'organisme.(Pincemail J. 2004) Notre organisme réagit en permanence à cette production de radicaux libres et l'on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule, les antioxydants primaires (systèmes enzymatiques) et les antioxydants secondaires (systèmes non enzymatiques). (Lacan D. 2001) (figure7)

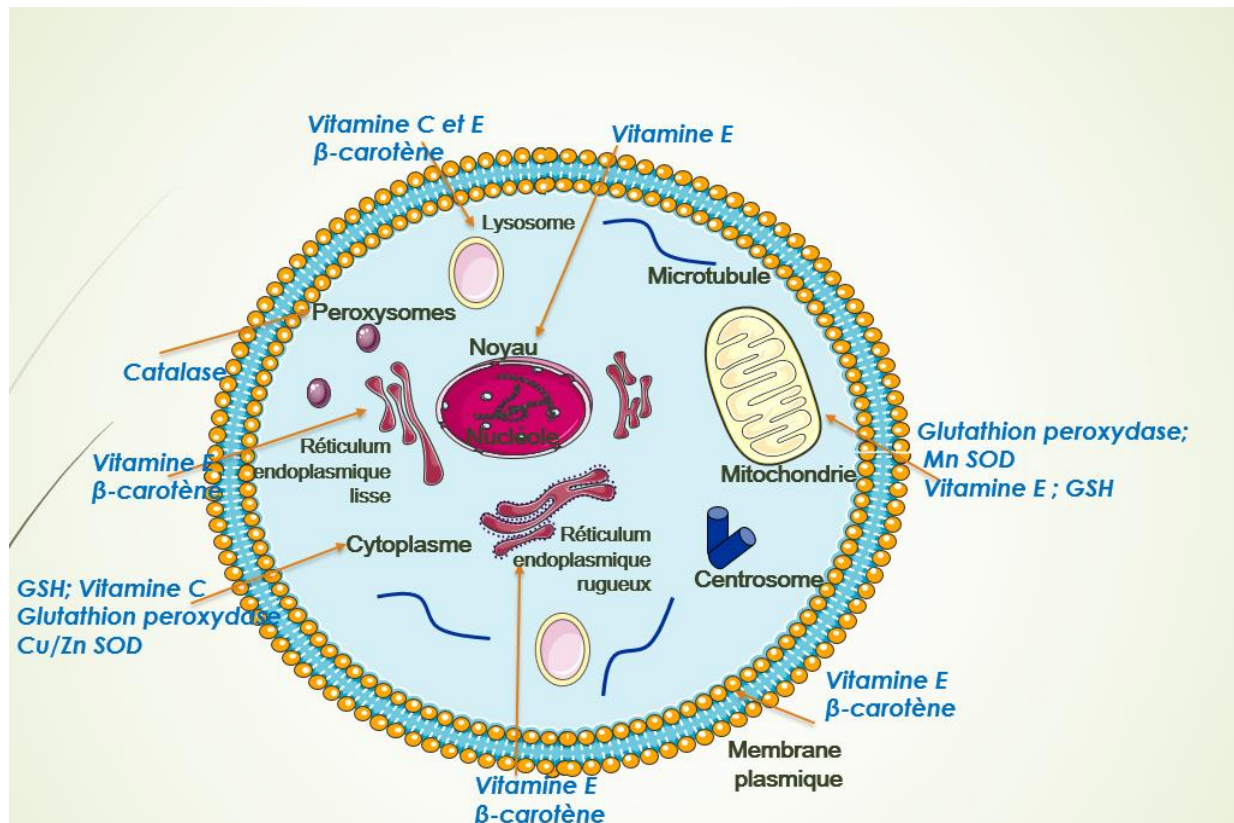


Figure 7. Figure représentant les différents systèmes antioxydants et leur localisation dans la cellule.

Modifiée d'après (Favier A. 2003). Mn-SOD : superoxyde dismutase mitochondriale, Cu/Zn-SOD : superoxyde dismutase cytosolique, GSH : glutathion réduit.

3.1. Le système à enzymes

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydantes qui sont la première ligne de défense très efficace et capable d'assurer en permanence la neutralisation des ROS par catalyse. Cette ligne de défense est constituée de la SOD, catalase et peroxydases (glutathion et ascorbate). Ces enzymes agissent sur les radicaux libres primaires en transformant l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène en produits non toxiques. (Hamdi Damak Y. 2013)

a- La superoxyde dismutase (SOD, EC : 1.15.1.1)

Les superoxydes dismutases (SOD) constituent une famille de métallo-enzymes qui catalysent la dismutation des anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en oxygène moléculaire (O_2). (Fridovich 1995) Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme dont la nature permettra de distinguer les superoxydes dismutases. En effet, chez l'homme, il existe trois isoformes de SOD, catalysant toutes la même réaction, codés par des gènes différents et qui diffèrent par leur localisation cellulaire et leur cofacteur

métallique. Il s'agit de la SOD à cuivre et à zinc (SOD1 ; 32 KDa) que l'on trouve dans le cytosol, le noyau et au niveau des liquides extracellulaires, la SOD à manganèse (SOD2 ; 23 KDa) qui est localisée dans les mitochondries et la SOD à cuivre et à zinc extracellulaire (SOD3 ; 135 KDa) de forme tetramérique glycosylée. (Henningson M. 2007) (Desbordes F. 2008) Toutefois, la SOD1 reste l'enzyme prévalente. Largement distribuée, elle représente 90% du total de SOD présent chez l'homme et les mammifères.

Il existe une SOD ferrique (Fe SOD) présente seulement dans les cellules procaryotes comme *Escherichia coli* et d'autres bactéries et dans certaines espèces végétales. (Desbordes F. 2008)

Ces enzymes sont codées par 3 gènes différents. Leurs expressions diffèrent et peuvent être modulées en fonction de plusieurs facteurs tels que la présence d'ions métalliques, ou d'un stress, et selon le type cellulaire. (Zelko I. 2002)

Une compréhension moléculaire de chacun de ces gènes s'est révélée utile afin de mieux comprendre leurs rôles biologiques. Par exemple, des variétés de mutations au niveau d'un seul acide aminé dans SOD1 ont été liées à la sclérose latérale amyotrophique familiale. L'invalidation du gène SOD2 chez la souris entraîne une cardiomyopathie létale. Une mutation d'un seul acide aminé dans le gène SOD3 humain est associée à une expression de 10 à 30 fois plus importante de la protéine. (Zelko I. 2002)

D'une façon générale, cette enzyme est très fortement exprimée dans presque tous les organismes aérobies. Elle est largement présente dans le système nerveux central des mammifères, avec majoritairement les deux isoformes SOD1 et SOD2. (Kunikowska G. 2002)

Puissante enzyme antioxydante naturelle, la SOD agit à la source même de la réaction en chaîne induite par les ROS et constitue donc le premier et l'un des principaux maillons du processus de défense contre les radicaux libres. L'élimination du radical superoxyde par la SOD conduit à la formation de peroxyde d'hydrogène qui est toxique pour la cellule parce qu'il participe à la formation d' $\text{OH}\cdot$. La cascade d'enzymes antioxydantes se poursuit par l'action des deux familles d'enzymes participant à l'élimination du H_2O_2 : la catalase et les peroxydases. (Lacan D. 2001)

b- La catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

Il s'agit d'une enzyme ubiquitaire hautement active que l'on retrouve chez presque tous les organismes procaryotes et eucaryotes à respiration aérobie.

C'est une oxydoréductase hémique constituée de quatre chaînes polypeptidiques d'environ 500 aa, comportant chacune un groupement hème et une molécule de NADPH. Le poids moléculaire total de la protéine est de 240 kDa. (Thompson V. S. 2003)

La catalase est présente dans un grand nombre de tissus, mais elle est particulièrement abondante dans le foie et les globules rouges. Chez les eucaryotes, on la trouve dans le peroxydosome des cellules. Elle catabolise le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène à l'état gazeux. (Mates J. M. 1999) Son expression est spécifique aux tissus (Luo D. 2003), elle est surexprimée au niveau de quelques cellules qui sont de nature plus vulnérables face au stress oxydatif comme les cellules nerveuses (Behl C. 1994), les cellules myocardiques, musculaires lisses (Johnson T. M. 1996) ou encore fibroblastiques (Jacobson M. D. 1995) afin de prévenir les dégâts oxydatifs susceptibles sur les biomolécules et la mort cellulaire par apoptose. La catalase affiche une vitesse réactionnelle très rapide, ne nécessitant pas de fourniture d'énergie par la cellule. (Lacan D. 2001)

c- La glutathion peroxydase (GPx, CE 1.11.1.9)

C'est une sélénoglycoprotéine formée de quatre sous-unités contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélénocystéine, elle-même incorporée dans son site actif. Chaque sous-unité présente un poids moléculaire compris entre 19 et 24,8 kDa. On distingue à l'intérieur des cellules, la forme cytosolique et mitochondriale (cGSH-Px) de la forme membranaire (PH-GSH-Px). Les GSH-Px assurent en synergie avec d'autres molécules de nature enzymatique (superoxyde dismutases, catalase) ou non (vitamines E, C, caroténoïdes, groupements SH), l'équilibre intra et extracellulaire de la balance oxydants-anti-oxydants. (Stocker R 1991)

Les GPx constituent la voie majeure de réduction de H_2O_2 en eau et en oxygène moléculaire, en utilisant le cofacteur GSH comme donneur d'électrons et ce dans la plupart des cellules et des compartiments subcellulaires.

Par ailleurs, un défaut d'apport en Se ou un stress oxydant, selon son intensité et sa nature, pourraient moduler les teneurs en GSH-Px en l'inactivant ou bien en augmentant son expression.

Des études *in vitro* démontrent que la GSH-Px peut, suite à la génération des espèces réactives de l'oxygène, à la fois perdre son activité enzymatique et donner suite à la formation de groupements carbonyles. Comme les SOD et GSH-Px travaillent en synergie, l'inactivation des GSH-Px se fait par les ions superoxydes alors que celui des Cu-Zn-SOD par H_2O_2 . Ainsi, des

séances d'UVA thérapie sur des malades psoriasiques présentent après la séance une baisse des glutathion peroxydases et une augmentation du MDA plasmatique. (Richard M.J. 1997)

Le rôle de ces enzymes citées est complémentaire. Tout de même, il existe de nombreuses autres enzymes antioxydantes comme les peroxyredoxines, l'hème oxygénase, la glutathion transférase, les thioredoxines réductases ou les thioredoxines peroxydases.

3.2. Les antioxydants non enzymatiques

Cette deuxième ligne de défense complémentaire consiste en un ensemble de composés susceptibles de ralentir considérablement les effets des radicaux libres qui n'ont pas été piégés par les systèmes de défense précédents (antioxydants primaires).

Ce sont des molécules exogènes indispensables à l'organisme qui sont apportées par l'alimentation. Ce sont de vrais scavengers qui permettent de capturer l'électron célibataire d'un R.L. et de le transformer en une forme peu réactive. On distingue les substances hydrosolubles telles que la vitamine C ou l'acide ascorbique et les liposolubles comme la vitamine A, la vitamine E, le coenzyme Q₁₀ et les flavonoides... (Gilgun-Sherki Y. 2001) On distingue également les protéines comme substances antioxydantes comme la ferritine, la transferrine, la céruléoplasmine et l'albumine. (Haleng J. 2007)

Certains antioxydants comme par exemple l'acide ascorbique sont utilisés comme piègeurs de radicaux libres dans l'industrie agro-alimentaire et permettent aussi de régénérer la vitamine E. Cependant, on doit distinguer les molécules qui peuvent piéger directement les radicaux libres organiques, comme la vitamine E, appelées scavengers et celles qui agissent de façon indirecte sur ces derniers et qui permettent leur régénération. Il est à noter qu'en l'absence de systèmes de régénération appropriés, ces scavengers deviendraient cytotoxiques. (Haleng J. 2007)

a- Les piègeurs de radicaux libres : antioxydants

Une molécule antioxydante ne piège qu'un seul radical libre. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule doit donc être régénérée par d'autres systèmes. On note par exemples :

La vitamine E : La vitamine E est une molécule lipophile, présente en grande quantité dans les huiles végétales qui agit comme un antioxydant très puissant. La vitamine E est localisée au niveau des membranes biologiques et elle protège les acides gras polyinsaturés contre la peroxydation des lipides en cédant un e- pour stopper la propagation radicalaire. Elle est très active contre les radicaux peroxyde (ROO°) et alkoxyde (RO°). Une seule molécule de vitamine E est capable d'inhiber la peroxydation de 1000 molécules d'acides gras polyinsaturés. La

vitamine E est régénérée par la vitamine C, elle-même, régénérée par des enzymes, les ascorbates réductases.(Favier A. 2003; Haleng J. 2007)

La vitamine A : La vitamine A est issue du β carotène qui piège les molécules d'oxygène singulet formées par les radiations solaires.(Haleng J. 2007)

b- Les substances régénérantes

Elles sont nombreuses dont la plus connue étant le **glutathion** qui est un tripeptide synthétisé par l'organisme à partir des acides aminés, cystéine, glutamine et glycine. Ce tripeptide présente un grand pouvoir réducteur du fait de sa concentration intracellulaire élevée et de sa forte capacité à céder des électrons. Le glutathion correspond au thiol non protéique le plus abondant dans les cellules des mammifères où il est produit majoritairement sous forme réduite (GSH). Une augmentation de la forme oxydée (GSSG) traduit un stress oxydant. Le glutathion constitue avec le NADPH les plaques tournantes de la défense antioxydante. Il peut interagir directement avec les ROS, servir de substrat à la glutathion peroxydase ou encore participer au recyclage de nombreux antioxydants comme la vitamine E et la vitamine C dont il restaure le pouvoir antioxydant. Enfin, le glutathion protège les groupements thiols (SH) des protéines cellulaires de l'oxydation, contribuant ainsi au maintien du statut redox cytoplasmique et au bon déroulement de la communication entre les cellules et la coordination de leurs activités.(Re D.B. 2005),(Haleng J. 2007)

Le selenium : C'est un constituant essentiel de certaines enzymes antioxydantes telle que la glutathion peroxydase. Cet antioxydant est nécessaire dans la réaction de détoxification des radicaux libres (RL) produits par le métabolisme cellulaire. Ce rôle de détoxification du sélénium est probablement à l'origine de ses effets anticancéreux et antiviellissement.(Burke E. 2002),(Haleng J. 2007)

D'autres molécules sont aussi dotées d'un potentiel antioxydant important comme les composés à groupement thiol, les caroténoïdes, les polyphénols, le Coenzyme Q10, l'acide urique, la bilirubine, les oligoéléments, les protéines (la ferritine à titre d'exemple) et les peptides tels que les peptides issus des algues vertes *chlorella vulgaris* et *Undaria pinnatifida*. (Haleng J. 2007)

4. Conséquences du stress oxydant

La production excessive de radicaux libres dans une cellule provoque l'inactivation des systèmes enzymatiques, la dégradation des protéines, l'altération de l'ADN et la détérioration de la membrane cellulaire par attaque de ses acides gras constitutifs à l'origine de la peroxydation

lipidique. Toutes ces agressions biochimiques créent des lésions responsables du dysfonctionnement cellulaire pouvant provoquer une hyper prolifération ou la mort des cellules par apoptose. (Estaquier J. 2012) Toutefois ces conséquences sont variables selon la dose induite du stress ainsi que le type cellulaire. En effet, un stress de nature modérée est susceptible de stimuler la prolifération cellulaire et l'expression des protéines d'adhésion, une intensité moyenne pourrait aboutir à l'apoptose alors que de fortes doses de stress provoqueraient une nécrose et des lyses cellulaires immédiates. (Favier A. 2003)

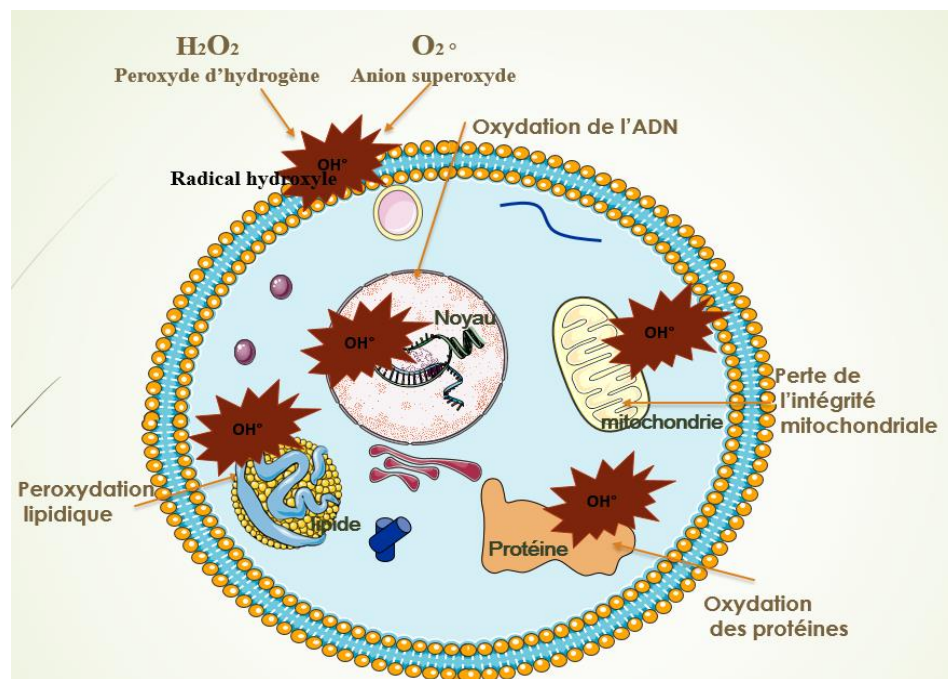


Figure 8. Figure représentante des conséquences du stress oxydatif sur les biomolécules cellulaires.

Modifiée d'après Favier et al., 2003.

4.1. Conséquences sur les lipides et les acides gras

L'une des conséquences biochimiques du stress oxydatif est bien l'oxydation des acides gras polyinsaturés au niveau membranaire ce qui entrainerait la formation des radicaux hydroperoxydes (LOO^\bullet) et alcoxydes (LO^\bullet) lipidiques, qui à leur tour enchainent une réaction de peroxydation lipidique. Ces radicaux peuvent alors, soit être réduits par la glutathion peroxydase ou alors s'oxyder et se fragmenter en aldéhydes acides et en alcanes (éthane, éthylène, pentane). Le radical peroxyde peut donner lieu à un peroxyde cyclique qui peut libérer, après coupure de la molécule, différentes aldéhydes toxiques dont le malonalaldéhyde. (Favier A.

2003) Ces produits finaux de la réaction de peroxydation ont des conséquences multiples telles que la diminution de la fluidité des membranes plasmiques, l'augmentation de la charge négative de surface, et la perturbation des membranes des organites cellulaires. On observe ainsi une inactivation des enzymes membranaires, une oxydation des groupements thiols, une augmentation de la perméabilité membranaire, un gonflement des mitochondries avec inhibition de la chaîne respiratoire et la perte du cytochrome C.(Démarchez M. 2012)

4.2. Conséquences sur la mitochondrie et Apoptose

Au niveau mitochondrial, la vitesse de production des ROS est dépendante du flux d'électrons dans la chaîne respiratoire et du degré de réduction des transporteurs d'électrons. Cette production est également liée au potentiel de membrane ($\Delta\psi$). En effet, la mitochondrie représente le moteur essentiel de la vie ou de la mort puisque la perméabilité mitochondriale constitue l'évènement déclencheur de la mort cellulaire programmée par apoptose. Cette perméabilisation de la mitochondrie est médiée par un déséquilibre entre les protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak,..) et les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL..) membranaires et conduit à la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$), ce qui entraîne la perte du maintien de l'intégrité mitochondriale nécessaire aux fonctions métaboliques. En effet, ceci se traduit par une libération de plusieurs facteurs proapoptotiques (cytochrome C, Apaf-1,..) de l'espace intermembranaire mitochondrial dans le cytosol et par l'activation des caspases de la voie intrinsèque de l'apoptose.(Schapira A.H. 2012) Plus en détail, le cytochrome C forme avec le facteur d'activation de la voie de signalisation de l'apoptose (Apaf-1), la désoxyadénosine triphosphate (dATP) et la pro-caspase 9 un complexe dit apoptosome. La formation de l'apoptosome permet l'activation de la caspase 9 qui à son tour enchaîne une cascade d'activation d'autres caspases effectrices, telles que les caspase 3, puis les caspases 6 et 7 qui auront pour rôle l'activation de la dénaturation de l'ADN par condensation de la chromatine et la formation des corps apoptotiques.(Didur O. 2007)

4.3. Oxydation des protéines

Parmi les autres cibles, les ROS peuvent aussi agir sur les protéines en augmentant le taux des groupements carbonylés et des clivages de chaînes peptidiques suite à l'oxydation de certains résidus des acides aminés, ceux qui sont les plus réactifs aux attaques des ROS sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. En général, les protéines les plus sensibles à la modification sont celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH) telles que les protéines de transport. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications structurelles les rendant, notamment, plus hydrophobes ou plus vulnérables face à

l'action des protéases. Ces altérations entraînent des modifications fonctionnelles importantes (non reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique). (Favier A. 2003) (Haleng J. 2007)

4.4. Dénaturation de l'ADN

L'ADN représente aussi une cible privilégiée à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. En effet, ces derniers peuvent agir sur cette molécule et engendrer plusieurs dommages parmi lesquels les bases oxydées, la guanine étant particulièrement sensible à l'oxydation, par exemple l'attaque de la guanine par $\text{OH}\cdot$ peut former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG). Ce dernier en s'appariant avec l'adénine au lieu de la cytosine, entraîne des mutations au sein de l'ADN et des altérations au niveau de l'information génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement. (Haleng J. 2007) Mais le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin. Ces oxydations peuvent encore s'étendre à des adduits intra-caténaux, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines. (Favier A. 2003)

De ce fait, on peut conclure que, le stress oxydant est l'une des causes essentielles de notre vieillissement (Brack M. 2011). Il intervient aussi dans le développement de certaines maladies neurodégénératives (Ré D.B. 2005) telles que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson. (Mariania E. 2005) Le stress oxydatif est également important dans d'autres pathologies tels que les maladies cardiovasculaires, le diabète, les cancers et les infections virales telles que l'hépatite C et le VIH. (Haleng J. 2007)

D'une façon générale, quand les ROS sont formées d'une façon excessive, elles deviennent «pathologiques» en activant l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires ou des protéines d'adhésion.

5. Les radiations UV-B

Le rayonnement UV est divisé en trois bandes distinctes par ordre décroissant de longueur d'onde et d'énergie croissante à savoir les UVA (320-400 nm), les UVB (280-320 nm) et les UVC (200-280 nm). Les radiations UV de la lumière solaire qui atteint la surface de la terre se compose de 90% d'UVA et de 10% d'UVB. La couche d'ozone stratosphérique permet de bloquer la totalité des radiations UVC et la majorité des radiations UVB. (H'ader D.P. 2007) En effet, moins de 0,5%, de ces rayonnements atteignent la surface de la terre et sont responsables de divers effets néfastes. (Martinez lüscher J. 2014) (Figure 9)

Les régions particulièrement polaires et alpines sont les plus vulnérables aux rayons UVB, étant donné que ces derniers pénètrent profondément dans l'eau. Les organismes biologiques marins sont encore plus à risque que d'autres en raison des effets inhibiteurs exercés par les faibles températures sur leurs capacités réparatrices. En effet, l'exposition au rayonnement UV B solaire peut réduire la productivité, affecter la reproduction et le développement, et permettre d'augmenter le taux de mutation chez les macroalgues, les œufs, les larves de poissons et d'autres animaux aquatiques. Tous ces phénomènes ont pour conséquences la réduction de la capacité d'absorption pour le dioxyde de carbone dans l'atmosphère et les effets négatifs sur la diversité des espèces et la stabilité de l'écosystème. (H'ader D.P. 2007) ,(Pescheck F. 2010)

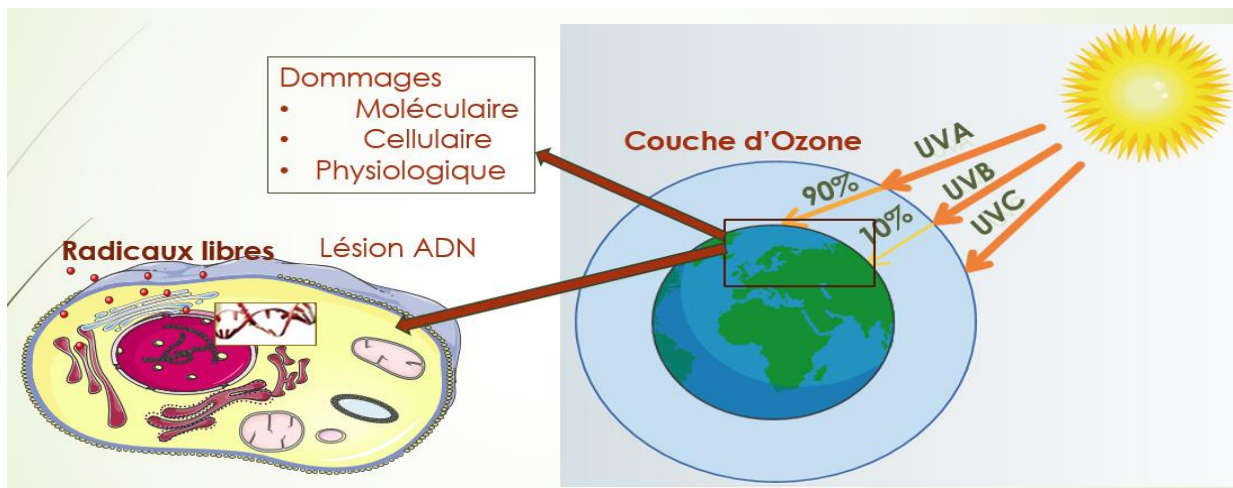


Figure 9. Les différents rayonnements UV et leur impact nocif sur la cellule.

Les UV constituent un facteur de stress important pour les cellules vivantes, ceci dit, les différentes longueurs d'onde et l'énergie associée à la subdivision UV correspondent à des effets nettement différents sur les tissus (Swann G. 2010). De plus, leur sensibilité à ces rayons demeure différente même entre deux espèces étroitement proches mais n'occupant pas le même habitat, elle est aussi variable en fonction des saisons. (H'ader D.P. 2007)

Afin de remédier à ce stress photooxydatif, de multiples espèces ont un système de photoréparation efficace contre les UV, constitué essentiellement par les mécanismes de réparation de l'ADN, des enzymes à activité antioxydante, des molécules à activité antioxydante telles que les caroténoïdes et des MAAs (mycosporine-like amino acids). (Pescheck F. 2010)

Alors que les UVA sont constants sur toute l'année, jouent un rôle crucial dans le photovieillessement, peuvent provoquer une hyperplasie épidermique ou un épaissement de la couche cornée, les UVB sont susceptibles de s'intensifier pendant l'été, phénomène amplifié par l'appauvrissement de la couche d'ozone, ce qui causerait une augmentation du risque d'exposition

de la peau aux actions délétères de ces rayonnements.(Korać and Khambholja 2011) Parmi ces réponses nocives des UVB (mille fois plus nocives que UVA), on distingue l'érythème, l'immunosuppression, l'œdème, les coups de soleil, l'hyperplasie, l'hyperpigmentation, le photovieillissement, la synthèse des cytokines inflammatoires et des métalloprotéinases et la photocarcinogénèse.(Mezghani S. 2015)

Les radiations UVB contribuent d'une manière importante dans le processus de la mort cellulaire programmée. Les mécanismes moléculaires de l'apoptose induite par les UVs comprennent essentiellement les lésions directes de l'ADN, le regroupement des récepteurs de mort à la surface de la cellule et la génération des ROS. (Lee C.H. 2013) Ce mécanisme implique d'une part les dommages à l'ADN suivis de l'activation du p53 et de la fuite du cytochrome c par les mitochondries. En effet, les UVB sont la cause principale des mutations géniques telles que C → T et CC → TT dans les séquences dipyrimidine de l'ADN (D'Errico M. 2007). Ces mutations sont responsables de la formation des produits photochimiques mutagènes entraînant des erreurs dans la synthèse de l'ADN voire même sa suppression.

D'autre part, l'UV peut également stimuler l'activation et regrouper plusieurs récepteurs de la mort de la membrane cellulaire, conduisant à l'activation de la cascade des caspases 8 et 3 et à la voie apoptotique dite extrinsèque.(Lee C.H. 2013)

Par ailleurs, la protéine p53 semble jouer un rôle crucial dans la protection cellulaire contre les UV-B, en qualité d'un facteur de transcription qui contrôle les gènes impliqués dans le cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation de l'ADN.(Henseleit U. 1997) En effet, la p53 sert de médiateur à l'apoptose dépendante des mitochondries par interaction directe avec la mitochondrie elle-même (voie intrinsèque) et / ou avec des membres de la famille BCL-2 des protéines régulatrices de l'apoptose (Assefa *et al.* 2005) conduisant par exemple à la translocation de Bax vers les mitochondries et à la libération du cytochrome c. Cette voie implique toujours l'activation des récepteurs de mort induite par UV. De plus, les UV peuvent induire une surproduction d'espèces d'oxygène réactives (ROS), non seulement endommageant plusieurs protéines et ADN structuraux et fonctionnels, mais également exerçant une libération du cytochrome c à partir de mitochondries altérées.(Lee C.H. 2013)

Les effets apoptotiques de l'UV peuvent dépendre de la dose et du type des cellules irradiées. De plus, l'implication des programmes intrinsèques et/ou extrinsèques en est aussi dépendante comme dans le cas de l'apoptose induite par UVB et UVC dans les kératinocytes humains HaCaT qui est médiée par les deux voies à la fois (Takasawa R. 2005). (Figure 10)

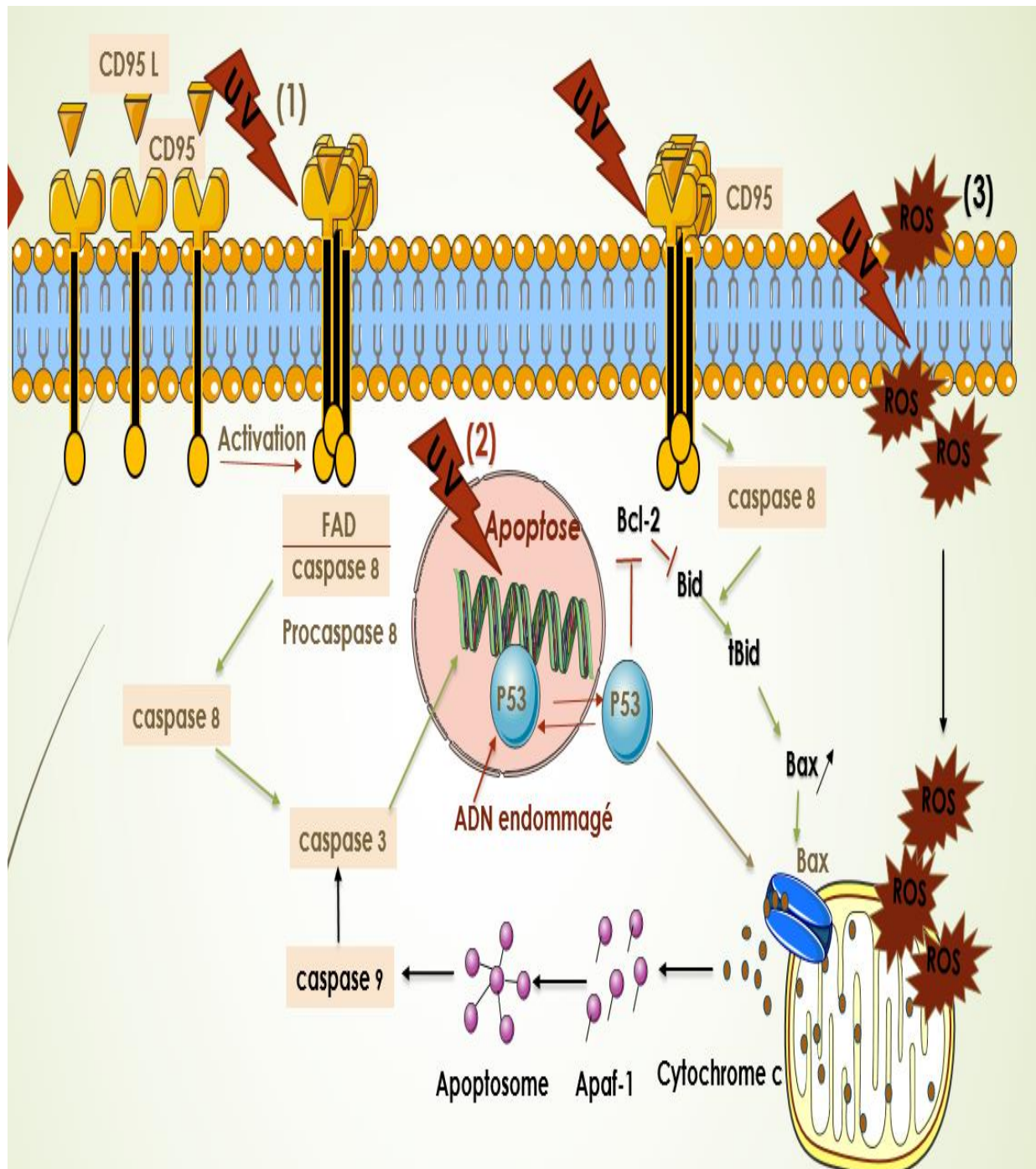


Figure 10. Mécanismes d'action des radiations UVB dans le processus de l'apoptose cellulaire.

Modifiée d'après (Lee C.H. 2013)

1 : voie extrinsèque médiée par l'activation des récepteurs de la mort CD95 ; **2** : Lésion directe de l'ADN et **3** : voie intrinsèque déclenchée par la formation de ROS, la translocation de la molécule pro-apoptotique Bax vers la membrane mitochondriale, la libération dans le cytosol du cytochrome c et l'activation de la caspase 9.

Récemment, une étude a porté sur l'évaluation des effets des UVB sur des cultures cellulaires d'astrocytes et les résultats ont montré que l'irradiation UVB diminue significativement la viabilité de la cellule et cet effet nuisible a été associé à l'accumulation des anions superoxyde O₂⁻, à une hyperpolarisation du potentiel membranaire mitochondriale, à la suppression de la respiration mitochondriale, à la libération du cyt-c, et à l'activation à la fois de la caspase-9 et -8 proapoptotiques. Tous ces effets ont été inhibés par un traitement avec le coenzyme Q10 qui a été déjà démontré comme agent protecteur des cellules neuronales contre les dommages des UVB et des ROS induites et pour améliorer le comportement neurologique chez des modèles animaux in vivo de la maladie de Parkinson.(Jing L. 2015)

IV- Les astrocytes

Les Astrocytes appelés littéralement « cellules en forme d'étoile » sont les plus nombreuses et diverses des cellules gliales dans le système nerveux central.(Kettenmann H. 2011) Les cellules gliales forment la majeure population cellulaire du système nerveux central (environ 90%) et sont subdivisées en différentes classes dont on cite principalement les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules NG2 et les cellules microgliales. Etant non émettrices de potentiels d'action, ces cellules gliales ont longtemps été considérées comme de simples cellules passives auxquelles seule la fonction de soutien aux neurones leur a été attribuée.(Barat E. 2013)

Les astrocytes, doivent leur découverte à Ramón y Cajal qui a été le premier à définir clairement la structure astrocytaire en 1888. Toutefois, l'image simple des cellules de support non-excitables du cerveau a radicalement changé au cours des vingt dernières années.(Escartin C. 2009)

De nos jours, elles sont définies comme une population de cellules hétérogènes en morphologie et en fonction. Ce sont des éléments de communication locaux du cerveau qui peuvent générer divers signaux de régulation, des structures de ponts et de réseaux qui sont autrement déconnectés les uns des autres.(Kettenmann H. 2011) De plus en plus de rôles spécifiques et essentiels dans les processus physiologiques normaux sont attribués aux astrocytes, également le nombre de maladies connues pour impliquer les astrocytes défectueux est en augmentation. En général, ces cellules astrogliales fournissent un support structural, trophique et métabolique aux neurones, modulent l'activité synaptique et leur survie est essentielle pour la réparation et la récupération du tissu cérébral endommagé.(Wang D. 2008)

1. Caractéristiques morphologiques et anatomiques des astrocytes

La morphologie des astrocytes est très hétérogène. Certains astrocytes possèdent une morphologie étoilée caractéristique, avec plusieurs prolongements provenant du soma et diversement ramifiés selon le type. Le corps cellulaire, est de taille moyenne d'environ 7-10 μm . Leur forme, semblable à une étoile, a été mise en évidence par un marquage immunohistologique de la glial fibrillary acidic protein (GFAP). (Kettenmann H. 2011)

En effet, les filaments intermédiaires largement présents au niveau des prolongements astrocytaires sont riches en cette protéine en plus de la vémentine. (Escartin C. 2009)

L'expression de la GFAP est communément utilisée comme un marqueur spécifique pour identifier les astrocytes. De plus, la glutamine synthétase, exclusivement exprimée au niveau des cellules gliales, est un autre marqueur métabolique de ces entités (Okada H. 2009)

Ces cellules sont également caractérisées par la présence de « pieds astrocytaires » par lesquels ils établissent des contacts avec les capillaires sanguins en les recouvrant totalement. (Somjen G. 1988.)

Les astrocytes sont également en contact avec les synapses qu'ils entourent avec leurs prolongements. (Spacek J. 1985)

On distingue exclusivement, deux types de cellules astrocytaires selon leur localisation au niveau de la substance grise ou blanche.

Les *astrocytes protoplasmiques* (type I) présents au niveau de la matière grise, sont caractérisés par des prolongements irréguliers, courts (~50 μm long) et élaborés et très peu de filaments intermédiaires. Ils établissent un contact avec les capillaires sanguins à travers des terminaisons appelées pieds astrocytaires (périvasculaires). Ce même type forme de multiples contacts avec les neurones élaborant donc une gaine au niveau des synapses à travers des milliers de prolongements fins. (Wang D. 2008), (Kettenmann H. 2011)

Le type II est appelé *astrocyte fibrillaire* et se retrouve au niveau de la substance blanche. Il se caractérise par des contours réguliers et des prolongements cylindriques allant jusqu'à 300 μm de long. Ces prolongements sont riches en filaments courts et denses, eux même riches en GFAP, et qui se terminent au niveau des axones des oligodendrocytes afin de promouvoir la myélinisation. (Wang D. 2008), (Kettenmann H. 2011) (figure 11)

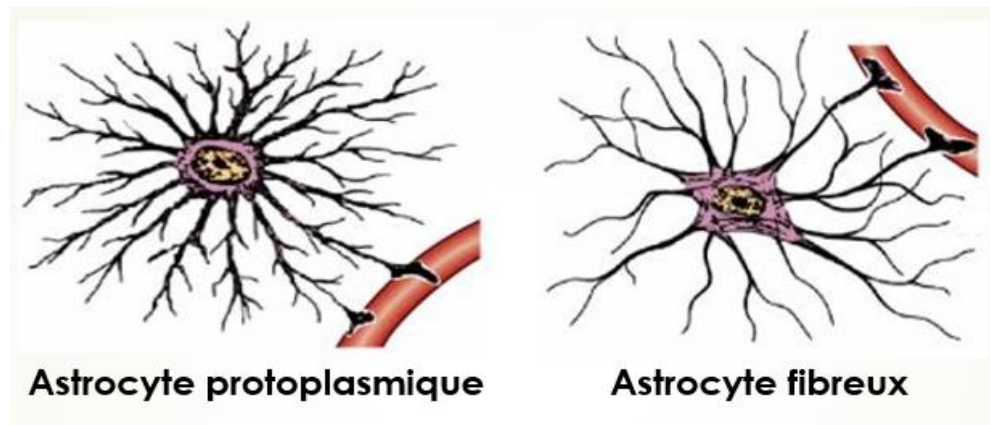


Figure 11. L'hétérogénéité morphologique des astrocytes : représentation d'un astrocyte protoplasmique et d'un astrocyte fibrillaire.

(Molofsky A. V. 2012)

Les astrocytes sont connectés étroitement entre eux par des jonctions communicantes GAP et formant ainsi un réseau de syncytium. Ces jonctions permettent des échanges métaboliques ou ioniques entre les cellules. Elles sont formées par des connexons, eux même formés par l'assemblage de six sous-unités, appelées connexines. Celles-ci permettent seulement la diffusion de molécules de taille inférieure à 1 kDa à savoir les ions, les seconds messagers, le glucose ou encore les molécules de signalisation comme l'ATP, l'IP3 et le glutamate. (Escartin C. 2009), (Giaume C. 1996)

La perméabilité de ces pores est modulable en fonction de l'activité neuronale, des variations de la concentration ionique ou encore à cause de certaines conditions pathologiques. (Molofsky A. V. 2012) De ce fait, on peut conclure que les différentes caractéristiques morphologiques et physiologiques des astrocytes laissent supposer leur importance fonctionnelle.

2. Les fonctions astrocytaires

Les cellules astrogliales ont plusieurs fonctions essentielles, y compris la promotion de la maturation neuronale en leur assurant un soutien métabolique, la synaptogenèse, le maintien de la barrière hémato-encéphalique (BHE), la survie des neurones au cours du développement, la régulation de l'angiogenèse et le maintien d'un microenvironnement viable pour les neurones et en général le maintien de l'homéostasie cérébrale. (Wang D. 2008), (Kettenmann H. 2011)

2.1. La microarchitecture du système nerveux central

Les cellules astrogliales définissent la micro-architecture du parenchyme en divisant la matière grise en unités structurales relativement indépendantes. Les astrocytes protoplasmiques

permettent de définir des domaines micro-anatomiques délimités par leurs prolongements. Dans les limites de ces domaines anatomiques, la membrane des astrocytes couvre les synapses et les membranes neuronales, de plus elle envoie ses prolongements au niveau de la paroi du vaisseau sanguin voisin afin de lui assurer un maintien trophique et métabolique. Le complexe astrocytes-neurones-vaisseau sanguin est généralement connu comme une unité neurovasculaire. (Kettenmann H. 2011)

2.2. Contrôle de l'homéostasie ionique et métabolique

Il a été reconnu que les astrocytes contrôlent les concentrations d'ions, les neurotransmetteurs et le métabolisme et régulent aussi les mouvements de l'eau. (Kettenmann H. 2011), (Wang D. 2008), (Escartin C. 2009)

Ainsi, une des fonctions importantes est la modulation de la concentration extracellulaire des ions K^+ qui augmente durant l'activité neuronale normale au niveau extracellulaire. L'évacuation de son excès est donc assurée à travers les jonctions gap au niveau du syncytium astrocytaire, ou encore via sa distribution par voie sanguine au niveau des pieds astrocytaires. Afin de tamponner le niveau extracellulaire en ions potassium, les astrocytes réalisent aussi, en plus de l'absorption passive, sa capture via des pompes Na/K/ATPases et des cotransporteurs $Na^+/K^+/Cl^-$, conduisant à une augmentation du niveau potassique intracellulaire et de l'eau. De ce fait, les canaux aquaporine, exprimés spécifiquement au niveau des astrocytes permettent de réguler le niveau aqueux. Les astrocytes participent aussi à la régulation du pH neutre via le transport des ions H^+ et HCO_3^- et ce à travers de nombreux transporteurs Na^+/HCO_3^- et Cl^-/HCO_3^- . (Barat E. 2013) (Simard M. 2004)

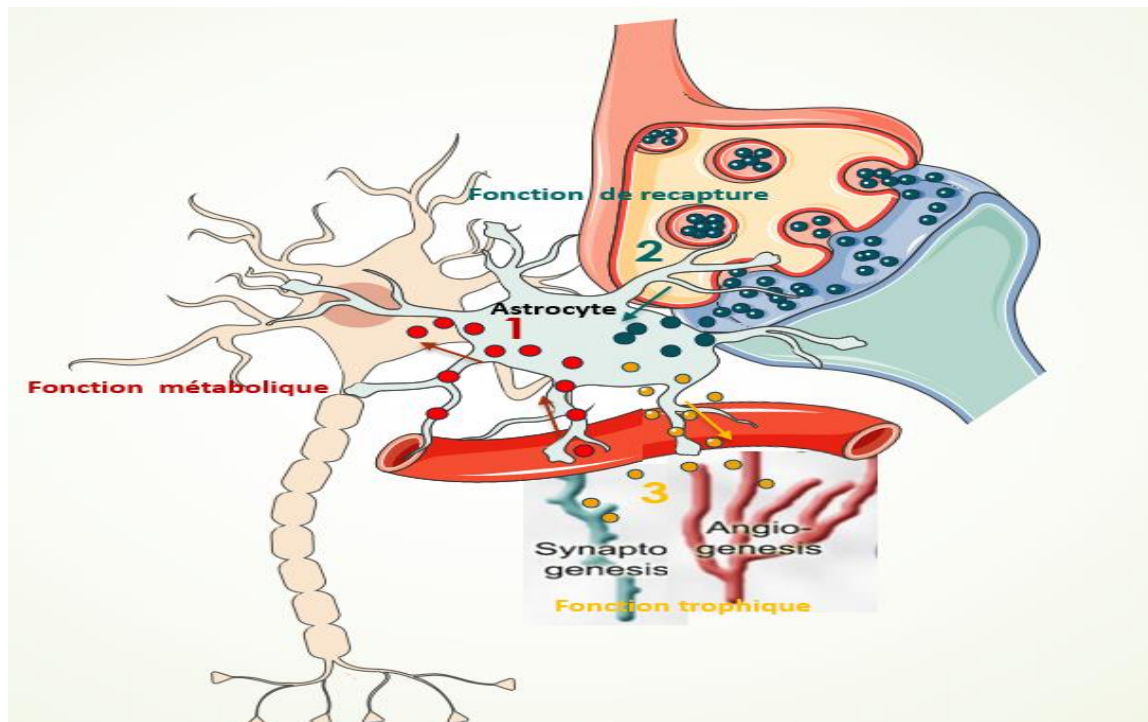


Figure 12. Figure représentative des principales fonctions des astrocytes.

(1) fonction métabolique pour les neurones, (2) fonction de recapture ionique et des neurotransmetteurs, (3) fonction trophique (Synaptogenèse, angiogenèse) et le maintien de la barrière hémato-encéphalique.

Modifiée d'après (Wang D. 2008)

Par ailleurs, les cellules astrogliales sont les éléments centraux des unités neurovasculaires ; étant celles qui intègrent les circuits neuronaux avec le flux sanguin local leur assurant, de ce fait, un soutien métabolique. Elles peuvent donc être considérées comme un pont neurovasculaire. Les astrocytes absorbent le glucose dans le sang grâce aux récepteurs spécifiques du glucose de type GLUT-1, le convertissent en lactate, ce dernier est libéré pour fournir un substrat énergétique aux neurones. Autrement, les astrocytes sont les seules cellules dans le cerveau qui peuvent synthétiser et stocker le glycogène à partir du glucose et peuvent donc servir de réservoir d'énergie. (Yu S. 2008) (Escartin C. 2009)

Une autre voie métabolique assurée par les astrocytes est celle de la navette glutamate-glutamine. En effet, le glutamate, accumulé par les astrocytes est converti en glutamine par la glutamine synthétase spécifique des astrocytes. La glutamine, étant non toxique et non détectable par les récepteurs des neurotransmetteurs, est transportée à des terminaisons présynaptiques à travers l'espace extracellulaire. Une fois, au niveau des neurones, la glutamine neuronale est de nouveau transformée en glutamate. Cette navette est couplée énergétiquement au métabolisme du glucose. De plus, le glutamate est connu pour être le principal neurotransmetteur excitateur dans le

cerveau des vertébrés. Le glutamate peut devenir une puissante neurotoxine lorsqu'il est libéré en excès provoquant ainsi la mort cellulaire neuronale dans de nombreuses lésions cérébrales aiguës et chroniques. Les astrocytes expriment donc spécifiquement des transporteurs des neurotransmetteurs afin de maintenir leur homéostasie, mais également de réguler leur action dans la fente synaptique. Parmi ces derniers, on note les transporteurs d'acides aminés excitateurs (EAAT chez les humains, GLAST /GLT-1 chez les rongeurs) qui éliminent donc 80% du glutamate extracellulaire. Cette fonction de recapture du glutamate est couplée à celle de trois ions Na^+ et H^+ , et à la sortie d'un ion K^+ . (Wang D. 2008), (Hamdi Damak Y. 2013; Y. 2013)

2.3. Contrôle de la synaptogenèse et maintien des synapses

Les astrocytes régulent la formation, la maturation, la maintenance et la stabilité des synapses contrôlant ainsi la connectivité des circuits neuronaux. Des études menées *in vivo* et *in vitro* ont démontré que la synaptogenèse dépend de la génération d'astrocytes. En effet, ces cellules sont capables d'induire une augmentation de 7 fois en nombre de synapses chez les cellules ganglionnaires de la rétine et près de 100 fois plus de leur activité synaptique. Parmi les molécules sécrétées par les astrocytes et qui influenceraient la synaptogenèse, on cite le cholestérol, indispensable pour la formation de nouvelles membranes, et les deux protéines à savoir la thrombine et l'agrine. (Kettenmann H. 2011),(Molofsky A. V. 2012),(Escartin C. 2009)

Les astrocytes peuvent aussi favoriser le maintien des synapses à travers la sécrétion de plusieurs systèmes de signalisation. On note par exemple, le $\text{TNF}\alpha$ (facteur de nécrose tumorale alpha) qui est responsable de réguler l'insertion des récepteurs du glutamate dans des membranes postsynaptiques. Bien au contraire, les astrocytes peuvent être responsables de l'élimination des synapses dans le système nerveux central à travers la sécrétion de certains facteurs ou des enzymes protéolytiques, qui attaquent la matrice extracellulaire et réduisent la stabilité du contact synaptique. Ainsi, on peut déduire le rôle modulateur des astrocytes sur la maturation et le maintien des synapses selon la situation physiologique normale ou pathologique. (Wang D. 2008)

2.4. L'angiogenèse, l'induction de la barrière hémato-encéphalique et leur maintien

Lors d'une co-culture d'astrocytes avec des cellules endothéliales, Lattera a démontré qu'il y a formation de structures de type capillaire. En effet, les astrocytes libèrent de l'acide époxyeicosatriénoïques (Shyamala B.N.), qui est une molécule mitogène et morphogène pour les cellules endothéliales. De plus, l'angiogenèse est contrôlée par une coopération étroite entre les neurones, les astrocytes, et les cellules endothéliales. En particulier, les neurones de la rétine sont

capables de libérer le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) pour stimuler la prolifération des astrocytes, qui à leur tour, stimulent la croissance des vaisseaux sanguins en sécrétant le facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires (VEGF). (Wang D. 2008),(Laterra J. 1990)

Par ailleurs, les astrocytes sont aussi connus pour réguler la formation et le maintien de la BHE, et ce en modulant les propriétés de perméabilité de cette dernière à travers la sécrétion de plusieurs signaux.(Wang D. 2008),(Kettenmann H. 2011)

2.5. Gliotransmission et modulation de la neurotransmission

En plus de leur éventuelle participation à la différenciation neuronale dite neurogenèse, les astrocytes modulent activement la neurotransmission. En effet, les astrocytes sont capables de libérer des gliotransmetteurs (glutamate, ATP, D-Sérine...) suite à un stimulus comme une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} . Ce dernier entraîne l'activation des astrocytes voisins suite à une vague calcique qui se propage à travers les jonctions gap. L'activation des astrocytes par vague calcique peut se propager et influencer même les neurones à proximité dans la mesure où l'augmentation de la $[Ca^{2+}]$ induit, entre autres, la libération du glutamate, impliqué dans la plasticité des synapses neuronales ainsi que leur activité. (Hamdi Damak Y. 2013),(Barat E. 2013)

Parallèlement, les astrocytes expriment des récepteurs aux neurotransmetteurs, en particulier au glutamate, ces derniers sont donc directement modulés par l'activité neuronale. A ce niveau, on peut introduire la notion de la synapse tripartite qui fait intervenir la terminaison neuronale présynaptique, la terminaison neuronale postsynaptique et l'astrocyte, qui enveloppe la synapse par l'intermédiaire des pieds astrocytaires. En général, la libération de facteurs dérivés des cellules gliales, peut influencer de nouveau les neurones et moduler la transmission synaptique dans une échelle de temps milliseconde à la seconde. (Escartin C. 2009)

On note par exemple que le glutamate libéré par l'astrocyte, en agissant sur l'élément neuronal post-synaptique, active les récepteurs NMDA alors qu'il induit au niveau présynaptique, la modulation de libération de neurotransmetteurs (diminution ou augmentation) selon le type de récepteur sur lequel il agit. De même, la sécrétion des autres gliotransmetteurs l'ATP, la D-sérine et le GABA peut agir sur la transmission synaptique en la potentialisant ou en réprimant l'activité neuronale.(Barat E. 2013)

3. Astrocytes et pathologies

De nos jours, le nombre de maladies connues pour impliquer des astrocytes défectueux augmente de plus en plus. En effet, et étant donné leur fonction antagoniste, ces cellules sont impliquées dans tous les types de pathologies cérébrales qu'elles soient des lésions aiguës (traumatismes ou accident vasculaire cérébral) ou des maladies neurodégénératives chroniques (comme la maladie d'Alexander, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose en plaques...). (Kettenmann H. 2011)

Par ailleurs, il est connu que les astrocytes sont plus résistants au stress oxydatif que les neurones grâce à leur stock en molécules antioxydantes de nature enzymatique à savoir la catalase, la Gpx et la superoxyde dismutase ou de nature non enzymatique comme le glutathion ou l'ascorbate (Escartin C. 2009)

Ces cellules participent activement à la protection neuronale contre l'excitotoxicité par recapture de l'excès d'ammoniac et du glutamate et les convertir en glutamine. De plus, ils participent à l'élimination de certains métaux lourds toxiques tel que le plomb grâce à leurs protéines à liaison métalliques comme les métallothionéines. (Struzynska L. 2001)

En conditions pathologiques, les astrocytes subissent diverses modifications morphologiques, métaboliques, au niveau de l'expression de leurs récepteurs et au niveau de la communication interastrocytaire. Parmi ces modifications on note l'astroglie réactionnelle caractérisée par une surexpression de la protéine GFAP et par une prolifération cellulaire, et qui est indispensable à la fois à limiter les zones endommagées (par la formation de cicatrices ou glie cicatricielle) et au remodelage post-lésionnel et la récupération de la fonction neuronale. (Hamdi Damak Y. 2013) (Liu H.T. 2003a)

Des études ont également souligné les propriétés neurotrophique et neurorégénératrice des astrocytes réactionnels en produisant des facteurs tel que le NGF (nerve growth factor) ou le CNTF (ciliary neurotrophic factor). (Hamdi Damak Y. 2013)

L'importance des fonctions occupées par les astrocytes en conditions physiologique et pathologique fait d'eux un modèle cellulaire très pertinent afin de développer de nouvelles thérapies et molécules contre le stress oxydatif. De plus, il est de plus en plus évident qu'une compréhension globale des maladies du cerveau passe par une connaissance approfondie de l'ensemble fonction et morphologie des astrocytes.

V- Protection cellulaire : système à protéines

Les espèces hautement réactives de l'oxygène provoquent de nombreux dommages notamment les lésions au niveau de l'ADN et la mort des cellules neuronales entraînant le développement de malignité et des maladies neurodégénératives. Afin de contrecarrer ces conséquences néfastes, les organismes supérieurs ont développé des mécanismes de défense ou de tolérance aux stress dont l'un des plus universels est la modification du profil d'expression des gènes codant des protéines spécialisées. Il en résulte une augmentation de la synthèse de ces protéines particulièrement protectrices. Néanmoins, la résistance des cellules aux différents stress est un caractère multigénique qui dépend de la combinaison d'un grand ensemble de gènes, de protéines et de voies de signalisations.(university 2012) En effet, c'est à travers des changements aussi qualitatifs que quantitatifs au niveau des protéines, qu'il y a une modulation de ces voies et donc une meilleure protection de l'organisme.

Dans ce cadre, On note le rôle prépondérant des enzymes antioxydantes à savoir la catalase, la superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase (détaillé dans le chapitre dernier). Toutefois, il existe aussi une panoplie d'autres protéines jouant un rôle central dans la protection cellulaire telles que la famille des protéines chaperonnes HSP (heat shock protein), la ferritine, la mélatonine et la cystéine synthase (Jaspard E. 2012)... D'autres protéines de signalisation participent également dans les mécanismes de régulation mis en place en réponse aux stress telles que la calmoduline, les protéines G ou les protéines 14.3.3(university 2012)

Dans cette partie, et en adéquation aux résultats décrits ultérieurement (partie résultats et discussion) on va présenter les propriétés de quelques-unes de ces protéines.

1. La cystéine synthase

La cystéine synthase [O-acétyl-L-sérine (thiol) lyase], qui est responsable de l'étape terminale de la biosynthèse de la cystéine, catalyse la formation de L-cystéine à partir de O-acétyl-L- sérine (OEA) et de sulfure d'hydrogène.(Rausch T. 2005)

Le produit final de cette réaction, la cystéine ($C_3H_7NO_2S$), représente un acide aminé essentiel qui intervient au niveau des activités catalytiques ainsi qu'à celui de la structure de nombreuses protéines ubiquitaires et essentielles.(Lithgow K. 2004) Cet acide aminé est la première molécule engagée dans le métabolisme des plantes contenant du soufre et il est le donneur de sulfure pour

la production de méthionine, du glutathion (GSH), des phytochélatines, des résidus fer-soufre, des vitamines, des cofacteurs et de multiples métabolites secondaires. (Salbitani G. 2010)

D'une façon plus générale, et dans de nombreux organismes ces molécules à base de cystéine jouent un rôle majeur dans le maintien d'un environnement réducteur intracellulaire et la protection contre le stress oxydatif grâce au groupement thiol que contient cet acide aminé. (Lithgow K. 2004)

La biosynthèse de la cystéine est assurée par deux étapes successives qui impliquent deux enzymes différentes à savoir la serine acetyltransferase (Satpati G. 2011) et la *O*-acetylserine (thiol) lyase (OAS-TL). Ces deux dernières forment ensemble le complexe enzymatique appelé la cystéine synthase. (Wirtz M. 2001) Les détails moléculaires de la façon dont OAS-TL et SAT forment le complexe hetero-oligomérique ne sont pas clairs. Un hexamère SAT (MW 180kD) et deux dimères de OAS-TL (70 kD chacun) comprennent le complexe chez les plantes comme chez les bactéries. (Francois J. A. 2006)

D'abord la sérine est activée par l'acétyl-CoA pour former O-acétyl-sérine (OEA), catalysée par la serine acétyltransférase (SAT, EC 2.3.1.30) ensuite l'O-acétyl-sérine (thiol) lyase (OAS-TL, EC 4.2.99.8) insère le sulfure dans l'OEA pour obtenir la cystéine.



Tandis que la SAT est exclusivement trouvée en association avec l'OAS-TL, formant le complexe de cystéine synthase, cette dernière peut aussi exister en tant que dimère libre afin de transformer, en présence du sulfure, l'EOA intermédiaire en cystéine. (Francois J. A. 2006)

Chez les plantes supérieures, la distribution subcellulaire de SAT et OAS-TL semble confirmer que la cystéine est synthétisée dans plusieurs compartiments cellulaires à savoir les plastides, les mitochondries et le cytosol. Par contre, chez les algues unicellulaires comme dans *Chlamydomonas reinhardtii*, la cystéine semble être synthétisée uniquement dans les chloroplastes.

La protéine SAT se compose de deux domaines d'interaction : le premier est un domaine central homomérique SAT-SAT et le deuxième est un domaine C-terminal SAT-OAS-TL pour heteromerization. Associées ensemble dans le même complexe, les deux enzymes fonctionnent différemment. En effet, la SAT s'active afin d'assurer une meilleure affinité aux substrats ainsi

qu'un plus haut Vmax pour la production de l'OEA alors que l'OAS-TL est essentiellement inactivée et agit en tant que régulatrice de l'activité SAT dans le complexe. (Wirtz M. 2001)

Il a été démontré par des études in vitro, que le taux de synthèse de la cystéine dépend de l'association / dissociation des deux enzymes. (Wirtz M. 2001) Ces deux phénomènes sont à leur tour régulés par la disponibilité de sulfure et de l'OEA dans le milieu comme le montre la figure suivante. (Francois J. A. 2006)

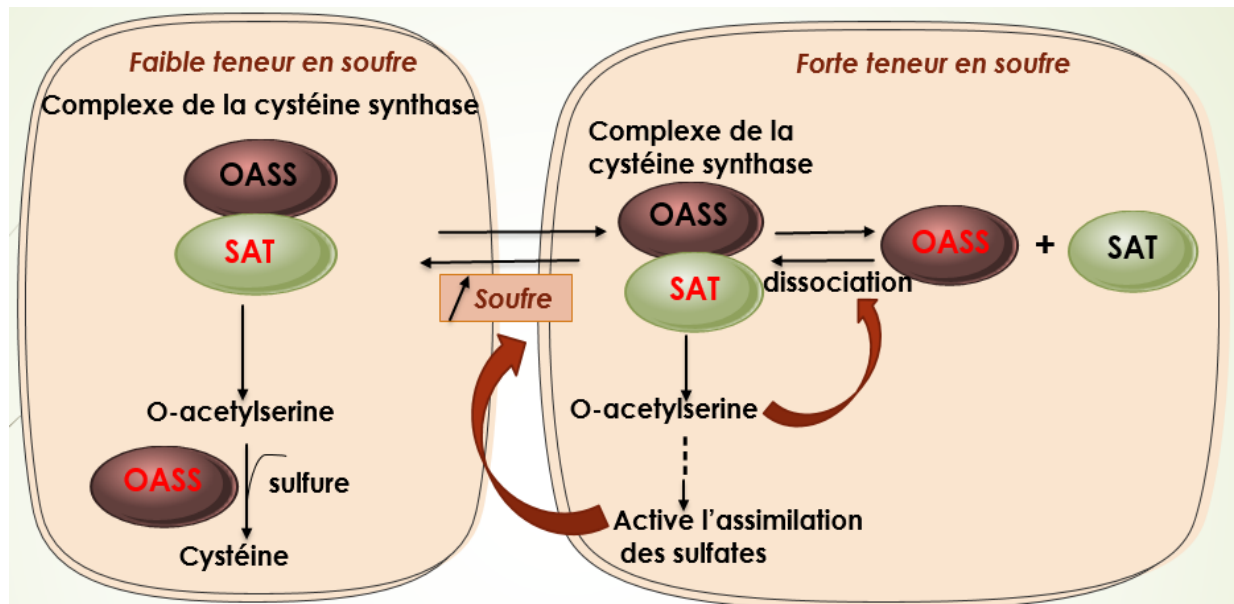


Figure 13. Modulation de la synthèse de la cystéine par le complexe de la cystéine synthase.

La fraction enzymatique active du complexe Sc est illustrée en rouge et la forme inactive en noir.

Modifiée d'après (Francois J. A. et al., 2006)

D'après Yang et al, il a été démontré que la cystéine synthase pourrait être une protéine clé dans la réponse et l'adaptation du riz au stress. En effet, d'après cette étude la cystéine synthase est la seule protéine régulée à la hausse suite à tout stress induit par l'aluminium ce qui témoigne de son implication dans le système de résistance au stress. (Yang Q. 2007a)

Une étude très récente a confirmé que la surexpression de la cystéine synthase ainsi que l'augmentation de son activité chez le parasite *Leishmania braziliensis* contribue à sa survie dans des conditions de stress oxydatif induit par H_2O_2 . Il est à noter qu'une capacité grandement accrue de *L. braziliensis* surexprimant la CS pour résister au stress oxydatif et nitrosatif a été constatée par comparaison aux cellules non transfectées ce qui démontre l'implication de cette enzyme dans le système de défense antioxydant. (Romero I. 2015)

Par ailleurs, des essais réalisés sur de plantes de tabac transgéniques (*Nicotiana tabacum*), ayant développé des activités de CS améliorées dans le cytosol et dans les chloroplastes, ont montré une tolérance hautement élevée au dioxyde de soufre et au sulfite toxique par rapport aux plantes non transgéniques. En outre, les feuilles des plantes transformées ont présenté une augmentation de la résistance au paraquat, un herbicide générateur de ROS. (Noji M. 2001)

Ceci a été également consolidé par une étude faite sur des cultures d'algue *Chlamydomonas reinhardtii*. En effet, l'ajout d'une concentration de 300 μM du cadmium dans le milieu de culture s'avère toxique aux cellules. Cette toxicité se traduit par l'inhibition de la croissance et de la productivité et un changement dans la composition élémentaire de la biomasse, caractérisé par une augmentation significative du soufre, une inhibition significative du taux d'absorption du nitrate par les cellules, une stimulation du taux d'absorption de sulfate et surtout une augmentation des activités SAT et OASTL, les deux composantes enzymatiques du complexe Cystéine synthase afin de fournir la cystéine requise pour contrecarrer cette toxicité. (Domínguez M. J. 2003)

2. La calmoduline

C'est une protéine ubiquitaire et multifonctionnelle exprimée dans toutes les cellules eucaryotes. Cette protéine de liaison au calcium est médiatrice d'un grand nombre de processus de signalisation. En effet, CaM joue un rôle central dans la régulation d'une myriade de fonctions cellulaires par interaction avec des protéines cibles multiples. Ceci dit, la liaison au Ca^{2+} est requise pour l'activation de cette calmoduline. Ce dernier participe à un système de signalisation intracellulaire en agissant comme un second messager diffusible aux stimuli initiaux et ce en se liant à ces diverses protéines cibles. Il est à noter que la plupart de ces protéines sont incapables de se lier au calcium elles-mêmes, et doivent d'abord se lier à la calmoduline qui joue le rôle de capteur de calcium et donc de transducteur de signaux. (biochimej 2016c; Cheval C. 2013b; wikipedia 2016b)

La CaM se compose de 148 acides aminés (16,7 kDa) et est codée par plusieurs gènes. C'est une protéine hautement conservée avec un taux d'identité très élevé (65%). (biochimej 2016b) Elle possède deux domaines globulaires approximativement symétriques et séparés par une hélice centrale de 7 tours. Les domaines sont constitués chacun d'une paire de motifs EF-hand (hélice-boucle- hélice). Ces boucles situées entre les hélices alpha sont des régions flexibles et incluent des sites de liaison pour un total de quatre ions Ca^{2+} . (Li S. 2014c; wikipedia 2016b)

La calmoduline possède des caractéristiques structurales qui lui confèrent la capacité de se lier à une grande variété de protéines cibles et d'intervenir ainsi dans le contrôle de nombreux processus physiologiques. Ceci est assuré grâce à la grande flexibilité de la protéine et notamment de ses régions de liaisons ainsi qu'à sa grande capacité à se lier à différentes formes protéiques et à des séquences non spécifiques d'acide aminés. En effet, une fois la liaison des ions calcium à l'EF-hand est établie, les deux têtes globulaires de la calmoduline changent de conformation, ce qui expose les résidus hydrophobes à la surface. Ces résidus hydrophobes sont souvent impliqués dans l'interaction avec d'autres protéines. Il est à noter que la liaison au Ca^{2+} provoque un changement conformationnel plus important au niveau du domaine N-terminal qu'au niveau du domaine C. (Berchtold M.W. 2014; biochimej 2016c)

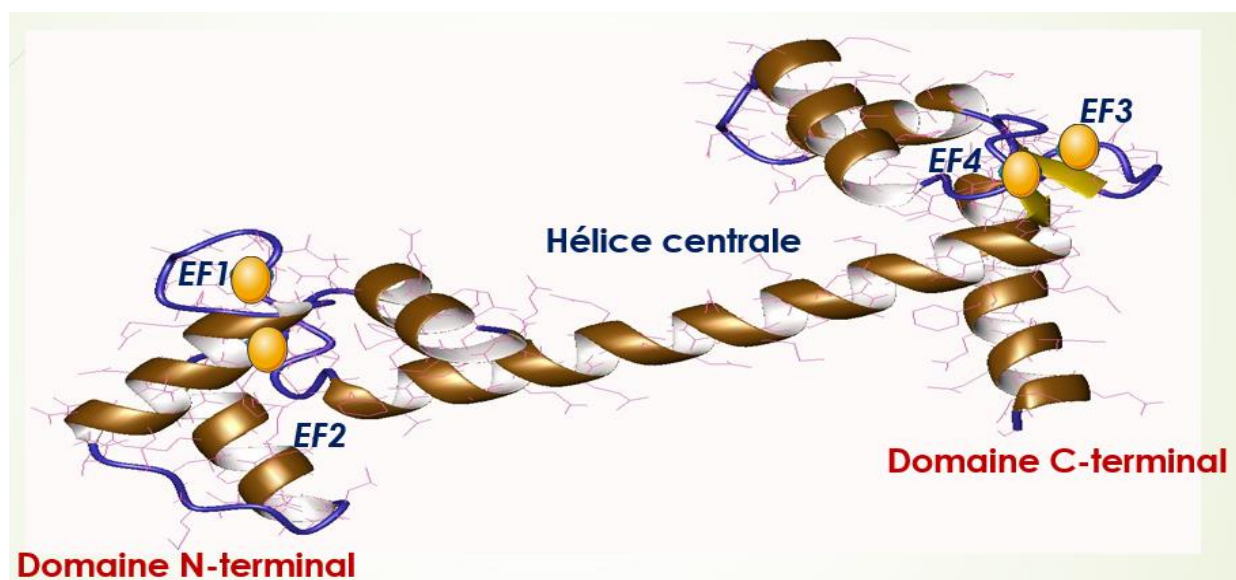


Figure 14. Schéma correspondant à la structure de la calmoduline liée aux ions Ca^{2+} .

Modifiée d'après (biochimej 2016b)

La calmoduline a initialement été découverte par Wai Yiu Cheung en 1970 (biochimej 2016b) et depuis les informations se sont accumulées concernant son rôle prépondérant dans le contrôle de nombreux processus physiologiques tels que le mouvement cellulaire, l'architecture et la fonction du cytosquelette, la prolifération cellulaire, l'inflammation, l'apoptose, l'autophagie, l'homéostasie métabolique, la rotation des phospholipides, le repliement des protéines, la phosphorylation /déphosphorylation des protéines, le transport des ions, le contrôle osmotique, le processus de reproduction, la contraction musculaire, l'expression des gènes, la mémoire à court et à long terme et la réponse immunitaire. (Berchtold M.W. 2014; Cheung W.Y. 1970; Chin 2000)

Afin de pouvoir assurer autant de fonctions, La CaM est exprimée dans de nombreux types cellulaires et peut avoir différentes localisations subcellulaires, y compris le cytoplasme et ses organites, ou associée aux membranes plasmiques mais elle est toujours localisée au niveau intracellulaire. (biochimej 2016b) Cette grande diversité fonctionnelle est attribuée sans doute à la capacité de cette protéine à interagir avec plusieurs centaines de protéines cibles et à moduler de façon différente leurs activités. Effectivement, cette protéine peut interagir avec des protéines membranaires telles que les canaux ioniques, les pompes, les jonctions gap, ou avec les protéines de différentes voies de signalisation via les RCPG comme l'adénylate cyclase et la phospholipase, ou encore avec des enzymes cytoplasmiques à savoir les CaM-kinases, les phosphatases, la glycogène synthase, ...(Berchtold M.W. 2014; biochimej 2016b)

L'implication de la calmoduline dans la prolifération cellulaire a d'abord été élucidée grâce au modèle cellulaire de *saccharomyces cerevisiae* létal où l'expression de CaM a été perturbée par inactivation de son gène unique. Fait intéressant, l'expression du N-terminal ou les moitiés C-terminales de la CaM dans la souche mutante était suffisante pour sauver la viabilité des cellules, bien que cela dépende de la température.(Sun G.H. 1991) En outre, la répression conditionnelle du gène de la CaM chez la levure *S. pombe* ou la manipulation génétique de *A. nidulans* ou enfin la mutagenèse insertionnelle du gène de la CaM chez le pathogène humain *Neoformans Cryptococcus*, ont bloqué la prolifération de ces organismes et arrêté le cycle cellulaire à la phase G2. (Kraus P.R. 2005; Lu K.P. 1992; Takeda T. 1987)

De même, il a été noté que la CaM se concentre au niveau des régions de la croissance cellulaire et qu'elle est associée aux filaments d'actine au cours de la progression du cycle cellulaire. La liaison aux ions Ca^{2+} est cependant indispensable puisque toujours chez *S. cerevisiae*, des mutations qui bloquent la liaison Ca^{2+} à CaM conduisent à la perte de la viabilité.(Sun G.H. 1991)

D'autres études ont aussi rapporté que dans le cas de cellules de mammifères recombinantes sur lesquelles un vecteur viral a été inséré et conduisant à la surexpression de CaM, une augmentation de la prolifération cellulaire a été observée à travers le raccourcissement de la durée de la phase G1 du cycle cellulaire et de la mitose. Inversement, la prolifération et le cycle cellulaire ont été arrêtés dans une culture in vitro des cellules épithéliales de souris après une régulation négative de CaM avec des ARN antisens CaM.(Berchtold M.W. 2014; Means A.R. 1988a)

D'après la bibliographie, on peut donc affirmer que La CaM joue un rôle central dans la régulation de la croissance des organismes eucaryotes, et que les mécanismes de

phosphorylation /déphosphorylation des protéines dépendante du complexe $\text{Ca}^{2+} / \text{CaM}$ sont la clef de la régulation de la prolifération cellulaire.(Berchtold M.W. 2014)

La calmoduline intervient aussi dans la protection cellulaire contre le stress et ce en modulant l'activité d'une panoplie de protéines notamment les enzymes antioxydantes tel est le cas de la catalase chez les plantes.

D'après Afiyanti et Chen, le traitement des tiges du maïs avec différentes concentrations de CaCl_2 pendant 8 h ont donné lieu à une augmentation de l'activité totale de la CAT d'une manière dépendante de la dose. Pareillement chez le blé, le durcissement des plantules avec du CaCl_2 a permis une augmentation de cette activité ainsi qu'une meilleure protection contre le stress thermique en assurant une meilleure survie. (Afiyanti M. 2014)

Il est évident que la catalase fonctionne comme un piègeur cellulaire pour H_2O_2 , et est donc essentielle pour la tolérance au stress notamment le stress oxydatif. Par ailleurs, l'ajout d'un inhibiteur de la calmoduline à noter la chlorpromazine a radicalement supprimé l'activité enzymatique totale de la principale isoforme de la catalase et cette suppression a été atténuée par l'ajout de la calmoduline exogène de la patate douce (SPCAM). (Afiyanti M. 2014) L'association de CaM et du CaCl_2 dans la modulation de l'activité de la catalase a été démontrée grâce à plusieurs études comme par exemple le cas des feuilles de riz où une déficience en calcium/calmoduline a significativement réduit la teneur en glutathion ainsi que l'activité de la CAT.(Liu H.T. 2003a) De plus, ceci a entraîné une toxicité accrue au Cadmium par rapport aux feuilles contrôle (Cho S.C. 2012) et d'une façon générale cette association semble favoriser une tolérance accrue à tout type de stress comme le stress salin dans les feuilles de moutarde(Tuteja N. 2008), la chaleur et le refroidissement dans le cas d'*Amaranthus lividus* et enfin le stress oxydatif dans le cas des feuilles de maïs(S. 2009). En plus, de son implication dans la réponse aux différents stress et dans la réponse immunitaire chez les plantes, ceci a aussi été confirmé chez les crabes chinois à mitaine.(Li S. 2014a)

3. L'actine

L'actine est une protéine bi-globulaire de 5,46 nm de diamètre, constituée d'un polypeptide de 375 acides aminés dont l'un des plus rares : la 3-méthyl histidine. C'est une protéine ubiquitaire et elle représente jusqu'à 15 % de la masse totale protéique des cellules.(Wikipedia 2016a) Par ailleurs, c'est l'une des protéines les plus hautement conservées du cytosquelette des cellules eucaryotes, qui sont généralement codées par les familles multigéniques.(Zhu L. 2013a)

Elle participe à plusieurs interactions entre les protéines plus que toute autre protéine connue et existe sous deux formes différentes à noter la forme monomérique globulaire (G-actine) qui se trouve toujours associé à un ion calcium ou magnésium et un nucléotide de type ATP ou ADP selon l'état de phosphorylation du nucléotide et la forme filamenteuse hélicoïdale (F-actine) qui n'est autre qu'un polymère d'actine G. (Dominguez and Holmes 2011; Wikipedia 2016a)

Ces propriétés ainsi que la grande facilité de l'actine à faire la transition entre ses deux formes lui confèrent le rôle essentiel dans de nombreuses fonctions cellulaires, allant de la motilité cellulaire et le maintien de la forme des cellules et de la polarité à la régulation de la transcription. (Dominguez and Holmes 2011) Par ailleurs, la majeure partie de tout le transport intracellulaire dans des cellules végétales a lieu sur des filaments d'actine. Cette protéine interviendrait également au niveau de la division cellulaire, de la formation des jonctions cellulaires y compris celle des neurones. (Dominguez and Holmes 2011; Zhu L. 2013a)

Récemment, il a été démontré que le cytosquelette d'actine contribue à la résistance du poivre au stress causé par le pathogène *Puccinia striiformis*. En effet, en suivant les niveaux d'expression des gènes de la protéine de liaison à l'actine Rho, la profiline et le facteur de dépolymérisation de l'actine (ADF) par qRT-PCR dans des feuilles de poivre inoculés avec *Puccinia striiformis* (Pst), les résultats prouvent une induction avec différents niveaux d'expression après l'inoculation avec Pst. Par ailleurs, un inhibiteur de polymérisation de l'actine latrunculine B a été utilisé pour révéler l'implication de l'actine dans les réactions de défense du poivre contre l'infection Pst. Ce traitement entraînerait une réduction de l'incidence de l'accumulation de H₂O₂ et de ce fait une faible résistance à l'infection. Ceci suggère donc que le cytosquelette d'actine est susceptible de contribuer à la résistance du poivre contre l'infection Pst. (Wang J. 2015a)

De plus, d'autres études ont prouvé que la perturbation du cytosquelette d'actine conduirait à l'activation des protéines kinases impliquées dans les réponses et la défense aux différents stress comme le stress osmotique, thermique et le froid. (Samaj J. 2002; Sangwan V. 2002) Tout cela impliquerait que la perturbation du cytosquelette d'actine agit comme mécanisme de surveillance, ce qui provoque donc l'activation de ces voies de signalisation. (Staiger C.J. 2009)

4. Les HSP

Les protéines du choc thermique (heat shock proteins) ou les protéines du stress, sont des protéines chaperonnes très conservées ayant pour rôle crucial la protection contre le stress,

le maintien et la régulation des fonctions des protéines auxquelles elles sont associées. (David J.C. 2011)

En bref ces protéines assurent plusieurs fonctions incluant : le repliement des protéines cellulaires, leur chaperonnage, leur transport et leur adressage membranaire, mais aussi l'apoptose et la prolifération, l'équilibre redox, les réponses inflammatoires ou encore l'intégrité des jonctions intercellulaires. (Arrigo A.P. 2005) (Arnal M. 2016)

Selon leur taille et masse moléculaire, trois grandes catégories des protéines du choc thermique ont été décrites à savoir : 27 kDa, 70 kDa et 90 kDa. (David J.C. 2011)

Ces protéines sont exprimées suite à un stress de nature physique tels que l'augmentation de la température, le choc osmotique, le rayonnement UV, l'exposition à des métaux lourds ou de nature physiologique causée entre autres par une ischémie, une infection virale, ou une carence des nutriments, ou enfin de nature chimique comme l'alcool, les pesticides organophosphorés, les agents oxydants... (Biochimej 2016d; Wikipedia 2016c) Et d'une façon générale, leur expression est générée suite à toute situation qui nuit à la survie cellulaire.

Afin de répondre à ces conditions de stress, le facteur de transcription HSF-1 (heat shock transcription factor-1), initialement présent et inactif comme un promoteur des gènes codant pour les Hsp, subit une étape de phosphorylation et de trimérisation, migre du cytoplasme vers le noyau, se lie aux sites HSE sur l'ADN et active la transcription des gènes spécifiques. (Biochimej 2016d) Le rôle prépondérant qu'exercent les HSP en tant qu'anti-cytotoxique et protecteur contre tout type de stress a été valorisé par de nombreuses études. En effet, une surexpression des gènes Hsp70 ou Hsp27 chez des souris mutantes augmenterait leur résistance au stress oxydatif. (Arrigo A.P. 2005)

Il est connu que les HSP sont responsables du repliement des protéines et en particulier celles ayant subi une altération conformationnelle afin qu'elles retrouvent leur forme native renaturée. Autrement, et dans le cas de dommages irréversibles, elles sont capables de stimuler les voies de dégradation nécessaires à l'élimination des protéines aberrantes. (Arrigo A.P. 2005; Timperio A. M. 2008)

Une étude récente a porté sur Les HSP inductibles dans l'épithélium intestinal. Celles-ci posséderaient des propriétés protectrices du stress inflammatoire et oxydant. Il est à noter qu'un défaut de régulation d'un peptide HSP pourrait être à l'origine du développement incontrôlé de l'inflammation intestinale. Néanmoins, cette protection semble dépendante des bactéries digestives présentes ainsi que de la nature des composés alimentaires ingérés. Les HSP seraient

capables d'exprimer des propriétés anti-inflammatoires en stimulant l'expression de la protéine I κ B α de la voie de signalisation NF κ B. (Arnal M. 2016)

Concernant les propriétés prolifératrice et anti-oxydante, il est à noter que l'HSP27 et l'HSP70 sont toutes les deux anti-apoptotiques, agissant par de nombreuses voies telles que l'inhibition des protéines pro-apoptotiques, la protection des protéines de survie telles que certaines kinases, la réduction de la production des espèces oxygénées réactives, la prévention des fuites mitochondriales du cytochrome c, l'activation de diverses enzymes anti-oxydantes (glutathion réductase, peroxydase). (Arrigo A.P. 2005; Arnal M. 2016)

La figure ci-dessous est un aperçu de quelques protéines de stress essentiellement les HSP et leur expression différentielle dans la cellule.

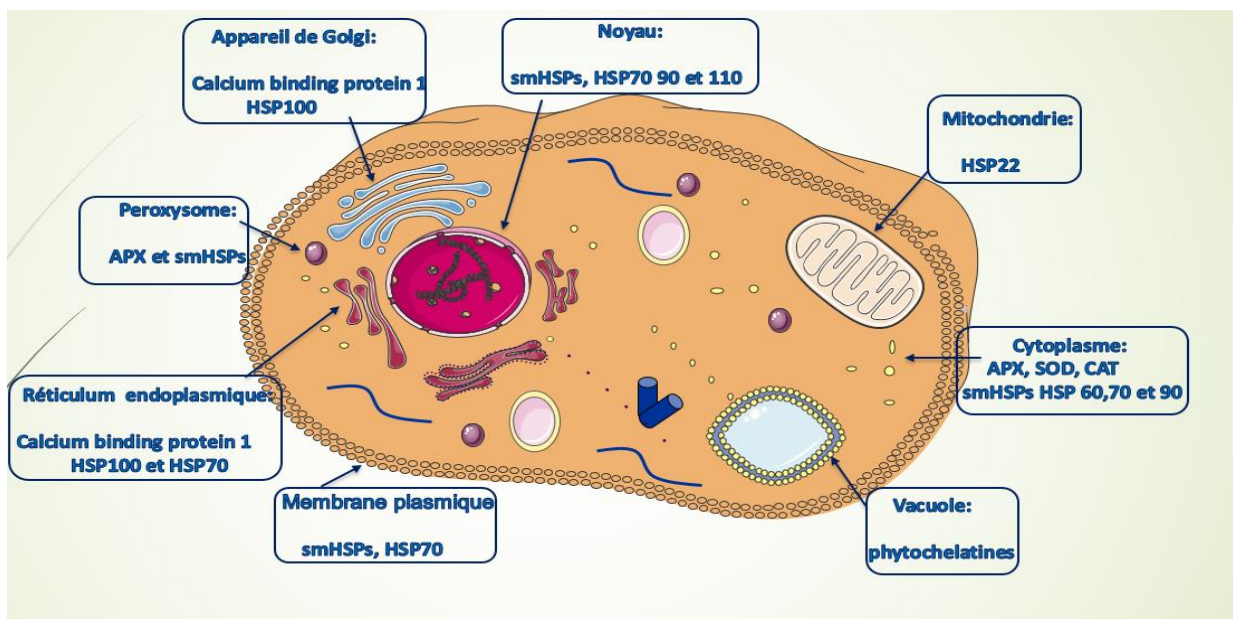


Figure 15. Figure récapitulative de quelques protéines de défense au stress selon leur localisation cellulaire.

Modifiée d'après (Biochimej 2016d)

Pour conclure, on peut dire que la plupart des HSP ont des effets cytoprotecteurs importants en maintenant l'homéostasie de la cellule et ce à 3 niveaux différents, d'abord en maintenant les protéines dans leur conformation fonctionnelle, ensuite en assurant le repliage des protéines dénaturées pour retrouver leur conformation fonctionnelle et enfin l'élimination des polypeptides non fonctionnels, et nocifs. (Timperio A. M. 2008)

5. Rôle des peptides et des acides aminés dans la protection cellulaire

Il a été démontré que le mécanisme cellulaire de tolérance au stress fait intervenir un réseau complexe de protéines par lequel plusieurs voies se chevauchent et interagissent les unes avec les autres afin d'établir un état d'homéostasie générale. (Timperio A. M. 2008)

Autre que les protéines, ces effets cytoprotecteurs et essentiellement antioxydants, sont aussi assurés par des hydrolysats protéiques ou encore des peptides linéaires, des peptides cycliques, des dérivés de peptides, des acides aminés et des analogues d'acides aminés. En effet, plusieurs études ont également démontré que les peptides ont une activité antioxydante sensiblement supérieure à celle des protéines intactes, étant donné que la rupture de leur structure tertiaire permet d'obtenir une meilleure accessibilité aux résidus d'acides aminés piègeurs de ROS. (Elias R. J. 2008; Pádraigín A. 2011)

A ce fait, plusieurs peptides d'origine marine ont fait leur preuve en tant qu'antioxydants à grande efficacité. On note à ce titre le cas des peptides issus des algues *Chlorella Vulgaris*, *Undaria pinnatifida*, *Navicula incerta*, *Spirulina platensis*, *Porphyra yezoensis*, *Pavlova lutheri*, *Ancanthophora delilei*, *Palmaria palmate*, ... (Elias R. J. 2008; Samarakoon K. 2012; Sarmadi B. H. 2010)

De même, Wang déclare que la libération des peptides essentiellement de faible masse moléculaire ou des acides aminés par hydrolyse enzymatique par protéases pourrait contribuer à l'amélioration de leurs activités antioxydantes. (Wang W. 2010) Consolidant le même point de vue, des études in vitro testant l'effet d'un hydrolysats protéique relatif à l'algue brune *Ishige okamurae* a montré un effet cytoprotecteur de premier plan contre les dommages de l'ADN induits par H₂O₂ sur les lymphocytes humains de manière dose-dépendante. (Samarakoon K. 2012)

Une étude récente rapporte que les propriétés antioxydantes des peptides sont plus liés à leur composition, leur structure, leur conformation et à l'hydrophobicité et que Tyr, Trp, Met, Lys, Cys, ainsi que les acides aminés avec des résidus aromatiques sont parmi les acides aminés qui améliorent ces propriétés. En outre, le poids moléculaire (MW) des peptides antioxydants peut influencer leur activité et que cette dernière était favorisée en présence de peptides de faible PM < 1500 Da. (Sila A. 2016)

Toutes ces propriétés intéressantes témoignent de l'importance des fonctions biologiques assurées par les protéines et les peptides des algues marines et que ces molécules pourraient être utilisées dans des potentialités futures, y compris, les produits pharmaceutiques, cosmétiques et les aliments fonctionnels. Néanmoins, une meilleure connaissance et compréhension de la relation structure fonction de ces protéines et peptides s'avère indispensable. D'un autre côté, les informations sur la séquence du génome ne suffisent pas à révéler les faits concernant la fonction des gènes, la biologie de leur développement et les mécanismes à adapter en cas de contraintes. Pour toutes ces raisons, des approches plus globales qui incluent des analyses quantitatives et qualitatives des produits d'expression génique sont nécessaires aux niveaux transcriptome, protéome et métabolome. (Suarez-Jimenez G.M. 2012; Timperio A. M. 2008)

VI- La protéomique

Au cours des deux dernières décennies, l'émergence de la discipline de la protéomique a permis une meilleure connaissance du monde des protéines désigné par le terme "protéome". Ce dernier inclut l'identification de la totalité des protéines exprimées par un génome donné et à un moment donné. Ce génome pourrait être issu d'un organisme, d'un fluide biologique, d'un organe, d'une cellule ou même d'un compartiment cellulaire. (Inserm 2013)

La protéomique permet donc d'étudier leur fonction, leur localisation dans les compartiments cellulaires, leur éventuelle modification post-traductionnelle, leur quantité ainsi que les interactions protéines-protéines. (picardie 2016)

De part sa complexité, le protéome est loin d'être une entité statique, et est l'objet de modifications permanentes. En effet, un même génome peut conduire à plusieurs protéomes différents en fonction des cellules ou tissus étudiés, du temps, de leur environnement, de leur état de développement, de leur état physiologique et pathologique. (I.D. 2016; picardie 2016)

La protéomique devient un outil puissant incluant des approches d'analyses qualitatives (identification des protéines et de leurs modifications post-traductionnelles) et quantitatives des produits de l'expression génique. Ces approches permettent d'analyser les voies biochimiques et les mécanismes moléculaires impliqués dans les grandes fonctions cellulaires. (Brosson D. 2006; Timperio A. M. 2008) Il est par exemple possible d'étudier des voies de signalisation impliquées dans des processus biologiques ou dans l'apparition de maladies. (Brosson D. 2006) Parmi ces approches on note:

La dimension descriptive

C'est l'établissement du profil d'expression globale des protéines sous leurs formes variées dans un type cellulaire ou un liquide biologique. (Bruley C. 2010)

La dimension quantitative

Cette approche implique la détermination des abondances relatives ou absolues des protéines d'un échantillon complexe selon la technique utilisée. (Bruley C. 2010)

La dimension intégrative

Cette dimension comprend non-seulement l'identification et la quantification des protéines, mais aussi la détermination de leur localisation et donc une meilleure compréhension de leur rôle dans la biologie de la cellule, leurs modifications post-traductionnelles, les interactions protéine-protéine, leurs activités et finalement leurs fonctions. (Bruley C. 2010) L'étude de celle-ci, traduit les différences d'expression des protéines en fonction des conditions environnementales. En effet, ces modifications induisent des variations d'expression de plusieurs protéines, spécifiques à chaque cellule ou communes à différents types cellulaires. Le protéome constitutif est la ligne de base des études fonctionnelles et l'analyse des modifications post-traductionnelles (MPT) prend ici une importance toute particulière. A titre d'exemple, les enquêtes protéomiques comparatives ou interactives des organismes, avant et après des contraintes spécifiques, tel que le stress, nous permettent d'obtenir des informations sur la façon dont les mécanismes de défense sont adoptés à partir de ces organismes. (Baudin B. 2011)

Il est de nos jours évident qu'en plus de la génomique, la protéomique joue un rôle essentiel de liaison entre le transcriptome et le métabolome et qu'en regroupant toutes ces informations ensemble qu'on pourrait dresser le mécanisme adapté par les cellules afin de résister à toute anomalie intra ou extracellulaire comme la réponse au stress. (Biochimie 2016a)

1. Différentes méthodologies de la protéomique

Ces méthodologies se divisent en techniques expérimentales, mais également en techniques d'analyse puissantes des données. (picardie 2016)

Les techniques expérimentales reposent sur l'extraction des protéines d'un échantillon donné, leur séparation et leur identification par spectrométrie de masse (figure 16).

L'extraction doit se faire dans de bonnes conditions afin de garantir un bon rendement, une bonne purification et d'éviter la dégradation des protéines chose qui pourrait compliquer leur

identification. Le tampon d'extraction joue donc un rôle crucial dans la réussite de cette étape.(Brosson D. 2006)

La deuxième étape permet de **séparer les protéines** en fonction de leurs caractéristiques physiques ou chimiques ou en fonction de leurs affinités pour un ligand. Pour ce, il existe diverses méthodes de séparation dont la plus conventionnelle est l'électrophorèse (par exemple l'électrophorèse SDS PAGE, l'électrophorèse bidimensionnelle, l'électrophorèse différentielle sur gel [DIGE]). Souvent les méthodes électrophorétiques sont couplées à des méthodes chromatographiques afin d'optimiser la résolution de la méthode de séparation. Après révélation des protéines dans les gels, l'analyse d'image des gels, les spots protéiques sont récupérés et digérés par des protéases.(Biochimej 2016a)

Toutefois, il est à noter que la technique d'électrophorèse sur gels de polyacrylamide est limitée en reproductibilité, en sensibilité ou en saturation (limite la quantification des protéines).

De nos jours, de nouvelles technologies de marquage et de spectrométrie de masse par exemple, le marquage isotopique [SILAC], [ICAT], [iTRAQ] et des méthodes de quantification sans marquage comme le Label free permettent de se passer de la séparation des protéines sur gel et de pallier aux limites précédemment citées. (Biochimej 2016a; Wikipedia 2016d)

L'**identification** se fait généralement par des techniques de spectrométrie de masse à haute résolution. Cette méthode se base sur une mesure précise de la masse des peptides ionisés.(Wikipedia 2016d)

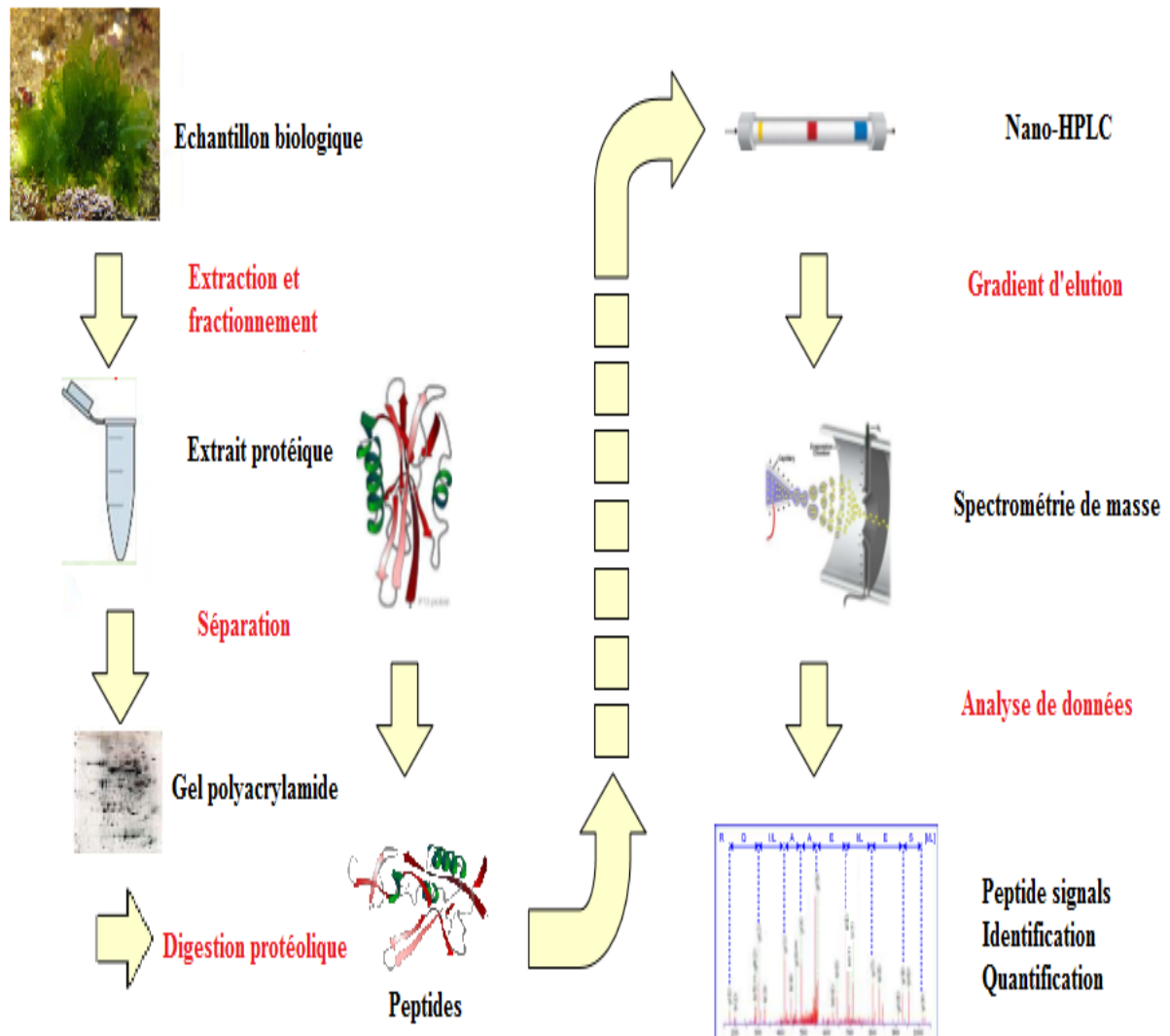


Figure 16. Principe de l'analyse protéomique.

Les protéines sont extraites de l'échantillon biologique par des traitements chimiques et/ou mécaniques, puis le mélange protéique est séparé sur un gel de polyacrylamide. Les protéines sont digérées dans le gel par la trypsine. L'identification des protéines se fait par l'analyse du rapport m/z des peptides de ce mélange par spectrométrie de masse.

Modifiée d'après les travaux de (Bruley C. 2010)

2. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse physico-chimique permettant de détecter, d'identifier et de quantifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse. (Wikipedia 2016e)

Le principe général étant la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). La spectrométrie de masse permet également de caractériser la structure chimique des molécules après fragmentation. (Wikipedia 2016e)

L'analyse en spectrométrie de masse est réalisée selon deux alternatives selon la nature et la complexité de l'échantillon à analyser. (picardie 2016)

Il existe la technique MS permettant l'obtention de la masse de chaque peptide et l'obtention d'un spectre de masse. Cette approche se base sur l'établissement de cartes peptidiques massiques qui seront comparées aux cartes de masses théoriques des protéines répertoriées dans les banques de données et obtenues par digestion in silico. Les logiciels d'analyse de données SM comme Mascot vont rechercher une série de protéines dans une base de données de séquences et générer pour chacune un spectre théorique pour ensuite le comparer au spectre expérimental afin de l'identifier. (Brosson D. 2006; picardie 2016)

Le schéma général d'un spectromètre de masse de type MS est illustré dans la figure suivante

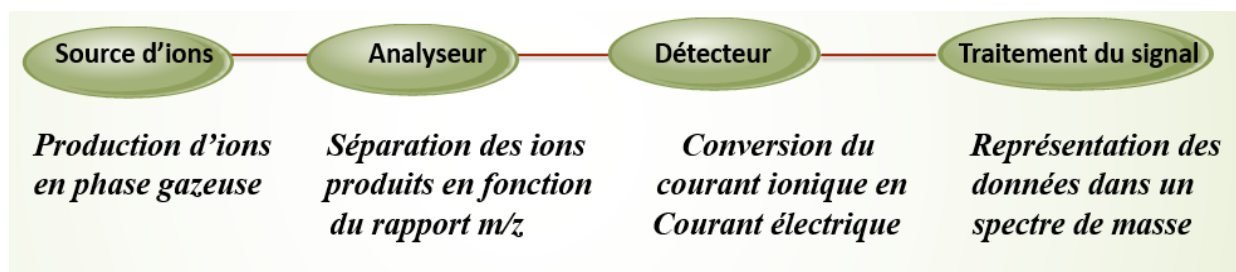


Figure 17. Différents composants d'un spectromètre de masse de type MS.

Il est constitué d'une source d'ions dans laquelle se produit le passage en phase gazeuse par vaporisation, sublimation ou désorption de l'échantillon injecté et l'ionisation des molécules ; un analyseur qui permet de séparer les ions en fonction de leur rapport m/z ; un détecteur qui compte les ions en leur associant leur rapport m/z et un enregistreur pour le traitement du signal et la visualisation des spectres.

La deuxième catégorie d'analyse spectrométrique concerne la spectrométrie de masse en tandem ou MS/MS. Elle est caractérisée par la combinaison de deux analyseurs permettant ainsi d'étudier les caractéristiques de fragmentation d'un peptide. Le premier analyseur reçoit les ions formés dans la source d'ionisation afin de déterminer leurs masses moléculaires. Un de ces ions est sélectionné comme référence pour sortir de l'analyseur 1 et pénétrer dans une chambre de collision où il est fragmenté par collision avec des molécules en gaz. Ces peptides fragmentés entrent dans le second analyseur et les pics de masse obtenus constituent une représentation de

la séquence partielle du peptide sur une dizaine d'acides aminés. (Brosson D. 2006; picardie 2016)

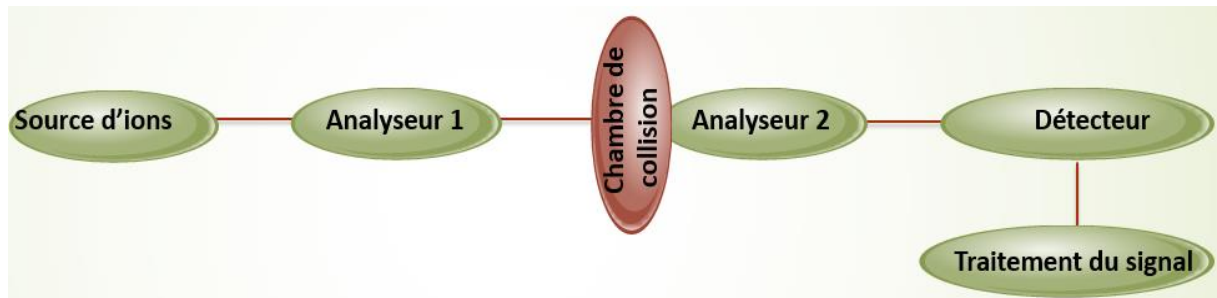


Figure 18. Différents composants d'un spectromètre de masse de type Tandem MS/MS.

Il se constitue: d'une source d'ionisation permettant le passage en phase gazeuse et l'ionisation de l'échantillon, Un premier analyseur effectuant le tri des ions selon leur rapport m/z et la sélection de l'ion précurseur, une chambre de collision assurant la fragmentation de l'ion précurseur, l'analyseur 2 effectue le tri des ions fragmentés issus de l'ion précurseur, le détecteur qui convertit le courant ionique en électrique et enfin l'enregistreur de signaux.

Par ailleurs, il existe plusieurs types d'ionisation dont les plus utilisés pour l'identification des protéines sont :

- L'électronebulisation ou électrospray (Wijesinghe W.A.J.P. 2011).

-La désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI), activée par une surface (SELDI) ou sur silicium (DIOS). (Wikipedia 2016e)

Le choix de l'un ou de l'autre est directement lié à la nature de l'échantillon et au type d'analyse souhaitée. L'ESI se base sur la désorption des ions par un fort champ électrique appliqué à de fines gouttelettes en nuage alors que le MALDI se base sur un laser UV qui est capable de désorber et d'ioniser un mélange de matrice-échantillon entraînant la vaporisation des peptides ionisés de l'échantillon avant leur acheminement vers un analyseur. (Brosson D. 2006)

En ce qui concerne l'analyse des ions, pareillement il existe plusieurs types d'analyseurs qui se différencient par leur principe de mesure du rapport m/z des ions à savoir la trappe à ions (IT), le temps de vol (TOF), le quadripôle, l'Orbitrap ou le FT-ICR...(Wikipedia 2016e)

Le tableau suivant résume les caractéristiques des différents analyseurs cités.

Tableau 2. Tableau représentatif des principaux analyseurs de masse

Analyseur	Caractéristiques
	<p>Cet analyseur mesure le temps que met chaque ion, initialement accéléré par une tension définie, à parcourir la distance pour arriver au détecteur. Ce temps est fonction du rapport m/z. (Brosson D. 2006; Wikipedia 2016e)</p> <p><i>Avantages :</i></p>
Le temps de vol (TOF)	<ul style="list-style-type: none"> • une gamme de masse très étendue (supérieure à 1 MDa), cela s'étend en pratique de 600 Da à 300 kDa, ce qui permet d'analyser les masses des ions d'un échantillon complexe. • une limite de sensibilité de détection de l'ordre d'une centaine de femtomoles et avec une précision de mesure de l'ordre de 50 ppm. • Constitue un outil pour les études de protéomique à grande échelle. (Brosson D. 2006; Descartes 2016).
	<p>Les peptides ionisés sont piégés dans la trappe par un champ électromagnétique tridimensionnel et éjectés en fonction de leur m/z pour arriver au détecteur. (Brosson D. 2006; Wikipedia 2016e)</p> <p><i>Avantages:</i> Identification plus sûre que le TOF.</p>
La trappe d'ions (IT)	<p><i>Limites :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Durée d'analyse plus longue que le TOF. • Gamme de masse située entre 15 et 4000 Da. • Une sensibilité de détection de l'ordre de 80 femtomoles et une précision de 100 ppm. (Descartes 2016; Wikipedia 2016e)
	<p>Constitué de quatre électrodes parallèles de section hyperbolique ou cylindrique. L'application d'une différence de potentiel entre chaque paire d'électrodes permet de créer un champ électrique quadripolaire qui permet de séparer les ions selon leur m/z.</p>
Quadripôle	<p><i>Avantages:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Appareils peu coûteux • La vitesse d'analyse peut être très élevée. • Le passage de l'ionisation positive à négative (ou l'inverse) est aisée. • Souplesse d'utilisation. • Résolution unitaire sur toute sa gamme de masse.

- Adaptabilité à différentes interfaces permettant le couplage avec la chromatographie gazeuse ou liquide. (Brosson D. 2006; Descartes 2016; Wikipedia 2016e)

Orbitrap

Il se compose d'une électrode creuse, à l'intérieur de laquelle est placée coaxialement une électrode en forme de fuseau. Les ions sont injectés tangentiellement à l'électrode centrale et piégés autour d'elle par la force électrostatique qui compense les forces centrifuges. Un mouvement ionique de même trajectoire circulaire se traduit par des ions d'un même rapport m/z .

Avantages:

- Une très bonne précision des mesures de m/z (1-2 ppm)
- Une résolution allant jusqu'à 100 000
- La gamme dynamique est satisfaisante (> 3 décades)
- Principalement utilisée en spectrométrie de masse en tandem. (Brosson D. 2006; Descartes 2016; Wikipedia 2016e)

C'est une trappe ionique où les ions sont emprisonnés dans un champ magnétique et la mesure de leur fréquence de rotation cyclotronique permet de déterminer leur m/z .

Avantages:

- Une résolution supérieure à 100 000
- La plus forte précision (2 ppm) diminue les ambiguïtés sur l'identification.
- la plus large gamme de masse analysable (valeur de m/z de 30 à plus de 300 000).
- permet l'analyse en MS/MS dans la même cellule. (Brosson D. 2006; Descartes 2016)

FT-ICR

Limites:

- La gamme dynamique est assez restreinte.
- La coexistence possible d'un nombre limité d'ions à défaut de mesure de masse moins précise pour les pics très minoritaires. (Brosson D. 2006; Descartes 2016; Wikipedia 2016e)

Le progrès réalisé durant ces deux dernières décennies dans le domaine de la protéomique a été en grande partie établi moyennant des approches basées sur la double dimension, bien que plusieurs limitations s'opposent à l'évolution de cette technique, comme précédemment citées telles que l'identification des protéines de faible abondance, la faible reproductibilité d'un gel à l'autre ou encore une mauvaise séparation des protéines sur gel.

De nos jours, pour pallier ces défauts, les appareillages commercialisés ne cessent d'évoluer pour permettre, entre autres, l'identification d'un plus grand nombre de protéines de faible abondance et ceci grâce à la sensibilité de leur seuil de détection. (Ben Mlouka M. 2014)

Par ailleurs, avec cette évolution la protéomique ne cesse d'élargir ses domaines d'application.

3. Implication de la protéomique dans l'étude du stress oxydatif

L'évolution technologique au niveau de la protéomique a largement contribué à l'étude du stress oxydatif et à mieux connaître le système protéique impliqué dans la défense cellulaire antioxydante. En effet, la notion de protéomique Redox a été décrite par Butterfield et al. comme un outil précieux à de nombreux domaines d'études dans lesquels le stress oxydatif est censé être au cœur du début de la maladie (Butterfield D.A. 2012). Aaron et Butterfield rapportent aussi que la compréhension de la façon dont une maladie est initiée et progresse est aussi importante que la capacité même de traiter cette maladie. Dans la mesure que, les données recueillies à partir des études protéomiques fournissent des informations précieuses sur la base moléculaire de la cellule, et jouent de ce fait un rôle dans la compréhension de la pathologie de la maladie et dans de nombreuses autres maladies présentant une pathologie similaire. (Swomley A. M. 2014)

Notons à titre d'exemple que la protéomique représente un outil pour surveiller l'étendue de l'oxydation des protéines et des modifications connexes, et pour identifier les protéines ciblées lors d'un stress donné. De plus, les différentes approches de la protéomique ont permis de découvrir de nouvelles voies de signalisation et ainsi de nouvelles sources thérapeutiques à travers des études quantitatives et qualitatives approfondies du contenu cellulaire en protéines. (Scaloni A. 2011)

D'une façon générale, la protéomique redox peut donc être considérée comme une approche à multiples facettes qui a le potentiel de fournir des indications sur les mécanismes moléculaires d'une maladie, de trouver des marqueurs de la maladie, ainsi que d'identifier des cibles potentielles pour le traitement médicamenteux. (Butterfield D.A. 2012)

Nombreux sont les exemples qui se classent dans le cadre de cette approche, on cite à ce titre les premiers travaux de Møller et ses collaborateurs qui ont examiné les événements de carbonylation des protéines qui se produisent in vivo et in vitro par oxydation catalysée par un métal. Les auteurs décrivent les méthodes protéomiques actuellement utilisées pour l'identification et la caractérisation des protéines carbonylées et leurs sites de modification. Hoffmann et ses collègues ont utilisé deux techniques différentes afin d'identifier les sites de modification des protéines carbonylées à savoir une analyse par MALDI-TOF MS suivie par une expérience d'analyse tandem NLC-ESI-Orbitrap MS/MS. (Scaloni A. 2011)

La protéomique Redox a aussi permis, parmi énormément d'autres investigations, de quantifier et de caractériser la carbonylation des protéines plasmatiques humaines dans le cas d'un cancer de sein, maladie connue pour être fortement reliée au stress oxydatif, grâce à un marquage par affinité à l'hydrazide de biotine couplé à la technologie iTRAC. (Madian A.G. 2011)

Plusieurs études ont démontré que les dommages oxydatifs sont caractéristiques de nombreuses maladies neurodégénératives. En effet, l'accumulation des protéines modifiées par oxydation est susceptible de perturber les fonctions cellulaires du cerveau en affectant l'expression de la protéine, le renouvellement des protéines, la signalisation cellulaire et l'induction de l'apoptose et de la nécrose, ce qui suggère que l'oxydation des protéines peut avoir une signification à la fois physiologique et pathologique. (Butterfield D.A. 2012)

A ces propos, plusieurs études se sont centrées sur le protéome des cellules du cerveau à noter les neurones et les cellules gliales étant donné qu'elles forment une unité fonctionnelle hautement spécialisée, et la perte ou le gain de leurs fonctions peuvent influencer l'initiation et la progression de différentes maladies neurodégénératives. (Elkharaz J. 2013) A ce titre, différentes approches basées sur gel ou la méthode shot-gun ont été développées et appliquées. Ces investigations vont de la 2DE traditionnelle à de nouvelles méthodologies incluant la SILAC, la 2Ddige, le label free... et touchant à tous les plans de la protéomique (protéomique globale quantitative, études des modifications posttraductionnelles, études des fonctions protéiques et de leurs structures ...

Le tableau suivant résume quelques travaux réalisés sur le stress oxydatif appliqué aux astrocytes tout en illustrant les stratégies d'analyses protéomiques adaptées.

Tableau 3. Implication de la protéomique dans l'étude du stress oxydatif appliqué au modèle astrocytaire

Type cellulaire	Méthode utilisée	Résultats obtenus	Références
Astrocytes de souris knockout GCLM (glutamate-cysteine ligase modifier).	Approche protéomique quantitative basée sur la technologie SILAC	Nouveaux sites d'acetylation affectés par la baisse chronique du taux de glutathion.	Pehar M. et al, 2015 (Pehar M. 2016)
Astrocytes de souris ayant subi une transformation cancéreuse in vitro.	Analyse quantitative 2D-DIGE (électrophorèse bidimensionnelle différentielle)	La reprogrammation métabolique sur les astrocytes favorise la glycolyse aérobie et la production de lactate. La transformation affecte la respiration, le métabolisme du glutamate et les défenses contre le stress.	Bentaieb A. et al, 2015 (Bentaieb A. 2015)
Synaptosome de cortex de souris femelle portant l'allèle de l'apolipoprotéine E (ApoE).	protéomique quantitative RP-LC MS/MS (ESI-MS)	L'analyse protéique synaptosomale montre une réduction de l'expression des protéines liées au métabolisme énergétique accompagnée par une augmentation des niveaux de stress oxydatif.	Shi L. et al, 2014 (Shi L. 2014)
Astrocytes et neurones prosencéphale de souris.	approche quantitative électrophorèse bidimensionnelle différentielle avec marquage fluorescent.	Le stress oxydatif causé par un dysfonctionnement du protéasome neuronal entraîne l'expression de la peroxydase antioxydante peroxiredoxine 6 par les astrocytes et l'augmentation de l'activité de la phospholipase A2 et de la peroxiredoxine 6 dans le cerveau de souris.	Elkharaz J. et al, 2013 (Elkharaz J. 2013)

En conclusion, on peut déduire que l'information obtenue à partir de la protéomique redox peut être utile dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement et la progression des troubles neurodégénératifs et peut même fournir des cibles potentielles pour une thérapie médicamenteuse pour ces maladies.

Ceci dit, les progrès dans ce domaine et spécialement dans la neuroproteomique sont encore à leur début par rapport à toutes les applications potentielles qu'on pourrait tirer de ces études.

Objectifs du travail

L'un des plus grands défis de nos jours est de contrôler le métabolisme oxydatif afin d'éviter un état de stress cellulaire générateur de multiples pathologies tels que les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires, l'ischémie, l'inflammation, le diabète et les tumeurs...(Agarwal A. 2003)

Les recherches se succèdent dans le but de découvrir des molécules antioxydantes capables de promouvoir la survie cellulaire et de bloquer une mort apoptotique provoquée par cet état de déséquilibre. De plus, on porte un intérêt accru pour la recherche de composés bioactifs avec une puissante activité antioxydante présentant une meilleure biodisponibilité et un coût moindre comparés aux molécules synthétiques.(Guerrero S. 2012; Winberg P.C. 2009; Winberg *et al.* 2009) C'est dans ce cadre que nous mettons la lumière dans ces travaux de thèse sur *Ulva rigida*, une algue verte à large distribution mondiale et communément utilisée pour la nutrition humaine.(Silva M. 2013) Des travaux ultérieurs *in vitro* et *in vivo* sur différents modèles murins ont reporté que des extraits de cette algue ont présenté des activités anti-hypercholestérolémique, immunomodulatrice, antioxydante et antihyperglycémique (Celikler S. 2009b; Godard M. 2009b; José M. L. 2007).

Certaines études ont reporté ces activités et essentiellement l'effet antioxydant à la présence de polyphénols,(Trigui M. 2013) d'autres l'ont souvent attribué aux polysaccharides sulfatés ou ulvanes présents en grande quantité dans tout le genre *Ulva*(Godard M. 2009b). Une troisième étude fait référence au rôle notoire des protéines de l'algue dans cet effet bénéfique.(Yildiz G. 2012)

Ces données sont à rapprocher d'une étude réalisée précédemment au laboratoire qui démontre l'activité anticytotoxique et antioxydante de l'extrait brut ainsi que la fraction éthanolique de l'algue contre les dommages causés par l'ajout du H₂O₂. Les deux extraits inhibent totalement la mort apoptotique des cellules HeLa avec une disparition des effets cytotoxiques morphologiques et une promotion de la survie cellulaire (Mezghani S. 2013a)

En continuité de ces travaux, une équipe de notre laboratoire a pu démontrer que ce même extrait d'*U. rigida* a permis de stimuler l'expression du gène anti-apoptotique Bcl-xL et de prévenir le clivage de la molécule pro-apoptotique Bax préservant ainsi le potentiel de la membrane mitochondriale dont la perte de son intégrité constitue un événement déclencheur de la cascade apoptotique.(Mezghani S. 2015) Ces travaux ont rapporté, chez la même algue récoltée des côtes

de Bizerte, un taux élevé en biomolécules dont les protéines et ont relayé ses effets bénéfiques en partie à leur présence.

En parallèle, d'autres travaux réalisés, entres autres en collaboration avec notre laboratoire, ont pointé l'importance primordiale des astrocytes dans la survie et la protection des neurones qui sont particulièrement sensibles au stress oxydant et ce grâce à leur système endogène riche en antioxydants. Il est néanmoins important de développer et de tester des biomolécules capables de promouvoir la survie des cellules astrogliales et de stimuler leur contenu antioxydant afin de contrecarrer la surproduction excessive de ROS, principale cause de la mort des astrocytes par apoptose et des maladies neurodégénératives.

Le but principal de cette étude étant d'identifier et de caractériser les métabolites de l'algue verte *Ulva rigida* et essentiellement les molécules à activité antioxydante présentes dans les extraits obtenus à partir de cette algue. Pour ce, nous nous sommes fixés comme objectifs principaux :

- D'optimiser l'extraction des protéines de l'algue et d'évaluer les activités antioxydantes des différents extraits par le test DPPH et le dosage du pouvoir réducteur.
- D'étudier l'effet glioprotecteur de l'extrait protéique d'*Ulva rigida* PE contre la mort cellulaire induite par les rayonnements UV-B et de rechercher l'effet de PE sur l'activité des enzymes anti-oxydantes dans le modèle cellulaire d'astrocytes corticaux en présence ou absence d'un stress oxydant induit par UV-B.
- D'évaluer l'éventuelle implication de la fraction protéique de l'extrait dans la protection cellulaire in vitro et de déterminer le profil en protéines totales de l'algue par spectrométrie de masse.
- D'isoler, d'identifier et de caractériser la ou les protéines responsables de l'activité glioprotectrice moyennant une approche protéomique et enfin d'évaluer toujours sur des cultures astrocytaires, les effets de la protéine isolée, ainsi que les effets de ses homologues structuraux.

Matériel et méthodes

I- Optimisation de l'extraction et évaluation de l'activité antioxydante

1. Récolte de l'algue

L'algue verte *Ulva rigida* est l'une des algues les plus répandues sur les côtes tunisiennes. Notre recherche a été basée sur la région de Bizerte située au nord de la Tunisie. La température de l'eau varie entre 25 et 32°C

La récolte a été effectuée en été (Juillet et août) 2012 et 2013 avec des températures variables entre 25 et 32°C et ce à partir d'une zone rocheuse. Une fois récoltée, l'algue a été transportée dans des glacières au laboratoire. Les épiphytes et la matière nécrotique ont été éliminées. Les échantillons ont été successivement lavés à l'eau de mer et à l'eau distillée.

Les échantillons sont fractionnés puis stockés à -20°C.

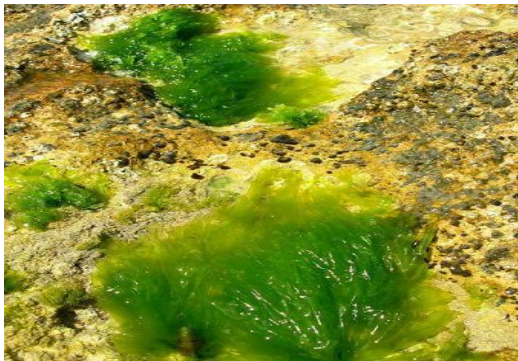


Figure 19. Récolte de l'algue *Ulva Rigida* des zones rocheuses

2. Identification de l'algue

Ulva rigida (C. Agardh) représente une part substantielle de la biomasse totale du benthos le long de la côte tunisienne. Notre collègue Professeur Habib Langar de l'Institut des Sciences et Techniques de la Mer a confirmé l'identité de l'algue *U. rigida* en examinant un petit nombre de critères morphologiques qui la distingue des autres espèces. En particulier, elle se distingue par un thallus très mince, en forme de feuille, de couleur vert émeraude translucide. Ce thalle, présentant un court stipe, est plus délicat et rigide à la base près des bords de croissance. Le stipe, par lequel l'algue se fixe à son support, se compose de petits rhizoïdes rigides.

Ulva rigida peut se retrouver sous forme de touffe, ou le plus souvent sous forme de lames solitaires. Ces lames peuvent être plates ou dentelées avec de petites dents microscopiques sur

les bords. Ces bords dentelés distinguent *Ulva rigida* de l'espèce *Ulva lactuca* et des autres espèces (voir les flèches ci-dessous).

Elles peuvent également être ou non perforées. Leur taille est variable, en moyenne 30 à 40 cm. Au niveau microscopique, les lames sont constituées d'une bicouche de cellules en épaisseur ; Les deux couches peuvent être facilement séparées en couches de cellules simples, ce qui représente un autre critère de sélection la distinguant des autres espèces similaires.

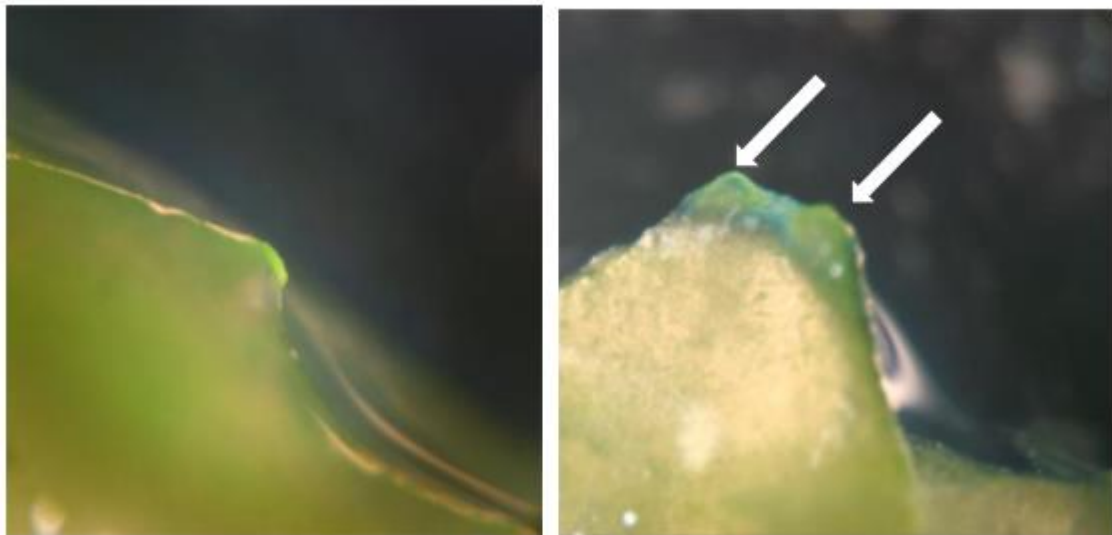


Figure 20. Observation microscopique de l'algue *Ulva rigida*.

BOTANY, U.O.H.A.M. Algae: Native Ulva Rigida C Agardh 1823

3. Préparation des extraits

3.1. Méthode de lyophilisation

Les algues stockées à -20°C ont été réparties dans des ampoules en verre préalablement refroidies et puis lyophilisées pendant une nuit ou plus jusqu'à ce que le poids devienne constant.

3.2. Méthode de séchage à l'étuve

Les algues stockées à -20°C ont été sorties puis après décongélation ont été mises dans une étuve réglée à une température de 30°C pendant une nuit ou plus jusqu'à ce que le poids devienne constant.

3.3. Méthode de séchage au soleil

Les échantillons ont été exposés directement au soleil (32°C) durant la période estivale pendant une journée au plus jusqu'à ce que le poids devienne constant.

3.4. Méthodes d'extraction

3.4.1. Précipitation des protéines à l'éthanol absolu

L'échantillon a été broyé frais en utilisant un mortier électrique (Moulinex, France) dans de l'eau distillée à une concentration de 0,5 ml/g (poids frais). Le mélange a été broyé en utilisant un mortier manuel et centrifugé à 10,000 rpm pendant 20 min (Équipement de laboratoire, Thermo Scientific, USA).

Les algues séchées ont été broyées avec un mélangeur Waring. La poudre obtenue est mise en suspension dans du Tris HCl 0,1 M pH 7,5 (5 g de poudre dans 200 ml) en présence de 5% de PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyl) inhibiteur de la protéase de Sigma Aldrich. La suspension a été agitée doucement pendant une nuit à 4°C afin de promouvoir la lyse cellulaire par choc osmotique et de faciliter l'extraction des protéines (Fleurence J. 1995) (Hsu B. 2006). Après incubation, la suspension a été soumise à une sonication (cycles de 30s à 2min dans du glaçon). La suspension a ensuite été centrifugée à 4 °C, pendant 20 min à 10 000 g. Le surnageant et le culot ont été récupérés. Le culot a été traité avec du NaOH (0,1 M) en présence de mercaptoéthanol (0,5% v/v) et le mélange a été agité doucement à température ambiante pendant 1 h avant d'être placé en centrifugation (10 000 xg, 20 min). Le surnageant a été recueilli et combiné avec le surnageant de la première centrifugation.

Le surnageant obtenu (à partir des échantillons frais ou secs) a été ajouté à l'éthanol absolu froid (1Vextract / 7Vethanol), et le mélange a été stocké à -20° C au moins pendant une nuit et ensuite centrifugé (10 000 xg, 20 min).

Le culot obtenu a subi une série de congélation/décongélation dans le but d'une meilleure solubilisation lors de l'utilisation. Le culot récupéré est remis en suspension dans de l'eau désionisée ou dans un tampon Tris HCl (0.1M, pH 7,5) en utilisant différentes concentrations à savoir 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml et 1 mg/ml tout juste avant l'utilisation.

3.4.2. Précipitation des protéines au sulfate d'ammonium

La même quantité que précédemment de la poudre de l'algue broyée a été dissoute dans 200ml de tampon d'extraction adéquat (tableau 4). La solution est agitée pendant 4h à 4°C puis filtrée sur mousseline et centrifugée à 10000 rpm pendant 30 à 60 mn à 4°C. Le culot obtenu est rejeté et les protéines du surnageant ont été précipitées au sulfate d'ammonium à 80% de saturation. Une dernière centrifugation a été effectuée à 10000 rpm et le culot final a été récupéré dans un tampon de suspension Tris HCl 25mM (pH 7.5).

Tableau 4. Composition du tampon d'extraction des protéines

Produits	Composition
Tris HCl	20 mM
PMSF	2 mM
EDTA	0,1 mM
Triton X100	0.5%

3.4.3. Précipitation des protéines au DOC/TCA

Afin de précipiter les protéines solubles, nous avons aussi testé la méthode DOC/TCA (DOC: sodium DeOxyChloate monohydrate, TCA: Acide Trichloracétique). Pour ce la poudre a été resuspendue dans une solution à 20% de TCA et 10% de DOC. Le mélange est incubé à 4°C pendant 15 min puis centrifugé (10000 x g pendant 20 min). Après élimination du surnageant, le culot est lavé dans de l'acétone (v/v), pendant 15 min à 4°C. L'échantillon est centrifugé à 10000 x g pendant 20 min. Enfin le surnageant est éliminé et le culot contenant les protéines est gardé.

4. Détermination de la quantité en protéines et de leur profil électrophorétique

4.1. Détermination de la quantité totale en protéines

Afin de calculer la concentration protéique présente dans un échantillon donné, le dosage de Bradford est fréquemment utilisé. Pour ce, des dilutions relatives aux échantillons sont effectuées au 1/10 et au 1/50. Ces dilutions ont pour but de réaliser des mesures d'absorbance dans la gamme d'étalonnage. De ce fait, 1mL de la solution de Bradford (Bio-Rad Protein Assay®) est mélangé à 20 µL de l'échantillon. L'incubation est réalisée à l'obscurité pendant 30 min, ensuite une lecture de l'absorbance se fait à 595nm et enfin la concentration en protéines est déterminée en fonction de la gamme de concentrations de la protéine standard BSA («Bovin Serum Albumin», Sigma-Aldrich). La concentration protéique est exprimée à la fois en µg/ml et en pourcentage du poids sec.

4.2. Détermination du profil protéique par électrophorèse

4.2.1. Electrophorèse monodimensionnelle

Après dosage des protéines par la méthode Bradford, la même quantité en protéines des deux échantillons obtenus a été déposée au-dessus d'un gel de polyacrylamide composé d'un gel

de concentration 4.5% et d'un gel de séparation 12.5 % (Tableau 5). Ce gel est d'abord coulé et polymérisé dans un dispositif en verre. La migration est ensuite effectuée dans une cuve (Protean IIXi, BioRad) contenant deux tampons spécifiques cathodique et anodique et ce sous un courant initial de 10 mA/gel pendant 45 min à 60 min et ensuite un courant de 20 mA/gel est appliqué jusqu'à la fin de la migration.

Tableau 5. Composition des gels de concentration et de séparation pour une électrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE)

Produits	Gel de concentration à 4.5%	Gel de séparation à 12.5%
acrylamide/bisacrylamide	0.3 ml	2.4 ml
Tris (contenant 2% SDS)	(pH 6.8) 0.5 ml	(pH 8.9) 1.5 ml
Eau milliQ	1.2 ml	2.1 ml
TEMED (6.6 M)	2 μ l	3 μ l
Persulfate d'ammonium 10%	12.5 μ l	30l

4.2.2. Révélation au nitrate d'argent

A la fin de la migration, on incube le gel pendant 2 heures ou alors sur toute la nuit dans un bain de fixation contenant 150 ml d'éthanol, 50 ml d'acide acétique et 300 ml d'eau milliQ. Le gel est ensuite introduit dans deux bains d'éthanol à 10% de 10 min chacun, suivis de trois lavages de 10 min dans de l'eau milliQ. Après une phase de sensibilisation d'une minute dans une solution de thiosulfate de sodium à 0.02%, le gel est incubé pendant 30 min dans un bain de coloration contenant une solution de nitrate d'argent à 0,1%. Afin de visualiser les bandes, le gel est introduit durant 20 min dans un bain de développement contenant 20 μ L de formaldéhyde, 24 g de carbonate de sodium, 80 μ L de thiosulfate de sodium à 2% et de l'eau milliQ qsp (2 L). Afin d'arrêter la coloration du gel, ce dernier est mis dans une solution d'arrêt contenant de l'acide acétique à 1%, et finalement il est rincé à l'eau milliQ et conservé dans la chambre froide.

Les gels ont été numérisés à l'aide d'un numériseur de gels de type Proscan Perkin Elmer.

5. Détermination de l'activité anti-oxydante

5.1. La capacité de neutralisation des radicaux libres (DPPH scavaging assay)

L'activité antiradicalaire des extraits a été estimée en premier lieu en fonction de sa capacité à piéger le radical libre stable diphényl picryl-hydrazyl (DPPH•) et *Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)*.

Elle a été évaluée en utilisant la méthode d'Atmani (Atmani D. 2011). Une solution de DPPH $0,135 \text{ mmol}^{-1}$ dans du méthanol (1ml) a été mélangée avec 1 ml de différentes concentrations de l'extrait. Le mélange réactionnel a été agité au vortex et laissé dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 min. L'absorbance du mélange a été enregistrée à 517 nm avec un spectrophotomètre Bio-Rad (Bio-rad Laboratoires, Philadelphie, PA, USA). Trois répétitions ont été effectuées.

Le pourcentage d'inhibition des radicaux libres DPPH a été calculé de la manière suivante :

Activité radical DPPH de balayage (%) = $[(\text{Abs}_{\text{Contrôle}} - \text{Abs}_{\text{échantillon}}) / (\text{Abs}_{\text{Contrôle}})] * 100$

Avec : $\text{Abs}_{\text{Contrôle}}$ est l'absorbance de DPPH radical + l'eau distillée, et $\text{Abs}_{\text{Essai}}$ est l'absorbance du composé.

Quant au *Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)*, ce dosage mesure la capacité anti-oxydante de l'échantillon, par rapport au standard trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid). L'unité de TEAC est définie comme la concentration de trolox ayant une activité antioxydante équivalente à l'échantillon. Le résultat est exprimé en mM d'équivalent Trolox.

5.2. Dosage du pouvoir réducteur

La méthode de Shyamala (Shyamala B.N. 2005) a été suivie pour déterminer le pouvoir réducteur des différents extraits.

Différentes quantités d'extraits ont été dissoutes dans 1 ml d'eau distillée, puis mélangées avec du tampon phosphate (2,5 ml, 0,2 M, pH 6,6) et du ferricyanure de potassium $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (2,5 ml, 1 %). Après addition de 2.5 ml d'acide trichloracétique (TCA) (10%), les mélanges ont été chauffés à 50 °C pendant 20 minutes, puis centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min.

La couche supérieure de la solution (2,5 ml) a été mélangée avec de l'eau distillée (2,5 ml) et du chlorure ferrique (0,5ml, 0,1%). L'Absorbance a été mesurée à 700 nm avec un spectrophotomètre Bio-Rad (Bio-Rad Laboratoires, Philadelphie, PA, USA).

L'augmentation d'absorbance du mélange correspond à une augmentation du pouvoir réducteur. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard.

II- Evaluation de l'effet protecteur de l'extrait sur les cultures d'astrocytes

1. Conditions d'utilisation des animaux

Les rats Wistar sont récupérés de l'Institut Pasteur de Tunis et sont entretenus par la suite dans l'animalerie de la Faculté des Sciences de Tunis (à une Température de 20°C). Tous les soins et l'utilisation des animaux sont en conformité avec les directives du comité médical de l'association Américaine des vétérinaires sous la supervision du Comité Ethique Local de l'Institut Pasteur de Tunis (Approval Nu FST/LNFP/Pro 152012).

2. Culture cellulaire d'astrocytes corticales de rat

Des cultures secondaires corticales d'astrocytes ont été préparées à partir de rats Wistar âgés de 1 à 2 jours selon la méthode de Brown et Mohn (BrownD. 1999) avec des modifications mineures. Ce protocole est validé par l'institut pasteur (Approval Nu FST/LNFP/Pro 152012).

En bref, après décapitation des rats, les hémisphères cérébraux ont été recueillies sous hotte à flux laminaire stérile dans un milieu de culture (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

DMEM / F12 (F-12 Nutriments Mixture) (2: 1; v / v) contenant en plus de la glutamine 2 mM, 1% d'insuline, 5 mM de HEPES (l'acide N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic), 0,4% de glucose et 1% de la solution d'antibiotique-antimycotique.

Après déminage et dissociation mécanique à l'aide d'une seringue fine, les cellules dissociées ont été centrifugées (5 min, 200 x g), puis filtrées sur un tamis de nylon (mailles de 100 µm) et enfin remises en suspension dans du milieu de culture contenant 10% de FBS (sérum de vœux fœtal), étalées dans des flasques de 150 cm² (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Allemagne) avec une densité de 25 x 10⁶ cellules/flasque et enfin incubées à 37°C dans un environnement saturé à 5% CO₂ / 95% O₂ jusqu'à obtenir un tapis cellulaire à confluence de 95%. Le renouvellement du milieu est effectué tous les 3 ou 4 jours. Ensuite, au bout de 7-8 jours, les astrocytes ont été isolés des autres cellules gliales de la culture, à noter la microglie, en

agitant toute la nuit les flacons avec un agitateur orbital (175 rpm, 37°C). En effet, cette étape est basée sur les différences d'adhésion des différentes populations de cellules gliales.

Les cellules restées adhérentes ont été détachées par trypsinisation, ensuite centrifugées (200 x g, 8 min) et enfin la suspension est pré-étalée pendant 5 min pour éliminer les cellules microgliales contaminantes. Ensuite, les astrocytes non adhérents ont été récoltés, dilués dans du milieu et étalés dans des plaques à 24 puits à une densité de 8×10^4 cellules/ml. Les cellules ont été incubées à 37° C dans une atmosphère humide (5% CO₂). Dans ces conditions, après 5 jours de culture dite secondaire, les cellules obtenues sont des astrocytes de type I. Toutes les expériences ultérieures ont été effectuées sur des cultures secondaires de 5 à 7 jours.

3. Irradiation

L'exposition des astrocytes corticaux en culture aux radiations UVB, a été réalisée en utilisant une lampe UVB (Fisher Scientific UV Transilluminator Modèle FB-TI-88A, longueur d'onde 312 nm). L'irradiance émise par la lampe UVB a été mesurée à l'aide d'un radiomètre modèle IL-1400-A (International Light, Newburyport, USA) équipé d'un détecteur pour UVB de type SEL624. La lampe a été maintenue à une distance de 30 cm du détecteur et bien évidemment des cellules irradiées.

L'irradiance (éclairage énergétique) mesurée étant de l'ordre de $0,13 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ et la dose appliquée était de $115 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$.

Il est à noter que la dose d'exposition est la quantité de rayonnement reçue par la cellule par cm^2 par le temps d'exposition.

Dose (mJ / cm^2) = éclairage énergétique (mW / cm^2) x temps d'irradiation (secondes)

Par ailleurs, différents temps d'exposition (et donc différentes doses) ont été appliqués aux cellules afin de déterminer la dose effectrice d'UVB permettant d'obtenir 50% de mortalité cellulaire.



Figure 21. Photo du montage du radiomètre et de la lampe réalisé au sein du laboratoire de radiométrie à l'INSAT.

4. Test de survie

La fluorescéine d'Ester de diacétate-acétoxyméthyl (CM-H₂DCFDA), est un substrat d'estérase intracellulaire et est généralement utilisé pour indiquer l'intégrité cellulaire.

Les cellules cultivées ont été traitées ou non avec l'extrait de protéine d'Ulva (PE) en l'absence ou la présence de rayonnements UVB et ensuite incubées à 37°C pendant 2 heures avec du milieu de culture exempt de sérum frais.

Ensuite, le milieu de culture a été aspiré des puits de la microplaque et les astrocytes ont été incubés pendant 8 min avec 15µg /ml de fluorescéine d'ester diacétate-acétoxyméthyl dans une chambre noire, puis rincées deux fois avec du PBS (Tableau 6) et lysées avec un tampon de lyse de solution de Tris / HCl contenant 1 % de sodium dodécyl sulfate.

Tableau 6. Composition du PBS (Phosphate Buffer Saline)

Produits	Composition
NaCl	4 g
KCl	0,1 g
Na ₂ HPO ₄	0,87 g
KH ₂ PO ₄	4g
Eau milli Q	QSP 500 ml

La fluorescence a été mesurée avec une excitation à 485 nm et une émission à 538 nm en utilisant un lecteur de microplaques à fluorescence FL800TBI (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). La fluorescence a été normalisée pour contrôler les niveaux de cellules, et a été fixée à 100 %.

5. Test de Lactate déshydrogénase (LDH)

La cytotoxicité des cellules a été évaluée par la mesure de la LDH (enzyme intracellulaire) libérée dans le milieu de culture par des cellules endommagées.

Les cellules cultivées ont été traitées ou non avec l'extrait d'Ulva en l'absence ou la présence de rayonnements UVB puis incubées à 37°C pendant 2 heures dans un milieu de culture exempt de sérum frais. Dans le cas du post-traitement, les cellules en culture ont d'abord été exposées au rayonnement UVB puis traitées ou non avec l'extrait PE et finalement incubées à 37 ° C pendant 2 h.

A la fin de l'incubation, la cytotoxicité engendrée par le traitement UV sur les astrocytes a été déterminée en utilisant le kit de dosage de l'activité de la LDH (Sigma Aldrich) en suivant les instructions du fabricant. Brièvement, 20 µL de chaque échantillon ont été ajoutés à 280 µL du mélange réactionnel LDH MIX.

En présence de l'enzyme LDH, le pyruvate est transformé en lactate et la NADH est alors transformée en NAD⁺. La disparition du NADH est suivie par mesure de l'absorbance à 340 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Bio-Rad). Les résultats sont exprimés en pourcentage de LDH totale libérée après lyse des cellules par une solution de Triton X-100 (1%) ou encore en unité de LDH/ml.

6. Mesure des marqueurs du stress oxydatif

6.1. Récupération des protéines intracellulaires

Les cellules en culture ont été incubées à 37°C pendant 2 heures avec du milieu sans sérum frais auquel on a ajouté ou non les substances d'essai. Par la suite, le milieu de culture a été éliminé et les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS, centrifugées (350 g, 4°C, 10 min) et le culot a été remis en suspension dans un tampon de lyse (tableau 7) pour en extraire les protéines cellulaires totales. Le mélange a été centrifugé (16 000 x g, 20 min, 4°C). Le culot final est gardé afin de doser les protéines par la méthode de Bradford et le surnageant a été stocké à -20°C pour des expérimentations complémentaires tel que le dosage de l'activité des enzymes antioxydantes.

Tableau 7. Composition du tampon de lyse

Produits	Composition
Tris/HCl	6.05 g (50 mM)
EDTA	2.92 g (10 mM)
Triton X- 100	1%
PMSF	0.17 g (0.1 mM)
Eau milli Q	QSP 500 ml

6.2. Dosage des activités enzymatiques antioxydantes

L'activité de la superoxyde dismutase (SOD; E.C.1.15.1) a été déterminée en utilisant une méthode modifiée du dosage d'épinéphrine (Castel H. 2006). La méthode consiste à évaluer la capacité de la SOD à inhiber l'auto-oxydation de l'épinéphrine causée par l'anion superoxide à un pH alcalin. Pour ce, 10 μ l des surnageants préparés comme décrit précédemment, ont été mélangés avec 10 μ l de la catalase bovine (0,4 U / 1L), 20 μ l de l'épinéphrine (5 mg / ml) et de tampon Na_2CO_3 / NaHCO_3 (62,5 mM, pH 10,2). L'absorbance a été enregistrée à 480 nm avec un spectrophotomètre Bio-Rad (Bio-Rad Laboratoires, Philadelphie, PA, USA).

L'activité de la catalase (CAT ; E.C.1.11.1.6) a été tracée par une diminution progressive du taux de H_2O_2 dans le milieu réactionnel en le réduisant en H_2O et O_2 (Misra H.P. 1971) (Aebi H. 1984). Le dosage se fait à 240 nm pendant 180 secondes avec des intervalles de 30s. Le mélange contient, en addition avec l'échantillon, 330 mM de H_2O_2 dans 50 mM de tampon phosphate pH 7,0. L'activité de la catalase a été calculée en utilisant le coefficient d'extinction de 40mM /cm de H_2O_2 .

6.3. Dosage de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est déterminée par la mesure de l'absorbance de son produit secondaire terminal à savoir le malondialdéhyde (MDA) suivant la méthode de double chauffage (Draper H. 1990). En bref, les échantillons (25 μ l) ont été dissous dans une solution contenant 1% de BHT (p/v) et 20 % de TCA (p/v). Le mélange a été centrifugé à 1000 g pendant 5 min à 4 °C. Le surnageant (100 μ l) a été introduit dans du HCl 0,5 M et du TBA 120 mM, le tout mélangé avec le tampon Tris à 26 mM, et ensuite chauffé à 95° C pendant 10 min. Après refroidissement, l'absorbance a été enregistrée à 532 nm avec un spectrophotomètre Bio- Rad (Bio-Rad Laboratories, Philadelphie, PA, USA).

La concentration en MDA a été déterminée en utilisant un coefficient d'extinction du complexe MDA- TBA de $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

6.4. Dosage du peroxyde d'hydrogène

La concentration en H_2O_2 a été déterminée selon Chance et al. (Chance B. 1979) par une méthode colorimétrique utilisant un kit disponible dans le commerce, fourni par Biomaghreb (Tunisie). Brièvement, H_2O_2 est oxydé par la peroxydase en H_2O et O_2 selon la réaction suivante :



L'absorbance a été mesurée à 505 nm en utilisant un spectrophotomètre Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Philadelphie, PA, USA).

6.5. Mesure du taux de calcium

La concentration en Ca^{2+} a été déterminée selon Stern et Lewis (1957) par une méthode colorimétrique (Stern J. 1957) utilisant un kit disponible dans le commerce auprès de Biomaghreb (Tunisie). En bref, à pH alcalin, le cresolphtaleine forme avec le calcium un complexe coloré en violet dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en calcium. Ce dosage est effectué en suivant l'absorbance à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Bio-Rad (Bio-Rad Laboratoires, Philadelphie, PA, USA).

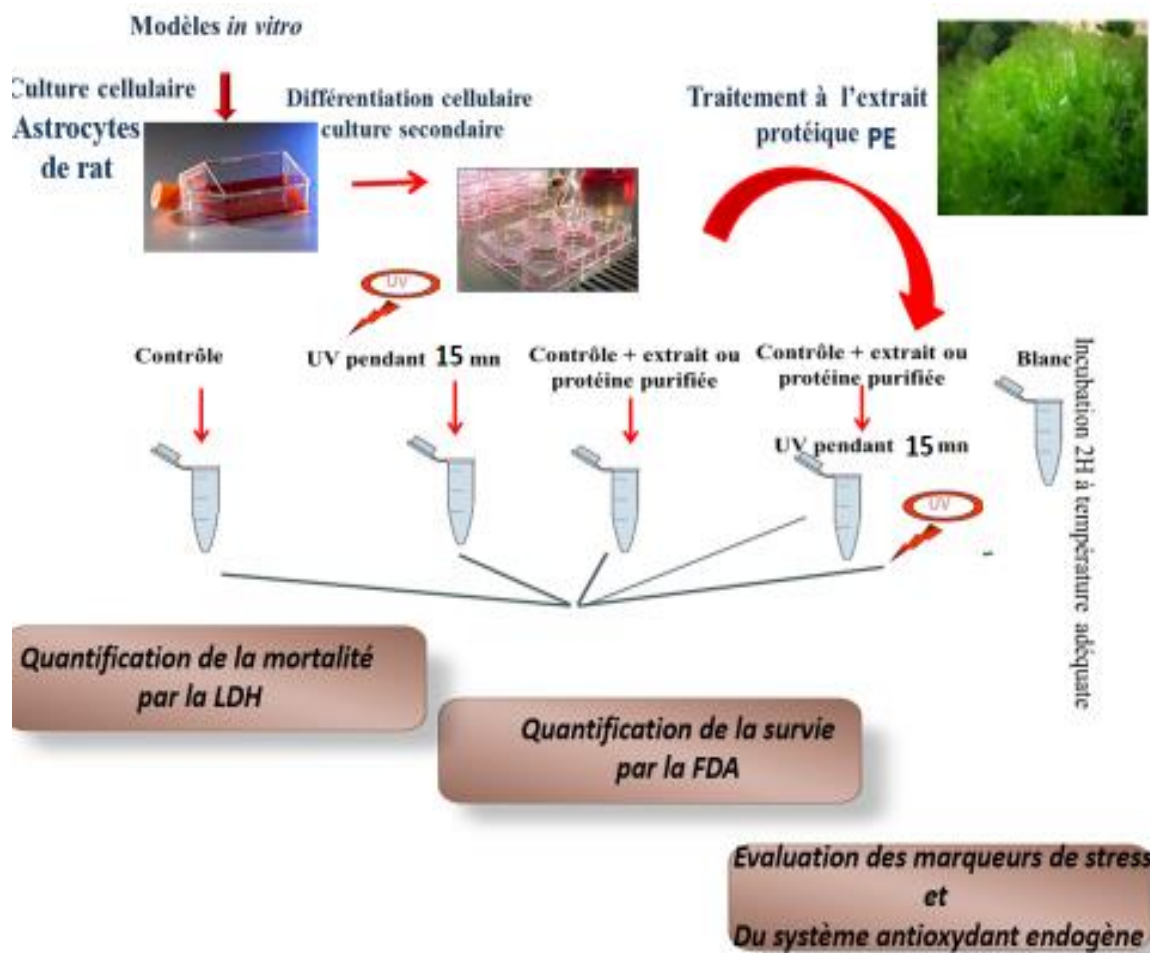


Figure 22. Protocole expérimental utilisé dans l'évaluation de l'effet protecteur de l'extrait sur les cultures d'astrocytes.

III- Evaluation de l'implication de la fraction protéique de l'extrait dans la protection cellulaire et investigation protéomique

A- Evaluation de l'implication de la fraction protéique de l'extrait dans la protection cellulaire

1. Dénaturation de l'extrait

Afin de caractériser la nature de l'effet de cet extrait d'algues sur les cellules, nous avons effectué sa dénaturation par un traitement thermique, par des hydrolases et par des protéases notamment la trypsine. Dans cette partie, nous avons utilisé la souche de levure pure comme modèle *in vitro* de cellules, d'une part, pour évaluer l'effet de l'extrait PE sur ce type de cellules et d'autre part pour sa facilité de culture et de sa disponibilité dans le laboratoire. De plus, en comparaison avec les cultures d'astrocytes corticales, les levures présentent un taux de croissance

plus élevé (seulement 48 heures de culture par rapport à la culture d'astrocytes qui dure en moyenne 15 jours). En outre, les cellules astrocytaires sont beaucoup plus sensibles que les cellules de levure aux produits de dégradation des extraits qui peuvent représenter une source supplémentaire de stress pour les astrocytes.

Pour ce, la souche *Saccharomyces cerevisiae* a été cultivée à 30°C et inoculée dans un YPD Gipco Broth (Thermo Fisher Scientific). L'inoculum a été cultivé pendant une nuit dans 10 mL de milieu dans un bioshaker à 150 coups par min avec une densité optique initiale à 600 nm de 0,1.

1.1. Traitement thermique

Les extraits traités avec la chaleur ont été plongés dans un bain d'eau chaude à 60°C et 90°C pendant 1h30, et les extraits de contrôle ont été plongés dans un bain-marie à 25°C pendant 1h30. Après incubation, les extraits ont été conservés à température ambiante et le même test de cytotoxicité (voir paragraphe 3) a été réalisé immédiatement après.

1.2. Digestion aux Hydrolases

Pour dénaturer la majeure partie de la fraction polysaccharidique de l'algue, les extraits ont été mélangés avec les enzymes à savoir la cellulase (de *Trichoderma reesei* EC 3.2.1.4, pH 5) et la pullulanase (de *Klebsiella pneumoniae* CE 3.2.1.41, pH 5) dans des tubes Eppendorf (1,5ml) puis ont été digérés pendant une nuit respectivement à 37°C et 25°C au bain-marie en mode agitation. La concentration finale des enzymes était de 5U/ml et de 10U/ml pour les deux hydrolases.

Le lendemain, les mélanges ont été placés à 4°C pendant 30mn afin d'arrêter les processus d'hydrolyse enzymatique.

Un Ulvane commercial, extrait d'*Ulva armoricana*, a été utilisé comme un contrôle positif et les cellules ont subi exactement le même dosage de cytotoxicité comme mentionné ci-dessus (voir la fiche technique dans la partie annexe).

1.3. Digestion par la protéase

La digestion de la fraction protéique de l'algue verte a été réalisée en utilisant un système enzymatique comprenant la trypsine (Promega). Cette enzyme est une sérine-protéase qui clive spécifiquement au niveau du groupement carboxyle de l'arginine et de la lysine.

Le même volume de la suspension de l'extrait a été utilisé comme précédemment et le dosage des protéines a été effectuée selon la méthode de Bradford avant et après la digestion des protéines afin d'évaluer le processus de dénaturation des protéines.

La solution d'enzyme (contenant 20 µg de trypsine dans 200µl de tampon de suspension) a été maintenue dans un bain de glace puis ajoutée à la suspension de protéines avec un rapport de protéase : protéine de 1:20 et 1:10 . Ensuite, le mélange a été incubé à 37°C pendant une période de 3 heures à une nuit selon l'étendue de la digestion et, enfin, les produits de digestion ont été placés à 4°C pendant 30mn afin d'arrêter l'action de la trypsine. Le même test de cytotoxicité a été réalisé tout de suite après.

B- Analyse Protéomique

Une analyse protéomique a été réalisée par la méthode Label Free, étant donné que c'est une approche par couplage chromatographique au spectrométrie de masse qui présente une meilleure sensibilité par rapport aux autres méthodes classiques.

1. La méthode Label Free

1.1. Concentration des protéines sur gel SDS-PAGE et coloration au bleu de coomassie

Après dosage des protéines par la méthode Bradford, 30 µg des échantillons protéiques d'ulva sont déposés sur un gel SDS-PAGE à 7% d'acrylamide afin de mieux les concentrer (Tableau 8). La migration dans un tampon adéquat (tableau 9) est effectuée d'abord sous un courant de 10 mA/gel et ce pendant 45 min puis un courant de 20 mA/gel est appliqué pendant 2h.

Tableau 8. Composition du gel de concentration SDS-PAGE 7%

Produits	Volume (ml)
Tris pH6.8	5
Mélange Acrylamide/Bisacrylamide	9.3
Eau milliQ	22.05
SDS 10%	0.4
TEMED	0.04
Persulfate d'ammonium 10%	0.4

Tableau 9. Composition du tampon de migration

Produits	Composition
Tris Base	3 g
SDS	1 g
Glycine	14 g
Eau milliQ	Qsp 1 L

A la fin de la migration, les gels sont introduits dans un bain colorant au bleu de Coomassie (Tableau 10) pendant une minute, puis mis dans un bain de décoloration jusqu'à apparition d'une bande fine contenant les protéines d'intérêts. Les bandes sont alors excisées puis stockées à 4°C.

Tableau 10. Composition de la solution de coloration et de décoloration

Produits	Composition (ml)
Acide acétique	10
Ethanol	50
Eau milliQ	Qsp 100
Bleu de Coomassie R-250 (solution de coloration)	0.5 g

1.2. Préparation des échantillons à la spectrométrie de masse

Après la révélation par Brillant G250 bleu, les fines bandes de protéines ont été lavées puis réduites dans le DTT à 5mM (7.7 mg, 10 mL d'eau milliQ) et les cystéines étaient irréversiblement alkylées dans 25mM d'iodoacétamide (18.5 mg, 10 mL d'eau milliQ). Les bandes de gel ont été lavées avec de l'eau, ensuite tamponnées dans des solutions de carbonate/acétonitrile (V/V) suivi d'un bain d'acétonitrile.

La digestion des protéines est ensuite réalisée dans une solution trypsique à 10µg/ml (reprise dans du tampon carbonate) durant 3h sous agitation à 37°C. Après incubation, la récupération des peptides est effectuée dans les surnageants après différents bains de lavage à l'eau milliQ, au

TFA 1% et à l'acéto-trinile. Les peptides qui baignent dans les surnagants sont séchés au speedvac pendant 2 à 4 h avant d'être conservés à 4°C.

1.3. Etape de la LC-MS/MS

Les peptides générés ont été, tout d'abord, dissous dans l'acide formique à 0,1% et dans de l'eau. Toutes les expériences ont été réalisées avec un spectromètre de masse à trappe d'ions Orbitrap-linéaire (LTQ Orbitrap Elite, Thermo Scientific) équipé d'une source nano-ESI et couplé à une chromatographie nanoliquid (Easy-nLC II, Thermo Scientific). Les échantillons (1 µl) ont été injectés dans une colonne d'enrichissement (C8, 0,5 x 2 mm, Michrom Bioresources), puis séparés sur une colonne à phase inverse (C18, L 153 mm, ID 5µm, 100 Å taille de pores, NikkyoTechnos, Japon). Le gradient (phase mobile A, H₂O / acide formique à 0,1% (FA); la phase mobile B, CH₃CN/0,1% FA) a été débité à 300 nl/min. La séparation des peptides à partir de la colonne en phase inverse dans le spectromètre de masse a été effectuée avec une tension capillaire fixée à 1,5kV et une température de la source fixée à 200°C. Cette étape est assurée selon un gradient linéaire de 2 à 40% en 105min, puis une augmentation rapide de 80% en 4 min et enfin à 80% pendant 15 min.

L'enregistrement du balayage MS initial dans l'analyseur Orbitrap a été effectué avec une résolution de 60000 sur une gamme de masse m/z 400-2000. Les ions mono-chargés n'étaient pas sélectionnés et le seuil de signal d'intensité pour la sélection du précurseur fixé à 500.

La fragmentation était effectuée au niveau de l'analyseur trappe ionique linéaire avec une énergie de collision normalisée de 35 %.

Le spectromètre de masse fonctionne en mode Data Dependent Mode et seulement les 20 ions les plus intenses de la fragmentation ont été sélectionnés.

Il est à noter que, toutes les mesures ont été réalisées dans l'analyseur après calibration interne à l'aide du pic de m/z à 445,12002 correspondant à un polydiméthylcyclosiloxane.

1.4. Identification des protéines

Les fichiers des données brutes ont été importés et traités en utilisant un logiciel Proteome Discoverer (version 1.3, Thermo Scientific). Les spectres MS/MS ont été comparés à la base de données NCBI en utilisant le moteur de recherche MASCOT (version2.2, Matrix Science).

Les paramètres suivants sont considérés comme des modifications variables : 1 clivage manquant et les modifications variables concernant la carbamidométhylation (Cys) et l'oxydation (Reichow

S.L.). La tolérance de masse sur l'ion précurseur et les ions fils a été fixée respectivement de 10 ppm et de 0,5 Da. Les résultats ont été filtrés pour un taux maximal de faux positifs de 5%.

Il est à noter que dans cette partie les identifications ont été réalisées à partir des 4 extraits différents de l'algue à savoir les extraits lyophilisé, séché au soleil, séché à l'étuve et frais afin de permettre l'identification d'un nombre maximal de protéines.

IV- Purification et identification

1. Electrophorèse monodimensionnelle

Après dosage des protéines par la méthode Bradford, 2, 4 et 6 µg de l'échantillon protéique ont été déposés au-dessus d'un gel de polyacrylamide composé d'un gel de concentration 4.5% et d'un gel de séparation 12.5 %. Les étapes de migration du gel et sa coloration sont semblables à celles décrites précédemment (voir paragraphe 4.2.1.).

2. Fractionnement de l'extrait selon le poids moléculaire

L'extrait protéique d'*Ulva rigida* a été fractionné en fonction du poids moléculaire par l'intermédiaire des filtres centrifuges Microcon® (Laboratoires Merck) en différentes fractions à savoir **F30**: PM > 30 kDa; **F10**: 30 kDa <MW> 10 kDa; **F3**: 10 kDa <MW> 3 kDa; **F0**: PM <3 kDa.

Pour ceci, un dispositif est formé de deux tubes avec bouchons attachés et d'une membrane d'ultrafiltration Microcon®. Lors de chaque utilisation, un tube est fait pour recueillir le filtrat, et l'autre pour récupérer un concentré. Initialement, les membranes sont prélavées avec de l'eau MilliQ afin d'éliminer toute trace d'interférent. Après l'insertion de la membrane de 30 KDa dans le tube, 500µl de l'extrait sont pipetés doucement au-dessus afin d'éviter d'abimer la membrane. Le dispositif est ensuite mis à centrifuger à 14000 x g pendant 20min (centrifugeuse 1-15, Sigma), la membrane est alors dévissée et placée au-dessus d'un nouveau tube. L'assemblage est inversé et centrifugé pendant 3 minutes à 1000 x g pour transférer le retenu des protéines correspondant à la fraction **F30** dans le tube. D'autre part, le filtrat est récupéré dans une nouvelle membrane de coupure de 10 KDa. Le tout est centrifugé à 14000 x g pendant 40 min (centrifugeuse 1-15, Sigma). Le retenu obtenu au-dessus de la membrane représente la fraction **F10** inversée et récupérée de la même façon que précédemment. Le filtrat est alors versé dans une membrane de 3 KDa. La centrifugation est réalisée, dans ce cas, pendant 10 min à 500g seulement. Le retenu final correspond à la **F3** alors que le filtrat récupéré **F0** contient les protéines de faible poids moléculaire inférieur à 3 KDa. Toutes les fractions sont alors récupérées et

stockées à -20°C dans des tubes hermétiques pour une utilisation ultérieure. Dans une seconde étape, un dosage des protéines par la méthode Bradford est effectué pour toutes les fractions et le même test d'activité (test de cytotoxicité sur des cultures d'astrocytes voir paragraphe II.5) est réalisé afin de déterminer la ou les fractions à activité protectrice contre les radiations UV-B.

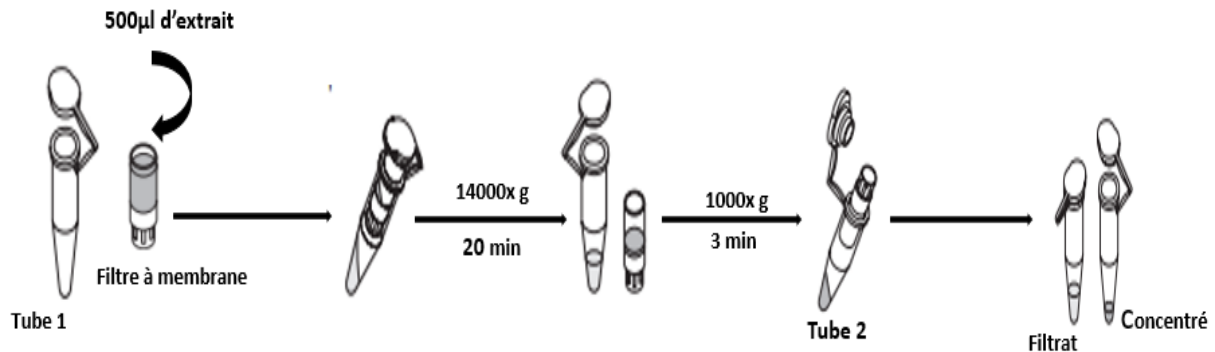


Figure 23. Différentes étapes du fractionnement via les filtres centrifuges Microcon.

(Merck, Millipore)

3. Détermination des bandes actives

Après détermination des fractions actives, un grand gel d'acrylamide composé d'un gel de concentration 4.5%, 5 cm de hauteur et d'un gel de séparation 12.5 %, 20 cm de hauteur a été mis à migrer. La quantité déposée dans chaque puit étant de 90 µg en protéines additionnée d'un tampon de charge (Laemmli) (0.1 ml Bleu de bromophénol 1%, 2 g SDS, 10 ml glycérol, 25 ml Tris pH 6.8 0.25M, qsp 100ml eau milliQ). La durée totale de la migration est de 6 heures (1h à 10 mA/gel puis 5h à 20 mA/gel) avec un voltage de 300 V. Une fois démontés, les gels sont colorés ou non au bleu de coomassie sur toute la nuit puis décolorés à l'aide de la solution de décoloration jusqu'à observation de toutes les bandes. Deux bandes majoritaires à 75KDa et à 20 KDa approximativement sont alors excisées, découpées en petits fragments puis stockées à 4°C.

3.1. Electroélution des protéines

Cette méthode permet, grâce à un montage spécifique et réfrigéré (BIOTRAP), au courant de passer à travers des fragments de gel contenant la protéine à purifier. En effet, les petits morceaux de gel sont placés dans une chambre d'électrophorèse horizontale. Alors que les protéines migrent vers une petite chambre délimitée par une membrane empêchant les molécules de plus de 5 KDa de passer, le gel est retenu dans une zone de piège formée par des membranes appelées BT1 et BT2. Ces protéines sont éluées dans un tampon de transfert spécifique (tableau

11). La migration se fait sur 3 heures sous un courant de 120 mA, un voltage de 200 V et une puissance de 60W.

Tableau 11. Composition du tampon d'électro-élution

Produits	Composition
Glycine 192mM	28.82g
Tris base 25mM	6.055g
SDS 0.025%	0.5g
Eau milliQ	Qsp 2L

À la fin de l'électroélution, la majorité des protéines éluées se retrouvent collées à la membrane piège. La polarité de la cuve est alors inversée pendant 30 secondes afin de les décoller. Le volume final obtenu de chaque éluat étant de 400µl.

3.2. Dialyse et Vérification de la pureté par SDS PAGE

Les différentes protéines sont ensuite récupérées dans des boudins de dialyse avec un seuil de coupure de 14000 Da. Ces derniers sont mis à dialyser dans une chambre réfrigérée contre du tampon PBS et ce durant toute la nuit. Cette étape a pour but d'éliminer d'abord le SDS puis le bleu de Coomassie. Le dialysat obtenu est récupéré dans un tube Eppendorf.

La pureté des protéines électroélues est vérifiée par passage sur un mini Gel SDS-PAGE à 12,5% d'acrylamide pour celle ayant un poids moléculaire de 75 KDa et à 15% d'acrylamide (2.5 ml d'acrylamide/ bisacrylamide, 1.25ml Tris pH 8.9, 1.17ml eau milliQ, 0.025ml SDS 20%, 0.05ml APS 10% et 0.002ml TEMED) pour la protéine aux alentours de 20 KDa. Après polymérisation des gels, 17µl de chaque protéine sont déposés dans un puit, additionnés de 5 µl de tampon Laemmli. Les mêmes conditions de migration précédemment décrites (paragraphe IV.1) sont établies. Les gels sont révélés au nitrate d'argent.

3.3 Test d'activité

Le même test d'activité établi précédemment (test de cytotoxicité sur des cultures d'astrocytes voir paragraphe II.5) est réalisé afin de déterminer la ou les bandes ayant une activité protectrice contre les radiations UV-B. 100µl de chaque éluat sont utilisés par puit afin de tester son éventuel effet protecteur.

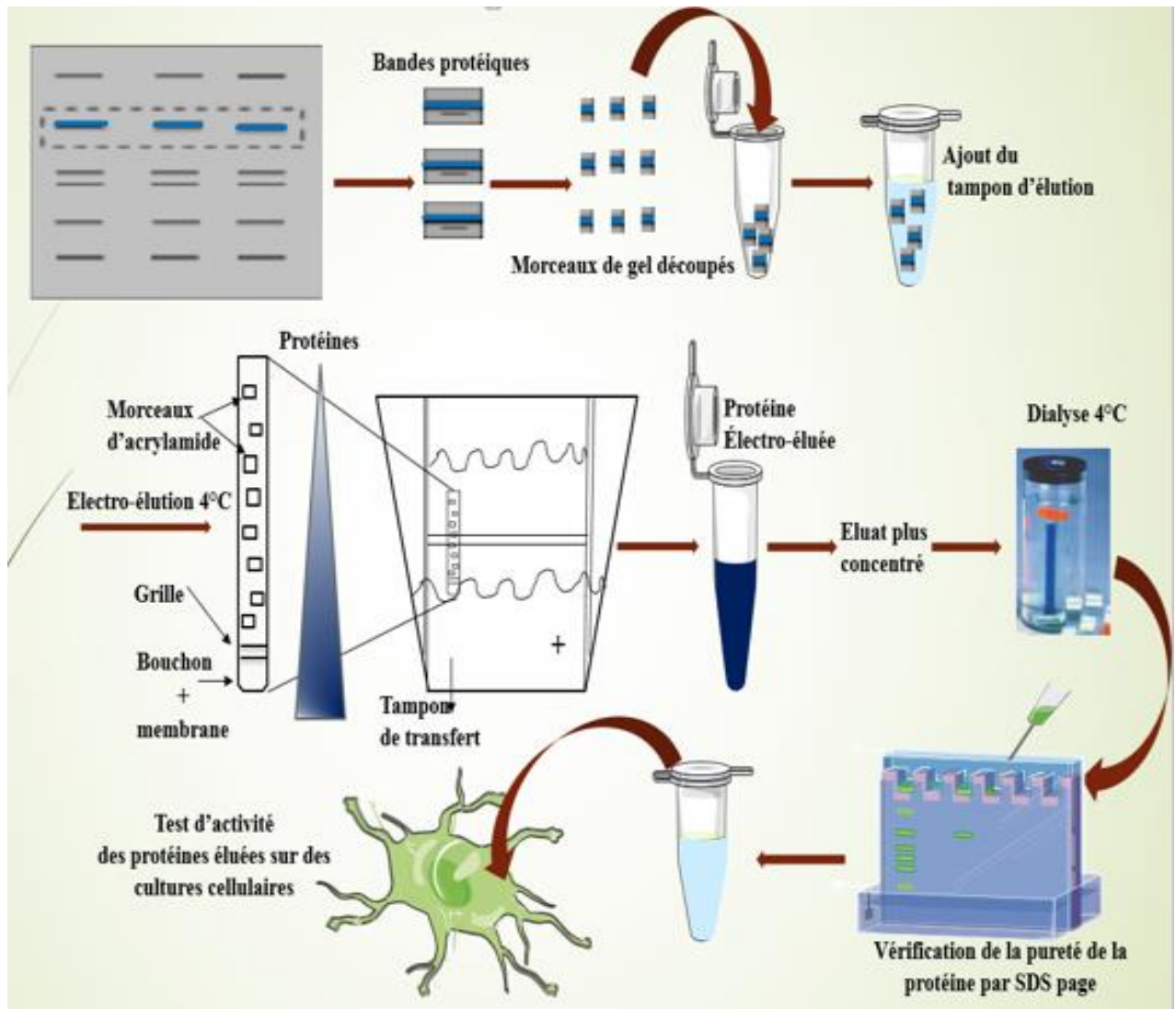


Figure 24. Protocole de purification des protéines à partir des gels en polyacrylamide.

4. Dosage de la concentration en protéines dans l'éluat

Un dosage de la concentration en protéines est effectué sur gel SDS PAGE 15% d'acrylamide contre une gamme de concentrations croissantes en BSA (serum bovine albumin, Sigma Aldrich) qui est une protéine standard utilisée fréquemment comme étalon dans les dosages protéiques habituels. Dans ce cas, le dosage colorimétrique Bradford n'est pas effectué à cause de la coloration bleuâtre des protéines éluées qui se maintient légèrement même après dialyse. Les concentrations étant de 2, 1.5, 1, 0.7, 0.5, 0.1, 0.01, 0.05 mg/ml. Un volume de 17 μ l de la protéine est ajouté au tampon de charge et le tout est mis à migrer dans les conditions habituelles. La coloration est faite au bleu de coomassie.

5. Identification de la protéine par spectrométrie de masse

L'identification de la protéine a d'abord été faite par la méthode MALDI-TOF. En effet, un gel à 15% d'acrylamide est réalisé exactement dans les mêmes conditions que le paragraphe IV.3.2. La bande est ensuite découpée et mise à digérer à la trypsine. Les peptides obtenus sont ensuite séchés au speed vac, puis resuspendus dans 10 μ L d'une solution contenant: 0,2% d'acide formique, 5% d'acétonitrile. Leur analyse est effectuée par spectrométrie de masse MALDI-TOF (prOTOTM 2000, Perkin Elmer). La protéine est identifiée par comparaison des spectres de masse expérimentaux avec ceux obtenus par digestion in silico à partir des séquences protéiques théoriques figurant dans le serveur de base des données Mascot.

Parallèlement, une analyse shot gun et une identification sur un spectromètre de masse LTQ Orbitrap Elite (Thermo Scientific) présentant plus de sensibilité par rapport à la première analyse a été entretenue afin de consolider la première identification (voir paragraphe III.3).

6. Alignement de la protéine identifiée avec la commerciale

Grâce à l'outil bio-informatique Clustal W, nous avons pu aligner la séquence de la protéine identifiée à son homologue commerciale (calmoduline bovine commerciale; Sigma Aldrich).

7. Verification de l'identité de la protéine

7.1. Western blot

La protéine identifiée (100 μ g/ml) ainsi que son homologue commerciale (1mg/ml) sont introduites dans des tubes à PCR à raison de 22.5 μ l et 5 μ l respectivement et sont additionnées à 7.5 μ l de tampon Laemmli 4x concentré. Le tout est dénaturé à 70°C pendant 10 min puis déposé sur un gel à gradient 4-20% d'acrylamide (BIORAD). L'électrophorèse est réalisée en condition dénaturante sous une tension de 200V pendant 20 min. A la fin de la migration, les protéines sont transférées, en mode semi sec, sur une membrane de nitrocellulose (Sigma Aldrich, France). Ce transfert est d'une durée courte de 7 min.

La membrane Wattman est ensuite incubée pendant 2 h dans une solution de saturation (4% de lait en poudre et 0,1% de Tween 20) afin de bloquer les sites de fixation aspécifiques. Après saturation, un prélavage de la membrane est effectué dans du tampon PBS/ Tween 0.05% (deux bains de 10 min) avant l'incubation durant une nuit à 4°C de la membrane avec l'anticorps polyclonal primaire anti-calmodulin (antibody produced in rabbit, Sigma Aldrich, France). Le gel est coloré au bleu de Coomassie afin de s'assurer du transfert total des protéines.

L'incubation avec l'anticorps secondaire est précédée par un lavage au PBS/ Tween 0.1%. L'anti-rabbit IgG peroxydase (antibody produced in goat) est donc incubé en présence de la membrane durant 1 heure. Finalement, 5 bains successifs au tampon de lavage sont réalisés dans le but d'éliminer l'excès d'anticorps secondaire et la révélation de la membrane est effectuée en utilisant un kit de détection chimioluminescence (ECL System, Amersham). Le produit de la réaction émet une luminescence proportionnelle à la concentration en protéine.

7.2. Immuno-précipitation

Une étude d'immunoprécipitation a été entretenue afin de mettre en évidence l'éventuelle interaction entre la protéine d'intérêt et l'anticorps anti-calmoduline. L'extrait protéique total a donc été incubé en présence des protéines G et de l'anticorps spécifique à la calmoduline.

Néanmoins, plusieurs étapes préparatoires précèdent cette co-incubation. En effet, tout d'abord 100 µg en protéines sont incubés en présence de 5 µl d'anti-calmoduline à 4°C sous une agitation modérée pendant une heure. Pendant ce temps, 100 mg de protéines G-couplées à des billes de Sepharose sont incubés dans du tampon PBS 0.1M pendant une heure afin qu'ils gonflent, puis après centrifugation, on retire le surnageant et on ajoute 1ml de PBS-BSA 1% p/v aux protéines G, qu'on mélange pendant une heure et qu'on rince ensuite deux fois dans du PBS 0.1M. Finalement, 100µl de ces billes sont rajoutés au mélange protéine-anticorps. Ce mélange est gardé à 4°C sous agitation douce pendant une nuit. Une fois le temps d'incubation est terminé, différentes étapes successives de lavages et de centrifugation ont permis l'élimination des protéines n'ayant pas interagi avec la protéine d'intérêt qui s'est complexée avec l'anticorps. L'échantillon protéique est ensuite analysé sur un SDS-Page.

8. Application sur des cultures d'astrocytes

Des cultures secondaires corticales d'astrocytes ont été réalisées dans les mêmes conditions que précédemment afin d'évaluer la capacité de la calmoduline purifiée et de son homologue commerciale à contrecarrer l'effet d'un stress oxydatif toujours induit par UV-B.

Un test de survie a également été effectué suite à un traitement des cellules par des quantités croissantes en protéines purifiée et commerciale à savoir 5, 10 et 20 µg et ce en l'absence ou la présence de rayonnements UVB. La dose de 20 µg a été choisie afin d'évaluer la cytotoxicité cellulaire ainsi que les différents marqueurs du stress oxydatif initialement testés (voir **chapitre II**).

9. Evaluation de l'effet neuroprotecteur sur une culture des neurones en grain

Une culture *in vitro* des cellules granulaires est préparée à partir de cervelets de 8 jours des rats Wistar selon la méthode (Solecki *et al.* 2001). Tout d'abord, les rats ont été décapités et les cervelets ont été recueillis dans du milieu contenant du DMEM. Après déminement, les cervelets ont été coupés en de fins fragments de tissus puis ont été lavés avec 10 ml d'une solution de Krebs additionnée de 0,3% de BSA et 0,02% de MgSO₄. 0,02% KBM (milieu basal des kératinocytes). Après centrifugation à 100x g pendant 10 s, le surnageant a été éliminé et remplacé par 10 ml de KBM additionné de 2,5 mg de trypsine. Au bout de 3 minutes de la digestion enzymatique, 10 ml d'une solution de Krebs supplémentés avec 3,2 mg d'inhibiteur de trypsine et 0,5 mg de DNase ont été ajoutés pour arrêter la réaction. La suspension a été centrifugée à 100 g pendant 10 s, le surnageant a été éliminé et remplacé par 10 ml de KBM additionné d'un inhibiteur de trypsine de 5,2 mg et 0,8 mg de DNase. La suspension a ensuite été pipetée de haut en bas avec une pipette Pasteur afin d'assurer une dissociation mécanique. La suspension a ensuite été transférée dans un tube contenant 5 ml de KBM additionné de 0,001% de CaCl₂ et on centrifuge à 200x g pendant 5 min. Les cellules ont été remises en suspension dans un milieu de culture et ensemencé dans des plaques multi-puits (Costar, Tewksbury, USA) à une densité de 1×10^6 cellules / ml. Les cellules ont été cultivées dans un milieu chimiquement défini constitué de 75% de DMEM et 25% de Ham F-12 supplémenté avec de la glutamine 2 mM, KCl 25 mM, un supplément de 1% d'insuline-transferrine-sélénium, une solution d'antibiotique-antimycotique 1% et 10% de FBS. Après 24 h, 10 uM de β -ARAC (cytosine- β -d-arabinofuranoside) a été ajouté au milieu afin d'inhiber la synthèse d'ADN. Les cellules ont été cultivées à 37°C dans un incubateur humidifié dans une atmosphère de 5% de CO₂ / 95% de O₂. Au bout de 7 jours, les cultures de granules neuronales sont utilisées pour tester l'effet de la protéine d'intérêt.

Des essais de viabilité cellulaire sont réalisés sur ces cultures de GN dans des conditions similaires à celles des cultures astrocytaires.

Analyse statistique

Toutes les données ont été exprimées en moyenne \pm SEM à partir d'au moins trois expériences indépendantes. L'analyse de la variance (One Way ANOVA) a été systématiquement effectuée pour en déduire la signification statistique pour l'ensemble des résultats. Tout d'abord, un test de Shapiro a été réalisé pour évaluer la normalité de la distribution des données. Ensuite, un test d'homogénéité de variance a été réalisé (test de Brown-Forsythe). Le test de Holm-Sidak a été finalement utilisé pour des comparaisons par paires ou des comparaisons par rapport à un groupe témoin, les valeurs p correspondantes étant indiquées dans les tableaux et les figures.

Une valeur p de 0,05 ou moins a été considérée comme statistiquement significative.

Résultats

Chapitre I: Optimisation de l'extraction et évaluation de l'activité antioxydante

Ce premier chapitre des résultats met le point sur l'évaluation des différentes méthodes de pré-traitement de l'algue ainsi que différents protocoles d'extraction et ce dans le but d'optimiser et de standardiser une méthode assurant un meilleur rendement en protéines et une meilleure activité antioxydante des molécules bioactives de l'algue verte *Ulva rigida*.

1. Détermination de la teneur totale en protéines

1.1. Différents types de traitement de l'algue et dosage des protéines

La méthode Bradford (1976) impliquant la protéine standard Sérum Bovine Albumine a été utilisée afin d'évaluer la concentration protéique de chaque extrait suite à différents types de traitements de l'algue à savoir la lyophilisation, le séchage au soleil, le séchage au soleil suivis par un broyage et une extraction des protéines. L'autre méthode consiste en un broyage de l'algue à son état frais puis la même étape d'extraction est réalisée. Dans ce paragraphe, les différents prétraitements ont été suivis par le même protocole d'extraction des protéines, à noter la précipitation à l'éthanol.

Tableau 12. Variation de la teneur en protéines du précipité éthanolique de *Ulva rigida* en fonction du type de traitement.

<i>Traitement</i>	<i>Concentration en protéines (mg.mL⁻¹)</i>	<i>Protéines Totales (% dry weight)</i>
Matériel fraîchement broyé	0.96±0,07	4,83±0,37
Matériel lyophilisé	2,63±0,04	13,16±0,55
Matériel séché à l'étuve	2,33±0,09	11,66±0,5
Matériel séché au soleil	0.72±0,1	3,6 ±0,53

Les valeurs sont la moyenne ± S.D. (n = 3).

Le Tableau 12 illustre le contenu en protéines des extraits *Ulva rigida*. Les résultats soulignent des variations assez importantes. La teneur en protéines de chaque extrait varie en fonction des procédés de séchage ou de broyage de la matière fraîche. La concentration maximale en protéines

(2.63 mg/ml, ce qui représente 13% du poids sec) a été obtenue après lyophilisation. Ce prétraitement assurant le meilleur rendement en protéines totales a été adopté tout au long des manipulations ultérieures.

1.2. Différentes techniques d'extraction

Le but de cette manipulation étant d'optimiser la méthode d'extraction afin d'assurer un meilleur rendement, dans ce cas, en termes de protéines tout en conservant leur activité biologique.

1.2.1. Détermination de la concentration protéique selon le type d'extraction

Nous avons donc réalisé le dosage des protéines des extraits d'algue, précédemment lyophilisés, suivant le type de précipitation et en variant les tampons. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 13. Variation de la teneur en protéines des extraits protéiques d'*Ulva rigida* en fonction du type d'extraction et en fonction des tampons.

<i>Concentration en protéines (mg/ml)</i>			
Précipitation	Précipitation à l'éthanol		Précipitation au sulfate d'ammonium
Solubilisation	<u><i>Tris HCl</i></u>	<u><i>Eau</i></u>	<u><i>Tris HCl</i></u>
	<i>2,63±0,04</i>	<i>1.65± 0.12</i>	<i>1.35±0.11</i>

Les valeurs sont la moyenne ± S.D. (n = 3).

Les résultats montrent que suite à la précipitation des protéines par deux méthodes différentes, le dosage Bradford montre une meilleure teneur suite à la précipitation à l'éthanol 70% par rapport à la précipitation au sulfate d'ammonium (saturé à 80%), également l'utilisation du tampon Tris HCl (0.1M) assure un meilleur résultat en terme de concentration protéique par rapport à l'eau. Ceci témoigne d'une meilleure efficacité de la première méthode d'extraction par rapport à la seconde.

Par ailleurs, une troisième méthode de précipitation à l'acide trichloracétique et au sodium DeOxyChloate monohydrate (DOC/TCA) a été entreprise mais le sédiment des protéines résultant a été tellement difficile à redissoudre que nous avons été convenus à renoncer à cette méthode et même la concentration obtenue de la partie soluble a été de l'ordre de quelques µg/ml.

1.2.2. Détermination du profil protéique par électrophorèse monodimensionnelle

Après détermination de la concentration en protéines récupérées des deux types d'extraction, et afin d'évaluer la qualité de ces deux méthodes de précipitation, nous avons voulu déterminer le profil protéique relatif à chacun de ces deux extraits à travers une analyse par électrophorèse monodimensionnelle (SDS PAGE à 12% d'acrylamide) représenté par la figure ci dessous. Une même quantité de protéines (6 μ g) a été déposée dans les deux gels.

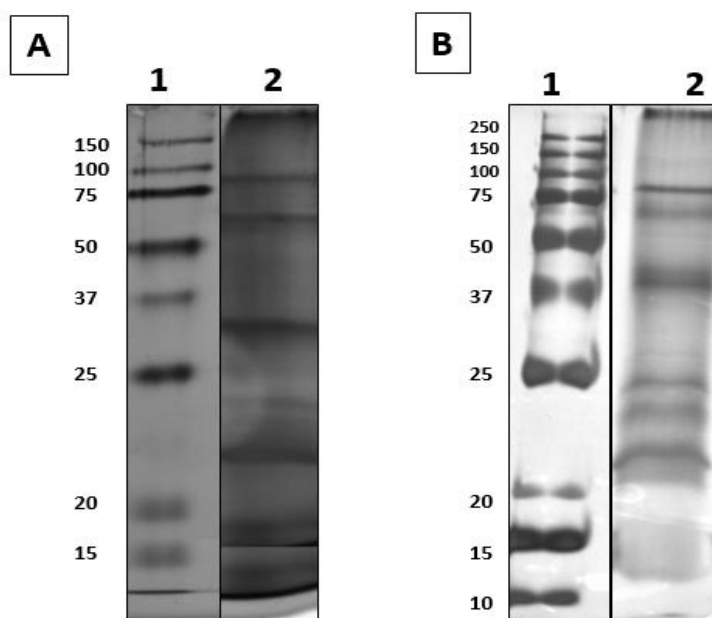


Figure 25. Gel SDS-PAGE à 12% d'acrylamide à partir des extraits protéiques.

A: précipitation au sulfate d'ammonium, B: précipitation à l'éthanol. 1: Marqueurs de poids moléculaire, 2: Protéines de l'extrait.

2. Détermination de l'activité antioxydante

2.1. Capacité de piégeage du radical DPPH•

Les propriétés anti-radicalaires de l'extrait algaire ont été évaluées par deux tests : le test de piégeage du radical diphényl picryl-hydrazyl (DPPH•) et le Trolox équivalent capacité antioxydante (TEAC).

Dans le cas du test DDPH, l'évaluation du potentiel anti-radicalaire est représentée par la figure 26 (A) qui illustre bien la capacité de l'extrait *Ulva rigida* à piéger les radicaux libres. Des différences ont été observées en fonction du traitement subi par l'algue c'est-à-dire des méthodes de séchage ou de broyage de la matière fraîche. L'activité maximale de piégeage des radicaux DPPH est d'environ 96, 404 % et elle correspond aux extraits d'algue lyophilisée au maximum de concentration testée (1 mg/ml).

La concentration de chaque extrait nécessaire pour atteindre 50% de réduction du radical DPPH \cdot (IC50) est de 0,555 mg/ml, 0,188 mg/ml, 0,227 mg/ml et 1,67 mg/ml, respectivement pour le matériel fraîchement broyé, le produit lyophilisé, le matériel séché au four et celui séché au soleil.

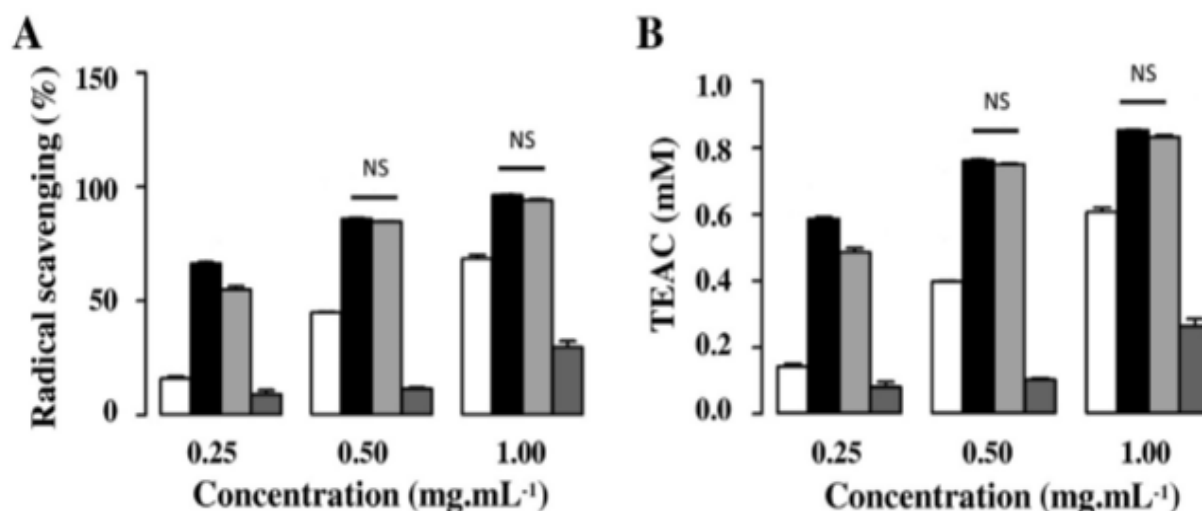


Figure 26. Evaluation des propriétés antioxydantes des extraits de l'algue à différentes concentrations.

(A) Activité anti-radicalaire DPPH (B) Activité anti-oxydante Trolox équivalent (mM trolox/g matière sèche) des extraits de l'algue à différentes concentrations (0.25, 0.5, 1 mg.mL⁻¹). Les résultats représentent une moyenne de 3 essais (n = 3). Code couleur : blanc, matériel fraîchement broyé ; noir, matériel lyophilisé; gris clair, séchage au four; gris moyen, séchage au soleil. Toutes les différences sont statistiquement significatives (p < 0,001), sauf dans les cas mentionnés (NS: non significatif).

L'activité antioxydante a également été mesurée et exprimée en Trolox équivalent capacité antioxydante (TEAC), où l'unité de TEAC est définie comme la concentration de trolox ayant une activité antioxydante équivalente et exprimée en mM /g de matière sèche (Figure 26B).

Les valeurs maximales ont été obtenues après lyophilisation et une capacité similaire a été observée pour le matériel séché au four.

2.2. Pouvoir réducteur des extraits

Le potentiel antioxydant résulte généralement de la présence des molécules capables de donner un électron. Le pouvoir réducteur des extraits d'*Ulva rigida*, en particulier leur capacité à transformer le complexe Fe³⁺/ferricyanure à la forme de fer est testée. La Figure 27 montre la capacité réductrice des extraits en comparaison avec l'activité de l'acide ascorbique.

L'activité de l'acide ascorbique a été significativement plus faible que l'extrait lyophilisé quelle que soit la concentration testée.

Toutefois, pour une même concentration les autres extraits ont montré des propriétés réductrices similaires à l'acide ascorbique à l'exception de l'extrait séché au soleil qui présente une activité très réduite comparée au standard.

Ceci est en accord avec les résultats du dosage DPPH qui démontrent que l'extrait lyophilisé contient probablement plus de donneurs d'électrons réagissant avec les radicaux libres que les autres extraits.

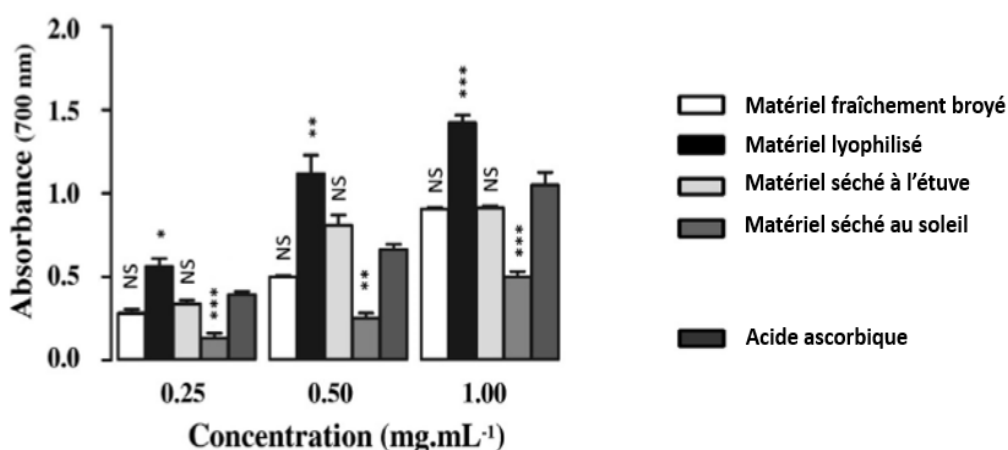


Figure 27. Le pouvoir réducteur des extraits de l'algue *Ulva rigida* à différentes concentrations.

Les résultats sont les moyennes de 3 essais (n = 3). Code couleur: blanc, matériel fraîchement broyé; noir, matériel lyophilisé; gris clair, séchage au four; gris moyen, séchage au soleil et gris foncé, le pouvoir réducteur de l'acide ascorbique. L'analyse statistique est établie entre un échantillon donné (pour les différents traitements) et le contrôle correspondant (mesure de l'absorbance de l'acide ascorbique): * p < 0,05; ** < 0,01; *** p < 0,001; NS, non significatif.

En conclusion, ces études préliminaires ont d'abord montré que la lyophilisation représente le traitement le plus adéquat en termes de teneur en protéines totales. Ce même traitement favorise également une meilleure activité antiradicalaire et antioxydante et un puissant pouvoir réducteur par rapport aux autres traitements de l'algue. De plus, les études d'optimisation de l'extraction des protéines ont favorisé la précipitation à l'éthanol absolu par rapport à la précipitation au sulfate d'ammonium puisque la première semble assurer une meilleure concentration en protéines et un meilleur profil électrophorétique. A l'issue de ces résultats, nous

avons opté pour le traitement de l'algue par lyophilisation qui semble assurer une meilleure conservation des molécules actives ainsi que la méthode d'extraction par précipitation à l'éthanol pour la suite des expérimentations.

Chapitre II: Evaluation de l'effet glioprotecteur de l'extrait protéique d'*Ulva rigida* PE contre la mort cellulaire induite par les rayonnements UV-B

Il est connu que les astrocytes sont très sensibles au stress oxydatif et bien qu'ils renferment de fortes concentrations en molécules antioxydantes telles que les enzymes antioxydantes, ces cellules restent plus ou moins vulnérables selon le degré de l'oxydation de leurs molécules ce qui se traduit par des troubles neurodégénératifs fréquents. C'est pour ces raisons que nous avons choisi ce type cellulaire en particulier (cultures secondaires d'astrocytes) afin de pouvoir évaluer, in vitro, un éventuel effet protecteur de PE contre les effets délétères d'un stress oxydatif induit par des rayonnements UV-B. Ce modèle représente un outil idéal pour caractériser, d'une part l'effet gliotoxique des UVB et d'autre part la protection assurée par l'extrait PE étant donné que les astrocytes participent activement à la réponse du cerveau aux agressions induites par les infections, les maladies neurogénératives ou encore l'ischémie et donc à la protection des neurones avoisinantes de la mort apoptotique qui est la principale conséquence de toutes ces agressions.

1. Effet des rayonnements UV-B sur la survie cellulaire

Nous avons tout d'abord commencé par faire une évaluation du temps d'exposition à l'UV-B sur la viabilité cellulaire des astrocytes.

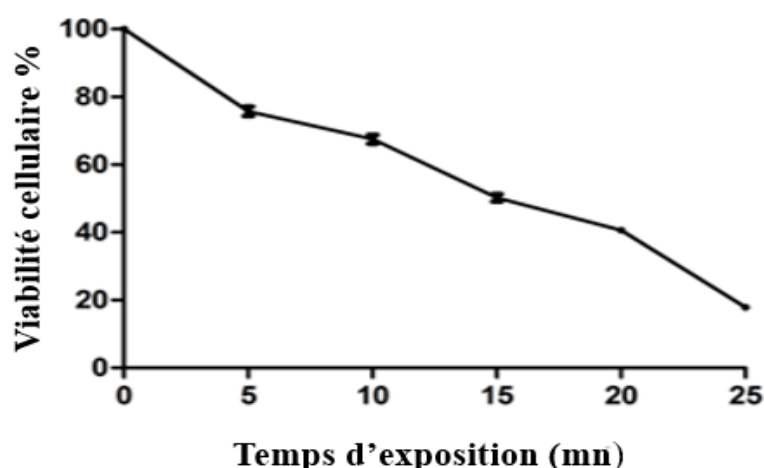


Figure 28. Effet de l'exposition aux rayonnements UV-B sur la survie cellulaire en fonction du temps.

Chaque valeur est une moyenne (\pm SEM) calculée à partir d'au moins quatre puits différents. ANOVA suivie par le test de Bonferroni. *** $p < 0,001$ statistiquement très différent du contrôle.

La figure 28 démontre la diminution de la survie des cellules de manière dépendante de la durée de l'exposition aux UV-B. Les résultats ont montré que la viabilité des cellules a diminué de manière significative de 24,2 % , 32,5%, 49,8 % , 59,4% et 82,1 % , respectivement , après 5 , 10, 15 , 20 et 25 minutes d'exposition aux rayons UVB, par rapport aux cellules témoins (non exposées). Les résultats sont exprimés en pourcentage de contrôle. Le temps d'exposition de 15 mn, qui a tué approximativement 50 % des cellules, a été utilisé dans toutes les expériences ultérieures.

Par ailleurs, la mesure de l'irradiance également dite éclairage énergétique de la lampe UV-B utilisée a été mesurée et une valeur de 0.13 mW.cm^{-2} a été rapportée.

La dose énergétique appliquée est dépendante du temps d'exposition aux radiations UV comme le montre la formule suivante :

Dose (mJ. cm^{-2})= irradiance * temps d'exposition (secondes)

Citons à titre d'exemple la dose capable d'induire 50% de mortalité cellulaire est de $0.13 * 15 * 60 = 115 \text{ mJ. cm}^{-2}$

2. Effet de l'extrait protéique d'ulva PE sur la survie astrocytaire

La figure 29 illustre le suivi de la survie des cellules en fonction de différentes doses de PE en présence ou pas des UV-B. En effet, le prétraitement des astrocytes avec des quantités graduées des protéines d'algues induit une stimulation dose-dépendante de la viabilité, qui atteint le 382 % (pourcentage de contrôle) avec une quantité optimale de 50 μg de protéines.

Les résultats ont montré que la viabilité des cellules a diminué de façon significative de 50,5 % , après exposition à une irradiation UV, par rapport aux cellules témoins (non exposées). Cependant, le traitement des cellules avec l'extrait protéique d'*Ulva* avant ou après le rayonnement UVB a augmenté la viabilité des cellules d'une manière dépendante de la dose.

En effet, le prétraitement avec 10, 20, 50 et 100 μg augmente la viabilité des astrocytes exposés aux rayons UVB de 13,5%, 49,86%, 142 % et 139 % respectivement. Cependant, la dose de 250 μg semble être toxique pour les astrocytes traités ou non par les UVB.

Le Post- traitement des cellules gliales avec une dose de 50 μg du même extrait qui s'effectue juste après l'exposition aux rayonnements UV, augmente considérablement la viabilité des cellules exposées aux UV-B ou non par 92 % et 280 % , respectivement.

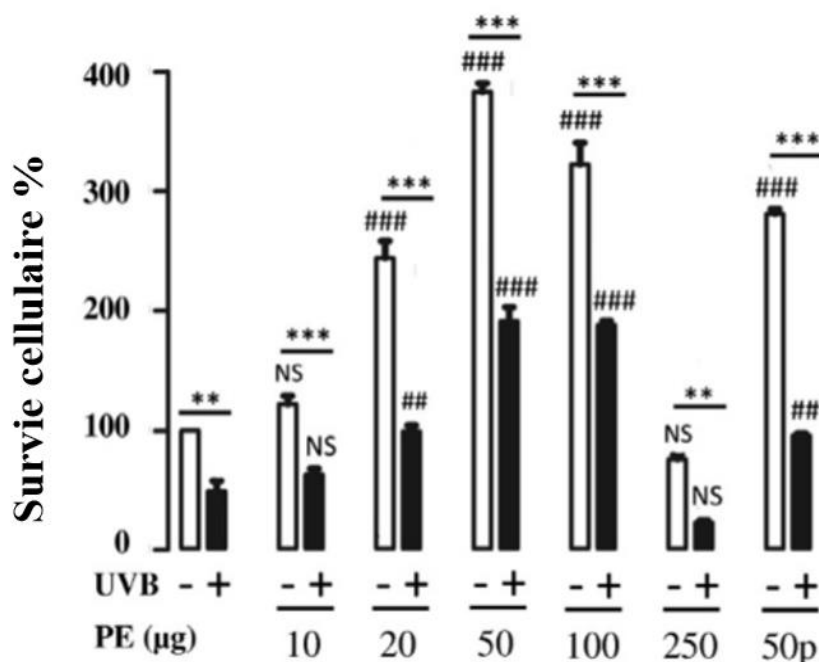


Figure 29. Effets des concentrations graduées de PE sur la viabilité des cellules astrocytaires en l'absence (-) ou la présence (+) d'une irradiation UVB.

Les cellules ont été pré-incubées pendant 2 heures en absence ou en présence de différentes concentrations de PE et ensuite exposées ou non aux rayonnements UV-B pendant 15 min. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur contrôle (\pm S.E.M). Détails des calculs ANOVA : pour la comparaison entre un échantillon donné (pour les différentes concentrations de PE) et l'échantillon témoin correspondant (cellules non exposées ou exposées aux UVB sans PE) : # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; NS, non significatif; Pour la comparaison entre non exposés ou exposés aux UV-B (pour chaque concentration de PE) ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; NS, non significatif.

3. Effet de l'extrait protéique d'ulva sur la cytotoxicité des astrocytes

La figure 30 illustre le suivi de la cytotoxicité des cellules (la libération de LDH). En effet, la cytotoxicité a été quantifiée par la mesure de la Lactate déshydrogénase, enzyme essentiellement intracellulaire, et qui se libère dans le milieu de culture (extracellulaire) des cellules en cas de dommages ou de lésions.

Selon la figure 30, il y a eu une augmentation significative de la fuite de LDH après l'exposition aux UV-B (80%). L'impact des UV sur les cellules a été totalement inhibé ou réduit de manière significative par le traitement des cellules avec l'extrait protéique PE avant ou après le traitement.

Le Prétraitement avec 10, 20, 50 et 100 µg d'extrait a réduit la libération de la LDH des astrocytes irradiés de 6,2 %, 43%, 29 %, 51,22 %, et 17 %. Au contraire, la dose finale de 250µg a augmenté significativement la cytotoxicité des cellules même sans exposition aux UVB.

En outre, le post-traitement, toujours en présence de la dose optimale de 50 µg réduit la libération de LDH à partir de cellules exposées ou non aux UV-B.

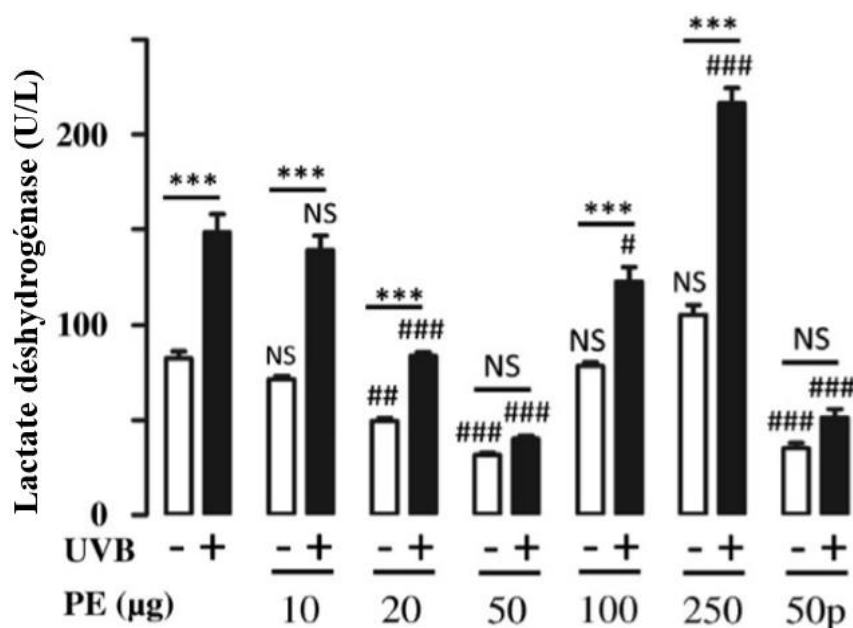


Figure 30. Effets des concentrations graduées de PE sur la cytotoxicité des cellules astrocytaires en l'absence (-) ou la présence (+) d'une irradiation UVB.

Les cellules ont été pré-incubées pendant 2 heures en absence ou en présence de PE et ensuite exposées ou non à 15 mn de rayonnement UVB. Les résultats sont exprimés en unité de lactate déshydrogénase (LDH) / L libéré dans le milieu de culture, quantifiés en utilisant un kit de dosage de l'activité LDH. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur contrôle (+ S.E.M). Détails des calculs ANOVA : pour la comparaison entre un échantillon donné (pour les différentes concentrations de PE) et l'échantillon témoin correspondant (cellules non exposées ou exposées aux UVB sans PE) : # p < 0,05; # P < 0,01; ### p < 0,001; NS, non significatif; Pour la comparaison entre non exposés ou exposés aux UV-B (pour chaque concentration de PE) ** p < 0,01; *** p < 0,001; NS, non significatif.

L'ajout de l'extrait protéique seul au milieu de culture réduit la libération de LDH d'une façon dose dépendante jusqu'à la dose de 100 µg. Ces résultats suggèrent que le traitement préalable par PE protège les cellules de la cytotoxicité et que le post-traitement a sauvé les cellules altérées par l'exposition aux UV de la mort apoptotique.

Il est à noter aussi que l'effet propre de cet extrait de protéines semble être à la fois proliférateur et glioprotecteur.

4. Effet de PE sur la morphologie des astrocytes en culture

L'étude d'imagerie cellulaire montre que le traitement des astrocytes en culture avec les UV-B en présence ou absence de PE provoque des modifications phénotypiques.

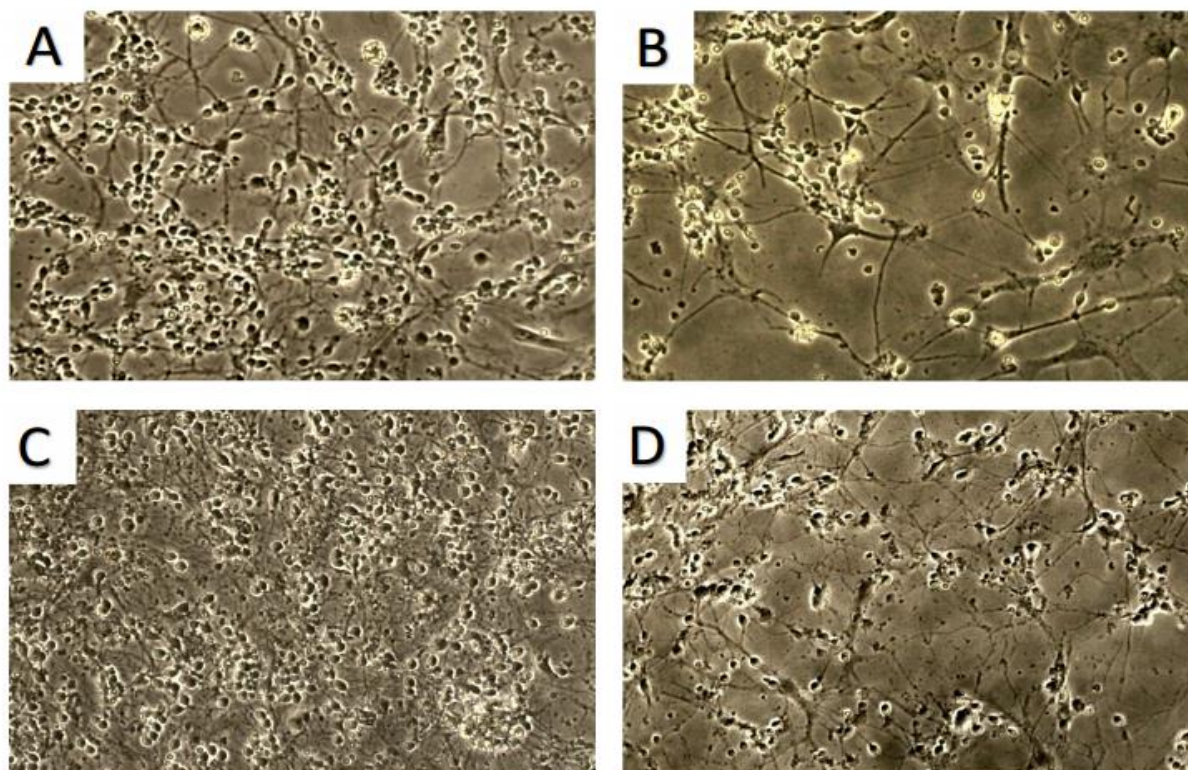


Figure 31. Images microscopiques illustrant l'effet de l'extrait protéique d'Ulva sur les changements induits par les UV-B dans la morphologie des astrocytes de rats en culture.

Les cellules ont été pré-incubées pendant 2 heures en l'absence ou en présence de 50 µg de PE (C-D), et ensuite exposées pendant 15 minutes au rayonnement UV-B (B-D).

En effet, l'examen des cellules par microscopie optique (figure 31) a révélé que les cellules traitées par l'extrait protéique d'Ulva affichent une morphologie polygonale plate similaire à celles des astrocytes non traités - (Figure A et C), tandis que le traitement par UV induit des changements morphologiques qui se traduisent par un rétrécissement cellulaire et l'apparition de longs processus minces (figure B) relatifs au phénomène de stellation astrocytaire. Le Prétraitement des cellules avec PE, prévient ces changements morphologiques induits par des rayonnements UV B (figure D). De plus, les images optiques viennent confirmer les résultats (en terme de pourcentage) de l'évaluation de la mort cellulaire des astrocytes par dosage de l'activité de la LDH dans les surnageants de culture ainsi que le dosage de la FDA spécifique à la survie cellulaire. Par ailleurs, si l'ajout de l'extrait PE n'as pas d'effet propre sur le changement de la

morphologie des cellules, ce dernier influence significativement la prolifération cellulaire en la stimulant qui se traduit par un nombre plus important de cellules vivantes.

5. Effet de l'extrait protéique d'ulva sur la capacité d'élimination du peroxyde d'hydrogène

Le stress oxydatif cause un effet cytotoxique qui est en grande partie dû à la production de dérivés réactifs de l'oxygène, il est donc important d'évaluer le taux du H₂O₂ cellulaire étant donné qu'il est le principal générateur de ces dérivés. Nous avons aussi évalué la capacité des molécules bioactives présentes dans l'extrait PE à piéger le H₂O₂ dans les cultures cellulaires des astrocytes et ainsi nous renseigner davantage sur le mécanisme impliqué dans l'action protectrice de cet extrait. Les résultats sont présentés dans la figure 32.

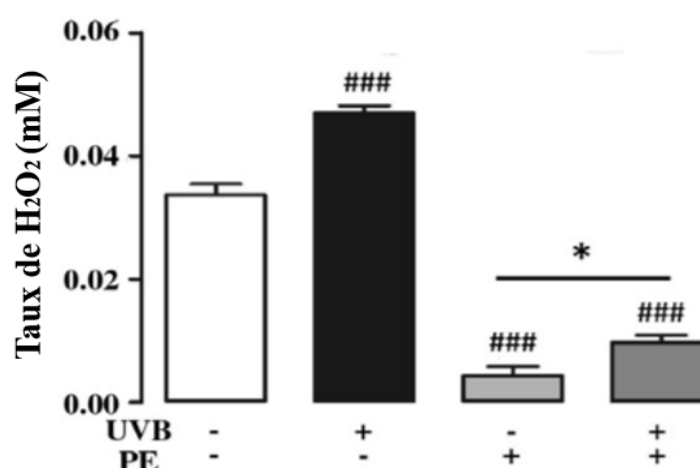


Figure 32. L'Effet de PE sur la teneur en H₂O₂ des cellules astrocytaires en l'absence ou la présence de radiations UVB.

Les cellules ont été préincubées pendant 2 heures en absence ou en présence de 50 µg d'extraits de protéines Ulva et ensuite exposées ou non à l'irradiation UVB pendant 15 mn. Chaque valeur est la moyenne ± SEM d'au moins quatre puits différents. Détails des calculs ANOVA: pour la comparaison entre un échantillon donné et le contrôle correspondant (cellules non exposées aux UVB sans PE): # p <0.05; ## p <0.01; ### p <0.001; NS, non significatif; Pour toutes les autres comparaisons p < 0,001, sauf: *: p b 0,05 et NS: non significatif.

Les résultats ont montré que l'exposition des cellules aux UVB augmente de manière très significative le niveau de peroxyde d'hydrogène de 42%.

En comparaison avec les cellules témoins, le traitement avec l'extrait d'Ulva réduit le taux de H₂O₂ de 87 % dans le milieu de culture. En outre, l'extrait a inhibé complètement l'effet délétère des UV-B.

6. Effet de l'extrait protéique d'ulva sur les activités des enzymes antioxydantes

Dans le même contexte que précédemment, nous avons suivi les activités des deux enzymes antioxydantes la superoxyde dismutase SOD et de la catalase dans les cultures d'astrocytes.

Il est déjà établi que les astrocytes possèdent une réserve très importante en enzymes antioxydantes, ce qui leur acquiert une résistance accrue au stress oxydatif en comparaison aux cellules neuronales.

Le but de cette partie est donc de suivre les éventuelles variations de ces enzymes en présence d'un stress photo-oxydatif ainsi que l'influence de l'extrait PE sur ce système de défense et de ce fait investiguer l'implication des enzymes antioxydantes dans l'effet glioprotecteur exercé par l'extrait PE.

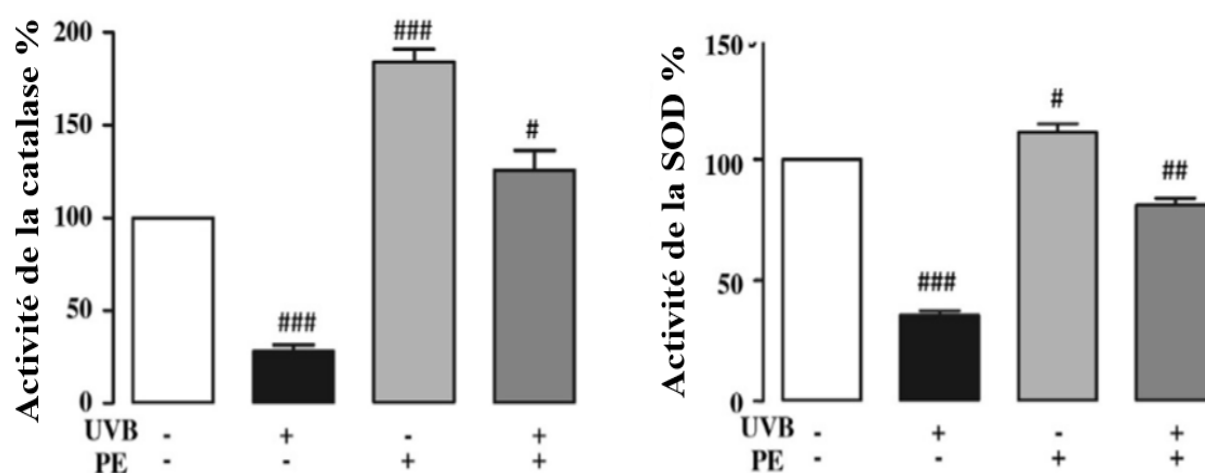


Figure 33. Effet de PE sur les activités de la catalase et de la SOD dans la culture des astrocytes en l'absence ou en présence de rayonnements UVB.

Les cellules ont été incubées en absence ou en présence de 50 ug d'extrait d'Ulva pendant 2 heures, puis exposées ou non aux radiations UVB pendant 15 mn. Chaque valeur est la moyenne \pm SEM d'au moins quatre puits différents. Détails des calculs ANOVA: pour la comparaison entre un échantillon donné et le contrôle correspondant (cellules non exposées aux UVB sans PE): # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$; NS, non significatif; Pour toutes les autres comparaisons $p < 0,001$, sauf: *: $p < 0,05$ et NS: non significatif.

Le résultat des données indiquées dans la Figure 33 montre que l'exposition des astrocytes aux rayons UVB pendant 15 minutes diminue respectivement les activités de la catalase et de la SOD de 72 % et 65 %. Les résultats ont révélé que l'ajout de PE dans le milieu de culture améliore significativement les deux activités et annule leur répression.

L'incubation des astrocytes en présence de PE induit une stimulation intense de l'activité de la catalase (84%) et un effet peu significatif en ce qui concerne l'activité de la SOD (11%). Par ailleurs, le PE a rétabli l'activité de la catalase au niveau du contrôle et a complètement inhibé l'effet exercé par le stress oxydatif sur les cellules.

En ce qui concerne l'activité de la SOD, la même concentration de l'extrait, réduit de façon significative, les effets délétères des UV-B sans pourtant l'inhiber totalement.

7. Effet de l'extrait protéique d'ulva sur la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique résulte d'une réaction d'oxydation entre des chaînes latérales d'acides gras insaturés de lipides et le radical hydroxyle. En effet, ce radical est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy. Cette réaction est dite en chaîne car le radical peroxy formé entre en contact avec un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué et se transforme ainsi en hydroperoxyde. Ce dernier peut alors évoluer après plusieurs réactions d'oxydation et donner lieu à des aldéhydes toxiques dont le malonalaldéhyde (MDA).

La capacité de l'extrait à inhiber cette réaction de formation du MDA est suivie par la formation TBA-RS en absence ou en présence de radiations UVB et les résultats sont présentés dans la figure 34.

L'expérimentation montre une forte augmentation de la peroxydation des lipides causée par l'exposition des cellules à un rayonnement UV-B, qui est dûe à l'augmentation du taux de ROS.

En outre, le taux de MDA libéré des cellules prétraitées avec PE ne présente pas de différence significative avec les cellules témoins.

La même concentration de PE, telle qu'utilisée précédemment, a diminué la concentration élevée en MDA des cellules exposées aux UV-B de 50% et a montré, ainsi, un potentiel élevé de protection contre la peroxydation lipidique.

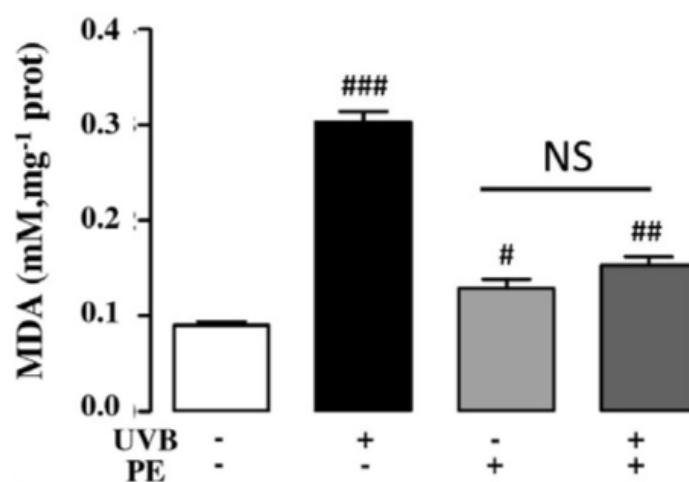


Figure 34. Effet de PE sur la peroxydation des lipides dans la culture des astrocytes en l'absence ou en présence de rayonnements UVB.

Les cellules ont été incubées en absence ou en présence de 50 ug d'extrait protéique *Ulva* pendant 2 heures, puis exposées ou non aux radiations UVB pendant 15 mn. Chaque valeur est la moyenne \pm SEM d'au moins quatre puits différents issus. Détails des calculs ANOVA: pour la comparaison entre un échantillon donné et le contrôle correspondant (cellules non exposées aux UVB sans PE): # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$; NS, non significatif; Pour toutes les autres comparaisons $p < 0,001$, sauf: *: $p < 0,05$ et NS: non significatif.

8. Effet de l'extrait protéique d'*ulva* sur le taux de libération du calcium

Il est bien connu que le Ca^{2+} régule de nombreux phénomènes cellulaires physiologiques en tant que deuxième messager, ainsi que le déclenchement d'événements pathologiques telles que la lésion des cellules et la mort apoptotique.

Le dosage colorimétrique du taux de calcium (figure 35) montre une élévation de 99% lorsque les cellules sont exposées au stress oxydatif tel que le rayonnement UV-B. De plus, il n'y a pas de différence significative entre le taux de calcium cellulaire des astrocytes contrôle et celui des cellules prétraitées avec l'extrait. La surcharge des cellules exposées aux UVB en calcium est atténuée avec le pré-traitement au PE de 45 mg/ml/ mg de protéine à 30 mg /ml/mg de protéine. On peut donc conclure que l'extrait permet de restaurer l'homéostasie calcique.

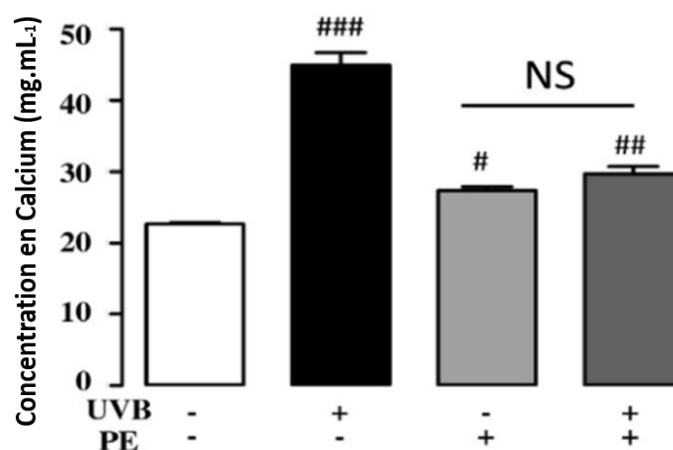


Figure 35. Effet de PE sur le dosage du calcium des cellules astrocytaires en l'absence ou présence de rayonnements UVB.

Les cellules ont été incubées en absence ou en présence de 50 ug d'extrait de PE pendant 2 heures, puis exposées ou non aux radiations UVB pendant 15min. Chaque valeur est la moyenne \pm SEM d'au moins quatre puits différents. Détails des calculs ANOVA: pour la comparaison entre un échantillon donné et le contrôle correspondant (cellules non exposées aux UVB sans PE): # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$; NS, non significatif; Pour toutes les autres comparaisons $p < 0,001$, sauf: *: $p < 0,05$ et NS: non significatif.

En conclusion, cette étude met en évidence la capacité de PE à stimuler la prolifération cellulaire en tant que effet propre et aussi à bloquer la mort des astrocytes induite par un stress photo-oxydatif UV-B spécifique. Ce qui témoigne de son implication dans le processus de la glioprotection.

Dans ce chapitre, nous avons également démontré l'implication des enzymes antioxydantes, SOD et catalase, dans cet effet protecteur et que cet extrait PE est capable de s'opposer à l'action pro-oxydante des UV-B en diminuant les taux des différents marqueurs de stress comme le H_2O_2 , le calcium intracellulaire et enfin le produit de la peroxydation lipidique le MDA.

Ces astrocytes corticaux reflètent donc une meilleure réponse de défense face aux dommages oxydatifs et acquièrent une meilleure résistance contre les dommages oxydatifs.

Chapitre III : Evaluation de l'implication de la fraction protéique dans la protection cellulaire

A- Validation de l'implication de la fraction protéique dans l'effet protecteur observé

Afin d'étudier l'hypothèse avancée quant à l'implication de la fraction protéique dans l'effet protecteur, nous étudions l'effet de la température, des hydrolases et l'action de la trypsine sur l'activité de l'extrait PE sur les cellules de levure.

Pour ce, nous avons commencé par un suivi de la concentration protéique après le traitement de l'extrait avec la température et la trypsine afin d'évaluer l'efficacité de la digestion. (Tableau 14)

Tableau 14. Suivi de la concentration en protéines de l'extrait PE après hydrolyse à la température et à la trypsine.

Traitement	Concentration initiale	Concentration finale
Chauffage à 60°C (1H30)	1 mg/ml	869 µg/ml
Chauffage à 95°C (1H30)	1 mg/ml	36 µg/ml
Trypsine 1:20	1 mg/ml	155 µg/ml
Trypsine 1:10	1 mg/ml	42 µg/ml

D'après le tableau 14 on remarque une variation de la teneur en protéines allant d'une diminution modérée (à 60°C) à une dégradation quasi-totale des protéines de l'extrait selon le traitement (chauffage à 95°C et Trypsine 1:10).

1. Effet de PE sur les cellules de levure

L'incubation des cellules de *saccharomyces cerevisiae* avec 50µg des protéines de l'algue pendant deux heures induit une diminution de la cytotoxicité de 47% traduite par une diminution du relargage de la LDH dans le milieu extracellulaire comme le montre le tableau 15. Ce qui implique que l'extrait exerce un effet stimulant sur la prolifération cellulaire, similaire à celui observé chez les cultures d'astrocytes corticaux.

Par ailleurs, l'exposition des cellules de levure à des radiations UV-B pendant 15 minutes avec la même dose appliquée précédemment, a provoqué une augmentation significative de la libération de LDH de 38% par rapport aux cellules témoins, ce qui indique une altération au niveau de l'intégrité membranaire et donc une augmentation de la cytotoxicité.

Le prétraitement des cellules avec l'extrait PE leur confère un effet protecteur, les effets endommageant dûs aux UV-B étant complètement abolis (seulement 10 % de plus de mortalité cellulaire par rapport aux cellules prétraitées avec PE). L'effet stimulant de l'extrait sur la prolifération des cellules persiste même en présence du stress photo-oxydant.

Tableau 15. Evaluation de l'effet de l'extrait PE sur la cytotoxicité cellulaire en absence ou présence des irradiations UV-B

Conditions	U LDH.mL ⁻¹	% de cytotoxicité
Cellules contrôle	4,54 ± 0,02	100
Cellules prétraitées avec PE	2,45 ± 0,84	53 ± 18
Cellules exposées aux UV-B	6,28 ± 0,09	138 ± 2
Cellules prétraitées avec PE et exposées aux UV-B	2,84 ± 0,54	63± 12

2. Dénaturation de l'extrait PE

L'ensemble des résultats de la dénaturation de l'extrait PE par les trois méthodes suivantes est résumé dans le tableau 17.

Effet de la température sur la protection cellulaire

Le traitement thermique de l'extrait algair a été réalisé à deux températures différentes à savoir une température élevée de 60°C et une température extrême de 95°C pendant 1h30 et ce dans le but de caractériser la nature des molécules bioactives de cet extrait et d'évaluer la probable influence de la dégradation thermique sur cette activité protectrice.

Le test de cytotoxicité appliqué exactement dans les même conditions que précédemment nous mène à conclure que le traitement thermique de PE n'a aucune influence sur son activité stimulatrice jusqu'à 60°C, mais l'inhibe complètement à 95°C.

L'action protectrice anticytotoxique de l'extrait PE face aux effets néfastes des UV-B a été complètement inhibée après incubation de l'extrait à 95°C et se trouve encore stable après chauffage à 60°C.

Effet des hydrolases sur la protection cellulaire

Le traitement enzymatique par des hydrolases a pour finalité principale d'éliminer la fraction polysaccharidique de l'extrait afin d'évaluer l'éventuelle implication de cette fraction dans l'activité biologique observée.

Ainsi, un simple traitement de l'extrait avec 5 mg de cellulase ou pullulanase n'a pas d'effet significatif sur son activité. De manière surprenante, une quantité de 10 mg de ces enzymes a augmenté l'effet protecteur de PE, en légère baisse de la cytotoxicité de 7,8% et 12,4% pour la pullulanase et la cellulase, respectivement. Néanmoins les tests statistiques établis ont qualifié cette différence de non significative.

Pour explorer davantage la nature de cette action protectrice, nous avons ensuite étudié la capacité de l'hydrolysate de PE à prévenir l'effet des radiations UV-B induisant la cytotoxicité cellulaire. Nous avons, alors constaté qu'une augmentation de la concentration de cellulase de 5 à 10 mg a permis une diminution de la mortalité cellulaire de 44 % à 34 %. Au contraire, une augmentation de la concentration de la pullulanase de 5 à 10 mg induit une augmentation de la libération de LDH dans le milieu extracellulaire, témoin de la mortalité cellulaire, et ainsi suggère une légère réduction de l'activité protectrice de 8%. Toutefois, ces résultats restent à confirmer étant donné la non signification des tests statistiques.

Effet de la déprotéinisation sur la protection cellulaire

La recherche de lien entre les variations de composition et l'activité biologique a été poursuivie par l'élimination de la fraction protéique à travers un procédé enzymatique. L'élimination des protéines de l'extrait est nécessaire afin de déterminer leur éventuel rôle dans l'activité biologique de la fraction.

Les enzymes telle que la trypsine agissent spécifiquement sur les liaisons peptidiques. En effet, la trypsine hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquelles un acide aminé basique à savoir la lysine et l'arginine engagent sa fonction carboxyle.

L'activité biologique des fractions déprotéinisées obtenues précédemment a été testée. En effet, le traitement de l'extrait avec de la trypsine dans un rapport de 1:20 a induit une légère diminution de l'effet protecteur et son inhibition totale dans un rapport de 1:10, conduisant à la mortalité cellulaire.

De même pour les cellules stressées aux UV-B, le traitement à la trypsine de PE n'influence que peu cette activité biologique protectrice pour un rapport de 1:20, alors qu'un rapport de 1:10 cause une augmentation importante de son inhibition tout en provoquant une surmortalité cellulaire.

Effet des polysaccharides sur la protection cellulaire

Pour mieux évaluer le rôle des polysaccharides présents dans PE (par exemple, les ulvanes), nous avons évalué la capacité des ulvanes commerciales d'*Ulva armoricana* pour prévenir et protéger les cellules de levure contre le stress oxydatif induit par les UV-B. Les résultats ont montré que l'incubation des cellules témoins avec les ulvanes (1 mg/ml) a induit une diminution de la cytotoxicité d'environ 25%. De plus, la mort cellulaire prononcée par exposition aux UVB a été légèrement réduite par un prétraitement aux ulvanes (environ 23%). Compte tenu de ces résultats, on peut suggérer que les ulvanes inhibent partiellement et non totalement (comme dans le cas de PE) l'effet des UV-B.

Ces polysaccharides présentent certes un effet protecteur, mais ce dernier est nettement inférieur à celui exercé par l'extrait PE (Tableau 16).

Tableau 16. Evaluation de l'effet des ulvanes d' *Ulva armoricana* sur la cytotoxicité cellulaire en absence ou présence des irradiations UV-B

Conditions	U LDH/ml	% de cytotoxicité
Cellules contrôle	4,54 ± 0,02	100
Cellules prétraitées aux ulvanes	3,41 ± 0,14	75 ± 3
Cellules exposées aux UV-B	6,28 ± 0,09	138 ± 2
Cellules prétraitées aux ulvanes et exposées aux UV-B	5,26 ± 0,11	116 ± 3

Compte tenu de l'ensemble de ces résultats, on peut conclure que certes les polysaccharides exercent un effet protecteur et anticytotoxique mais ne représentent pas la seule fraction active de l'algue, bien plus, les protéines semblent jouer un rôle important et indispensable dans cette protection cellulaire contre le stress oxydatif provoqué par les UV-B. Pour cela, nous avons poursuivi nos recherches en effectuant une investigation des protéines totales de l'algue verte *Ulva rigida* afin de mieux analyser sa composition et son éventuelle implication dans cette protection cellulaire.

Tableau 17. Evaluation de l'effet de la température, des hydrolases et l'action de la trypsine sur l'activité de l'extrait PE

	U LDH/ml ^a		p-value	U LDH/ml		p-value
	% de cytotoxicité			% de cytotoxicité		
	Sans UV-B exposure			Avec UV-B exposure		
Cellules contrôle traitées avec l'extrait PE	2,45 ± 0,84	100	NS	2,84 ± 0,54	116 ± 19	NS
Cellules traitées avec l'extrait PE chauffé à 60°C pendant 1h30	2,41 ± 0,81	99 ± 33	NS	2,08 ± 0,52	85 ± 25	NS
Cellules traitées avec l'extrait PE chauffé à 95°C pendant 1h30	5,40 ± 1,92	221 ± 35	p < 0.001	6,56 ± 2,61	268 ± 39	p < 0.001
Cellules traitées avec l'extrait PE digéré avec 5 mg pullulanase	2,50 ± 1,06	102 ± 42	NS	2,30 ± 1,00	94 ± 43	NS
Cellules traitées avec l'extrait PE digéré avec 10 mg pullulanase	2,05 ± 0,85	84 ± 4	NS	2,81 ± 0,33	115 ± 11	NS
Cellules traitées avec l'extrait PE digéré avec 5 mg cellulase	2,59 ± 1,22	106 ± 47	NS	2,78 ± 0,28	113 ± 10	NS
Cellules traitées avec l'extrait PE digéré avec 10 mg cellulase	1,57 ± 0,98	64 ± 62	NS	2,19 ± 0,33	89 ± 15	NS

*Mesure de la libération de la LDH. Les cellules de levure ont été pré-incubées pendant 2 h en présence de 50 ug de l'extrait d'algue natif (PE) ou de l'extrait dénaturé correspondant. Les cellules n'ont pas été exposées ou exposées pendant 15 minutes aux rayonnements UV-B. Les résultats représentent les moyennes ± SEM à partir de déterminations en triple (n = 3). Détail des calculs d'ANOVA: pour la comparaison entre tout échantillon donné et l'échantillon témoin correspondant (c'est-à-dire les cellules traitées au PE, en gras).

B- Investigation Protéomique

1. La méthode shot gun

Après migration de 30 µg des protéines de l'extrait sur un gel de polyacrylamide, leur fixation et coloration au bleu de coomassie, leur digestion in-gel et leur analyse par spectrométrie de masse (Orbitrap), les identifications des protéines ont été réalisées avec le logiciel Proteome Discoverer.

Brièvement, les fichiers bruts ont été importés, recherchés et comparés sur la base de données NCBI en utilisant le serveur Mascot. Ici, nous avons d'abord comparé le contenu en protéines des extraits d'algues obtenus après différents traitements utilisés, à savoir, la lyophilisation, le séchage au four, le séchage au soleil et le broyage frais.

Nous avons donc identifié seulement 38 protéines à partir des différents échantillons toujours en raison de la limitation liée à l'absence de séquence génomique d'*Ulva* disponible dans les bases de données (Tableau 19). Notons que seulement 38 d'entre elles ont été identifiées avec au moins deux peptides différents ce qui est défini comme étant le seuil de certitude satisfaisant.

Il convient de noter également que certaines protéines ont été identifiées à partir de différents organismes, et sont probablement redondantes.

Les poids moléculaires des protéines identifiées sont compris entre environ 10 et 80 kDa et le point isoélectrique (pI) varie de 4,42 à 11,47. Fait intéressant, une grande partie des protéines identifiées possède un pI allant de 4 à 7, ce qui témoigne de la présence d'une majorité de protéines acide.

Comme on s'y attendait, une fraction importante des protéines a été identifiée à partir d'espèces algaires. Parmi celles-ci, 3 protéines, parmi les plus abondantes (selon le nombre de PSM) de cette analyse, ont été détectées dans tous les extraits (à savoir, la calmoduline, P04352; l'actine, O65316; et la cystéine synthase P31300).

Nous notons à ce propos que les protéines identifiées à partir de l'extrait lyophilisé sont caractérisées par le PSM le plus abondant relatif à la calmoduline et la cystéine-synthase, suivie de l'extrait séché à l'étuve qui maintient le même nombre de PSM pour la cystéine synthase. Les 3 protéines communes se trouvent dans l'extrait frais, mais leur PSM est relativement moindre à celui de l'extrait lyophilisé. L'extrait séché au soleil, qui est caractérisé par une activité antioxydante réduite, ne présente qu'une seule protéine des 3 à savoir la calmoduline (PSM faible). (tableau18)

Tableau 18. Résumé des protéines identifiées à partir d'*Ulva rigida* et communes aux quatre extraits traités différemment

Protéine	Extrait lyophilisé		Extrait séché à l'étuve		Extrait Frais		Extrait séché au soleil	
	Score	# PSM	Score	# PSM	Score	# PSM	Score	# PSM
Actine	72	3	63	2	188	6	0	0
Calmoduline	323	12	164	7	320	10	85	2
Cystéine Synthase	95	2	85	2	86	1	0	0

Par ailleurs, les protéines identifiées ont ensuite été clustérisées en fonction de leur compartiment cellulaire, leur processus biologique et leur fonction moléculaire auxquelles elles appartiennent (Figure 36).

La majorité des protéines identifiées sont impliquées dans la photosynthèse et les processus énergétiques (telles que ATP synthase, ubiquitine, cytochrome c, photosystème II P680 chlorophylle A apoprotéine ...). D'autres protéines, majoritairement représentées, sont impliquées dans la structure cellulaire (comme l'actine, la tubuline ou les histones) ou dans le métabolisme (par exemple, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ou la cystéine synthase).

Les protéines de stress ont également été identifiées, telles que les HSP connues sous le nom de chaperones et jouent un rôle crucial dans le repliement des protéines et la protection des cellules contre le stress et l'apoptose.

En conclusion de ce chapitre, on peut affirmer que les protéines de l'algue *Ulva rigida* jouent un rôle important dans la protection cellulaire étant donné que l'élimination des polysaccharides n'influence pas grandement l'activité biologique de l'extrait alors que sa déprotéinisation inhibe considérablement cette protection chez les cellules de levure.

Fait étonnant, l'analyse protéomique effectuée par la méthode shot-gun a permis d'identifier un certain nombre de protéines consolidant encore plus nos résultats compte tenu de la présence de protéines connues par leur implication directe ou indirecte dans la défense cellulaire contre le stress.

Tableau 19. Résumé des protéines identifiées à partir de l'extrait protéique d'*Ulva rigida*

Accession ^a	Protéine	Organisme apparié	#Peptides ^b	#PSM ^c	MW (kDa)	pI	Extrait ^d
P48348	14-3-3-like protein GF14 kappa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2	2	28.0	4,89	O
O65316	Actin	<i>Mesostigma viride</i>	4	6	41,6	5,48	F, O, L
P20904	Actin	<i>Volvox carteri</i>	4	6	41,7	5,48	F
O42161	Actin, cytoplasmic 1	<i>Salmo salar</i>	7	7	41,8	5,48	L
P02580	Actin-3	<i>Glycine max</i>	4	4	41,6	5,40	S
P28555	Allophycocyanin alpha chain	<i>Aglaothamnion neglectum</i>	2	2	17,5	4,88	S
Q3ZJ00	ATP synthase subunit alpha	<i>Pseudendoclonium akinetum</i>	2	2	54,0	5,49	L
A6BM09	ATP synthase subunit beta	<i>Gnetum parvifolium</i>	5	9	51,9	5,21	L, O
A6YGB6	ATP synthase subunit beta	<i>Leptosira terrestris</i>	5	6	51,8	5,17	O
Q3ZJ68	ATP synthase subunit beta	<i>Pseudendoclonium akinetum</i>	5	5	51,7	5,30	L
Q01859	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	<i>Oryza sativa</i>	2	3	58,9	6,37	F
P37399	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	<i>Daucus carota</i>	2	3	59,1	5,85	L
P04352	Calmodulin	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	7	12	18,3	4,42	L, O, F, S
Q7DMP0	Calmodulin-2/4	<i>Solanum tuberosum</i>	1	3	14,0	4,35	F
P28557	C-phycoyanin alpha chain	<i>Aglaothamnion neglectum</i>	2	2	17,7	7,08	S
P31300	Cysteine synthase, chloroplast/chromoplast	<i>Capsicum annuum</i>	2	2	40,0	5,27	F, O, L
P00052	Cytochrome c	<i>Phaseolus aureus</i>	2	2	12,1	9,31	F
P50362	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplast	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2	2	40,3	9,09	O
P27322	Heat shock cognate 70 kDa protein 2	<i>Solanum lycopersicum</i>	2	2	70,7	5,19	L, O
P36181	Heat shock cognate protein 80	<i>Solanum lycopersicum</i>	2	2	80,1	5,03	L, O
A2YWQ1	Heat shock protein 81-1	<i>Oryza sativa</i>	2	2	80,1	5,07	O
Q6PV61	Histone H2A	<i>Penaeus vannamei</i>	3	6	13,3	10,73	L, O
Q9LD28	Histone H2A.6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2	2	13,6	10,15	L, O
Q43216	Histone H2B.5	<i>Triticum aestivum</i>	1	3	15,0	10,02	F

Accession ^a	Protéine	Organisme apparié	#Peptides ^b	#PSM ^c	MW (kDa)	pI	Extrait ^d
P27996	Histone H4	<i>Solaster stimpsoni</i>	2	2	11.4	11,19	L, O
P62785	Histone H4 variant TH011	<i>Triticum aestivum</i>	3	3	11.4	11,47	L, O
P06007	Photosystem II D2 protein	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2	2	39.4	5,73	L, O
37255	Photosystem II P680 chlorophyll A apoprotein	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2	3	39.4	5,73	L, O
O49843	R-phycoerythrin alpha chain	<i>Porphyra tenera</i>	4	5	17.7	5,59	S
O44119	Tropomyosin	<i>Homarus americanus</i>	6	7	32,9	4,77	S
Q9GZ70	Tropomyosin	<i>Perna viridis</i>	3	5	16.8	4,36	S
Q7M3Y8	Tropomyosin	<i>Turbo cornutus</i>	3	3	16.8	4,36	S
O04386	Tubulin beta chain	<i>Chlamydomonas incerta</i>	3	3	49.6	4,92	F
P20364	Tubulin beta-1 chain	<i>Daucus carota</i>	2	2	35.8	4,86	F
P37832	Tubulin beta-7 chain	<i>Oryza sativa</i>	2	3	49.6	4,87	F
P13117	Ubiquitin	<i>Neurospora crassa</i>	2	2	8.6	7,25	F
Q38680	Vacuolar ATP synthase subunit B 2	<i>Acetabularia acetabulum</i>	2	2	54.7	5,25	F

^a Protein accession number

^b Number of peptides identified

^c Number of peptide spectrum matches (PSM)

^d Protein identified from the different extracts: **O**: Oven-dried; **L**: Lyophilized; **F**: Freshly ground; **S**: Sun-dried)

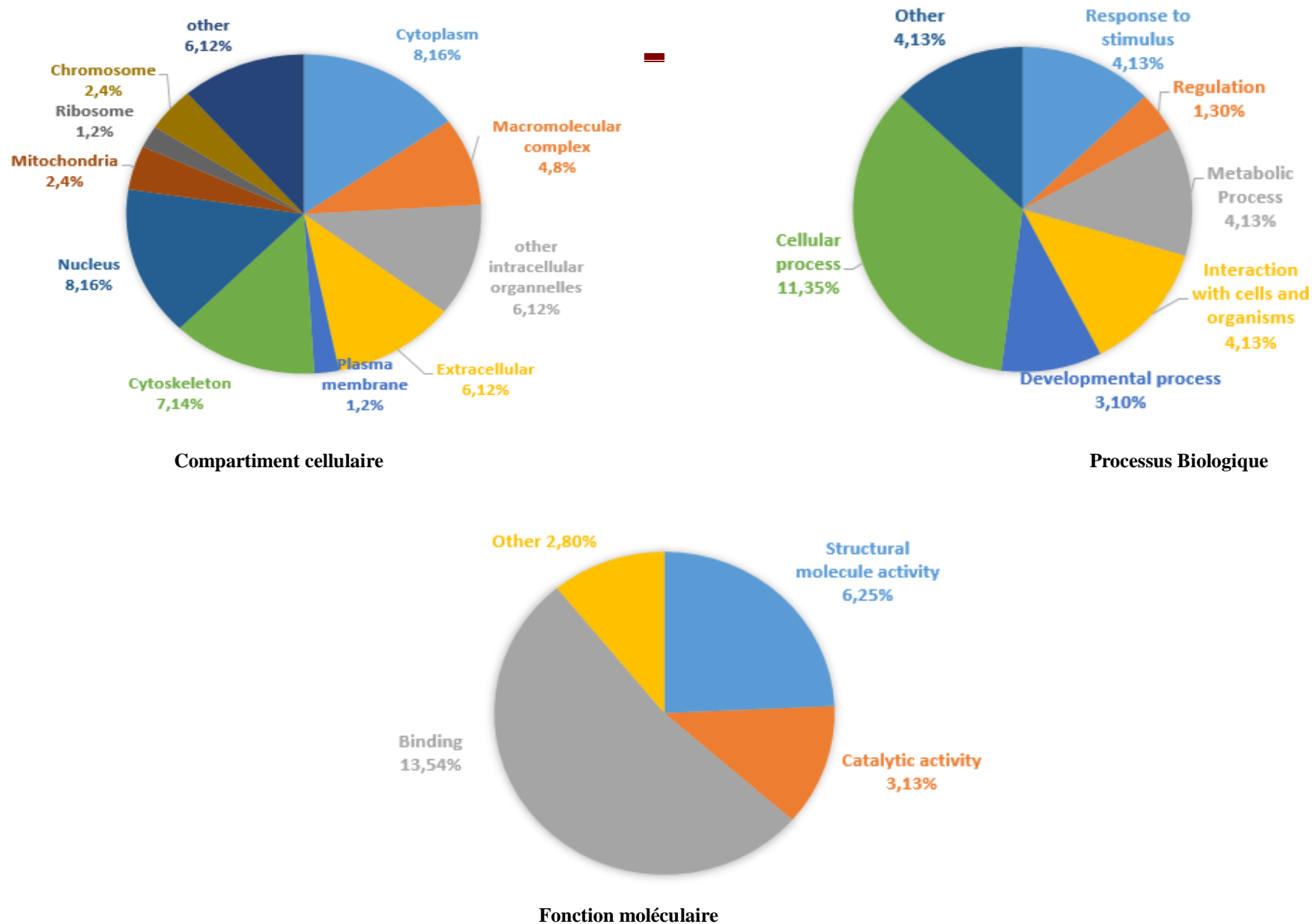


Figure 36. Analyse de l'ontologie de 38 protéines identifiées d'*Ulva rigida*. La classification de l'ensemble des protéines a été réalisée selon le «compartiment cellulaire», «processus biologique» et «fonction moléculaire».

Chapitre IV: Purification d'une calmoduline et étude de son effet cellulaire

Au cours de ce chapitre, nous avons choisi d'évaluer les protéines impliquées dans l'activité protectrice, pour ce, différentes étapes de fractionnement, de purification et d'identification ont été entreprises.

D'une façon générale, l'identification d'une molécule à activité biologique suit trois grandes étapes principales à savoir le fractionnement de l'extrait, la caractérisation des différentes fractions obtenues et enfin l'évaluation de leur activité biologique.

1. Fractionnement de l'extrait selon le poids moléculaire

Le fractionnement d'un extrait peut être mis en oeuvre moyennant différentes méthodes. Il existe des techniques de séparation simples et peu coûteuses telles que la précipitation, l'hydrolyse et la filtration qui séparent les molécules d'un seul extrait selon le poids, la taille ou la charge, comme il existe d'autres méthodes plus développées et assez coûteuses telles que les chromatographies permettant ainsi d'avoir des préparations très pures.

A la lumière des résultats précédents, nous avons choisi de réaliser un fractionnement de l'extrait PE selon le poids moléculaire via des filtres centrifuges (microcon) avec des membranes de masse de coupure spécifiques et les 4 fractions obtenues ont été testées dans des expériences de cytotoxicité cellulaire. (Figure 37)

D'après cette figure, on peut d'abord conclure que toutes les fractions ne présentent aucun effet cytotoxique sur les cellules astrocytaires. Toutefois, seules les fractions F10 et F30 conduisent à la protection la plus importante des cellules contre les effets délétères des radiations UV-B et ce par rapport aux mesures de libération de la LDH dans le milieu extracellulaire.

Ceci dit, seule la fraction F10 assure, d'une part un effet proliférateur prononcé sur les cellules non stressées et d'autre part une protection maximale contre les effets des UV-B en restaurant le taux de libération de la LDH à la valeur contrôle (100%) inhibant ainsi totalement cet effet cytotoxique.

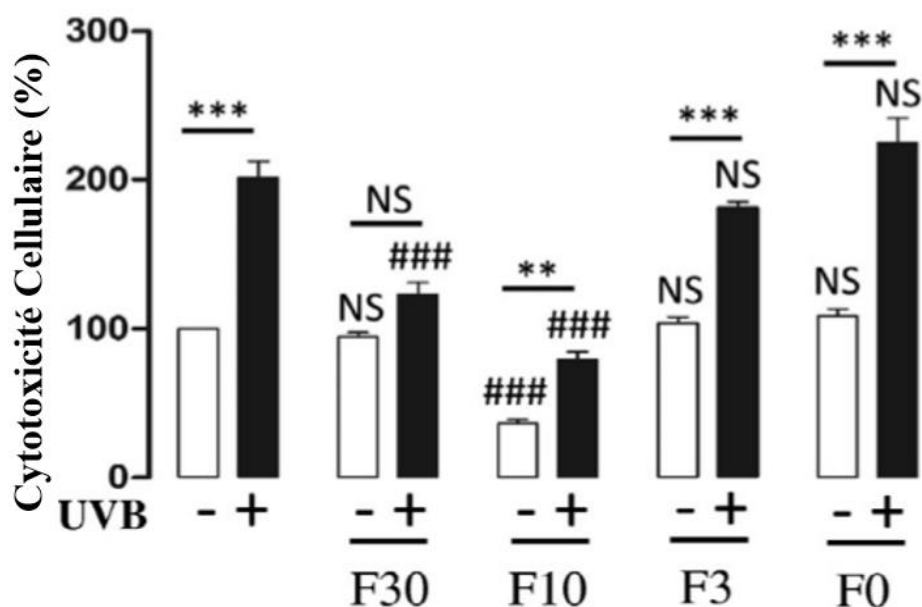


Figure 37. Fractionnement de l'extrait protéique selon le poids moléculaire et évaluation de l'activité protectrice des différentes fractions.

Le fractionnement a été réalisé en fonction du poids moléculaire par l'intermédiaire Microcon® filtres centrifuges (F30: PM > 30 kDa; F10: 30 kDa <MW> 10 kDa; F3: 10 kDa <MW> 3 kDa; F0: PM <3 kDa). Pour les tests d'activité, les cellules d'astrocytes ont été incubées en présence ou absence de fractions de protéines pendant 2 h, puis exposées ou non à des rayonnements UV-B pendant 15 min. Chaque valeur est la moyenne \pm SEM d'au moins quatre puits différents. Détails des calculs ANOVA: pour la comparaison entre un échantillon donné (pour les différentes fractions) et l'échantillon témoin correspondant (cellules non exposées ou exposées aux UVB): #p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001; NS, non significatif; Pour la comparaison entre non exposés ou exposés aux UVB (pour chaque fraction) ** p < 0,01; *** p < 0,001; NS, non significatif.

2. Identification de la calmoduline comme un important contributeur à l'activité de protection

2.1. Détermination d'une bande active

Au cours de cette étape, l'ensemble de l'extrait des protéines PE a d'abord été caractérisé par SDS-PAGE. Un gel à 12% d'acrylamide a été réalisé. Cette séparation électrophorétique témoigne de la présence de plusieurs protéines qui coïncident avec l'analyse protéomique précédente.

Lorsque l'on regarde le profil SDS-PAGE, des bandes protéiques appartenant soit à la fraction F10 ou à la fraction F30 (flèches sur la figure 38) ont été excisées du gel (colorié au bleu de coomassie) puis électro-éluées et enfin dialysées (membrane à seuil de coupure de 14000 Da)

contre du PBS. La vérification de la pureté de la protéine biologiquement active est réalisée sur gel SDS-PAGE. (Figure 39)

Ensuite, les protéines obtenues ont été investiguées dans des essais de viabilité cellulaire (Figure 40) toujours dans les mêmes conditions utilisées précédemment.

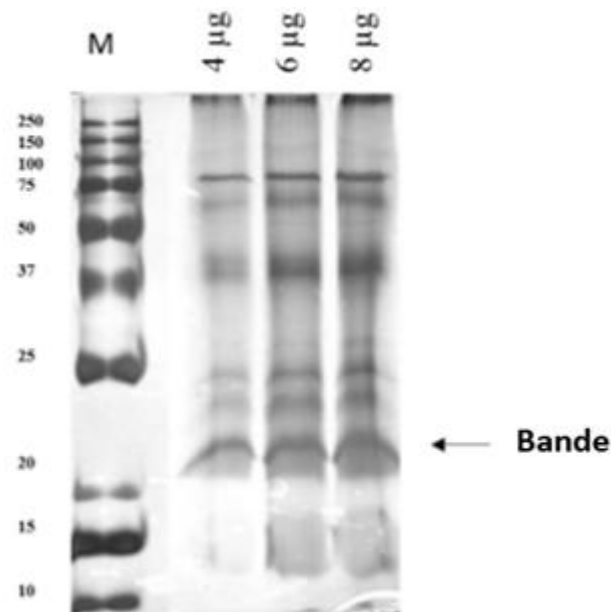


Figure 38. Gel SDS-PAGE à 12% d'acrylamide à partir de l'extrait protéique PE.

Les pistes correspondent à 4µg, 6µg et 8 µg de protéines. M: marqueurs de poids moléculaire.

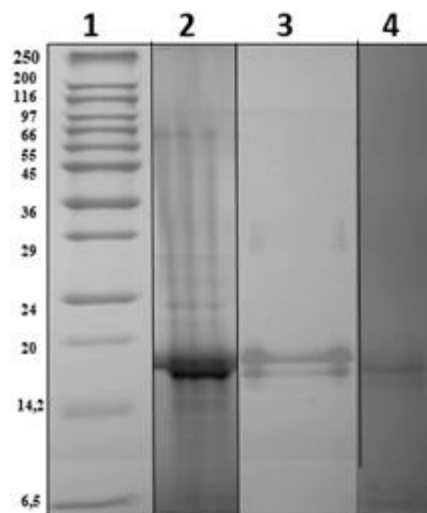


Figure 39. Vérification de la pureté des protéines électro-éluées sur un gel SDS-PAGE.

gel SDS PAGE 15% d'acrylamide (coloration au bleu de Coomassie); 1: marqueurs de poids moléculaire (kDa); 2: profil protéique total de l'algue verte *Ulva Rigida*; 3 et 4: Mise en évidence de la pureté d'une bande de protéine d'environ 20 kDa après électro-élution et dialyse.

Fait intéressant, la protéine de la bande électroéluee (environ 20 kDa) procure un avantage important, avec une réduction de plus de 50% de la cytotoxicité cellulaire lorsque les cellules ont été exposées à des radiations UV-B. Cependant, cet effet était légèrement inférieur à celui de la fraction F10. D'ailleurs, aucune protection détectable n'a été observée par la protéine isolée à partir d'une autre bande (environ 75 kDa) ici utilisée comme contrôle (bande A). (Figure 40)

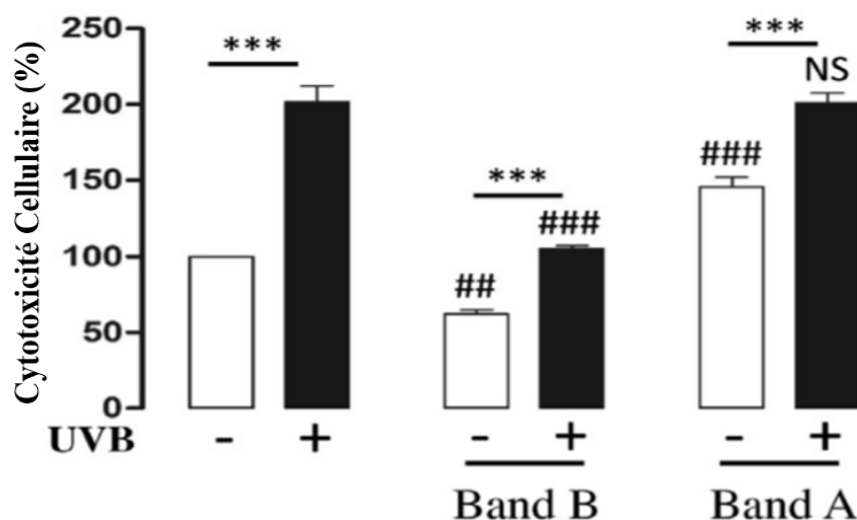


Figure 40. Test d'activité des deux protéines purifiées.

la bande A (contrôle): environ 75 kDa et bande B :environ 20 kDa .

Pour les tests d'activité, les cellules d'astrocytes ont été incubées en présence ou absence des protéines partiellement purifiées pendant 2 h, puis exposées ou non à des rayonnements UV-B pendant 15 min. Chaque valeur est la moyenne \pm SEM d'au moins quatre puits différents. Détails des calculs ANOVA: pour la comparaison entre un échantillon donné (pour les différentes fractions) et l'échantillon témoin correspondant (cellules non exposées ou exposées aux UVB): #p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001; NS, non significatif; Pour la comparaison entre non exposés ou exposés aux UVB (pour chaque fraction) ** p < 0,01; *** p < 0,001; NS, non significatif.

2.2. Dosage de la concentration protéique sur gel

La concentration de la protéine purifiée a été estimée sur gel *SDS-PAGE* à 15% d'acrylamide contre une gamme de concentration en BSA (protéine standard serum albumine bovine) puisque la couleur bleuâtre résiduelle dans la solution protéique interférerait avec le réactif de Bradford lors du dosage en solution de routine. La concentration de la protéine est estimée d'après le gel, après coloration au bleu de coomassie, aux environs de 50 μ g/ml.

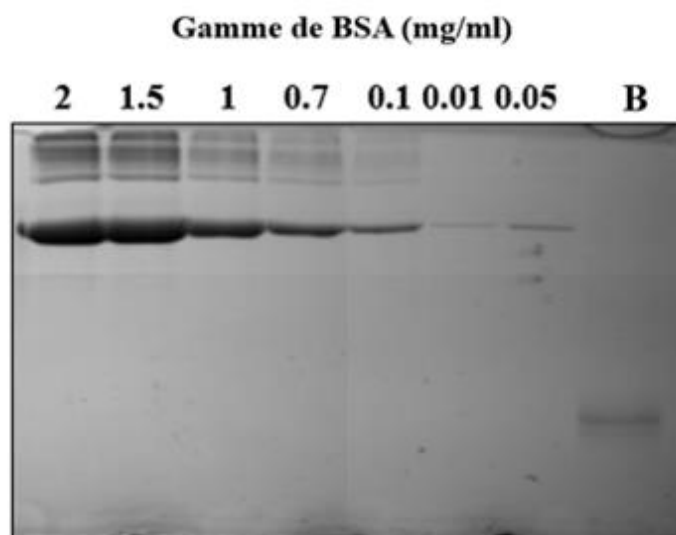


Figure 41. Dosage protéique de la protéine purifiée.

La concentration protéique de la Bande B est dosée sur un gel de Polyacrylamide à 15% (gamme de concentration BSA allant de 0.01 à 2 mg/ml). Le gel après migration est coloré au bleu de coomassie.

2.3. Identification par spectrométrie de masse

Cette étape a consisté en l'identification de la protéine présente dans la bande B. Pour ce, deux méthodes d'identification par spectrométrie de masse ont été réalisées. La première étant la technique *shotgun* couplée à l'identification par un spectromètre de masse LTQ Orbitrap Elite (tableau 20) qui présente l'avantage d'être plus rapide et plus sensible par rapport à la deuxième méthode d'identification classique par MALDI-TOF (figure 42). L'identification a été réalisée contre la base de données Mascot.

Tableau 20. Identification de la calmoduline par LTQ Orbitrap.

Accession	Description	Score	Taux de recouvrement	# Peptides	# PSM	# AAs	MW [kDa]	pI
P04352	putative Calmoduline	169,56	42,94	4	4	163	18,3	4,42

Les deux résultats ont mené à l'identification, sans ambiguïté, de la calmoduline de *Chlamydomonas reinhardtii*, avec 4 peptides avec des spectres de fragmentation annotés et un taux de recouvrement supérieur à 40%.

A Match to: **CALM_CHLRE** Score: **181** **Calmodulin - Chlamydomonas reinhardtii**
 Nominal mass (M_r): **18285**; Calculated pI value: **4.30** Sequence Coverage: **47%**

I MAANTEQLTE EQIAEF**KEAFALFDKDG**DTITTKELGTVMRSLGQNPTEA
51 ELQDMISEVD ADGNGTIDFP EFLMLMARKM KETDHEDEL R EAFK**VFDKDG**
101 **NGFISAAELRHVMTNLGEKLSEEEVDEMIR****EADV**DGDGQVNYEEFVR**MMT**
151 SGATDDKDKK GHK

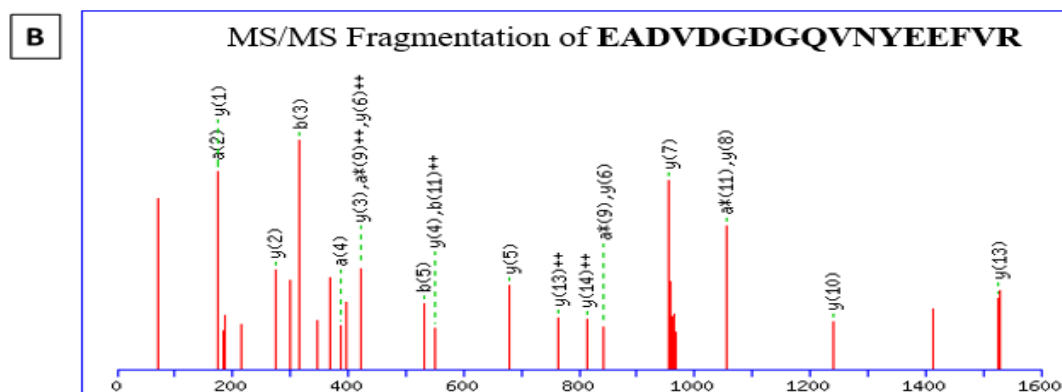


Figure 42. Identification de la calmoduline par MALDI-TOF.

(A): La protéine a été identifiée avec un score de 181 et un taux de recouvrement de 47% (Données MASCOT). (B): Exemple de spectre de fragmentation d'un des peptides identifiés et appartenant à la calmoduline.

2.4. Alignement avec la protéine commerciale

L'alignement de la séquence de la protéine identifiée de l'algue avec celle de la calmoduline bovine commerciale sur le logiciel Clustal W a montré que les deux séquences partagent un haut niveau d'homologie.

	10	20	30	40	50	60
P04352	MADQLTDEQIAEFKEAFALFDKDG	DTITTKELGTVMRSLGQNPTEA	ELQDMISEVDADG			
CALM_BOVIN	MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDG	DTITTKELGTVMRSLGQNPTEA	ELQDMINEVDADG			
	70	80	90	100	110	120
P04352	NGTIDFPPEFLMLMARKMKETDHE	DELREAFKVFDKDGNGFISAAELRH	VMTNLGEKLSE			
CALM_BOVIN	NGTIDFPPEFLTMARKMKD	TDEEIR	EAFVFDKDGNGYISAAELRH	VMTNLGEKLTDE		
	130	140	150	160		
P04352	EVDEMIREADV	DGDGQVNYEEFV	MMTSGATDDKDKK	GHK		
CALM_BOVIN	EVDEMIREAD	IDGDGQVNYEEFV	QMMTAK	-----		

Figure 43. L'alignement des séquences de la calmoduline algale identifiée et de la calmoduline Bovine commerciale.

L'alignement a été réalisé sur le logiciel Clustal W. En rouge sont rapportés les résidus conservés.

2.5. Vérification de l'identité de la protéine

L'identité de la calmoduline a été vérifiée à travers un western blot. La protéine algale et son homologue commerciale ont été incubées avec un anticorps primaire polyclonal anti-calmoduline.

La révélation de la membrane par luminescence montre que les protéines d'intérêt se sont complexées avec l'anticorps spécifique ce qui confirme bien son identité. (Figure 44)

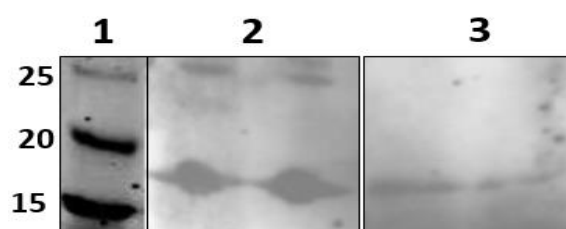


Figure 44. Identification confirmée par western blotting.

1: marqueurs de poids moléculaire (kDa); 2: révélation de la calmoduline commerciale; 3: révélation de la calmoduline identifiée.

Par ailleurs, une expérience d'immunoprécipitation a permis de vérifier la présence de la calmoduline à partir de l'extrait total PE. En effet, les protéines sont incubées en présence de protéines G et de l'anticorps spécifique et après différentes étapes de lavage afin d'éliminer les protéines n'ayant pas complexé avec l'anticorps, l'échantillon est analysé sur un gel SDS-Page comme le montre la figure 45.

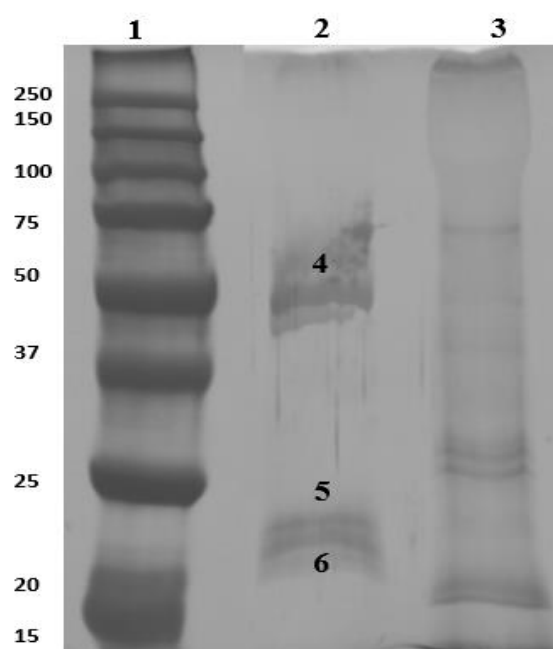


Figure 45. Identification de la calmoduline confirmée après immunoprécipitation à partir de l'extrait PE.

1: marqueurs de poids moléculaire (kDa); 2: Observation de bandes protéiques de l'anticorps et de la protéine fixée; 3: protéines dans le surnageant après lavage; 4 et 5: chaîne lourde (50 kDa) et chaîne légère (25 kDa) de l'anticorps anti calmoduline; 6: calmoduline (20 kDa).

3. Evaluation de l'effet de la calmoduline algaire et commerciale sur des cultures astrocytaires

3.1. L'effet des protéines sur la survie cellulaire

L'homologie importante de séquence entre la calmoduline algaire et la calmoduline bovine nous a suggéré l'idée d'utiliser cette dernière comme témoin positif pour une évaluation réaliste de l'activité de la calmoduline algale identifiée.

D'abord, les doses de 5, 10 et 20 µg des deux protéines sont appliquées aux cultures d'astrocytes et le suivi de la survie des cellules a été investigué en fonction des doses. D'après la figure 46, on remarque une augmentation significative de la viabilité cellulaire en fonction de l'augmentation de la dose appliquée dans le cas des deux protéines.

Cette stimulation dose-dépendante de la viabilité nous témoigne de l'effet proliférateur propre aux deux protéines. La dose de 20 µg qui assure une valeur optimale de survie a été adoptée dans le reste des essais.

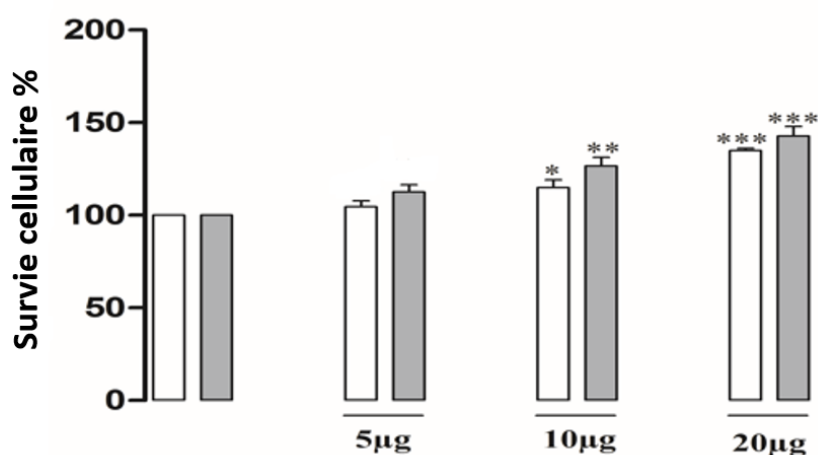


Figure 46. Suivi de la viabilité cellulaire dans des cultures astrocytaires en fonction de différentes doses de la calmoduline algaire (blanc) et de la calmoduline commerciale (gris).

Les cellules ont été incubées en présence de 3 doses différentes de PP ou PC pendant 2 h. Les résultats sont exprimés en pourcentage de contrôle. Chaque valeur est la moyenne \pm SEM d'au moins quatre puits

différents. Détails des calculs ANOVA: pour la comparaison entre un échantillon donné (pour les différentes concentrations) et l'échantillon témoin correspondant * $p < 0,1$ ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.2. L'effet des protéines sur la cytotoxicité cellulaire et le niveau du calcium

Afin de mieux consolider l'effet à la fois stimulant et protecteur des deux protéines, nous avons réalisé d'abord un test de cytotoxicité suivi d'un dosage du taux de calcium en présence de 20ug de chacune des calmodulines et ce en présence ou absence des radiations UV-B.

La figure 47 nous renseigne donc sur le niveau de la libération de la LDH et le taux de calcium cellulaire en présence ou absence de chacune de ces deux protéines avec ou sans les UVB.

Dignes de mention, les deux calmodulines inhibent de la même façon la libération de la LDH (figure A) des cellules (diminution de plus que 50%), même lorsque celles-ci ne sont pas exposées à des rayonnements UVB.

Néanmoins, cet effet est clairement élucidé sous exposition aux UV-B. En effet, les pourcentages de cytotoxicité chez les astrocytes diminuent de 65%.

En outre, le taux de calcium a également été étudié (figure B). Dans des conditions de base, l'addition de la calmoduline n'a pas modifié la concentration en calcium. Cependant, après l'exposition aux UV-B, le niveau de calcium est largement diminué lorsqu'on a ajouté la calmoduline, plaidant pour son rôle bénéfique.

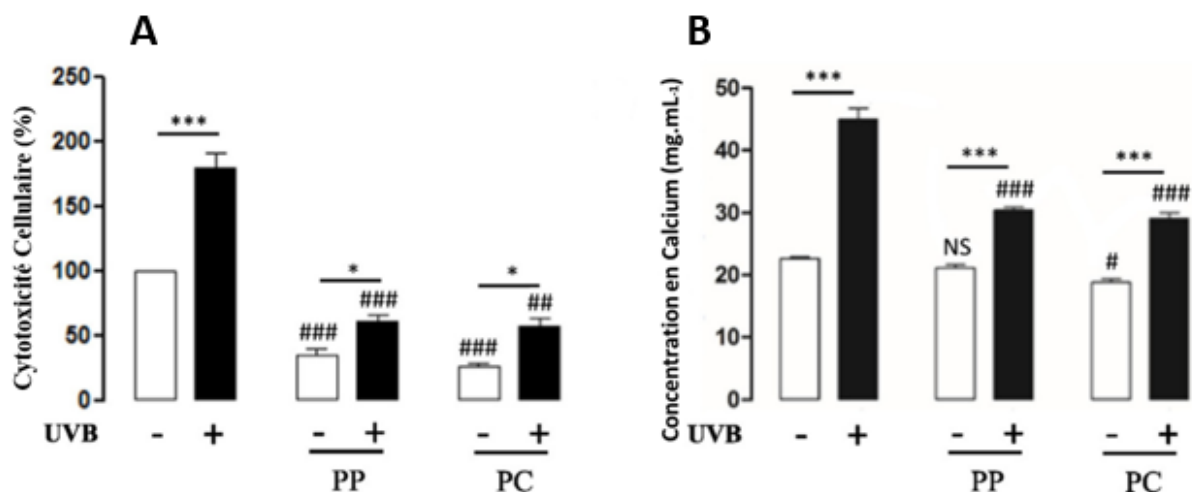


Figure 47. Evaluation de la cytotoxicité des astrocytes et de la concentration en calcium.

Les cellules ont été incubées en présence ou en absence de 20 ug de PP ou PC pendant 2 h, puis exposées ou non à des radiations UV-B pendant 15 minutes (+ ou -). Chaque valeur est une moyenne \pm SEM d'au moins quatre puits différents. Détails des calculs ANOVA: pour la comparaison entre un échantillon donné (pour les différentes protéines) et l'échantillon témoin correspondant (cellules non

exposées ou exposées aux UVB sans Protéines): #p < 0,05; # P < 0,01; ### p < 0,001; NS, non significatif; Pour la comparaison entre non exposés ou exposés aux UVB (pour chaque protéine) * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0. 001; NS, non significatif.

3.3. Effet des protéines sur la morphologie des cellules

L'étude de l'imagerie cellulaire (figure 48) montre que le traitement des astrocytes en culture avec les UV-B augmente la cytotoxicité et réduit le nombre de cellules en plus des modifications phénotypiques citées précédemment. Le prétraitement des cellules avec la calmoduline algale rétablit ces modifications incluant le taux de viabilité cellulaire.

En plus de son effet protecteur, la calmoduline algale possède un effet propre stimulant sur la prolifération cellulaire qui se traduit sur ces images microscopiques (image C) par un nombre plus élevé de cellules.

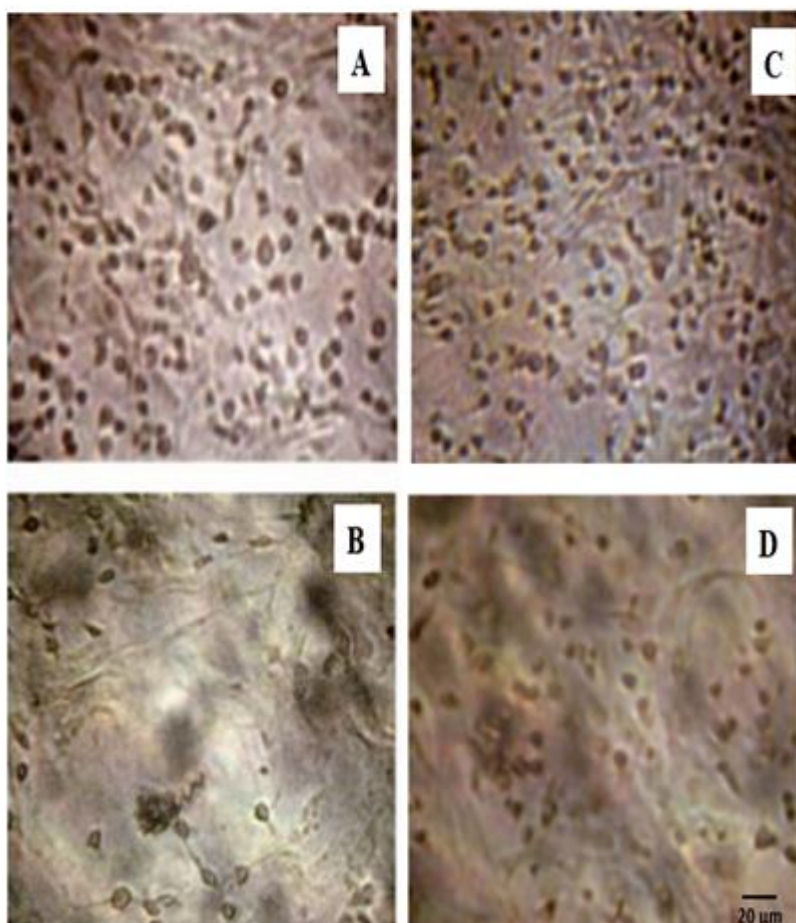


Figure 48. Images microscopiques illustrant l'effet de la calmoduline algale commerciale sur les changements induits par les UV-B dans la morphologie des astrocytes de rats en culture.

Les cellules ont été pré-incubées pendant 2 heures en absence ou en présence de 20 μg de protéine algale (C-D), et ensuite exposées pendant 15 minutes au rayonnement UV-B (B-D).

4. Evaluation de l'effet de la calmoduline algale et commerciale sur des neurones en grain

Compte tenu de l'originalité des résultats précédents, nous avons voulu évaluer l'effet de la calmoduline algale (A) et de son homologue commerciale (B) sur les cultures de neurones.

La figure 49 résume la variation du taux de viabilité cellulaire des neurones en grain suite à leur exposition à des radiations UV-B et ce en absence ou en présence des protéines identifiées et commerciale.

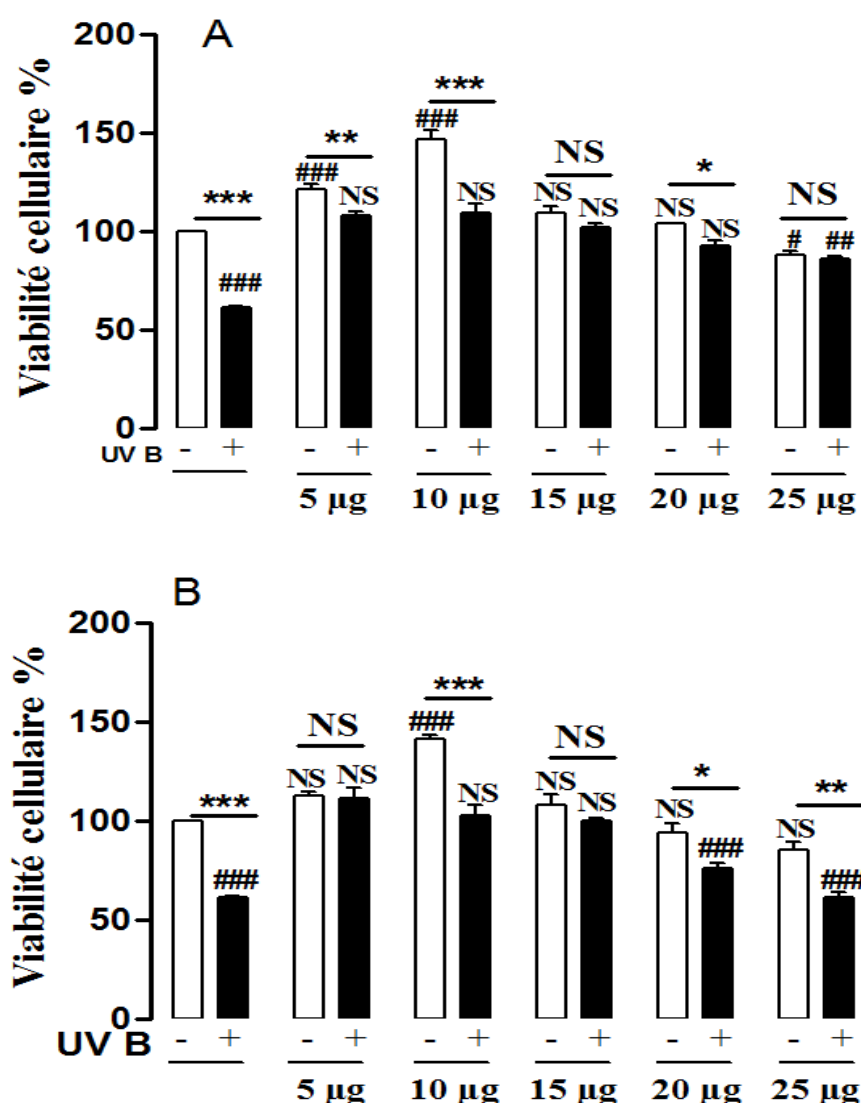


Figure 49. Effets des concentrations graduées de PP (A) et de PC (B) sur la viabilité des neurones en grain en absence (-) ou en présence (+) d'une irradiation UVB.

Les cellules ont été pré-incubées pendant 2 heures en absence ou en présence de différentes concentrations de PP (A) et de PC (B) et ensuite exposées ou non aux rayonnements UVB pendant 15 minutes (+ ou -). Chaque valeur est une moyenne \pm SEM d'au moins quatre puits différents. Détails des

calculs ANOVA: pour la comparaison entre un échantillon donné (pour les différentes concentrations) et l'échantillon témoin correspondant (cellules non exposées aux UVB sans PE): ### $p < 0,001$; NS, non significatif; Pour la comparaison entre non exposés ou exposés aux UVB (pour chaque concentration) * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS, non significatif.

Les résultats ont montré que les radiations UVB ont diminué la viabilité des cellules de façon significative de 40 %, par rapport aux cellules contrôle.

Le prétraitement des cultures neuronales avec des quantités graduées de calmoduline de l'algue ou commerciale induit un effet similaire pour les deux protéines, traduit par une stimulation dose-dépendante de la viabilité, qui atteint pour les deux traitements une valeur approximative de 150% (pourcentage de contrôle) avec une quantité optimale de 10 μg de protéines.

En outre, le traitement avec 5, 10, 15, 20 et 25 μg de PP ou de PC augmente la viabilité des neurones exposés aux rayons UV-B jusqu'à 48% pour la PP et jusqu'à 42% pour la PC. Cependant, la dose de 10 μg semble assurer un maximum de viabilité pour les neurones traités ou non par les UVB.

Conclusion

A l'issue de ce chapitre, nous avons pu fractionner l'extrait PE de l'algue *ulva rigida*, séparer ses protéines, récupérer une protéine à effet protecteur des UVB, l'identifier par spectrométrie de masse et doser sa concentration. L'alignement de cette calmoduline à la calmoduline bovine commerciale témoignant d'une grande similitude nous a permis de tester l'effet des deux protéines sur des cultures d'astrocytes. L'ajout de la calmoduline identifiée ou commerciale (témoin positif) se traduit par une augmentation de la viabilité et une diminution de la cytotoxicité cellulaire, en plus de son effet protecteur contre les radiations UV-B ce qui met en évidence l'implication de la calmoduline dans le processus de la glioprotection.

Pour finir, un essai sur les neurones en grain a fait preuve d'une même capacité à contrecarrer les effets des UVB de la calmoduline avec une dose plus faible que celle appliquée sur les astrocytes étant donné leur plus grande sensibilité. Ces résultats nous encouragent donc à investiguer une étude neurophysiologique plus complète afin de mieux cerner les composantes cellulaires impliquées dans cette neuroprotection.

Discussion

De nos jours, on porte un intérêt croissant pour les molécules bioactives, essentiellement celles issues d'algues marines. Dans ce contexte, *U. rigida* possède des molécules antioxydantes naturelles, et en tant que telle, elle est d'un grand intérêt pour les industries cosmétiques et alimentaires (Farasat M. 2014). Cette algue verte, est également d'une grande considération pour les futures applications en médecine, en particulier pour le traitement préventif et curatif des maladies, notamment celles qui découlent de la détérioration oxydative et des processus neurodégénératifs (Yildiza G. 2012). C'est dans ce cadre que nous étudions, ici, la capacité des molécules bioactives en particulier les protéines d'*ulva rigida* à promouvoir la survie cellulaire et l'activité antioxydante face aux effets néfastes d'un stress oxydatif induit par l'exposition à des radiations UV-B. Également, une investigation protéomique générale de l'extrait protéique PE a mené à identifier le protéome de cette algue et puis à séparer et identifier une protéine impliquée dans ces effets protecteurs. Pour finir, l'application biologique de cette protéine sur des cultures d'astrocytes et des neurones en grain a été marquée par un effet glioprotecteur et neuroprotecteur.

1. Optimisation de l'extraction et implication dans l'activité antiradicalaire

A première vue, nous nous sommes intéressés à l'optimisation de l'extraction et du traitement de séchage de l'algue afin d'assurer un bon rendement en protéines et donc une meilleure activité biologique. A ce titre, plusieurs études ont examiné les taux de protéines dans les algues. Kendel et ses collègues rapportent que les protéines et les acides aminés totaux représentent une assez petite fraction par rapport à d'autres biomolécules (Kendel M. 2015) bien que des rapports plus élevés allant jusqu'à 40% aient été décrits dans d'autres recherches.

D'autres travaux ont rapporté la variabilité de la teneur en protéines de l'algue en fonction de la saison, quand ils sont collectés, le rapport varie de 11 à 23% (Rouxel C. 2001a). Dans la présente étude, un ratio d'environ 14% a été trouvé, qui s'accorde bien avec les données de Mezghani et al (Mezghani S. 2013b). Cependant, nous avons également fait remarquer ici que cette teneur en protéines était fortement dépendante du traitement utilisé pour l'extraction des protéines. Ainsi, parmi les différentes méthodes testées, la lyophilisation présente une meilleure efficacité de l'extraction des protéines puisque cette dernière semble être celle qui protège le plus les biomolécules actives, notamment les protéines de l'algue *Ulva*. Plusieurs études ont également mentionné l'impact du processus de congélation sur la stabilité des protéines (Kasper J.C. 2013). Cette observation est en ligne avec des études antérieures dans lesquelles des procédés de lyophilisation ont été établis comme une approche utile pour surmonter les instabilités physiques

et / ou chimiques des biomolécules, et en particulier des protéines (Chang B. S. 1995; Poulet P. 2007).

En outre, l'influence des méthodes de pré-extraction sur la récupération des protéines d'*Ulva rigida* dépend des caractéristiques physico-chimiques de la paroi cellulaire. En effet, une étude a révélé que l'extractibilité des protéines des algues à parois rigides telles que *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata* et *Haematococcus pluvialis* était inférieure à celle obtenue pour les microalgues à parois cellulaires fragiles telles que *Porphyridium cruentum* et *Athrospira platensis* (Safi C. 2013)

Dans certains cas, on a signalé que les méthodes de séchage au soleil et de séchage à l'étuve étaient plus efficaces que d'autres méthodes (notamment la lyophilisation), mais cela concerne principalement la récupération d'autres composés bioactifs tels que les phlorotannins de l'Algue brune *Ecklonia* (Chowdhury M.T.H. 2011). Cependant, dans notre travail, le séchage au soleil a révélé une diminution de la teneur en protéines probablement due au chauffage qui a favorisé la dégradation des protéines.

Une autre étude a visé à mettre le point sur l'effet des méthodes de séchage au soleil, de séchage à l'étuve et de lyophilisation sur la composition nutritionnelle de *Sargassum hemiphyllum* (Chan J.C. 1997). Cette étude n'a révélé aucune différence significative dans la teneur en protéines. Cependant, l'algue lyophilisée a révélé la plus grande teneur en acides aminés totaux et les algues séchées au soleil ont la teneur la plus faible.

Parmi d'autres, les activités anti-athérosclérotiques, anti-hyperglycémiques et anti-génotoxiques ont été décrites pour les extraits d'*U. Rigida* (Celikler S. 2009a; Godard M. 2009a). Ici, nous montrons que notre extrait exerce également un potentiel anti-radicalaire. En particulier, la capacité à piéger les radicaux DPPH observée ici concorde bien avec les données rapportées par d'autres groupes (Mezghani S. 2013b). Là aussi, le traitement par lyophilisation assure un optimum en termes d'activité antioxydante anti DPPH ainsi qu'en ce qui concerne le pouvoir réducteur étant donné que c'est l'approche (lyophilisation) la plus appliquée afin de surmonter les instabilités physiques et/ ou chimiques des molécules. (Kasper J.C. 2013)

Par ailleurs, la méthode d'extraction semble influencer le rendement en protéines. On note une teneur plus élevée en protéines suite à la précipitation à l'éthanol par rapport à celle effectuée au sulfate d'ammonium (presque le double). Ceci témoignerait de l'efficacité de l'extraction à l'éthanol. Il est à noter d'après plusieurs études que l'éthanol froid a été largement utilisé pour

précipiter les protéines, entre autres celles dérivées du plasma avec leur structure native. (Pittz E.P. 1971; Sakamoto R. 2004) (Okuda M. 2003)

Il a été démontré que la constante diélectrique diminuée d'une solution d'éthanol joue un rôle majeur dans la diminution de la solubilité des protéines natives. Par ailleurs, des interactions défavorables entre la protéine native, et les solvants organiques ont été proposés pour être la cause de la précipitation des protéines et leur cristallisation. (Arakawa T. 2007)

De plus, les méthodes de précipitation des protéines avec les sels, typiquement, le sulfate d'ammonium ont été largement étudiées. En effet, les interactions entre les sels de précipitation et les protéines peuvent causer leur cristallisation et sont thermodynamiquement défavorables. (Arakawa T. 1984) Ce phénomène de cristallisation est d'autant plus important que la concentration en sel est élevée. Il est vrai que les sels de précipitation favorisent une structure plus compacte des protéines et donc une meilleure stabilisation. A l'inverse, la solubilisation des protéines après leur cristallisation par l'ajout de dénaturants tels que l'urée et le chlorure de guanidine cause la déstabilisation de leur structure native. La déstabilisation de la protéine native par ces additifs est due à leur interaction plus favorable avec les états dissociés et dépliés. En outre, leurs effets déstabilisateurs augmentent avec la concentration. Parallèlement, l'utilisation des solvants organiques et des alcools à basse température diminuent la solubilité des protéines à l'état natif et favorise leur précipitation. Cependant l'utilisation d'alcools et d'autres solvants organiques à forte concentration ou à des températures élevées pourrait causer la dénaturation protéique en raison de l'interaction favorable avec des groupements hydrophobes. (Yoshikawa H. 2012)

Par ailleurs, Lee et al appuie dans une étude récente la pertinence de la précipitation des protéines à l'éthanol en tant que méthode simple, reproductible, économique et adaptable pour les études protéomiques. En effet, l'éthanol à 50% représente une concentration optimale pour l'analyse par 2 DE des protéines de la patate douce conduisant à la détection de nouvelles protéines en faible abondance. De plus, cette méthode est potentiellement efficace pour tous les organismes riches en carbohydrates. (Lee H.M. 2015)

2. Effet glioprotecteur de l'extrait PE

Plusieurs molécules végétales se sont révélées être efficaces dans la prévention des dommages oxydatifs de l'ADN induits par les UV à travers un mécanisme de piégeage des ROS in vitro et dans des modèles animaux.(Gill S.S. 2010)

Les résultats remarquables de ce chapitre montrent qu'un traitement des astrocytes de rats aux UV-B, induit des modifications de la morphologie cellulaire et une augmentation de la mort cellulaire en fonction du temps d'exposition et que des extraits protéiques d'Ulva protègent ces cellules en culture contre les effets nocifs des radiations UV-B, augmentent la viabilité et diminuent la libération de l'enzyme clé de la cytotoxicité cellulaire LDH.

Selon Leach al, les radiations ionisantes génèrent des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote après quelques minutes d'exposition des cellules, conduisant à compromettre la viabilité des mitochondries, à l'activation des voies de signalisation MAPK et apportant des dommages à l'ADN.(Leach J.K. 2001)

Pérez-Sánchez a signalé que les ROS intracellulaires sont l'un des effets les plus dommageables des deux radiations UV-B et UV-A sur les cellules, avec des dommages consécutifs sur les lipides, les protéines et l'ADN mitochondrial et nucléaire (Pérez-Sánchez A. 2014). En effet, quand la cellule devient incapable de contrer l'effet d'un stress oxydatif intense, cela affecte sa viabilité et ses fonctionnalités (Ferrero-Gutierrez A. 2008). On note à ce propos le cas des maladies neurodégénératives.

Plusieurs études ont démontré l'implication des astrocytes dans la modulation des processus neurodégénératifs et le contrôle du métabolisme oxydatif cérébral. En effet, ces maladies de neurodégénération sont marquées par une prolifération des astrocytes (étant des cellules de support pour les neurones), un excès de produits d'oxydation des biomolécules cellulaires, une baisse de l'activité et de l'expression des enzymes antioxydantes au niveau du cortex et du plasma et une altération de la biosynthèse des molécules antioxydantes comme le GSH dans les astrocytes (Baillet A. 2010; Emerit J. 2004).

Il est à noter que l'irradiation UVB peut causer des dommages à l'ADN par absorption directe (photo-oxydation) ou indirectement par la génération de radicaux libres. En outre, une étude récente a suggéré que les UVB contribuent à la mort des astrocytes par l'activation des voies intrinsèque et extrinsèque de la mort cellulaire.

Au cours de ce travail, nous avons montré pour la première fois que l'incubation des astrocytes en présence de concentrations croissantes d'extrait *Ulva*, a empêché la mort cellulaire provoquée par les UVB et a éliminé les modifications induites par les UV sur la morphologie des cellules. Les effets nocifs observés après l'exposition aux UV-B disparaissent par addition de 50 µg de PE dans le milieu d'incubation, ce qui suggère que cet extrait peut servir d'agent glioprotecteur. Il est à noter que la faible sensibilité des astrocytes face à des durées d'exposition courtes aux UVB peut être attribuée à leur capacité à neutraliser les ROS du milieu de culture.

Cette réparation peut donc être déclenchée par une inhibition directe des lésions de l'ADN, de la voie intrinsèque de l'apoptose activée par une perméabilisation de la membrane mitochondriale (suivie de l'activation de la caspase 9 et de la caspase-3) et /ou de la voie de mort médiée par le récepteur (voie extrinsèque impliquant l'activation de la caspase 8).

Certaines études ont également démontré que l'exposition des cellules HeLa aux extraits d'*U. Rigida* protège ces cellules contre la mort induite par le stress oxydatif provoqué par H₂O₂ (Mezghani S. 2013b). De même, de nombreux extraits de plantes présentent des effets protecteurs sur des cellules de peau contre l'accumulation des ROS provoquée par les UVB sur des souris et des modèles cellulaires par le biais de l'activation de p53 (Ferrero-Gutierrez A. 2008). Il est en effet bien connu que la protéine p53 joue un rôle crucial dans la protection aux UV-B, agissant en tant que facteur de transcription qui contrôle les gènes impliqués dans le cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation de l'ADN (Decraene D. 2004).

Dans une étude récente Mezghani et Carrier (Mezghani S. 2014) ont démontré que l'effet antioxydant de l'algue est dû à une diminution de l'activation de la calpaïne (médié par une diminution de la concentration des ROS intracellulaire), à une inhibition du clivage de la protéine pro-apoptotique Bax et enfin à une accumulation de la protéine anti-apoptotique Bcl-xl.

En complément aux rapports précédents, d'autres études se sont intéressées aux voies de signalisation impliquées dans le déclenchement de l'apoptose dans les astrocytes et ont rapporté que les ROS provoquent des dommages au niveau de la mitochondrie entraînant la libération du cytochrome c dans le cytosol favorisant ainsi l'activation des caspases. (Masmoudi-Kouki O. 2011)

En outre, pour prévenir les dommages cellulaires, les astrocytes possèdent un éventail de systèmes de défense cellulaires, y compris les enzymes antioxydantes, comme la SOD, la glutathion peroxydase et la catalase (Hamdi Y. 2011). Pour mieux comprendre les mécanismes

par lesquels l'extrait PE protège les cellules contre le rayonnement UV-B, nous avons étudié l'effet de l'extrait sur le taux du calcium et du H₂O₂ au niveau des astrocytes.

Notre étude montre clairement une augmentation des teneurs en H₂O₂ dans le milieu astroglial lorsque les cellules sont exposées aux UV-B, chose qui reflète la stimulation de la production de H₂O₂ dans les cellules par des UV-B. En fait, l'étude faite par Lee montre que O⁻² et H₂O₂ sont les principales espèces de ROS générées par les cellules après une exposition aux UV-B. (Valko M. 2007) (Farasat M. 2014) Bien au contraire, les résultats montrent clairement que l'addition de PE dans le milieu conduit à une réduction de la concentration en H₂O₂ dans le milieu astroglial suite à une exposition aux UV-B (Shiu C. 2005). Ces données peuvent être expliquées par la capacité de l'extrait protéique à neutraliser les radicaux libres. Hamdi et al, ont rapporté que des concentrations élevées en H₂O₂ induisent la mort des astrocytes, notamment par la régulation négative de la SOD et de la catalase (Hamdi Y. 2011).

De même, nous avons démontré pour la première fois, que l'exposition aux UV-B induit une diminution accrue des activités de la SOD et de la catalase dans les cultures astrocytaires et que l'extrait protéique d'algues a complètement éliminé cet effet inhibiteur. Cependant, il est à signaler que dans quelques études le stress oxydatif causé par l'ajout de H₂O₂ provoque une activité stimulatrice du système antioxydant enzymatique dans les cellules fibroblastiques et hépatiques.(Röhrdanz E. 1998; Shen Q. 1993). D'autres travaux, au contraire sont en adéquation avec nos résultats et démontrent que le stress oxydatif réprime les activités enzymatiques dans les astrocytes de rat en culture, plus encore, il a été montré que le H₂O₂ diminue de façon dose-dépendante l'activité enzymatique de la SOD et de la catalase. Ces résultats pourraient témoigner que la réponse cellulaire au stress diffère selon le type cellulaire, l'intensité de la dose utilisée ainsi que la durée d'incubation (Zaheer A. 2004; Zhang Z. 2009) Par ailleurs, le prétraitement des astrocytes par 50µg de PE élimine l'effet inhibiteur des radiations UVB sur l'activité de la SOD et de la catalase. Ces résultats indiquent que PE stimule l'activité du système antioxydant enzymatique en s'opposant à l'action pro-oxydante des UVB et en augmentant la résistance des astrocytes contre les dommages oxydatifs. Des recherches entretenues sur des astrocytes de rats en culture surexprimant la SOD montrent que ces derniers deviennent plus résistants au stress oxydatif (Chen Y. 2001; Wang J. 2005), et que dans le cas contraire ces cellules deviennent plus vulnérables aux effets néfastes du stress oxydant (Schuessel K. 2005).

En outre, il a été élucidé chez *U. fasciata* que la SOD est capable d'éliminer l'anion superoxyde induit après exposition aux UV-B (Shao P. 2013). Les voies de signalisations impliquées dans la stimulation des activités de la SOD et de la catalase par l'extrait PE sont encore mal connues.

Cependant, cet effet pourrait être attribué à une augmentation rapide de l'expression de la SOD et de la catalase, ou à un processus de déphosphorylation relié à une augmentation de la concentration intracellulaire du calcium (Hamdi Y. 2011; Kumar S. 2010). L'affirmation de cette hypothèse a été appuyée par la mesure du calcium intracellulaire. En effet, le traitement des cellules astrogliales avec les UV-B conduit à une augmentation du $[Ca^{2+}]_c$ et le même effet a été observé avec une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène dans des cellules tumorales 9L RBT de cerveau de rats . (Kasper J.C. 2013) Ces effets ont été supprimés par le traitement PE.

Ainsi, on pourrait penser à un mécanisme d'action impliquant une certaine mobilisation du calcium. Alberdi et al. ont rapporté que la signalisation de Ca^{2+} dans les cellules gliales peut réguler l'expression des gènes, le développement et la différenciation, et peut initier la mort cellulaire. Ces auteurs ont fait remarquer une relation étroite entre la perturbation de l'homéostasie calcique dans les cellules gliales et la pathogenèse des maladies neurodégénératives (Alberdi E. 2005).

Nos travaux ont aussi montré que la génération, par les cellules astrocytaires, des produits de l'oxydation des lipides, par exemple, le malondialdéhyde, après l'exposition aux UV-B, a été fortement diminuée par le traitement PE. Il est déjà établi, à ce sujet, que les marqueurs de la peroxydation lipidique augmentent au cours de la pathogenèse des maladies neurodégénératives tels que dans le cortex ou le fluide cérébrospinal chez les patients atteints de sclérose latérale amyotrophique, d'Alzheimer ou de parkinson. C'est de ce fait, que les facteurs qui pourraient empêcher les dommages oxydatifs dans la membrane lipidique pourraient se révéler d'un grand potentiel thérapeutique pour le traitement des lésions cérébrales impliquant la neurodégénérescence oxydative. Plusieurs travaux se sont intéressés à ce sujet. (Hamdi Y. 2015)

Pris ensemble, tous ces résultats démontrent pour la première fois que l'extrait PE empêche l'altération des constituants cellulaires causée par le stress oxydatif induit par l'exposition aux UV-B, ce qui est au moins en partie, grâce à l'amélioration de l'activité des enzymes antioxydantes. En effet, il n'est pas encore prouvé si PE peut inhiber à la fois les deux voies intrinsèque et extrinsèque et même s'il peut supprimer totalement les dommages. Cependant, nous avons démontré que l'extrait d'algue peut stimuler le système antioxydant endogène (activité SOD et catalase), associé au puissant effet glioprotecteur.

En outre, PE peut activer l'expression des gènes impliqués dans les défenses de stress cellulaire comme Bcl 2 qui induit la protection des astrocytes et la prévention des dommages UVB. De plus, le prétraitement cellulaire avec du PE pourrait conduire à une protection physique par

absorption ou dissipation de l'énergie transférée par les UVB. Cet effet photo-protecteur a déjà été décrit pour les cellules épithéliales de la rétine et la détection implicite par un photorécepteur aux UVB qui conduit à l'activation de l'expression de gènes liés à la photo-protection afin de prévenir ou de minimiser la génération de molécules oxydantes et de neutraliser les espèces réactives d'oxygène. (Atmani D. 2011)

3. Validation de l'effet protecteur des protéines

3.1. Effet de PE sur les cellules de *Saccharomyces Cerevisae*

Au cours de cette partie, nous avons d'abord investigué l'action protectrice potentielle de PE sur les cellules de *Saccharomyces Cerevisae* vis à vis d'un stress oxydatif toujours induit par les radiations UVB et dans les mêmes conditions précédemment établies. Les résultats témoignent d'une meilleure résistance des levures au stress des UV-B par rapport aux astrocytes comme l'indique la figure comparative ci-dessous (figure 51). L'ajout de PE dans le milieu augmente la protection contre les UV-B de la même façon dans les deux types cellulaires. Ceci témoignerait de la possibilité de l'implication des mêmes marqueurs cellulaires des deux types cellulaires dans leur protection tel que le système de défense enzymatique. Plusieurs études ont démontré le rôle prépondérant, entre autres, de la superoxide dismutase dans la réponse des levures au stress puisque des cellules dépourvues de leur capacité à exprimer l'enzyme sont plus vulnérables à l'anion superoxide et que l'ajout de la SOD exogène protégerait les levures des dérivés du stress oxydatif. (Dantas A. 2015; Youseff B.H. 2012)

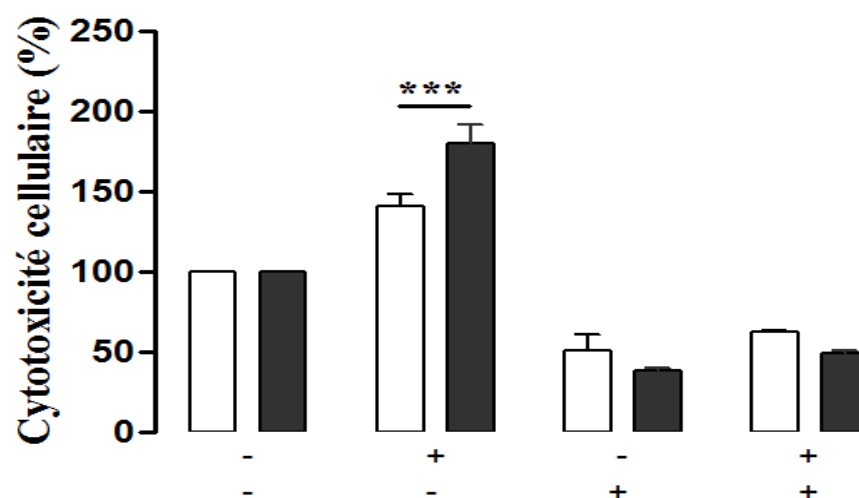


Figure 50. Figure comparative de l'effet de l'extrait PE sur la cytotoxicité des levures (blanc) et des astrocytes en culture (noir) en l'absence ou présence de rayonnements UVB.

Les cellules ont été incubées en présence ou en absence de 50 ug de PE pendant 2 heures (+ ou -), la ligne inférieure, puis exposés ou non à des radiations UV-B pendant 15 minutes (+ ou -, la ligne supérieure).

Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle. ANOVA suivi par le test de Bonferroni *** $p < 0,01$ très différent du contrôle.

3.2. Effet de la digestion de l'extrait sur la protection cellulaire

Plusieurs études ont été menées pour caractériser la nature des molécules biologiques impliquées dans la résistance cellulaire contre le stress oxydatif. Les polyphénols et les polysaccharides ont été proposés (Yildiza G. 2012) (Celikler S. 2009a; Peasuraa N. 2015). Ainsi, Serap et ses collègues ont rapporté que les effets bénéfiques de certaines espèces d'*Ulva* peuvent être en partie attribués à l'effet antioxydant / antiradicalaire des composés phénoliques (Celikler S. 2009a). En outre, Gamze a résumé les composants bioactifs antioxydants d'*U. rigida*, dont les composés phénoliques totaux, les lipides, les vitamines (A, E et C), les protéines, les glucides et les pigments (Yildiza G. 2012).

Un grand nombre de documents est axé sur l'intérêt des polysaccharides d'algues comme les ulvaceae. En effet, de nombreux polysaccharides d'algues, notamment acides, présentent des propriétés immunomodulatrices intéressantes. Ainsi, Lamas et ses collaborateurs ont montré que les polysaccharides acides d'*U. rigida* stimulent les activités des macrophages murins, y compris l'expression accrue des cytokines inflammatoires et la régulation positive de plusieurs gènes associés à des réactions pro-inflammatoires (Leiro J. M. 2007). Il est à noter que cette capacité de stimulation a été perdue lorsque les polysaccharides ont été désulfatés.

D'autres travaux ont également montré que les polysaccharides acides d'*Ulva* sont impliqués dans des activités antioxydantes, comme les ulvanes d'*Ulva rigida* qui empêchent probablement la diminution des défenses antioxydantes chez les hamsters atteints d'athérosclérose. En outre, les polysaccharides sulfatés d'*Ulva pertusa* ont montré des effets inhibiteurs significatifs sur les radicaux superoxyde et hydroxyle, avec une forte puissance réductrice et une capacité de chélation des métaux. En particulier, les ulvanes de bas poids moléculaire présentent une activité antioxydante plus forte que les autres fractions.

Etant donné leur importance fonctionnelle, le squelette du sucre de ces polysaccharides sulfatés ou ulvanes, a été investigué, il est, vraisemblablement, composé de rhamnose, de xylose et de glucose et contient des sulfates au niveau des positions C2 ou C3 du rhamnose.

Il a été rapporté que ces polysaccharides sulfatés présentent des activités biologiques importantes telles que les activités anticoagulante, antioxydante, antiproliférative, antitumorale, ainsi que les activités anti-inflammatoire, antivirale et antiadhésive (Peasuraa N. 2015; Sangwan V. 2002; Shao P. 2013). Cependant, Shao a constaté que les fractions de polysaccharides sulfatées qui

présentaient une teneur en sulfate inférieure ont montré des activités antioxydantes plus élevées (Shao P. 2013). Cet auteur a conclu que les activités antioxydantes des fractions de polysaccharides ne sont probablement pas dues qu'à un facteur unique, mais sont la résultante d'une combinaison de plusieurs facteurs telles que la teneur en acide uronique et surtout la teneur en protéines (Shao P. 2013). Ce rôle des protéines a également été proposé par Sheih et ses collègues (Sheih I. 2009), qui ont avancé que les protéines d'algues ont été efficaces pour piéger les radicaux libres et prévenir contre les maladies liées au stress-oxydant telles que l'athérosclérose, les maladies coronariennes et le cancer.

De la même manière, les peptides bioactifs, comme étant des produits de l'hydrolyse des protéines alimentaires diverses, se sont avérés dotés de plusieurs activités biologiques dont la plus importante est l'activité antioxydante (Sarmadi B.H. 2010). En accord avec cette hypothèse, la digestion enzymatique des protéines de l'extrait PE induit une diminution dose-dépendante de l'activité protectrice. La digestion enzymatique de l'extrait PE a été suivie par un dosage des protéines. Ceci, en plus de la diminution ou l'inhibition totale de l'activité protectrice du digest témoignent de l'efficacité de cette digestion protéolytique.

De même, les traitements par chauffage ont montré qu'une température de 95°C est nécessaire pour inhiber cet effet protecteur, ce qui pourrait confirmer la nature protéique des principaux composés actifs (Žilić S. 2012) (Promeyrat A. 2013). Par ailleurs, il est connu que la structure des protéines ; leur poids moléculaire et leurs séquences en acides aminés peuvent fortement affecter leur capacité antioxydante soulignant ainsi que l'intégrité structurale moléculaire est primordiale pour les protéines ayant un rôle antioxydant et ce face à un stress donné.

Nous avons également observé que la digestion du PE par des hydrolases a renforcé son effet protecteur et a engendré une diminution de la cytotoxicité des cellules. Nous pouvons suggérer que ce phénomène est originaire d'une libération des protéines et d'un meilleur contact avec les cellules de levures. De plus, les ulvanes d'*U. Armoricana* ont présenté selon notre étude une faible protection contre le stress oxydatif comparé à l'effet exercé par notre extrait PE.

Peasura a récemment confirmé que tous les extraits de polysaccharides sulfatés d'*Ulva* ont été contaminés par les protéines étant donné que les fragments de sulfate d'ester peuvent former des anions forts et attirer les protéines chargées positivement. (Peasuraa N. 2015)

3.3. *Investigation protéomique*

La protéomique représente un outil puissant pour comprendre les processus de base dans la croissance des plantes et leur développement. Dans cette étude, nous présentons la première analyse protéomique de l'algue *U. rigida*. Les investigations ont confirmé la présence de nombreuses protéines dans les échantillons de PE. Comme précédemment mentionné, nous avons rapporté, 38 protéines relatives à *Ulva Rigida*.

Parmi les protéines identifiées et les plus abondantes, on cite l'actine, qui est l'une des protéines cytosquelettiques les plus hautement conservées dans les cellules eucaryotes (Zhu L. 2013b). L'actine joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions cellulaires, par exemple, la mobilité des cellules, le maintien de leur forme et de leur polarité et la régulation de la transcription (Dominguez R. 2011). De plus, la majorité du transport intracellulaire chez les végétaux passe par les filaments d'actine. (Dominguez R. 2011)

Récemment, il a été démontré que le cytosquelette d'actine contribue à la résistance du poivre au stress induit par *Puccinia striiformis* en affectant l'accumulation de H_2O_2 et la réaction d'hypersensibilité (Wang J. 2015b). D'autres études ont montré que la perturbation du cytosquelette d'actine a conduit à l'activation des protéines kinases impliquées dans le stress osmotique, thermique et le froid (Šamaj J. 2002; Sangwan V. 2002). La perturbation du cytosquelette d'actine pourrait donc agir en tant que mécanisme de suivi, ce qui provoque l'activation des voies de signalisation impliquées dans la réponse de la défense au stress (Staiger C.J. 2009).

En outre, on sait que la réorganisation du cytosquelette d'actine est modulée par plusieurs protéines de liaison à Ca^{2+} , telle que la calmoduline (Aslam S. 2012). Dans nos échantillons, nous avons identifié la calmoduline avec un score élevé et de nombreux peptides.

La vérification de l'interaction entre ces deux protéines a été effectuée à travers des analyses bioinformatiques sur les bases de données. Les résultats suggèrent de fortes interactions entre l'actine et la calmoduline. (Figure 51A)

Cette protéine ubiquitaire, régleme les activités biologiques de nombreuses protéines cellulaires tels que les aquaporines et les transporteurs ioniques transmembranaires essentiellement d'une manière dépendante du Ca^{2+} (Reichow S.L. 2013). Parmi les enzymes stimulées par le complexe calmoduline- Ca^{2+} on note un certain nombre de protéines kinases et phosphatases capables d'initier diverses cascades de signalisation (Berchtold M. W. 2014). (Figure 51 B et C)

Il a été rapporté que cette protéine est l'expression d'un gène important dans la réponse immunitaire et au stress chez les plantes et le crabe chinois (Cheval C. 2013a; Yang Q. 2007b).

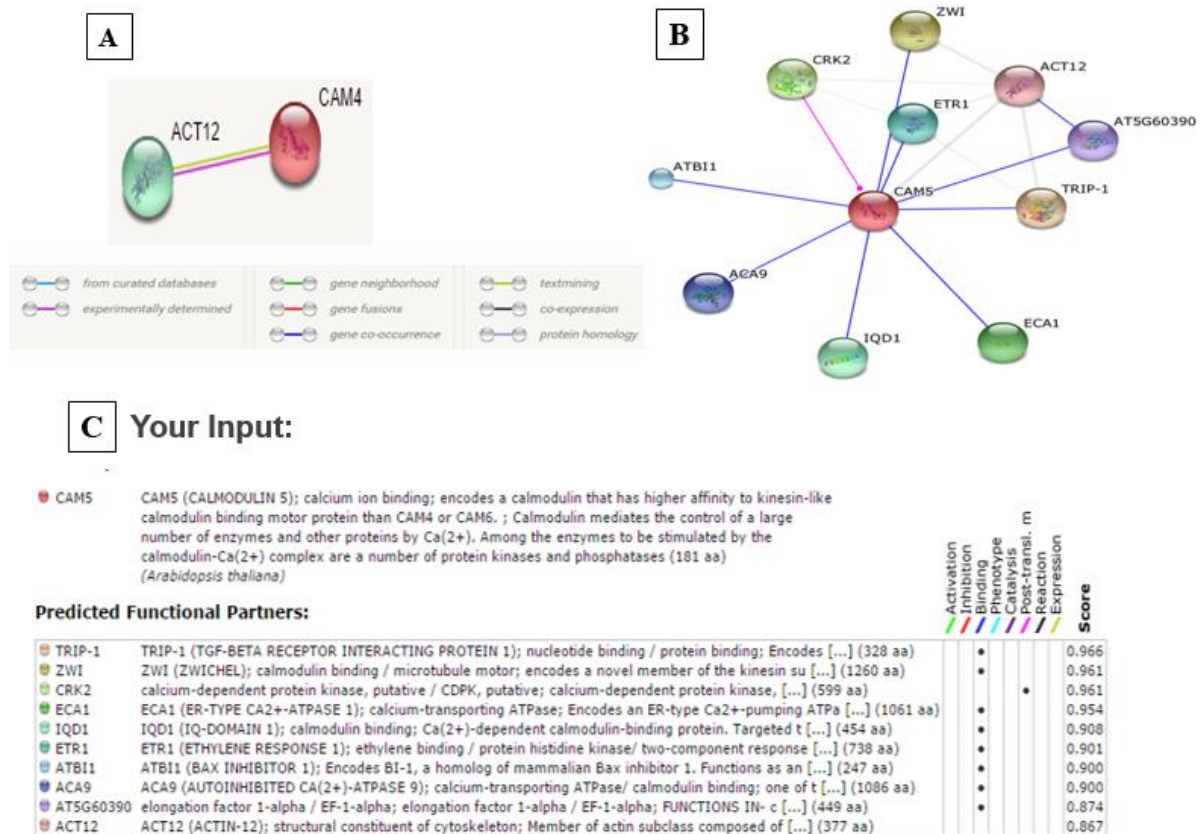


Figure 51. Prédiction des interactions de la calmoduline avec ses partenaires fonctionnels.

(A): Interaction prédite de la calmoduline avec l'actine (B): Les partenaires fonctionnels les plus probables de la calmoduline. (C): Scores attribués à chaque interaction, STRING (<http://string-db.org/>).

Parmi les protéines identifiées, la cystéine synthase a également été trouvée dans les extraits d' *U. rigida* présentant les activités anti-oxydantes les plus élevées. La cystéine synthase est une enzyme clé de l'assimilation du soufre, responsable de la production d'anti-oxydants et des chélateurs de métaux, tels que la métallothionéine, la phytochélatine et le plus important du glutathion (Yang Q. 2007b). La cystéine synthase est un complexe hétéro-oligomérique composé de deux enzymes, à savoir la sérine acétyltransférase et l'O-acétylsérine (thiol) lyase. Ce complexe catalyse la biosynthèse de la cystéine dans les plantes à partir de la sérine et de l'acétyl-CoA (Wirtz M. 2006).

Comme dit ci-dessus, la cystéine est un précurseur pour la synthèse de divers métabolites contenant du soufre, impliqués dans l'activité antioxydante et les systèmes de défense au stress. Des études ont montré que l'expression accrue de CS peut améliorer à la fois les niveaux de

cystéine et de glutathion dans les plantes (Yang Q. 2007b). En outre, il a été rapporté que la surexpression de la cystéine synthase induit l'expression du gène de la SOD chez *Arabidopsis thaliana*. D'autres résultats suggèrent que l'introduction d'un gène de la cystéine synthase dans des plantes de tabac entraîne non seulement la production élevée de composés riches en soufre capables de détoxifier les métaux lourds, mais aussi l'élimination active de la toxicité de la plante en raison de l'excrétion active ou la dilution par une croissance rapide. (Haradaa E. 2001). Par conséquent, on pourrait parler d'une enzyme clé responsable de la synthèse de la cystéine et donc impliquée dans les défenses antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques.

Pris ensemble, les résultats de l'analyse protéomique de l'extrait confirment l'implication de la fraction protéique de cette algue verte dans l'activité de protection et dans les systèmes de défense contre le stress oxydatif. D'autres investigations, pour isoler et caractériser cette fraction active se sont suivies.

4. Identification de la calmoduline comme principal acteur de l'extrait protéique

Après la caractérisation de l'extrait total des protéines, nous avons effectué un fractionnement et la calmoduline isolée a montré une activité protectrice particulièrement intéressante. La calmoduline a des caractéristiques structurales qui lui confèrent la capacité de se lier au Ca^{2+} et à une grande variété de protéines cibles. Depuis sa découverte (Cheung W.Y. 1970), les informations se sont accumulées sur son rôle de premier plan dans le contrôle de nombreux processus physiologiques telles que l'architecture et la fonction du cytosquelette, la prolifération cellulaire, l'inflammation, l'apoptose, l'autophagie, l'homéostasie métabolique ou la réponse immunitaire, de manière non exhaustive. Par exemple, l'implication de la calmoduline dans la prolifération cellulaire a été élucidée en utilisant le modèle de cellules de *Saccharomyces cerevisiae*, où l'expression létale de la calmoduline a été perturbée par l'inactivation du gène (Sun G.H. 1991). D'un autre côté, une autre étude a également signalé que, dans le cas de cellules recombinantes de mammifères dans lesquelles un vecteur viral conduisant à la surexpression de la calmoduline a été insérée, on a observé une augmentation de la prolifération cellulaire (Means A.R. 1988b).

Le plus intéressant dans le cadre de notre travail, est que la calmoduline a été montrée pour être impliquée dans la protection des cellules contre le stress en modulant l'activité d'une variété de protéines, y compris les enzymes antioxydantes. Ainsi, le traitement des tiges de maïs avec différentes concentrations de CaCl_2 a entraîné une augmentation de l'activité de la catalase d'une

manière dépendante de la dose (Afiyanti M. 2014). De même dans le blé, le durcissement des plants avec du CaCl_2 déclenche une protection accrue contre le stress thermique (Liu H.T. 2003b). Il est évident que la catalase fonctionne comme un piège à H_2O_2 , et est essentielle pour la tolérance au stress, y compris le stress oxydatif. En outre, l'addition de la chlorpromazine, un inhibiteur de la calmoduline supprime considérablement l'activité enzymatique totale de l'isoforme principale de la catalase et cette suppression a été atténuée par l'addition de la calmoduline exogène. (Afiyanti M. 2014) L'action de la calmoduline exogène a été également observée sur des cellules végétales, des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine et des cellules de foie de rats. (Dawson R. A. 1992; Swierenga S.H.H. 1980)

La combinaison de CaCl_2 et de la calmoduline dans la modulation de l'activité de la catalase a été démontrée dans plusieurs études, avec par exemple, pour des feuilles de riz où une carence en calcium / calmoduline a réduit de manière significative la teneur en glutathion et l'activité de la catalase (Cho S.C. 2012). En général, cette combinaison semble favoriser une tolérance accrue à toutes sortes de stress tels que le stress salin dans les feuilles de moutarde (Tuteja N. 2008) ou thermique (chaleur et froid) dans le cas d'*Amaranthus lividus* (Bhattacharjee S. 2009). En plus de son implication dans la réponse à divers stress et la réponse immunitaire chez les plantes, ceci a également été confirmé chez le crabe chinois (Li S. 2014b). C'est aussi dans ce cadre que nous avons voulu tester l'effet de la calmoduline algale et commerciale sur les activités des enzymes antioxydantes des cultures d'astrocytes en présence ou absence des radiations UV-B (figure 52).

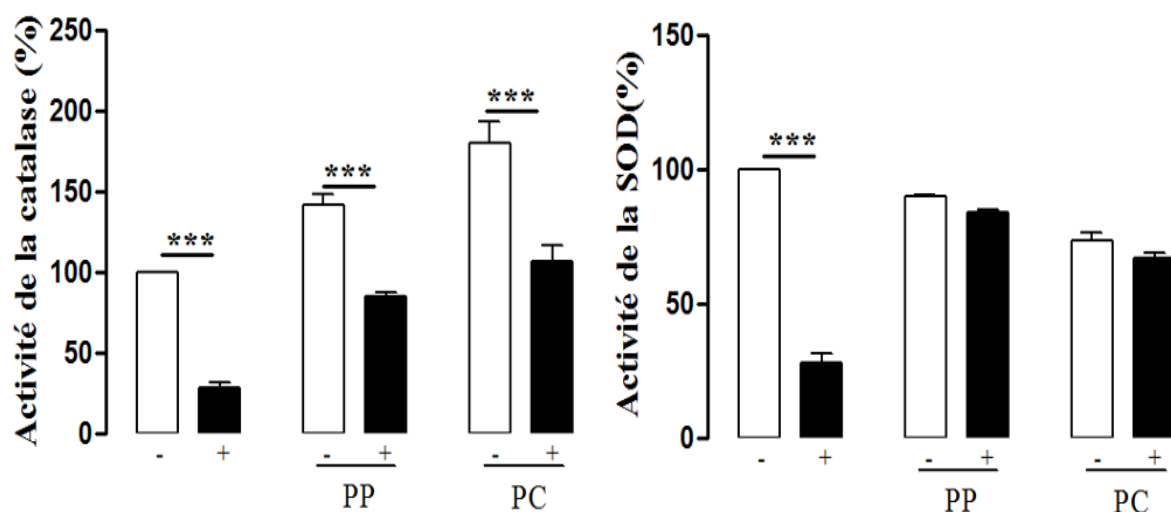


Figure 52. Evaluation de l'effet de la calmoduline algale (PP) et commerciale (PC) sur les activités de la catalase et de la SOD des cultures astrocytaires.

Les cellules ont été incubées en présence ou en l'absence de 20 ug de PP ou PC pendant 2 h, puis exposées ou non à des radiations UV-B pendant 15 minutes (+ ou -). Chaque valeur est une moyenne \pm SEM.

Les résultats concordent bien avec ce que nous avons précédemment avancé. En effet, le simple ajout de la calmoduline exogène dans le milieu de culture stimule l'activité de la catalase. L'évènement marquant est que le prétraitement avec cette même protéine (aussi bien PP que PC) inhibe complètement l'effet réprimant des radiations UV-B et rétablit le niveau des activités des enzymes antioxydantes à leur valeur initiale.

D'autres études établies récemment viennent consolider nos résultats, étant donné qu'un prétraitement d'astrocytes en culture par des peptides glioprotecteurs comme l'ODN ou le PACAP pendant 10 min était suffisant pour abolir l'effet inhibiteur de H₂O₂ sur l'activité de la SOD et de la catalase et sur la cytotoxicité cellulaire. Dans une autre étude connexe (réalisée dans les mêmes conditions), les expériences ont révélé que les niveaux d'ARNm de la SOD et de la catalase étaient significativement améliorés, ce qui indique l'effet stimulateur au niveau de la transcription (Hamdi Y. 2012) (Douiri S. 2016)

Ces résultats sont également étayés par les données, détaillées précédemment, qui révèlent l'implication de la calmoduline dans la réponse à divers stress (Afiyanti M. 2014) et nous encouragent à supposer qu'en stimulant l'activité du système antioxydant enzymatique, la calmoduline pourrait s'opposer à l'action pro-oxydante des radiations UV-B et améliorer la résistance des astrocytes contre les dommages oxydatifs.

Toutes ces observations soutiennent l'effet glioprotecteur que nous avons observé avec l'extrait de protéines d'algues dans lequel la calmoduline a été identifiée comme un élément majeur. En outre, nos analyses complémentaires démontrent clairement que la calmoduline endogène est en mesure de promouvoir le même résultat bénéfique avec limitation de la cytotoxicité exercée par les radiations UV-B.

Au vu des effets protecteurs de la protéine sur la survie des astrocytes et la lutte contre le stress oxydatif, nous avons émis l'hypothèse que cette protéine pourrait exercer une action neuroprotectrice. Nous avons donc conclu nos travaux par investiguer l'effet de la calmoduline sur des cultures de neurones en grain et nous avons confirmé la présence d'un effet neuroprotecteur significatif.

En outre, il a été rapporté que la calmoduline régule l'activité de plusieurs protéines kinases dont potentiellement l'activation de la calcium/calmodulin-dependent Protein Kinase II (CaMKII) et que la survie neuronale dépend considérablement de l'activité astrocytaire (Liu L. 2016). Une

étude rapporte, dans ce cadre, que la perte de l'activité CaMKII dans les neurones est préjudiciable à la viabilité neuronale et qu'une perte de signalisation dans les astrocytes toujours par l'inhibition de la CaMKII dérègle l'absorption du glutamate ce qui pourrait conduire à un dysfonctionnement cellulaire et à compromettre la survie neuronale.(Ashpole N.M. 2012; Ashpole N.M. 2013)

Nos données suggèrent donc que la calmoduline peut être une cible potentielle afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques dans le but de contrecarrer l'effet du stress oxydatif principalement impliqué dans les maladies neurodégénératives.

Conclusion générale
Et Perspectives

Au terme de ce travail, nous démontrons, à travers la présente étude, l'effet glioprotecteur puissant de l'extrait de l'algue verte *U. rigida* contre les dommages cellulaires des UV-B. L'extrait protège vraisemblablement les cellules astrogliales de la mort causée par le stress oxydatif.

Nous avons démontré que cet effet antioxydant et prolifératif de l'extrait PE sur les cellules astrogliales, se traduit particulièrement par la promotion de la survie cellulaire, la diminution du relargage de la LDH dans le milieu extracellulaire, l'inhibition de la production de marqueurs de stress, tels que le H₂O₂ ou encore le produit de la peroxydation lipidique le Malondialdéhyde. Nous avons également conclu que cet effet peut être attribué à l'activation du système antioxydant endogène comme les enzymes antioxydantes SOD et catalase.

Ce travail a également montré que la lyophilisation semble être le traitement des algues qui permet le meilleur effet antioxydant, peut-être en offrant une meilleure extraction et/ou conservation des protéines par rapport aux autres traitements de pré-extraction.

Au vu de ces résultats précédents, et de l'effet glioprotecteur de l'extrait PE observé même à de faibles concentrations, nous avons investigué de près la nature de la fraction de l'extrait responsable de cette protection et des effets bénéfiques sur la survie cellulaire. Nous avons pu déterminer l'implication de la fraction protéique de l'extrait PE dans cette action protectrice étant donné que l'action du traitement thermique et en particulier l'action de protéase la trypsine inhibent efficacement l'activité biologique de l'algue contre les radiations UV-B. Néanmoins, on ne peut exclure le rôle bénéfique que possèdent d'autres composés tels que les polysaccharides ou les polyphénols et leur contribution à renforcer la protection contre les rayonnements UVB.

Parallèlement, nous avons en partie élucidé le profil protéique total de l'algue *ulva rigida* à partir de ces 4 extraits ce qui nous a mené à l'identification de quelques dizaines de protéines connues par leur implication, entre autres, dans la protection cellulaire contre le stress et l'apoptose. L'étude a également mené à l'identification de 3 protéines communes à l'ensemble des extraits (i.e., la calmoduline, P04352; actine, O65316; et la cystéine synthase, P31300).

Enfin, le fractionnement de l'extrait protéique PE selon le poids moléculaire nous a permis d'identifier par spectrométrie de masse la calmoduline et de la proposer comme principal contributeur à l'origine de ces effets préventifs. L'évaluation de cette protéine algale et de son homologue commerciale a confirmé leur action à la fois glioprotectrice et neuroprotectrice contre un stress oxydatif induit toujours par les rayonnements UV-B.

Nous pouvons, en définitive, affirmer que l'évaluation du profil protéique total ainsi que l'action des différentes protéines qui sont à l'origine de ces effets préventifs pourraient dans un futur proche assurer une meilleure exploitation du potentiel thérapeutique de cette algue.

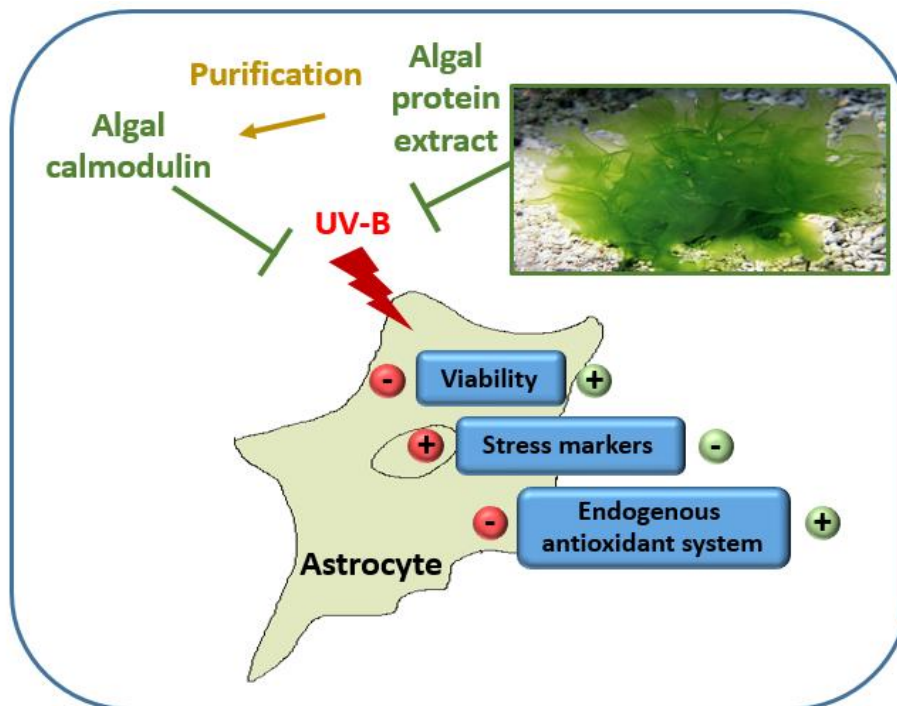


Figure 53. Action glioprotectrice de l'extrait protéique PE de l'algue verte *Ulva rigida* récoltée sur les côtes de Bizerte ainsi que de la calmoduline purifiée de ce même extrait contre les effets délétères des UV-B.

Dans le prolongement de ces travaux, nous proposons dans un premier temps et toujours sur un plan in vitro d'étudier l'effet de l'extrait PE sur le profil protéique des astrocytes corticaux de rats. Il s'agit d'analyser les modifications protéomiques des cultures d'astrocytes associées à l'effet protecteur de PE et ce en absence et en présence d'un stress oxydatif relayé à la même dose de rayonnements UV-B utilisée précédemment. En outre, il s'agit d'identifier et de quantifier les protéines qui interagiraient avec l'extrait PE et celles principalement liées au stress oxydatif, en particulier les protéines impliquées dans la protection cellulaire contre le stress oxydatif. Les protéines dont l'expression est régulée de façon opposée par les UV-B et l'extrait PE seront mises en évidence.

Grâce à l'approche de la protéomique différentielle basée sur la spectrométrie de masse (Orbitrap) couplée à la technique shotgun, nous pourrions d'abord identifier toutes les protéines impliquées dans le contrôle du métabolisme oxydatif. En outre, par le biais de la quantification de l'abondance des protéines, qu'elles soient surexprimées ou sous-exprimées, nous pourrions nous investiguer davantage sur les mécanismes d'action impliqués dans la correction des troubles

relatifs aux effets délétères des UV-B par l'extrait PE et permettant ainsi de rétablir la balance Redox.

En collaboration avec la plateforme protéomique de Rouen PISSARO, nous avons entamé ces travaux et le simple dosage des protéines par la méthode Bradford révèle des différences significatives entre les 4 conditions utilisées à savoir les astrocytes contrôle, les cellules exposées aux UV-B pendant 15 mn, les astrocytes traitées par l'extrait PE (50µg) et enfin les cellules à la fois traitées par PE et irradiées. Les analyses différentielles sur le logiciel *Progenesis* seront établis ultérieurement.

En se basant sur les effets protecteurs de l'extrait PE et de la calmoduline algair sur la survie des astrocytes et contre les effets délétères du stress oxydant par UV-B, nous proposons par la suite de vérifier si les effets protecteurs observés in vitro pourraient être retrouvés in vivo. Nous envisageons de tester l'effet de différentes doses de PE sur des modèles murins.

En parallèle, différentes doses de rayonnements UV-B peuvent être appliquées à ces animaux et ce dans le but d'évaluer la capacité de PE en premier lieu puis de la calmoduline, injectés par exemple par voie ICV, à contrecarrer et à réduire, les changements nocifs qu'on pourrait observer suite à l'exposition aux UV-B. Parmi ces changements on note principalement l'immunodépression, l'augmentation de l'hétérochromatine causant l'altération de l'ADN, une distension du réticulum endoplasmique rugueux, des perturbations mitochondriales et une augmentation du nombre de corps de myéline. Les changements morphologiques susceptibles d'être enregistrés, suggèreraient des processus apoptotiques et montrent que l'exposition de ces modèles expérimentaux de rats à des longueurs d'onde allant de 254 à 312 nm (UVB) peut produire des altérations susceptibles d'avoir un impact négatif sur le bon fonctionnement cellulaire.(De Oliveira Miguel N. C. 2003)

A ce fait, nous pourrions mettre en place, chez ces mêmes modèles murins, des tests comportementaux tels que les tests d'attention, d'apprentissage et de mémorisation, les tests d'explorations, les tests de mesures d'activité locomotrice et les tests de douleur...

Sur le plan biochimique, nous pourrions entreprendre par le biais de dosages enzymatiques, l'effet de l'extrait ou de la protéine injectés sur l'activité des enzymes anti-oxydantes à savoir la SOD, la catalase et la GPx, sur le taux du glutathion, et sur le taux des marqueurs du stress tel que le H₂O₂ et le calcium. Enfin nous proposons de doser les produits de la peroxydation lipidique tel que le MDA et les protéines carbonylées plasmatique et/ou tissulaire.

A terme, ces travaux de thèse visent à améliorer notre compréhension de l'effet bénéfique exercé par l'extrait protéique d'*ulva rigida* dans le processus de la protection cellulaire, et ce dans le but de réduire le stress oxydatif responsable de différents désordres et maladies mortels.

L'ensemble de ces résultats fournit une source précieuse de protection qui ouvrira la voie au développement de nouvelles approches thérapeutiques.

Références Bibliographiques

A

- Aebi H.** 1984. [13] Catalase in vitro. *Methods in enzymology* 105:121-126.
- Afiyanti M. CHJ.** 2014. Catalase activity is modulated by calcium and calmodulin in detached mature leaves of sweet potato. *Journal of plant physiology* 171:35-47.
- Agarwal A. SRA, Bedaiwy M.A.** 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and sterility* 79:829-843.
- Alberdi E. S-GOM, Matute** 2005. Calcium and glial cell death. *Cell Calcium* 38:417–425.
- Alizé I.** 2016. protéomique.
- Arrigo A.P.** 2005. Chaperons moléculaires et repliement des protéines : l'exemple de certaines protéines de choc thermique ». *M/S : médecine sciences* 21:619-625.
- Arakawa T. TSN.** 1984. Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding. *Biochemistry* 23:5912-5923.
- Arakawa T. KY, Timasheff S.N.,** 2007. Protein precipitation and denaturation by dimethyl sulfoxide. *Biophysical Chemistry* 131:62-70.
- Arnal M. LJP.** 2016. Protéines du choc thermique inductibles dans l'épithélium intestinal : propriétés protectrices et modulation par le microbiote et des facteurs alimentaires. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 51:186-194.
- Ashpole N.M. SW, Brustovetsky T., Engleman E.A., Brustovetsky N., Cummins T.R., Hudmon A. , .** 2012. Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II (CaMKII) Inhibition Induces Neurotoxicity via Dysregulation of Glutamate/Calcium Signaling and Hyperexcitability. *Journal of Biological Chemistry* 287:8495-8506.
- Ashpole N.M. CaR, Martin M.P., Brustovetsky T., Brustovetsky N., Hudmon A.,.** 2013. Loss of Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Activity in Cortical Astrocytes Decreases Glutamate Uptake and Induces Neurotoxic Release of ATP. *Journal of Biological Chemistry* 288:14599-14611.
- Aslam S. BS, Bhattacharya A.** 2012. The Calmodulin-like Calcium Binding Protein EhCaBP3 of *Entamoeba histolytica* Regulates Phagocytosis and Is Involved in Actin Dynamics. *PLoS Pathogen* 8.
- Assefa Z, Van Laethem A, Garmyn M, Agostinis P.** 2005. Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes: On the role of cytosolic factors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1755:90-106.
- Atmani D. BM, Ruiz-Sanz J.I., Bakkali F., Atmani D.** 2011. Antioxidant potential, cytotoxic activity and phenolic content of *Clematis flammula* leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* 5:589-598.

B

- Baillet A, V. Chantepedrix, Et Al.** 2010. The role of oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease. . *Neurochem Res* 35:1530-7.
- Balaban RS, Nemoto, S. And Finkel, T.** 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120:483-495.

- Barat E.** 2013. Etude des interactions entre neurones et astrocytes au sein de la substance noire réticulée [neurobiology]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00906952>. 187 p.
- Barouki R.** 2006. Oxydants /Antioxydants : Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/Sciences* 22 :266-72.
- Baudin B.** 2011. Proteomic and mass spectrometry. *Revue Francophone des Laboratoires* 2011:31-40.
- Behl C.** DJBEA. 1994. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77:817-27.
- Bentaib A.** DTP, Chneiweiss H., Hermans E., Junier M.P., Leprince P. 2015. Metabolic reprogramming in transformed mouse cortical astrocytes: A proteomic study. *Journal of Proteomics* 113:292-314.
- Berchtold M.W.** VA. 2014. The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1843:398-435.
- Bhattacharjee S.** 2009. Involvement of calcium and calmodulin in oxidative and temperature stress of *Amaranthus lividus* L. during early germination.
- Biochimej.** 2016a. La protéomique.
- Biochimej.** 2016b. Le complexe calcium/calmoduline et l'activation des protéines.
- Biochimej.** 2016c. Le complexe calcium/calmoduline et l'activation des protéines.
- Biochimej.** 2016d. Rôles des protéines LEA et des protéines de choc thermique (HSP).
- Biofuels BF.** 2015. Catalogue of algae species with high growth rates and energy potentiel.
- Botany.** 2001. *Algae: Native Ulva Rigida* C Agardh 1823 : University of Hawaii at Manoa.
- Brack M.** 2011. Stress Oxydatif.
- Bravo L.** 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Research* 56:317–33.
- Brosson D.** 2006. Analyse protéomique et caractérisation de nouvelles protéines de paroi chez *Encephalitozoon cuniculi*, une microsporidie pathogène de l'homme : Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.
- Brown DR,** Mohn CM. 1999. Astrocytic glutamate uptake and prion protein expression. *Glia* 25:282-292.
- Bruley C.** 2010. Les outils de la bio-informatique pour la protéomique à grande échelle : enjeux et défis. *Gen2Bio* Saint-Malo.
- Burke E.** GS, And Kendall G. . 2002. A survey and analysis of diversity measures in genetic programming. . New York: Morgan Kaufmann. 716-723 p.
- Butterfield D.A.** PM, Reed T.,Muharib T., Hughes C.P., Robinson R.A., Sultana R. 2012. Redox proteomics in selected neurodegenerative disorders: from its infancy to future applications. *Antioxid Redox Signal* 17:1610–1655.

C

- Cabioc'h J.** FJY, Le Toquin A., Boudouresque C.F., Meinesz A., Verlaque M. . 1992. Guide des algues des mers d'Europe : Manche/Atlantique. 1:272.

- Cabrita M.T. VC**, Rauter A.P. . 2010. Halogenated Compounds from Marine Algae. . *Mar Drugs* 8:2301-2317.
- Casabianca M.L. BN**, Serrano O., Sfriso A. 2002. Growth rate of *Ulva rigida* in different mediterranean eutrophicated sites *Bioresource Technology* 82:27-31.
- Castel H. DM**, Chatenet D., Leprince J., Desrues L., Schouft M.T., Fontaine M., Dubessy C., Lihrmann I., Scalbert E. 2006. Biochemical and functional characterization of high-affinity urotensin II receptors in rat cortical astrocytes. *Journal of neurochemistry* 99:582-595.
- Celikler S**, Yildiz, G., Vatan, O., Bilaloglu, . 2008. In vitro antigenotoxicity of *Ulva rigida* C. Agardh (Chlorophyceae) extract against induction of chromosome aberration, sister chromatid exchange and micronuclei by mutagenic agent MMC. . *RBiomed Env Sci* 21:492–498.
- Celikler S. TS**, Vatan O., Ziyank-Ayvalik S., Yildiz G., Bilaloglu R. 2009. Anti-hyperglycemic and antigenotoxic potential of *Ulva rigida* ethanolic extract in the experimental diabetes mellitus. *Food and Chemical Toxicology* 47:1837–1840.
- Chance B. SH**, Boveris A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews* 59:527-605.
- Chang B. S. FNL**. 1995. Development of an Efficient Single-Step Freeze-Drying Cycle for Protein Formulations. *Pharmaceutical Research* 12:831-837.
- Chan J. C. CPC**, Ang P.O. 1997. Comparative Studies on the Effect of Three Drying Methods on the Nutritional Composition of Seaweed *Sargassum hemiphyllum* (Turn.) C. Ag. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:3056-3059.
- Chen Y. CPH**, Swanson R. 2001. Astrocytes overexpressing Cu, Zn superoxide dismutase have increased resistance to oxidative injury. *Glia* 33:343-347.
- Cheung WY**. 1970. Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 38:533–538
- Cheval C. AD**, Galaud J. P., Ranty B. 2013. Calcium/calmodulin-mediated regulation of plant immunity. *Biochimica et Biophysica Acta Journal* 1833:1766–1771.
- Chin DEA**. 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends in Cell Biology* 10:322 - 328
- Chirapart PR-aaA**. 2006. Nutritional evaluation of tropical green seaweeds *Caulerpa lentillifera* and *Ulva reticulata*. . *Kasetsart Journal: Natural Sciences* 40:75–83.
- Cho S.C. CYY**, Kao C.H., . 2012. Calcium deficiency increases Cd toxicity and Ca is required for heat-shock induced Cd tolerance in rice seedlings *J Plant Physiol* 169:892–898.
- Chouikhi A**. 2013. Potential applications of marine seaweeds and pharmacological activities of their metabolites: A review. *International Congress of the Populations & Animal Communities*:40.
- Chowdhury M.T.H. BI**, Kang J.Y., Park Nam G., Ahn D.H., Hong Y.K. 2011. Distribution of Phlorotannins in the Brown Alga *Ecklonia cava* and Comparison of Pretreatments for Extraction. *Fisheries and aquatic sciences* 14:198-204.

Christie A.O. ELV. 1962. Periodicity in liberation of Gametes and zoospores of *Enteromorpha Intestinalis* Link. Nature 193:193-194.

D

Dantas A. DA, Ikeh M., Kos I., Achan B., Quinn J. 2015. Oxidative Stress Responses in the Human Fungal Pathogen, *Candida albicans*. *Biomolecules* 5:142.

David J.C. GJF. 2011. Les protéines de stress. *INRA Prod Anim* 14:29-40.

Dawson R. A. NSM. 1992. Mitogenic role for extracellular calmodulin-like activity in normal human umbilical vein endothelial cells. *British Journal of Haematology* 82:151-160.

Decraene D. VLA, Agostinis P., De Peuter L., Degreef H., Bouillon R., Garmyn M. 2004. AKT status controls susceptibility of malignant keratinocytes to the early-activated and UVB-induced apoptotic pathway. *Journal of investigative dermatology* 123:207-212.

Démarchez M. 2012. peroxydation lipidique/peroxydation des lipides. In: AHUNTSIC S, editor. *Biologie de la peau*.

De Oliveira Miguel N. C. M-RVB, Allodi S. 2003. A structural study of the retinal photoreceptor, plexiform and ganglion cell layers following exposure to UV-B and UV-C radiation in the albino rat. *Micron* 34:395-404.

D'errico M. LT, Calcagnile Angelo, Santis Luca Proietti De, Dogliotti Eugenia. 2007. Cell type and DNA damage specific response of human skin cells to environmental agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 614:37-47.

Desbordes F. La SuperOxyde Dismutase.

Descartes UP. 2016. Spectrométrie de Masse: introduction à l'instrumentation utile en analyse protéomique.

Desport J.C. CP. 2002. Stress oxydant et maladies neurodégénératives *NUTRITION CLINIQUE ET MÉTABOLISME* 16:253-259.

Didur O. 2007. Étude de voies de signalisation apoptotiques suite à divers stress dans les cellules Neuro 2A Université du Québec

Diler I. TA, Guroy D., Guroy K. B., Soyuturk M. 2007. Effects of *Ulva rigida* on the Growth, Feed Intake and Body Composition of Common Carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Biological Sciences* 7:305-308.

Domínguez M. J. GF, León R., Vilchez C., Vega J. M., Vigarà J. 2003. Cadmium increases the activity levels of glutamate dehydrogenase and cysteine synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry* 41:828-832.

Dominguez R, Holmes KC. 2011. Actin Structure and Function. *Annual Review of Biophysics* 40:169-186.

Dominguez R. HKC. 2011. Actin structure and function. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 40:169-86.

Douiri S. BS, Hamdi Y., Cubi R., Basille M., Fournier A., Vaudry H., Tonon M.C. ,Amri M., Vaudry D., Masmoudi-Kouki O. 2016. Involvement of endogenous antioxidant systems in the protective activity of pituitary adenylate

cyclase-activating polypeptide against hydrogen peroxide-induced oxidative damages in cultured rat astrocytes. *Journal of neurochemistry* 137:913-930.

Draper H. HM. 1990. [43] Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Methods in enzymology* 186:421-431.

E

Elias R. J. KS, Decker E. A. 2008. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48:430-441.

Elkharaz J. U-KA, Constantin-Teodosiu D. , Lawler K. , Mayer R. J., Billett E., Lowe J. , Bedford L. 2013. Implications for oxidative stress and astrocytes following 26S proteasomal depletion in mouse forebrain neurones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1832:1930-1938.

Emerit J, M. Edeas, Et Al. . 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother* 58:39-46.

Escartin C. 2009. Caractérisation phénotypique et fonctionnelle de l'activation astrocytaire induite par transfert lentiviral du CNTF in vivo: Implications pour la survie neuronale. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00433114>: UNIVERSITE PARIS VI - PIERRE ET MARIE CURIE. 257 p.

Estaquier J. VF, Et Al. . 2012. The mitochondrial pathways of apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 942: 157-83.

F

Facility GBI. 2013. Map of *Ulva Rigida*.

Faller H. 2011. Les applications et la toxicité des algues marines :132.

Farasat MK-N, R. A. Nabavi, S. M. Namjooyan, F. 2014. Antioxidant Activity, Total Phenolics and Flavonoid Contents of some Edible Green Seaweeds from Northern Coasts of the Persian Gulf. *Iran J Pharm Res* 13:163-70.

Favier A. 2003. Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique *L'actualité chimique* 270:108-115.

Fedorov S. N. ESP, Zvyagintseva T. N., Stonik A. V. 2013. Anticancer and Cancer Preventive Properties of Marine Polysaccharides: Some Results and Prospects. *Marine Drugs* 11:4876-4901.

Ferrero-Gutierrez A. P-GA, Novelli A. And Fernandez-Sanchez. 2008. Inhibition of protein phosphatases impairs the ability of astrocytes to detoxify hydrogen peroxide. *Free Radical Biology & Medicine - Journal* 44:1806–1816.

Fleurence F. KR. 1999. Les algues marines: une source méconnue de protéines végétales. *Equinoxe* 56:7-12.

Fleurence J. LCC, Mabeau S., Maurice M., Landrein A. 1995. Comparison of different extractive procedures for proteins from the edible seaweeds *Ulva rigida* and *Ulva rotundata*. *Journal of Applied Phycology* 7:577-582.

- Fleurence J.** 1999. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. . Trends in Food Science & Technology 10:25–28.
- Fleurence J.** 2010. Les algues sont une source de protéines intéressantes. In: A. P, editor. <http://www.lanutrition.fr/>.
- Floc'h J. Y. LV.** 2010. Les secrets des algues. :168.
- Francois J. A. KV, Jez J. M. .** 2006. Structural basis for interaction of O-acetylserine sulphydrylase and serine acetyltransferase in the Arabidopsis cysteine synthase complex. Plant Cell 18:3647-55.
- Fridovich I.** 1995. Superoxide Anion Radical ($O_2^{\bullet-}$), Superoxide Dismutases, and Related Matters. the journal of biological chemistry 272:18515-18517.
- Funahashi H. IT, Mase T., Sekita M., Yokoi K., Hayashi H., Shibata A., Hayashi T., Nishikawa M., Suda N., Hibi Y., Mizuno Y., Tsukamura K., Hayakawa A., Tanuma S., .** 2001. Seaweed prevents breast cancer? Journal of Cancer Research 92:483-487.

G

- Gardes Albert M.** 2004. De la physico-chimie à radiobiologie les radicaux libres. Les nouvelles orientations en radiobiologie et radiopathologie ed.
- Gardes Albert M.** 2006. Physico-chemical aspects of reactive oxygen species Ann Pharm Fr 64:365-72.
- Garon-Ladiere S.** 2004. Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales). :332.
- Giaume C. MaD.** 1996. Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. Trends Neurosci 19:319-25.
- Gill S.S. TN.** 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48:909-930.
- Gilgun-Sherki Y. MEEA.** 2001. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. Neuropharmacology 40:959-75.
- Godard M. DK, Ventura E., Soteras G. , Baccou J.C, Cristol J.P. , Rouanet J.M. .** 2009. Polysaccharides from the green alga *Ulva rigida* improve the antioxidant status and prevent fatty streak lesions in the high cholesterol fed hamster, an animal model of nutritionally-induced atherosclerosis. Food Chemistry 115:176–180.
- Goudable J. FA.** 1997. Oxidative free radicals and antioxidants. Nutrition Clinique et Métabolisme 11:115–120.
- Greiner A, & Wendorf, J. H. , .** 2007. Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. Angewandte Chemie International Edition 46:5670–5703.
- Guerrero S. CJ.** 2012. Integrated Multi-trophic Aquaculture (IMTA): A sustainable, pioneering alternative for marine cultures in Galicia. : Regional Government of Galicia (Spain).

H

- H'Adler D.P.** KHD, Smith R. C., Worrest R. C. 2007. Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochemical & Photobiological Sciences* 6:267–285.
- Haleng J.** PJ, Defraigne J.O., Charlier C., Chapelle J.P. 2007. Le stress oxydant. *Rev Med Liege* 62:628-638.
- Hamdi-Damak Y.** 2013. Contribution à l'étude des mécanismes moléculaires de la maladie d'Alzheimer: implication des endozépinines dans la modulation des interactions neuro-astrocytaires, UNIVERSITE TUNIS EL MANAR FACULTE DES SCIENCES DE TUNIS. Doctorat en Sciences Biologiques: 141.
- Hamdi Y.** MO, Kaddour H. , Belhaj F. , Gandolfo P. , Vaudry D. , Mokni M. , Leprince J. , Hachem R. , Vadry H. , Tonon Mc. , Amri M. . 2011. Protective effect of octaneuropeptide on hydrogen peroxide induced oxidative stress and cell death in cultured rat astrocytes. *JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY* 118 :416–428.
- Hamdi Y.** KH, Vaudry D. , Douiri S., Bahdoudi S., Leprince J. , Castel H., Amri M. , Vaudry H. , Tonon Mc. , Masmoudi-Kouki O., 2012. The stimulatory effect of the octadecaneuropeptide ODN on astroglial antioxidant enzyme systems is mediated through a GPCR. *Frontiers in Endocrinology* 3:138.
- Hamdi Y.** KH, Vaudry D. , Leprince J. , Zarrouk A. , Hammami M. , Vadry H. , Tonon Mc. , Amri M. , Masmoudi-Kouki O. . 2015. Octadecaneuropeptide ODN prevents hydrogen peroxide-induced oxidative damage of biomolecules in cultured rat astrocytes. *Peptides* 71:56-65.
- Hamed I.** OF, Ozogul Y., M. Regenstein J. 2014. Marine Bioactive Compounds and Their Health Benefits: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14:446-465.
- Haradaa E.** CYE, Tsuchisakab A., Obatab H., Sanoa H., 2001. Transgenic tobacco plants expressing a rice cysteine synthase gene are tolerant to toxic levels of cadmium. *Journal of Plant Physiology* 158:655–661.
- Harper M.K.** BTS, Copp B.R., James R.D., Lindsay B.S., Richardson A.D., Schnabel P.C., Tasdemir D., Vanwagoner R.M., Verbitski Sm M. . 2001. Introduction to the chemical ecology of marine natural products. *Marine Chemistry Ecology*: 3-69.
- Henningson M.** JU, Borg A. , Olsson H. And Jernstro M H. 2007. CYP17 genotype is associated with short menstrual cycles, early oral contraceptive use and BRCA mutation status in young healthy women. *Molecular Human Reproduction* 13:231–236.
- Henseleit U.** ZJ, Wanner R., Haase I., Kolde G., Rosenbach T. 1997. Role of p53 in UVB-induced apoptosis in human HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1997 Dec;109(6):722-7 109:722-7.
- Hsu B.** CIM, Ng K. 2006. Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm, *Hyphaene thebaica*. *Food Chemistry* 98:317-328.

I

- Ilknur Ak • Cenk O' Z. YO,** Zu Dog Ru • Tolgo K., 2015. Effect of sodium acetate and sodium nitrate on biochemical composition of green algae *Ulva rigida*. *Aquaculture International* 23:1–11.
- Indergaard M.** MJ. 1991. *Animal and human nutrition.* : John Wiley & Sons, Chichester. 21-64 p.
- Innovante LDEM.** 2012. ALGORAFFINERIE.
- Inserm.** 2013. Protéomique.

İrkin C. L. EH. 2014. Chemical composition of *Ulva rigida* C. Agardh from the Çanakkale Strait (Dardanelles), Turkey. *J Black Sea/Mediterranean Environment* 20:114-121

Ivanova V. SM, Petrova D. . 2013. FATTY ACID COMPOSITION OF BLACK SEA ULVA RIGIDA AND CYSTOSEIRA CRINITA. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 19:42–47.

J

Jacobson M. D. RMC. 1995. Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature* 374:814-6.

Jaspard E. MD, Hunault G. 2012. Computational and statistical analyses of amino acid usage and physico-chemical properties of the twelve late embryogenesis abundant protein classes. *PLoS One* 7:e36968.

Je. K. 1989. Seafoods and fish oils in human health and diseases. *Int J Cardiol* 22:409–11.

Jing L. HMT, Chang Y., Mehta S.L., He Q.P., Zhang J.Z., Li P.L. 2015. Coenzyme Q10 Protects Astrocytes from ROS-Induced Damage through Inhibition of Mitochondria-Mediated Cell Death Pathway. *Int J Biol Sci* 11:59-66.

Johnson T. M. YZXE. 1996. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11848-52.

José M. L. RC, Jon A. A. , Jesús L. 2007. Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *International Immunopharmacology* 7:879–888.

K

Karray R. HM, Sayadi S. . 2015. Evaluation of ultrasonic, acid, thermo-alkaline and enzymatic pre-treatments on anaerobic digestion of *Ulva rigida* for biogas production. *Bioresource Technology* 187:205–213.

Kasper J.C. WG, Friess W. 2013. Recent advances and further challenges in lyophilization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 85 :162–169.

Kendel M. W-CG, Bertrand S., Roussakis C. , Bourgougnon N. , Bedoux G. , . 2015. Lipid Composition, Fatty Acids and Sterols in the Seaweeds *Ulva armoricana*, and *Solieria chordalis* from Brittany (France): An Analysis from Nutritional, Chemotaxonomic, and Antiproliferative Activity Perspectives. *Mar Drugs* 13:5606–5628.

Kerr Rg BB. 1991. Marine Sterols. *Nat Prod Rep* 8:465-497.

Kettenmann H. VA. 2011. Neuroglia - Living Nerve Glue. *Fortschritte der Neurologie und Psychiatrie* 79:588-597.

Kim M. JDJ, Giraud T.J.,. 1996. Seasonal variations of triacylglycerols and fatty acids in *Fucus serratus*. *Phytochemistry Reviews* 43:49–55.

K.J. Davies, O. s. (2000). "antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems." *IUBMB Life* 50: 279–289.

Korać RR, Khambholja KM. 2011. Potential of herbs in skin protection from ultraviolet radiation. *Pharmacognosy Reviews* 5:164-173.

Kraus P.R. NCB, Heitman J. . 2005. Calcium- and calcineurin-independent roles for calmodulin in *Cryptococcus neoformans* morphogenesis and high-temperature growth. *Eukaryot Cell* 4:1079–1087.

Kumar S. SN, Fonseca F. V., Hou Y. And Black S. M. . 2010. Shear stress stimulates nitric oxide signaling in pulmonary arterial endothelial cells via a reduction in catalase activity: role of protein kinase C *Lung Cellular and Molecular Physiology* journal 298,: 105–116.

Kunikowska G. 2002. The distribution of copper, zinc- and manganese-superoxide dismutase, and glutathione peroxidase messenger ribonucleic acid in rat basal ganglia. *Biochem Pharmacol* 63:1159-64.

L

Lahaye M. RB, Baumberg S., Qumener B., Axelos M. 1995. Natural Decoloration, ComDosition and Increase in Dietary Fibre & tent of an Edible Marine Algae, *UZva rigida* (Chlorophyta), Grown under Different Nitrogen Conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 68:99-104.

Lahaye M. RB, Baumberg S., Qumener B., Axelos M. 1996. Chemical characterisation and gelling properties of cell wall polysaccharides from species of *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta). *HYDROBIOLOGIA* 326/327:473-480.

Lami R., Orignac J. Fiche de *Ulva rigida*. : Université virtuelle environnement et developpement durable.

Laplace C. TM, Peltre M.C., Lambert E., Rodriguez S., Vergon J.P. . 2015. Guide pratique de détermination des algues macroscopiques d'eau douce et de quelques organismes hétérotrophes.

Laterra J. GC, Goldstein G.W. 1990. Astrocytes induce neural microvascular endothelial cells to form capillary-like structures in vitro. . *J Cell Physiol* 144:204–215.

Leach J.K. VTG, Lin P.S. , Schmidt-Ullrich R., Mikkelsen R.B.,. 2001. Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen . *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 61: 3894–3901.

Lee C.H. WS-B, Hong Chien-Hui, Yu Hsin-Su, Wei Yau-Huei. 2013. Molecular Mechanisms of UV-Induced Apoptosis and Its Effects on Skin Residential Cells: The Implication in UV-Based Phototherapy. *International Journal of Molecular Sciences* 14:6414-6435.

Lee H.M. GR, Kim S.H., Wang Y., Rakwal R., Agrawal G.K., Kim S.T. 2015. Abundant storage protein depletion from tuber proteins using ethanol precipitation method: Suitability to proteomics study. *PROTEOMICS* 15:1765-1769.

Lee K. Y. JL, Kang Y. O., Lee S. J., Park W. H. . 2009. Electrospinning of polysaccharides for regenerative medicine. . *Advanced Drug Delivery Reviews* 61:1020–1032.

Leiro J. M. CR, Arranz J. A., Lamas J. 2007. Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *International Immunopharmacology* 7:879-888.

Le Goff T. RA. Biodiversité des algues marines et de la faune marine des côtes françaises: Manche et Atlantique. : Marevita.

Li S. JZ, Li X. , Geng X. , Sun J. 2014. Calmodulin is a stress and immune response gene in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Fish & shellfish immunology* 40:120-128.

- Lithgow JK**, Hayhurst EJ, Cohen G, Aharonowitz Y, Foster SJ. 2004. Role of a Cysteine Synthase in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 186:1579-1590.
- Liu H.T.** LB, Shang Z.L. , Li X.Z. , Mu R.L., Sun D.Y., Zhou R.G. 2003. Calmodulin is involved in heat shock signal transduction in wheat. *Plant Physiol* 132:1186–1195.
- Liu L.** YH, Denton K., Li X.J., Mccullough L., Li J.,. 2016. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase β is neuroprotective in stroke in aged mice. *European Journal of Neuroscience* 44:2139-2146.
- Lotharius, J.**, et al. (2005). "Progressive degeneration of human mesencephalic neuron-derived cells triggered by dopamine-dependent oxidative stress is dependent on the mixed-lineage kinase pathway." *Journal of Neuroscience* **25**(27): 6329-6342.
- Lu K.P.** RCD, May G.S., Means A.R. 1992. Cooperative regulation of cell proliferation by calcium and calmodulin in *Aspergillus nidulans*. *Mol Endocrinol* 6:365–374.
- Lu, M.**, et al. (2008). "Hydrogen sulfide protects astrocytes against H₂O₂-induced neural injury via enhancing glutamate uptake." *Free Radical Biology and Medicine* **45**(12): 1705-1713.
- Luning K.** KP, Pang S. 2008. Control of reproductive rhythmicity by environmental and endogenous signals in *Ulva pseudocurvata*. *Journal of Applied Phycology* 44:886-873.
- Luo D.** RTA. 2003. The regulation of catalase gene expression in mouse muscle cells is dependent on the CCAAT-binding factor NF-Y. *Biochem Biophys Res Commun* 303:609-18.
- Lüscher JM.** 2014. Effects of UV-B radiation on grapevine (*Vitis vinifera* cv. Tempranillo) leaf physiology and berry composition, framed within the climate change scenario (water deficit, elevated CO₂ and elevated temperature). <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01153596>. 287 p.
- Lu Y.** OGA. 2009. Green Algae as a Platform to Express Therapeutic Proteins. *Discovery Medicine* 8:28-30.

M

- Mabeau S.** CE, Fleurence J., Lahaye M. 1992. New seaweed based ingredients for the food industry. *International food ingredients* 3:38-45.
- Macartain P.** CG, Brooks M., Campbell R., Rowland I. 2007. Nutritional value of edible seaweeds. *Nutrition Review* 65:535–543.
- Madian A.G.** D-MN, Gao Q., Regnier F.E. 2011. Oxidative stress induced carbonylation in human plasma. *Journal of Proteomics* 74:2395-2416.
- Mariania E.** PMC, Cherubinia A., Mecocci P. . 2005. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. *Journal of Chromatography B* 827: 65–75.
- Masmoudi-Kouki O.** DS, Hamdi Y., Kaddour H., Bahdoudi S., Vaudry D., Basille M., Leprince J., Fournier A., Vaudry H. 2011. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects astroglial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Journal of Neurochemistry* 117:403-411.
- Mates J. M.** P-GC, Et Al. . 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. . *Clin Biochem* 32:595-603.
- Means A.R.** RCD. 1988. Calcium, calmodulin and cell proliferation. *Cell Calcium* 9:313–319.

- Medeiros J MM**, Constancia J, Loduca J, Cunningham G, Et Al. . 1999. Potential anticancer activity for plants and marine organisms collected in the Azores. . Açoreana 9:55-61.
- Mediterraneo AM**. 2015. *Ulva rigida*.
- Messyasz B**. RA. 2010. Abiotic factors affecting the development of *Ulva* sp. (Ulvophyceae, Chlorophyta) in freshwater ecosystems. . Aquatic Ecology Jobs 45:75-87.
- Mezghani S**. N' Guessan P., Carrier A. , Amri M. 2015. The ethanol precipitate of *ulva rigida* protects HeLa cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis. Journal of Food Biochemistry:1745-4514.
- Mezghani S**. Bourguiba I., Hfaïdh I. , Amri M. . 2013. Antioxidant Potential of *Ulva rigida* Extracts: Protection of HeLa Cells Against H₂O₂ Cytotoxicity. The Biological Bulletin 225:1-7.
- Mezghani S**. Hamami A., Amri M. 2015. Low- level laser therapy: effects on human face aged skin and cell viability of HeLa cells exposed to UV radiation Arch Biol Sci, 67:25-29.
- Michel C**. BC, Lahaye M. 1999. Les oligosides algaux comme aliments fonctionnels : étude in vitro de leurs effets cellulaires et fermentaires. . Sciences des Aliments 19:311-32.
- Misra H.P**. FI. 1971. The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. Journal of Biological Chemistry 246:6886-6890.
- Mlouka M**. 2014. Caractérisation du système BAC impliqué dans la formation de biofilms chez *Pseudomonas aerugi*: université de rouen.
- Molofsky A**. V. KR, Ullian E., Hui-Hsin T., Deneen B., Richardson W., Barres B., Rowitch D. 2012. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. Genes and development 26:891–907.

N

- Noji M**. SM, Nakamura M., Aono M., Saji H., Saito K. 2001. Cysteine synthase overexpression in tobacco confers tolerance to sulfur-containing environmental pollutants. Plant Physiol 126:973-80.
- Norziah M.H**. CC. 2000. Nutritional composition of edible seaweed *Gracilaria changgi*. . Food Chemistry 68:69–76.

O

- Okada H**. UM. 2009. Catalase gene of the yeast *Candida tropicalis*. Sequence analysis and comparison with peroxisomal and cytosolic catalases from other sources. Eur J Biochem 170:105-10.
- Okuda M**. UY, Tatsumi N. 2003. A New Method of Purifying Fibrinogen with Both Biological and Immunological Activity from Human Plasma. Preparative Biochemistry and Biotechnology 33:239-252.

P

- Pádraigín A**. Harnedy RJF. 2011. BIOACTIVE PROTEINS, PEPTIDES, AND AMINO ACIDS FROM MACROALGAE. journal of phycology 47:218–232.

- Padua M.** GPS, Mathias L.A. . 2004. Chemical composition of *Ulvaria oxysperma* (Kützling) Bliding, *Ulva lactuca* (Linnaeus) and *Ulva fasciata* (Delile). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 47:49-55.
- Peasuraa N.** LN, Kerdchoechuena O., Wanlapaba S. 2015. Characteristics and antioxidant of *Ulva intestinalis* sulphated polysaccharides extracted with different solvents. *International Journal of Biological Macromolecules* 81:912–919.
- Peihar M,** Ball LE, Sharma DR, Harlan BA, Comte-Walters S, Neely BA, Vargas MR. 2016. Changes in Protein Expression and Lysine Acetylation Induced by Decreased Glutathione Levels in Astrocytes. *Molecular & Cellular Proteomics* 15:493-505.
- Pérez-Sánchez A.** B-CE, Caturla N., Castillo J. , Benavente-García O. , Alcaraz M. , Micol V. 2014. Protective effects of citrus and rosemary extracts on UV-induced damage in skin cell model and human volunteers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 136 :12–18.
- Perez R.** 1997. Ces algues qui nous entourent: conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisations, culture. : 272.
- Pescheck F.** BK, And Bilger W. 2010. Screening of ultraviolet A and ultraviolet B radiation in marine green macroalgae (chlorophyta). *J Phycol* 46: 444–455.
- Pettett P.** 2009. Preliminary investigation into the induction of reproduction in *ulva* spp. in southeast Queensland for mass cultivation purposes. In: *Coast FosUotS*, editor. p 71.
- Pezoa-Conte R.** LA, Anugwomc I. , Von S., Paranko J., P.Maki-Arvela, Willfor S., M. Muszynski, J. Nowicki , Lienqueo M.E., Mikkola J.-P.,. 2015. Deconstruction of the green alga *Ulva rigida* in ionic liquids: Closing the mass balance. *Algal Research* 12: 262–273.
- Picardie UD.** 2016. plateforme d'ingenierie cellulaire et analyses des proteines.
- Pincemail J.** DJO. 2004. Les antioxydants : un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène. Symposium « Antioxydants et alimentation » ▪ Institut Danone ▪ ed.
- Pittz E.P.** BJ. 1971. Studies on bovine pancreatic ribonuclease A and model compounds in aqueous 2-methyl-2,4-pentanediol. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 146:513-524
- Plaza M.,** et al. (2008). "In the search of new functional food ingredients from algae." *Trends in Food Science & Technology* 19(1): 31-39.
- Popov S. S.** MNL, Konaklieva M. I., Panayotova M. I., Diwtrova-Konaklieva S. 1985. STEROLS FROM SOME BLACK SEA ULVACEAE. *Phytochmisrry* 24:1987-1990.
- Poulet P.** CS, Barillot E. 2007. myProMS, a web server for management and validation of mass spectrometry-based proteomic data. *PROTEOMICS* 7:2553-2556.
- Promeyrat A.** DJD, Gatellier J.D. 2013. Kinetics of protein physicochemical changes induced by heating in meat using mimetic models: Relative effects of heat and oxidants. *Food Chemistry* 138: 581–589.

R

- Rausch T. WA.** 2005. Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends Plant Sci* 10:503-9.
- Raven P. H.** ERF, Eichhorn S. E., Evrardt C. . 2007. *Biologie végétale.* :725.
- Ray B. LM.** 1995. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (Ulvales, Chlorophyta). Extraction and chemical composition *Carbohydrate Research* 274:251-261.
- Re D.B.** NI . 2005. Cerebral oxidative stress: are astrocytes vulnerable to low intracellular glutamate concentrations. Consequences for neuronal viability. *Ann Fr Anesth Reanim* 24:502-9.
- Ré D.B.** NI, Nieoullon A., Le Goff L.K., Had-Aissouni L. 2005. Cerebral oxidative stress: are astrocytes vulnerable to low intracellular glutamate concentrations? Consequences for neuronal viability. *Annales Francaises D'anesthesie et de Reanimation* 24:502-509.
- Reichow S.L.** CDM, Freitas J.A., Nemeth-Cahalan K.L., Heyden M., Tobias D.J., Hall J.E., Gonen T. 2013. Allosteric mechanism of water-channel gating by Ca(2+)-calmodulin. *Nature Structural & Molecular Biology* 20:1085-1092.
- Reinjenders M.** GaVR, M.C. Lam C. , A. Scaife M., A.P. Martins Dos Santos M., G. Smith A., J. Schaap P. 2014. Green genes: bioinformatics and systems-biology innovations drive algal biotechnology. *Trends in Biotechnology* 32.
- Resende R.**2008. "Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease." *Free Radical Biology and Medicine* 44 (12): 2051-2057.
- Richard M.J.,** Chalas J., Ceballos-Picot I., Vitoux D., Boyer M.J., Chaudière J., Favier A. 1997. Les glutathion peroxydases : intérêt de leur dosage en biologie clinique. *Annales de Biologie Clinique* 55.
- Röhrdanz E.** KR. 1998. Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine* 24:27-38.
- Romero I.** TJ, Romanha A. J., Steindel M., Grisard E. C. 2015. Upregulation of Cysteine Synthase and Cystathionine beta-Synthase Contributes to *Leishmania braziliensis* Survival under Oxidative Stress. *Antimicrob Agents Chemother* 59:4770-81.
- Ross AB,** Jones, J.M., Kubacki, M.L., Bridgeman, T. Bioresour. . 2008. Classification of macroalgae as fuel and its thermochemical behaviour. . *Technol* 99:6494–6504.
- Rouxel C.** BE, Danieli A., J'Erôme M., Etienne M., Fleureunce J. 2001. Identification by SDS PAGE of green seaweeds (*Ulva* and *Enteromorpha*) used in the food industry. *Journal of Applied Phycology* 13:215–219.
- Ruperez P.** AO, Leal J.A. . 2002. Potential antioxidant capacity of sulphated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:840–845.

S

- Safi C.** CM, Pignolet O., Silvestre F., Vaca-Garcia C., Pontalier P.Y. 2013. Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. *Journal of Applied Phycology* 25:523-529.

- Sakamoto R.** NS, Shiraki K. 2004. High Temperature Increases the Refolding Yield of Reduced Lysozyme: Implication for the Productive Process for Folding. *Biotechnology Progress* 20:1128-1133.
- Salbitani G.** 2010. Effects of sulphate-deficiency on cysteine metabolism in the green alga *Chlorella sorokiniana*: UNIVERSITY OF NAPLES. 98 p.
- Samaj J.** OM, Hlavacka A., Lecourieux F., Meskiene I., Lichtscheidl I., Lenart P. , Salaj J., Volkman D., Bögre L., Baluska F. , Hirt H., 2002. Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *EMBO J* 21:3296–3306.
- Samarakoon K.** JYJ. 2012. Bio-functionalities of proteins derived from marine algae — A review. *Food Research International* 48:948-960.
- Sangwan V.** OBL, Beyerly J. , Hirt H. , Dhindsa R.S., . 2002. Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *Plant J Cell Mol Biol* 31:629–638.
- Santhanam R.N.** RN, Jagathusan G. 1990. Coastal aquaculture in India. CBS Publishers and distributors:159-162.
- Sarmadi B. H.** IA. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides* 31:1949-1956.
- Satpati G.** PR. 2011. Biochemical composition and lipid characterization of marine green alga *Ulva rigida*- a nutritional approach. *Journal of Algal Biomass* 2:10-13.
- Scaloni A.** ZL. 2011. Redox Proteomics. *Journal of Proteomics* 74:2223-2227.
- Schuessel K.** SS, Bayer T. A., Czech C., Pradier L., Müller-Spahn F., Müller W.E., Eckert A. 2005. Impaired Cu/Zn-SOD activity contributes to increased oxidative damage in APP transgenic mice. *Neurobiology of disease* 18:89-99.
- Shalaby E.A.** 2011. Algae as promising organisms for environment and health. *Plant Signal Behavior* 6:1338-1350.
- Shao P.** CM, Pei Y., Sun P. 2013. In vitro antioxidant activities of different sulfated polysaccharides from chlorophytan seaweeds *Ulva fasciata*. *International Journal of Biological Macromolecules* 59 :295– 300.
- Shapira A.H.** 2012. Mitochondrial diseases. *Lancet* 379:1825-34.
- Sheih I.** WT, Fang T. 2009. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems *Bioresource Technology* 100:3419–3425
- Shen Q.** CFF, Newburger P.E. 1993. Sequences in the 3'-untranslated region of the human cellular glutathione peroxidase gene are necessary and sufficient for selenocysteine incorporation at the UGA codon. *Journal of Biological Chemistry* 268:11463-11469.
- Shi L.** DX, Zhou H., Tao C., Liu Y.,Meng F.,Wu G.,Xiong Y.,Xia C.,Wang Y.,Bi G., Zhou J.N. 2014. Cumulative effects of the ApoE genotype and gender on the synaptic proteome and oxidative stress in the mouse brain. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 17:1863-1879.
- Shiu C.** LT. 2005. Ultraviolet-B-induced oxidative stress and responses of the ascorbate–glutathione cycle in a marine macroalga *Ulva fasciata*. *Journal of Experimental Botany* 56: 2851–2865.

- Shuuluka D. B.**, Anderson J. 2013. Protein content, amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors of *Ulva rigida* and *Ulva capensis* from natural populations and *Ulva lactuca* from an aquaculture system, in South Africa. *J Apply Phycol* 25:677–685.
- Shyamala B.**, Gupta S, Lakshmi AJ, Prakash J. 2005. Leafy vegetable extracts—antioxidant activity and effect on storage stability of heated oils. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 6:239-245.
- Sila A.** BA. 2016. Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *Journal of Functional Foods* 21:10-26.
- Silva M.** VL, Almeida A.P., Kijjoa A. . 2013. The Marine Macroalgae of the Genus *Ulva*: Chemistry, Biological Activities and Potential Applications. *Oceanography* 1.
- Simard M.** NM. 2004. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* 129:877-896.
- Sirbu R.** SC, Ghergic D. L., Passy Mouima N. 2006. CARACTERISATION DE CERTAINS PRINCIPES ACTIFS DE *ULVA LACTUCA* ET *ULVA RIGIDA* –ALGUES VERTES DU LITTORAL ROUMAIN DE LA MERE NOIRE. Scientific study and research 2.
- Smithsonian Tropical Research Institute.** 2009. *Ulva rigida*(C. Agardh).
- Solecki DJ.**, Liu X, Tomoda T, Fang Y, Hatten ME. 2001. Activated Notch2 Signaling Inhibits Differentiation of Cerebellar Granule Neuron Precursors by Maintaining Proliferation. *Neuron* 31:557-568.
- Somjen G.** 1988 . *Nervenkitt*: notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia* 1:2-9.
- Spacesek J.** 1985. Relationships between synaptic junctions, puncta adhaerentia and the spine apparatus at neocortical axo-spinous synapses. A serial section study. *Anat Embryol (Berl)* 173:129-135.
- Staiger C.J.** SMB, Khurana P., Wang X., Mccurdy D.W., Blanchoin L. , . 2009. Actin filament dynamics are dominated by rapid growth and severing activity in the *Arabidopsis* cortical array. *J Cell Biol* 184:269–280.
- Stern J.** LW. 1957. Serum proteins in mongolism. *The British Journal of Psychiatry* 103:222-226.
- Stocker R FB. 1991. Endogenous antioxidant defences in human blood plasma. In : *Oxidative stress : oxidants and antioxidants*. . Academic Press:213- 43.
- Struzynska L.** BI, Walski M., Rafalowska U. 2001. Astroglial reaction during the early phase of acute lead toxicity in the adult rat brain. . *Toxicology* 165:121–131.
- Suarez-Jimenez G.M.** B-HA, Ezquerro-Brauer J.M. 2012. Bioactive Peptides and Depsipeptides with Anticancer Potential:Sources from Marine Animals. *Mar Drugs* 10:963-986.
- Sun G.H.** OV, Anraku Y.,. 1991. Half-calmodulin is sufficient for cell proliferation Expressions of N- and C-terminal halves of calmodulin in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 266:7008–7015.
- Swann G.** 2010. The skin is the body’s largest organ. *J Vis Commun Med* 33:148–149.

Swierenga S.H.H. WJF, Boynton A. L., Macmanus J.P., Rixon R. H., Sikorska M., Tsang B.K., Walker P.R. 1980. Regulation of proliferation of normal and neoplastic rat liver cells by calcium and cyclic AMP. *Annals of the New York Academy of Sciences* 349:294-311.

Swomley A. M. FS, Keeney J.T., Triplett J., Zhang Z., Sultana R., Butterfield D. . 2014. Abeta, oxidative stress in Alzheimer disease: Evidence based on proteomics studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1842:1248-1257.

T

Taboada C. MaR, Míguez I. 2009. Composition, nutritional aspects and effect on serum parameters of marine algae *Ulva rigida*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90:445–449.

Taboada M. C. MR, Miguez M. I. 2012. Nutritional value of the marine algae wakame (*Undaria pinnatifida*) and nori (*Porphyra purpurea*) as food supplements. *Journal of Applied Phycology* 25.

Takasawa R. NH, Mori T., Tanuma S. 2005. Differential apoptotic pathways in human keratinocyte HaCaT cells exposed to UVB and UVC. *Apoptosis* 10:1121-1130.

Takeda T. YM. 1987. Analysis and in vivo disruption of the gene coding for calmodulin in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:3580–3584.

Thompson V. S. SKD, Et Al 2003. Purification and characterization of a novel thermo-alkali-stable catalase from *Thermus brockianus*. *Biotechnol Prog* 19:1292-9.

Timperio A. M. EMG, Zolla L. 2008. Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). *Journal of Proteomics* 71:391-411.

Toskas G. HRD, Laourinea E., Cherifa C. , Smyrniotopoulos V. , Roussis V. . 2011. nanofibers based on polysaccharides from the green seaweed *Ulva Rigida* Georgios Toskasa. *Carbohydrate Polymers* :1093–1102.

Trigui M. GL, Zouari I., Tounsi S. 2013. Seasonal variation in phenolic composition, antibacterial and antioxidant activities of *Ulva rigida* (Chlorophyta) and assessment of antiacetylcholinesterase potential. *Journal of Applied Phycology* 25:319–328.

Tuney I CB, Unal D, Sukatar A 2006. Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (Azmir, Turkey). *Turk J Biol* 30:1–5.

Tuteja N. SSK. 2008. Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. *Plant Signal Behav* 3:525–536.

U

University A. 2012. Rôles des protéines LEA et des protéines de choc thermique (HSP).

V

Valente L.M.P. GA, Rema P., Matos J., Gomes E.F., Pinto I.S. 2006. Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 252:85–91.

Valko M, Leibfritz D.. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44-84.

Villarreal-Gomez L.J. S-MIE, Guerra-Rivas G., Ayala-Sanchez 2010. Antibacterial and anticancer activity of seaweeds and bacteria associated with their surface. . *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 45:267-275.

W

Wang D. BA. 2008. The Astrocyte Odyssey. *Prog Neurobiol* 86:342–367.

Wang J. MJH, Giffard R.G. 2005. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase decreases ischemia-like astrocyte injury. *Free Radical Biology and Medicine* 38:1112-1118.

Wang J. ZH, Huo Y., Feng C., Wang Y., Ma Q. 2015. Evaluation of actin cytoskeleton in non-host resistance of pepper to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* stress. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 15.

Wang W., Shoseyov O., Altman A. 2010. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci* 9:244–252.

Watanabe F. TS, Katsura H., Masumder S.A., Abe K., Tamura Y. 1999. Dried green and purple lavers (Nori) contain substantial amounts of biologically active vitamin B₁₂ but less of dietary iodine relative to other edible seaweeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:2341–2343.

Wichard T. 2015. Algal of the year 2015: The Sea Lettuce *Ulva* only gets into shape with the right bacteria. Website of the Phycology Section of the German Botanical Society: .

Wijesinghe W.A.J.P. JYJ. 2011. Biological activities and potential cosmeceutical applications of bioactive components from brown seaweeds: a review *Phytochemistry Reviews* 10:431-443.

Wikipedia. 2016a. actin.

Wikipedia. 2016b. Calmodulin.

Wikipedia. 2016c. HSP.

Wikipedia. 2016d. proteomique.

Wikipedia. 2016e. spectrométrie de masse.

Winberg PC, Ghosh D, Tapsell L. 2009. Seaweed culture in integrated multi-trophic aquaculture-nutritional benefits and systems for Australia.

Wirtz M. BO, Droux M. Hell R. 2001. The cysteine synthase complex from plants. *European Journal of Biochemistry* 268:686-693.

Wirtz M. HR. 2006. Functional analysis of the cysteine synthase protein complex from plants: Structural, biochemical and regulatory properties. *Journal of Plant Physiology* 163:273–286.

X

Xu N FX, Yan X, Tseng Ck 2004. Screening marine algae from China for their antitumor activities. *J Appl Phycol* 16:451-456.

Y

Yaich H. GH, Bchir B. , Besbes S., Paquot M. , Richel A., Blecker C., Attia H. 2015. Chemical composition and functional properties of dietary fibre extracted by Englyst and Prosky methods from the alga *Ulva lactuca* collected in Tunisia. *Algal Research* 9:65–73.

Yang Q. WY, Zhang J., Shi W., Qian C. Peng X. 2007. Identification of aluminum-responsive proteins in rice roots by a proteomic approach: cysteine synthase as a key player in Al response. *Proteomics* 7:737-49.

Yasuhara BL. 2010. Marine compounds and their antiviral activities. *Antiviral research* 86:231-240.

Yildiza G. CS, Vatana O., Derea S. 2012. Determination of the Anti-Oxidative Capacity and Bioactive Compounds in Green Seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *International Journal of Food Properties* 15:1182-1189.

Yoshikawa H. HA, Arakawa T., Shiraki K. 2012. Mechanistic insights into protein precipitation by alcohol. *International Journal of Biological Macromolecules* 50:865-871.

Youseff B.H. HED, Smolnycki K. A., Rappleye C.A. 2012. Extracellular Superoxide Dismutase Protects *Histoplasma* Yeast Cells from Host-Derived Oxidative Stress. *PLoS Pathog* 8:e1002713.

Yu S. ZT, Et Al. . 2008. Hypoxic preconditioning up-regulates glucose transport activity and glucose transporter (GLUT1 and GLUT3) gene expression after acute anoxic exposure in the cultured rat hippocampal neurons and astrocytes. . *Brain Res* 1211:22-9.

Z

Zaheer A. YB, Cao X., Lim R. 2004. Decreased Copper–Zinc Superoxide Dismutase Activity and Increased Resistance to Oxidative Stress in Glia Maturation Factor–Null Astrocytes. *Neurochemical research* 29:1473-1480.

Zehlila A. SA, Benmlouka A., Bourguiba I., Hardouin J., Masmoudi O., Cosette P., Amri M., Jouenne T. 2017. Glioprotective effect of *Ulva rigida* extract against UVB cellular damages. *Algal Research* 23:203-215.

Zelko I. JMT, Folz R. . 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine* 33:337–349.

Zhang Z. LY, Xue B. , Wei L. 2009. Protective effects of catalpol against H₂O₂-induced oxidative damage in astrocytes. *journal of Chinese materia medica* 34:1955-1958.

Zhu L. ZY, Hu Y., Wen T., Wang Q. 2013. Dynamic Actin Gene Family Evolution in Primates. *BioMed Research International* 2013:11.

Annexes

Liste des articles et des présentations scientifiques

Articles scientifiques

Article publié

A. Zehlila, A. Schaumann, A. Benmlouka, I. Bourguiba, J. Hardouin, O. Masmoudi, P. Cosette, M. Amri, Thierry Jouenne. *Glioprotective effect of Ulva rigida extract against UVB cellular damages*. *Algal Research*, 2017; doi : 10.1016/j.algal.2017.02.001 (IF : 4.6)

Article en collaboration

I. Bourguiba, **A. Zehlila**, N. Bouaicha, M. Amri, S. Mazghani. *Evaluation of the antioxidant activity of the protein extract of the marine green alga Ulva rigida*. *South African Journal of Science*, 2017 (peer reviewed)

Présentations dans des congrès nationaux et internationaux

Communication orale Internationale

A. Zehlila, A. Schaumann, A. Benmlouka, E. DE, O. Masmoudi, P. Cosette, M. Amri, Thierry Jouenne. *Rôle des protéines de l'algue verte Ulva rigida dans les activités antioxydantes*. Le 26ème forum international des sciences biologiques et de biotechnologie de l'ATSB, Monastir du 23 au 26 mars 2015.

Communications affichées internationales

A. Zehlila, Cosette P., Jouenne T. et Amri M. *Rôle des protéines de l'algue verte Ulva rigida dans les activités antioxydantes*. IIème congrès international de Biotechnologie et valorisation des bio-ressources ATBVBR, Tabarka du 17 au 19 mars 2014.

A. Zehlila, Cosette P., T. Jouenne et Amri M. *Mise en évidence des protéines antioxydantes issues de l'algue verte Ulva rigida*. 29ème édition du Congrès de la SFEAP- PrIMS, Rouen du 15 au 17 octobre 2012.

Communication affichée nationale

Zehlila, A., Cosette P., Jouenne T., et Amri M. *Role of proteins in the green algae Ulva rigida in antioxidant activities*. La 2ème Journée annuelle de l'IRIB, Rouen le 21 /06/2013.

ARTICLE IN PRESS

ALGAL-00788; No of Pages 13

Algal Research 23 (2017) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Algal Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/algalGlioprotective effect of *Ulva rigida* extract against UVB cellular damagesAmel Zehlila^{a,b}, Annick Schaumann^{b,c}, Amine Ben Mlouka^b, Ines Bourguiba^a, Julie Hardouin^{b,c},
Olfa Masmoudi^a, Pascal Cosette^{b,c,*}, Mohamed Amri^a, Thierry Jouenne^{b,c}^a Laboratory of Functional Neurophysiology and Pathology, Research Unit, 00 UR/08-01, Department of Biological Sciences, Faculty of Science of Tunis, University Tunis El Manar, Tunis, Tunisia^b CNRS UMR 6270, Laboratory Polymers, Biopolymers, Surfaces, Normandy University, 70820 Mont-Saint-Aignan, France^c PISARO Proteomic Facility, IRIB, Normandy University, 70820 Mont-Saint-Aignan, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 August 2016

Received in revised form 20 January 2017

Accepted 1 February 2017

Available online xxx

Keywords:

Ulva rigida

UVB radiation

Glioprotection

Proteins

Calmodulin

ABSTRACT

Natural molecules from different origins exhibit high therapeutic potential. Among them, molecules from marine algae are of particular interest. In the present study, we investigated the preventive effect of a protein extract (PE) of *Ulva rigida* against UVB-induced cellular damages. We demonstrated that a treatment of cortical astrocytes with 50 µg of PE induced a strong glioprotective effect and suppressed harmful effects of UVB radiations, increasing in particular cellular viability. In additional assays, this extract promoted the activity of catalase and superoxide dismutase and inhibited the production of stress markers, such as H₂O₂ or lipid peroxidation. As expected, proteolytic digestion or heating treatment of algal extract inhibited this preventive effect, arguing for the predominant role of the protein fraction. Thereafter, proteomic investigations allowed to identify several proteins from the extract, among which calmodulin revealed to represent an important contributor to the observed protective activities.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Sustained exposure to UV radiation induces cellular stress, implied in skin cancer development, premature skin aging or cataracts [1]. Other factors, such as chemicals, alcohol, tobacco, were also shown to promote the production of reactive oxygen species (ROS), involved in apoptotic cell death in several diseases, especially in neurodegenerative diseases and cardiovascular disorders as well as in diabetes and cancers [2]. To explain this, oxidative stress disrupts the physiological balance, and leads to excessive ROS production, notably superoxide anion [O₂⁻], hydroxyl radicals [OH•], singlet oxygen [O₂¹], hydrogen peroxide [H₂O₂], thus participating to degradation of cellular components such as lipids, proteins and DNA [3,4]. To face these deleterious situations, organisms produce non-enzymatic and enzymatic endogenous defenses [5], like superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione peroxidase to modulate ROS production.

Reducing the damages caused by stress such as excessive ROS production and protecting organisms against oxidants have thus become an important research goal to maintain the balance of oxidative status, health and well-being of humans and animals. In this field, there is a great interest in natural products obtained from marine organisms, and particularly algae. Interestingly, the bioactive algal compounds can act as alternatives to drug molecules, disposing of great advantage

over conventional medicines with high bioavailability and often better specificity [6]. Recently, several algal compounds, including polyphenols, polysaccharides and proteins, were demonstrated as powerful antioxidants that protect cells from free radicals and retard the progress of many chronic diseases [7]. Among algae, the antioxidant activity of *Ulva rigida*, a nutrient-rich seaweed, has been reported. In particular, its ethanolic precipitate exhibited a high level of bioactive compounds (e.g., polysaccharides and protein [8]) that protected HeLa cells by blocking the apoptotic cell death pathway [9]. Moreover, in vivo studies have shown that oral administration of *Ulva rigida* ethanolic extract improved the antioxidant status in animal models of atherosclerosis [10], and protected against diabetes-associated DNA damages [11]. Noteworthy, *Ulva* species is associated to very high potential for biotechnology, linked to high biomass productivity with reduced costs when cultured in integrated multi trophic aquaculture [12,13].

The present study was designed to evaluate the glioprotective effect of an *Ulva rigida* extract against UVB induced cell death in astroglial cells. Astrocytes are known to support neurons and to provide protection against oxidative stress as well as cell death, thanks to its level of ROS scavenger molecules, such as vitamins E and C or also antioxidant enzymes such as Mn- and Cu,Zn-superoxide dismutases [14,15]. Despite the fact that astrocytes are more resistant to oxidative damage than neurons [16], a strong cellular stress can alter both their functionality and viability [17,18], causing serious brain injury. Protecting astrocytes could thus represent an alternative approach to maintain antioxidant balance in the brain and to prevent neuronal damage. In this work, several parameters related to oxidative stress were

* Corresponding author at: UMR CNRS 6270, Plateforme Protéomique PISARO (IRIB), Normandie Université, 70821 Mont-Saint-Aignan, Cedex, France.
E-mail address: pascal.cosette@univ-normandie.fr (P. Cosette).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.02.001>
2211-5264/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article as: A. Zehlila, et al., Glioprotective effect of *Ulva rigida* extract against UVB cellular damages, *Algal Res.* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.02.001>

ARTICLE IN PRESS

2

A. Zehila et al. / Algal Research 23 (2017) xxx–xxx

monitored, e.g., level of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, H_2O_2 production. Our different assays suggested that the algal protein fraction was mainly involved in this protective effect. We subsequently performed a proteomic analysis on the extract and identified calmodulin as an important contributor to the protective properties displayed by the *Ulva rigida* extract.

2. Materials and methods

2.1. Algal material

The green alga *U. rigida* was collected in summer (July and August) 2012 and 2013 from a rocky habitat on the Mediterranean shore of the Bizerte region in Tunisia and transported in ice coolers to the laboratory. Epiphytes were cleaned, and the necrotic material was removed. The samples were successively washed with seawater and distilled water and then stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Professor Habib Langar from the Institute of Sciences and Technology of the Sea confirmed *U. rigida* identity.

2.2. Preparation of extracts

2.2.1. Sample treatments

The stored seaweeds were either used as fresh material, lyophilized, sun-dried or dried in an oven at $30\text{ }^\circ\text{C}$ overnight.

2.2.2. Extraction method

Fresh sample was mashed using an electric mortar (Moulinex, France) in distilled water (0.5 mL per g of fresh weight). The mixture was ground using a manual mortar and centrifuged at $10,000 \times g$ for 20 min (freshly ground material).

Dried algae were mashed by using a Waring blender. The powder thus obtained was suspended in 0.1 M Tris HCl buffer (pH 7.5) in the presence of 5% phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Sigma Aldrich). The suspension was gently stirred overnight at $4\text{ }^\circ\text{C}$ to promote cell lysis and so to facilitate protein extraction [19,20]. After incubation, the suspension was subjected to sonication (cycles of 30 s for 2 min) on ice. The extract was then centrifuged at $4\text{ }^\circ\text{C}$, for 20 min at $10,000\text{ }g$. The supernatant and the pellet were recovered. The pellet was treated with NaOH (0.1 M) in the presence of mercaptoethanol (0.5% v/v) and the mixture was gently stirred at room temperature for 1 h before centrifugation ($10,000\text{ }g$ for 20 min). The supernatant was collected and mixed with the supernatant of the first centrifugation. Cold absolute ethanol was then added to the extract (7:1 v/v) and the mixture was stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ at least overnight. After centrifugation ($10,000\text{ }g$ for 20 min), the pellet was recovered, freeze-dried, and finally suspended in deionized water.

2.3. Determination of the protein amount and antioxidant activity

2.3.1. Determination of total protein amount

Protein content was determined by the Bradford method using bovine serum albumin as standard. The results were also expressed per g of dry weight.

2.3.2. Free radical scavenging capacity (DPPH scavenging assay)

The antioxidant activity of the extracts was first estimated according to its ability in quenching the stable free radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) [21]. It was evaluated using the method of Atmani and coworkers [22].

Briefly, a solution of 0.135 mM DPPH in methanol (1 mL) was mixed with 1 mL of different amounts of the extract. The reaction mixture was vortexed and stored in the dark at room temperature for 30 min. The absorbance was then measured at 517 nm (spectrophotometer, Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, PA, USA).

The percentage of inhibition of DPPH free radicals was calculated as followed:

DPPH radical scavenging activity (%) = $\frac{[Abs_{control} - Abs_{sample}]}{Abs_{control}} \times 100$ where $Abs_{control}$ is the absorbance of DPPH radical + distilled water.

2.3.3. Reducing power

The method of Shyamala [23] was used to determine the reducing power of the different extracts. Different amounts of extracts were solubilized in 1 mL distilled water and then mixed with 2.5 mL phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 2.5 mL 1% potassium ferricyanide ($[K_3Fe(CN)_6]$). The solutions were heated at $50\text{ }^\circ\text{C}$ for 20 min and then centrifuged ($3000\text{ }g$ for 10 min) after addition of 2.5 mL of 10% trichloroacetic acid (TCA). The upper layer (2.5 mL) of the solution was mixed with distilled water (2.5 mL) and 0.5 mL of 0.1% ferric chloride. The absorbance was measured at 700 nm (Bio-Rad spectrophotometer) and ascorbic acid was used as control for activity measurements.

2.4. Cell culture of rat cortical astrocytes

Secondary cultures of rat cortical astrocytes were prepared from 1- or 2-day-old Wistar rats (all experiments were performed in accordance with ethical committee of Tunis University for care and use of animals in conformity with NIH guidelines) according to Brown and Mohn [24] with minor modifications. Briefly, cerebral hemispheres were collected in DMEM/F12 (2:1; v/v) culture medium supplemented with 2 mM glutamine, 1% insulin, 5 mM HEPES, 0.4% glucose and 1% of the antibiotic-antimycotic solution. Dissociated cells were suspended in culture medium supplemented with 10% FBS, plated in 150-cm² flasks (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Germany) and incubated at $37\text{ }^\circ\text{C}$ in a 5% $CO_2/95\text{ }O_2$ atmosphere until confluence. Then, astrocytes were isolated from cultures by shaking overnight the flasks with an orbital agitator. Adhesive cells were detached by treatment with trypsin and pre-plated for 5 min to discard contaminating microglial cells. Non-adhering astrocytes were then harvested and plated in 24-well plates at a density of 8×10^4 cells/mL. The cells were incubated at $37\text{ }^\circ\text{C}$ in a humid atmosphere (5% CO_2). In these conditions, after 5 days, >99% of the cells were labelled by antibodies against glial fibrillary acidic protein [25]. All experiments were performed on 5- to 7-day-old secondary cultures.

For the UVB exposure of cortical astrocytes, we used an UV lamp (Fisher scientific UV Transilluminator Model FB-TI-88A; wavelength 312 nm). The UVB output was measured using a model IL-1400-A radiometer (International Light, Newburyport, USA) with a radiometer sensor for UVB (SEL624). The UVB irradiation rate was $0.13\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, and the applied dose was $115\text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$.

2.5. Survival assay

The diacetate-acetoxymethyl ester (CM-H₂DCFDA) which is an intracellular esterase substrate, was used as a fluorescein conjugate to indicate the cell integrity. Cultured cells were treated or not with the ulva protein extract (PE) in the absence or the presence of UVB radiations and then incubated at $37\text{ }^\circ\text{C}$ for 2 h with fresh serum-free culture medium. The culture medium was then removed and the astrocytes were incubated for 8 min with $15\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ fluorescein CM-H₂DCFDA in a dark room, rinsed twice with PBS and lysed with a lysis buffer (Tris/HCl solution containing 1% sodium dodecyl sulfate). Fluorescence was measured with excitation at 485 nm and emission at 538 nm using a FL800TBI fluorescence microplate reader (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). Fluorescence was normalized to that of control cells (without PE and without UVB) which was set at 100% fluorescence.

Please cite this article as: A. Zehila, et al., Glioprotective effect of *Ulva rigida* extract against UVB cellular damages, Algal Res. (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.02.001>

ARTICLE IN PRESS

A. Zehliia et al. / Algal Research 23 (2017) xxx–xxx

3

2.6. Lactate dehydrogenase assay

Cell cytotoxicity was evaluated by measurement of lactate dehydrogenase (LDH) release into the culture medium caused by cellular damages. Cultured cells were pre-treated or not with PE and then incubated at 37 °C for 2 h with fresh serum-free culture medium followed or not by UVB radiations. In the case of post-treatment, cultured cells were first exposed to the UVB radiation and then treated or not with PE (50 µg) and finally incubated at 37 °C for 2 h.

Thereafter, the cytotoxicity of UVB treatment on astrocytes was determined using the LDH activity assay kit (Sigma Aldrich) according to the manufacturer's instructions. For this, 20 µL of each sample was added to 280 µL of reconstituted LDH reagent MIX. Briefly, in the presence of LDH, pyruvate is converted to lactate and then NADH to NAD⁺. The disappearance of NADH is monitored by measuring the absorbance at 340 nm using a spectrophotometer (Bio-Rad). The results are expressed in units of LDH mL⁻¹.

2.7. Measurement of oxidative stress markers

Cells in culture were incubated at 37 °C for 2 h with fresh serum-free medium into which was added or not test substances. The culture medium was then removed and the cells were washed twice with PBS, centrifuged (350 xg, for 10 min, at 4 °C) and the pellet was suspended in a lysis buffer containing 50 mM Tris–HCl (pH 8), 10 mM EDTA, 0.1 mM phenylmethyl-sulfonylfluoride and 1% Triton X-100. The mixture was centrifuged (16,000g for 20 min at 4 °C) and the supernatant was stored at –20 °C before further experimentation.

2.7.1. Antioxidant enzyme assay

The superoxide dismutase activity (SOD; E.C.1.15.1.1) was determined using modified epinephrine assay [26]. Supernatants prepared as described previously, were mixed with bovine catalase (0.4 U/L), epinephrine (5 mg·mL⁻¹) and Na₂CO₃/NaHCO₃ buffer (62.5 mM, pH 10.2). Absorbance was measured at 480 nm (Bio-Rad spectrophotometer).

The catalase activity was measured by progressive decrease of the concentration of H₂O₂ in the reaction medium [26,27] after sample addition. The reaction was performed in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) and monitored at 240 nm for 180 s at 30-s intervals. Catalase activity was calculated using the extinction coefficient of 40 mM⁻¹ cm⁻¹ for H₂O₂.

2.7.2. Lipid peroxidation assay

Lipid peroxidation was determined by measurement of malondialdehyde (MDA) concentration according to the double heating method [28]. Briefly, samples (25 µL) were solubilized in a solution containing 1% BHT (w/v) and 20% TCA (w/v). The mixture was then centrifuged at 1000g for 5 min at 4 °C. The supernatant (100 µL) was put into 0.5 M HCl, and 120 mM TBA in 25 mM Tris buffer, and then heated at 95 °C for 10 min. After cooling, the absorbance was measured at 532 nm (Bio-Rad spectrophotometer). MDA concentration was determined by using an extinction coefficient for MDA-TBA complex of 1.56 × 10⁵ M⁻¹ cm⁻¹.

2.7.3. Hydrogen peroxide scavenging assay

H₂O₂ concentration was determined according to Chance and coworkers [29] by a colorimetric method using a commercially available kit (from Biomaghreb, Tunisia). Briefly, H₂O₂ was oxidized by peroxidase. The absorbance was measured at 505 nm using a spectrophotometer (Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, PA, USA).

2.7.4. Calcium measurement

Ca²⁺ levels were determined according to Stern and Lewis [30] using a commercially available kit (from Biomaghreb, Tunisia). Briefly, at alkaline pH, cresolphthalein produced in the presence of calcium a colourful complex measurable at 570 nm (Bio-Rad spectrophotometer).

2.8. Algal extract denaturation

In order to characterize the nature of active molecules within the algal extract, we carried out different denaturing stages (heating, hydrolases and trypsin). In this assay, we used a *Saccharomyces cerevisiae* strain as in vitro cell model to evaluate the loss of protective effect depending on the denaturing process. The yeast was cultured at 30 °C and inoculated into 10 mL YPD Broth Gipco culture medium (Thermo fisher Scientific) at an initial optical density of 0.1 at 600 nm. The culture was performed overnight in 10 mL on a bioshaker (150 strokes per min).

2.8.1. Heating treatment

Extracts were dipped into a 60 °C and 90 °C warm water baths for 1.5 h whereas control extracts were dipped in a 25 °C water bath for 1.5 h. After incubation, the extracts were cooled to room temperature and the LDH assay was immediately performed.

2.8.2. Digestion with hydrolases

To evaluate the role of the algal polysaccharide fraction, the extracts were mixed with cellulase (from *Trichoderma reesei*) and pullulanase (from *Klebsiella pneumoniae*) in 1.5 mL Eppendorf. Digestions were performed overnight at 37 °C and 25 °C, respectively, on a shaker bath. The final enzyme concentration was 5 U/mL and 10 U/mL for the cellulase and pullulanase, respectively. After digestion, the digests were placed at 4 °C for 30 min to stop the reaction.

2.8.3. Protease digestion

Digestion of the algal protein fraction was carried out using trypsin (Promega). Briefly, 1.2 mL of extract suspension was used and the enzyme solution (containing 20 µg trypsin in 200 µL resuspension buffer) was added to the protein suspension with a protease: protein ratio of 1:20 and 1:10. The mixture was incubated at 37 °C overnight.

2.9. Proteomic analysis: enzymatic digestion of protein extracts and mass spectrometry

Twenty-five µg of proteins were loaded on a 7% SDS-polyacrylamide stacking gel for migration during 1.5 h. After staining with Brilliant Coomassie blue G250, the protein bands were reduced in 5 mM dithiothreitol and cysteines were irreversibly alkylated in a 25 mM iodoacetamide solution. Gel bands were washed with distilled water and submitted to protein digestion (trypsin from Promega, 0.5 µg per band). Peptides thus obtained were extracted from gel pieces and evaporated.

Resulting peptides were firstly dissolved in 0.1% formic acid and water. Mass spectrometry experiments were carried out with a linear ion trap-orbitrap mass spectrometer (LTQ Orbitrap Elite, Thermo Scientific) equipped with a nano-ESI source and coupled to a liquid nano-chromatography system (Easy-nLC II, Thermo Scientific). Samples were injected into an enrichment column (C8, 0.5 × 2 mm, Michrom Bioresources), then separated on a reversed phase column (C18, L 153 mm, ID 5 µm, 100 Å pore size, Nikkyo Technos, Japan). The gradient (mobile phase A, H₂O/0.1% formic acid (FA); mobile phase B, CH₃CN/0.1% FA) was delivered at a flow rate of 300 nL/min. The elution of peptides from the reversed phase column was realized according to a linear gradient from 2 to 40% in 105 min, followed by a rapid increase to 80% in 4 min and final stage at 80% for 15-min. These peptides were sent online into the mass spectrometer with a capillary voltage set at 1.5 kV. The mass spectrometer was operated in data-dependent mode and selected the 20 most intense ions for fragmentation (top 20 method).

Raw data files were imported and processed using Proteome Discoverer software (version 1.3, Thermo Scientific). MS/MS spectra were compared to the NCBI database using the MASCOT search engine (version 2.2, Matrix Science). The following parameters were

Please cite this article as: A. Zehliia, et al., Glioprotective effect of *Ulva rigida* extract against UVB cellular damages, Algal Res. (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.02.001>

considered: one missed cleavage allowed and as variable modifications: carbamidomethylation of cysteine and oxidation of methionine.

2.10. Purification and identification

2.10.1. SDS PAGE electrophoresis

After determination of the protein amount in the extract using the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), respectively 2, 4 and 6 µg of proteins sample were loaded onto a polyacrylamide gel SDS-PAGE (12.5% (w/v) polyacrylamide resolving gel). After migration, proteins were visualized by silver nitrate staining and the gel was scanned using a ProXpress imager (PerkinElmer).

2.10.2. Extract fractionation according to molecular weight

The *Ulva rigida* protein extract was fractionated (according to molecular weight) via Microcon® centrifugal filters (Merck Laboratories) in various fractions, namely (F30: MW > 30 kDa; F10: 30 kDa > MW > 10 kDa; F3: 10 kDa > MW > 3 kDa; F0: MW < 3 kDa). After sample insertion (500 µL of extract), the device was centrifuged at 14,000 × g for a typical spinning time of 10–40 min, depending on the membrane cut off. The assembly was then reversed and centrifuged for 3 min at 1000 × g to transfer the retained proteins in a specific tube. On the other hand, the filtrate was recovered in a new fractionating device with a lower cut-off. After recovery, all fractions were stored at –20 °C. Then, a new Bradford protein assay was carried out for all the different fractions to allow performing a new LDH cytotoxicity test on astrocytes cultures. This highlighted the fractions associated to protective activity against UVB radiation after pre-incubating cells with 50 µg of each fraction for 2 h.

2.10.3. Determination of active bands

Lanes of a SDS-PAGE gel (4.5% (w/v) stacking and 12.5% (w/v) polyacrylamide resolving gel; width, 16 cm; length, 16 cm; thickness, 0.75 mm) were loaded with 90 µg of extract. After migration (6 h), proteins were stained with Coomassie brilliant blue R250. Two major bands at approximately 75 kDa and 20 kDa were then excised and cut into small gel pieces. The latter were placed in an electro-elution chamber (Biotrap, Schleicher and Schuell). These proteins were eluted using a dedicated transfer buffer (glycine 192 mM, tris base 25 mM, SDS 0.025%). The migration took place for 3 h under a current of 120 mA (with limitations of voltage of 200 V and power of 60 W). Eluted proteins were then recovered into a dialysis rod with a cutoff of 14,000 Da. Dialysis was carried out in a refrigerated chamber against PBS buffer overnight. The dialysates were then used to test their preventive action against UVB radiation on astrocytes cells (LDH cytotoxicity).

2.10.4. Identification of calmodulin

Protein identification was performed in the same way as described above. Using the ClustalW bioinformatics tool, the sequence of the identified protein was aligned with its commercial counterpart (commercial bovine calmodulin, Sigma Aldrich).

2.11. Statistical analysis

All data were expressed as mean ± SEM from at least three independent experiments. One Way Analysis of Variance (One Way ANOVA) was systematically performed to infer statistical significance to the different sets of results. Firstly, a Shapiro test was realized to evaluate the normality of data distribution. Then, a test of variance homogeneity was carried out (test of Brown-Forsythe). The Holm-Sidak test was finally used for either pairwise comparisons or comparisons versus a control group, with the corresponding p-values given in the tables and figures.

3. Results

3.1. Determination of protein amount

Algal protein amounts were measured after the different treatments performed on the algal ethanolic precipitate (Table 1). Results pointed out rather important variations in the protein concentration according to the various treatments tested, the maximum concentration (2.63 mg·mL⁻¹, representing 13% of the dry weight) being obtained after lyophilization.

3.2. Antioxidant activity

The ability of PE (*Ulva rigida* protein extract) to scavenge free radicals was tested and differences were observed depending on the extract treatment (Fig. 1A). The maximal DPPH (diphenylpicrylhydrazyl) radical scavenging activity was observed from both lyophilized and oven-dried algae at the maximal concentration tested (1 mg·mL⁻¹).

The concentration of each extract required to achieve 50% of DPPH radical reduction (IC50), was 0.555 mg·mL⁻¹, 0.188 mg·mL⁻¹, 0.227 mg·mL⁻¹ and 1.67 mg·mL⁻¹ for freshly ground material, lyophilized material, oven-dried material and sun-dried material, respectively.

In addition, the anti-oxidative activity was measured and expressed in trolox equivalents antioxidant capacity (TEAC) per g of dry material and compared depending on the algal treatment (Fig. 1B). Maximal values were obtained after lyophilization and for oven-dried material.

The anti-oxidative ability generally results from the presence of molecules capable of giving a hydrogen atom to break the chain of free radicals. The reductive capacity of the algal PEs (i.e., their ability to transform the Fe³⁺/ferricyanide complex to the ferrous form), was measured and compared to ascorbic acid used as standard (Fig. 1C). The activity of the lyophilized extract was significantly lower than that of ascorbic acid whatever the concentration tested. Besides, freshly ground material and oven-dried extracts exhibited a similar reducing activity compared to ascorbic acid. These data accord well with DPPH assay, and demonstrate that the lyophilized extract contains more electron donors able to react with free radicals.

3.3. PE effect on UVB induced astroglial cell death

Initially, the evolution of cell survival according to the duration of UVB exposure was monitored. Data pointed out that cell viability significantly decreased with time exposure. The exposure time of 15 min, which killed about 50% of cells, was used in all subsequent experiments (Sup. Fig. 1).

3.3.1. PE effect on astrocytes survival and cytotoxicity

When applying the latter condition, cell survival (Fig. 2A) and cell cytotoxicity assessed by the measure of LDH (lactate dehydrogenase) release (Fig. 2B) were monitored. Firstly, the results showed that cell viability systematically and significantly decreased after exposure to UVB irradiation. Besides, incubation of astrocytes with graded concentrations of algal proteins induced a dose-dependent increase of viability, which reached 382% for an optimal amount of 50 µg of PE. However, a larger dose of 250 µg appeared to be toxic for astrocytes, even if this result was not significant. Interestingly, post-treatment with the PE

Table 1
Protein content according to the treatment of the algal ethanolic precipitate.

Treatment	Protein concentration (mg·mL ⁻¹) ^a	Total protein content (% dry weight) ^a
Freshly grinded material	0.96 ± 0.07	4.83 ± 0.37
Lyophilized material	2.63 ± 0.04	13.10 ± 0.55
Oven drying	2.33 ± 0.09	11.60 ± 0.50
Sun drying	0.72 ± 0.10	3.60 ± 0.53

^a Values are means ± SD (n = 3).

Please cite this article as: A. Zehliia, et al., Glioprotective effect of *Ulva rigida* extract against UVB cellular damages, Algal Res. (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.02.001>

ARTICLE IN PRESS

A. Zehlila et al. / Algal Research 23 (2017) xxx–xxx

5

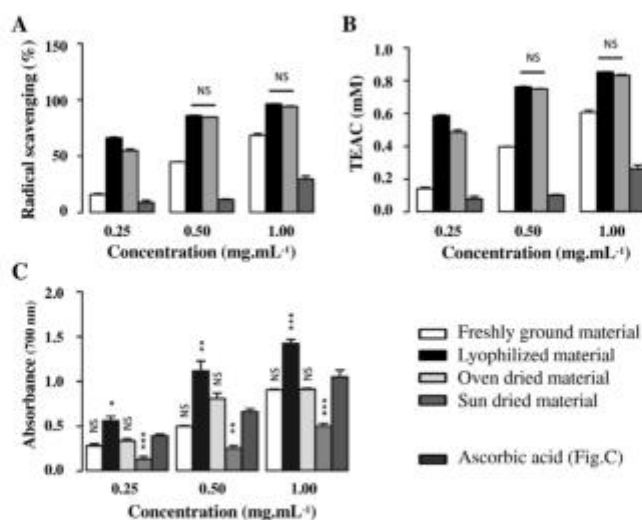


Fig. 1. Evaluation of antioxidant properties. DPPH radical scavenging activity (A), trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay (B) and reducing power (C) of the algal extract at different concentrations (0.25, 0.50 and 1.00 mg.mL⁻¹). Results represent means \pm SEM from triplicate determinations (n = 3). Details of ANOVA calculations: for the comparisons in panel A and B, all the differences were statistically significant ($p < 0.001$) except where mentioned (NS: not significant); for the comparisons in panel C, between any given sample (for the different treatments) and the corresponding control (measurement for the reference ascorbic acid): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS, not significant.

extract at a dose of 50 μ g, also increased the viability of cells exposed or not to UVB.

In parallel, cytotoxicity was also quantified by measurement of LDH release in the culture medium of injured cells (Fig. 2B). Accordingly, there was a significant increase of LDH leakage after UVB exposure. This effect was significantly reduced by cell treatment with algal protein extract prior to or post UVB radiation. Pre-treatment with 10, 20, 50 and 100 μ g of the extract decreased the release of LDH from irradiated astrocytes. However, a higher dose of 250 μ g significantly increased the cell cytotoxicity, in particular after UVB irradiation. Data pointed also out

that a post-treatment with 50 μ g of extract significantly decreased LDH leakage by cells exposed or not to UVB.

3.3.2. PE effect on astrocytes morphology

Optical microscopy examinations of astrocyte cultures revealed that PE-treated cells displayed a flat polygonal morphology similar to that of untreated astrocytes (Fig. 3A and C), while UVB treatment induced cell shrinkage and the appearance of long thin processes (Fig. 3B). In addition, pre-treatment of cells with PE partially prevented the morphological changes induced by UVB radiations (Fig. 3D).

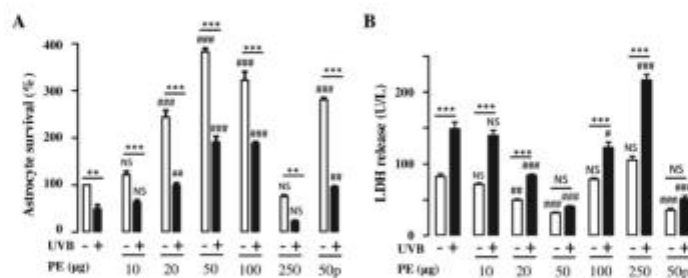


Fig. 2. Protective effect of the algal protein extract on UV-exposed cell viability. (A) Measure of astrocyte viability. In these experiments, astrocytes were pre-incubated for 2 hours in the absence or presence of increasing concentrations of algal extract (PE) and then exposed or not for 15 min to UV-B radiations (open bars: not exposed to UVB; closed bars: exposed to UVB). Results from cells only exposed to algal extract were used as a reference for normalization. (B) Measure of LDH release. In the same conditions as above, a LDH activity assay was performed. The results were expressed as units of lactate dehydrogenase (LDH) release per liter of culture medium. For both experiments, each value is the mean \pm SEM, calculated from at least four different wells from three independent cultures. Details of ANOVA calculations: for the comparison between any given sample (for the different concentrations of PE) and the corresponding control sample (cells either not exposed or exposed to UVB without PE): # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$; NS, not significant; for the comparison between not exposed or exposed to UVB (for each PE concentration) * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS, not significant.

Please cite this article as: A. Zehlila, et al., Glioprotective effect of *Ulva rigida* extract against UVB cellular damages, Algal Res. (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.02.001>

ARTICLE IN PRESS

0

A. Zehila et al. / Algal Research 23 (2017) xxx–xxx

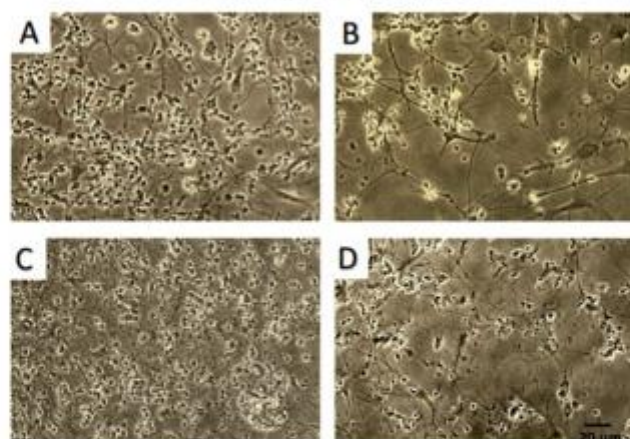


Fig. 3. Optical images illustrating UV-B induced changes in morphology of cultured rat astrocytes. Cells were pre-incubated for 2 h in the absence (A–B) or presence of 50 µg PE (C–D), and also exposed for 15 min to UV-B (B–D).

3.4. H_2O_2 scavenging assay

To further explore the mechanism involved in the protective action of the algal protein extract, we evaluated the ability of this extract to scavenge H_2O_2 in astrocyte cultures (Fig. 4). The results showed that cell exposure to UVB significantly increased (+42%) H_2O_2 level while PE treatment highly decreased the deleterious effect.

3.5. Antioxidant enzyme activities in astrocytes

We monitored superoxide dismutase (SOD) and catalase activities in astrocytes (Fig. 4). Data indicated that exposure of astrocytes to UVB for 15 min decreased the catalase and SOD activities by 72 and 65%,

respectively. The results also revealed that the addition of PE in the culture medium significantly enhanced enzyme activities. PE restored the catalase activity above control levels and completely inhibited the oxidative stress exerted by UVB. The same PE concentration significantly reduced the deleterious effects of UVB on the SOD activity but did not completely suppress it.

3.6. Monitoring of lipid peroxidation

Lipid peroxidation results from an oxidative reaction between hydroxyl radicals and unsaturated fatty acid side chains of lipids [31]. The ability of PE to inhibit this reaction was monitored by TBA-RS formation in the absence or presence of UVB radiations (Fig. 4). Data

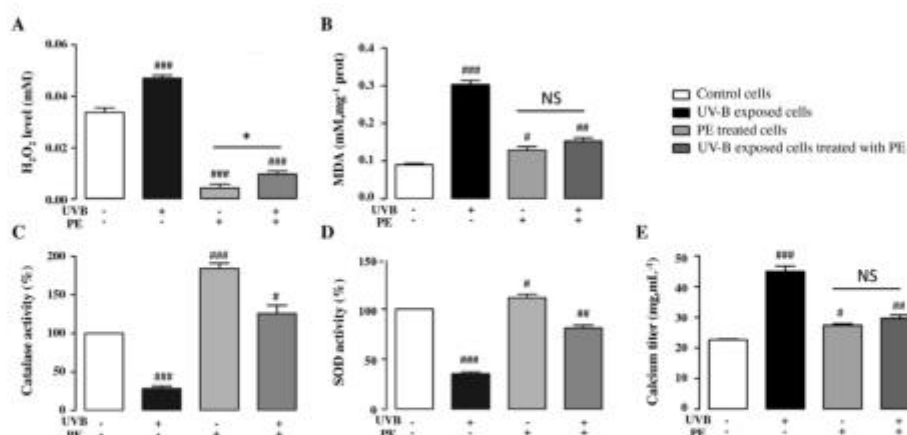


Fig. 4. Levels of oxidative stress markers, antioxidant enzymes and calcium from the different conditions. From astrocyte culture, H_2O_2 levels (A), lipid peroxidation (B), catalase (C) and SOD (D) activities were calculated. Finally, calcium levels were also determined (E). For these assessments, cells were incubated in the presence or absence of 50 µg of algal extract for 2 h (PE, + or –), and then exposed or not to UV-B radiations for 15 min (UVB, + or –). Each value is the mean \pm SEM of at least four different dishes from three independent cultures. Details of ANOVA calculations: for the comparison between any given sample and the corresponding control sample (cells not exposed to UVB without PE): #p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001; NS, not significant; for all other comparisons p < 0.001 except where mentioned: *p < 0.05 and NS: not significant.

Please cite this article as: A. Zehila, et al., Glioprotective effect of *Ulva rigida* extract against UVB cellular damages, Algal Res. (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.02.001>

ARTICLE IN PRESS

A. Zehlila et al. / Algal Research 23 (2017) xxx–xxx

7

pointed out a strong increase in lipid peroxidation after cell exposure to UVB radiation, due to the increase in the ROS production. In addition, pre-treatment of cells with PE did not exhibit a significant alteration of the MDA concentration. However, PE induced a high decrease of the MDA concentration in comparison to exposed cells, pointing out a high protection against lipid peroxidation.

3.7. PE effect on astrocytes calcium concentration

It is well known that Ca^{2+} regulates numerous physiological cellular phenomena and triggers pathological events, such as cell injury or death [32]. The present data (Fig. 4) showed a doubling of the Ca^{2+} concentration when cells were exposed to UVB. As for lipid peroxidation, there was no significant difference in cellular calcium levels between control astrocytes and those pre-treated with the algal extract. The calcium accumulation by cells exposed to UVB was significantly decreased by a PE pre-treatment (from $45 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ per mg protein to $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ per mg protein).

3.8. Validation of protein implication in the observed protective effect

To confirm the nature of the molecules involved in the PE protective effect, we investigated the effect of temperature, hydrolase or protease treatment on PE activity (Table 2). The thermal treatment of PE had no influence on its activity up to 60°C , but the prevention was significantly inhibited at 90°C . The PE treatment by 5 or 10 mg of cellulase or pullulanase had no impact while PE treatment with trypsin at a ratio of 1:10 induced a significant decrease of the protective, conducting to cell mortality.

To better assess the role of the polysaccharides present in PE (e.g., ulvans), we evaluated the ability of commercial ulvans from *Ulva aramonic* to prevent and protect yeast cells against the oxidative stress induced by UVB. Results showed that the incubation of control cells with ulvans ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) induced a decrease of the cytotoxicity by about 25%. Moreover, the increased cell death by UVB exposure was slightly reduced by an ulvan pretreatment (about 23%). In view of these results, one can suggest that ulvans also exhibit a protective effect but the latter is significantly lower than that exerted by the protein extract (Supp. Table 1).

3.9. Proteomic investigations

We first compared the protein content of the algal extracts obtained after the different treatments used, i.e., lyophilization, oven-drying, sun-drying and grinding of fresh material. Due to the limitation linked to the lack of ulva genomic sequence data in available database, only 38 proteins were identified from the different samples (Table 3). It should be noted here that some proteins were identified from different organisms, and are probably redundant. The molecular weights of identified proteins were ranging from around 10 to 80 kDa and the isoelectric points

(pI) varied from 4.42 to 11.47 (Table 3). Interestingly, a major part of the identified proteins (38 proteins) exhibited pIs ranging from 4 to 7, which testifies to the presence of a majority of acidic proteins. As expected, an important fraction of the proteins were identified from algal species. Among them, 3 proteins were detected in all the 4 extracts (i.e., calmodulin, Uniprot entry P04352; actin, O65316; and cysteine synthase, P31300) (Table 4).

The identified proteins were then clustered according to the cellular compartment, the biological process and the molecular function to which they belong (Supp. Fig. 2). The majority of identified proteins are involved in photosynthesis and energy processes (such as ATP synthase, ubiquitin, cytochrome c, photosystem II P680 chlorophyll A apoprotein...). Some other highly represented proteins are involved in the cellular structure (such as actin, tubulin or histones) or implied in metabolism (such as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A or cysteine synthase). Stress proteins were also identified, which are known as chaperones, and play crucial roles in protein folding and cell protection against stress/apoptosis [33] (Table 4).

The whole protein extract was characterized by SDS-PAGE (Fig. 5A). This separation by electrophoresis demonstrated the presence of numerous proteins. To evaluate proteins involved in the protein activity, the algal protein extract was fractionated by centrifugal filtration with membranes of specific mass cut-off and the resulting fractions were used for cell viability experiments (Fig. 5B). From the latter, fractions F10 and F30 conducted to the larger cellular protection to UVB with respect to LDH release measurements.

When looking at the SDS-PAGE profile, bands corresponding to either the F10 or the F30 fraction were excised from the gel and the corresponding proteins were electro-eluted and used for further cell viability experiments (Fig. 5C). Interestingly, protein from band B (around 20 kDa, lower arrow in Fig. 5A) procured an important advantage, with a reduction of >50% of cellular cytotoxicity when cells were exposed to UVB radiations. However, this effect was slightly lower than that of the F10 fraction. As a negative control, no detectable protection was observed by the protein isolated from the band A (upper arrow in Fig. 5A).

3.10. Identification of calmodulin as an important contributor to protective activity

The last issue of this work consisted in identification of the protein present in band B. Mass spectrometry experiments unambiguously yielded to the identification of calmodulin from *Chlamydomonas reinhardtii*, with 4 peptides with annotated fragmentation spectra and a sequence coverage superior to 40% (Fig. 6A). Remarkably, the algal calmodulin shares a high level of homology with the bovine calmodulin (Fig. 6B), which is commercially available. This important homology sustained the idea that bovine calmodulin may be used as a control for a realistic evaluation of the activity of the algal calmodulin. With both proteins, the level of LDH release was measured (Fig. 6C). Noteworthy,

Table 2
Survival of yeast cells by LDH release measurements after different treatments of the algal extract (temperature, hydrolases and protease).

	U LDH/mL* Without UV-B exposure	% of cell cytotoxicity	p-value	U LDH/mL With UV-B exposure	% of cell cytotoxicity	p-value
Control (cells with algal extract)	2.43 ± 0.84	100	NS	2.84 ± 0.54	116 ± 19	NS
Cells treated by algal extract heated at 60°C for 1 h 30 min	2.41 ± 0.81	99 ± 33	NS	2.08 ± 0.52	83 ± 25	NS
Cells treated by algal extract heated at 90°C for 1 h 30 min	5.40 ± 1.92	221 ± 33	$p < 0.001$	0.56 ± 2.01	208 ± 39	$p < 0.001$
Cells treated by algal extract digested overnight with pullulanase 5 mg	2.30 ± 1.06	102 ± 42	NS	2.30 ± 1.00	94 ± 43	NS
Cells treated by algal extract digested overnight with pullulanase 10 mg	2.05 ± 0.85	84 ± 4	NS	2.81 ± 0.33	115 ± 11	NS
Cells treated by algal extract digested overnight with cellulase 5 mg	2.59 ± 1.22	106 ± 47	NS	2.78 ± 0.28	113 ± 10	NS
Cells treated by algal extract digested overnight with cellulase 10 mg	1.57 ± 0.98	64 ± 62	NS	2.19 ± 0.33	89 ± 15	NS
Cells treated by algal extract digested overnight with trypsin 1:20	3.25 ± 1.70	132 ± 54	NS	3.29 ± 1.43	135 ± 43	NS
Cells treated by algal extract digested overnight with trypsin 1:10	5.07 ± 1.30	232 ± 26	$p < 0.001$	5.22 ± 0.66	220 ± 12	$p = 0.009$

* Measure of LDH release. Yeast cells were pre-incubated for 2 h in the presence of $50 \mu\text{g}$ of the native algal extract (PE) or of the corresponding denaturated extract. Cells were either not exposed or exposed for 15 min to UV-B radiations. Results represent means ± SEM from triplicate determinations ($n = 3$). Details of ANOVA calculations: for the comparison between any given sample and the corresponding control sample (i.e., PE treated cells, in bold).

Please cite this article as: A. Zehlila, et al., Glioprotective effect of *Ulva rigida* extract against UVB cellular damages, Algal Res. (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.02.001>

ARTICLE IN PRESS

8

A. Zehila et al. / Algal Research 23 (2017) xxx–xxx

Table 3
Summary of identified proteins from algal extracts.

Accession*	Descriptive name	Matched organism	# Peptides ^b	# PSM ^c	MW (kDa)	pI	Extract ^d
P48348	14-3-3-like protein GF14 kappa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2	2	28.0	4.89	O
O05310	Actin	<i>Mesostigma viride</i>	4	6	41.6	5.48	F, O, L
P20904	Actin	<i>Volvox carterii</i>	4	6	41.7	5.48	F
O42161	Actin, cytoplasmic 1	<i>Salmo salar</i>	7	7	41.8	5.48	L
P02580	Actin-3	<i>Glycine max</i>	4	4	41.6	5.40	S
P28555	Allophycocyanin alpha chain	<i>Aglaohammion neglectum</i>	2	2	17.5	4.88	S
Q3ZJ00	ATP synthase subunit alpha	<i>Pseudonocardium okinetum</i>	2	2	54.0	5.49	L
A68M09	ATP synthase subunit beta	<i>Gaetum parvifolium</i>	5	9	51.9	5.21	L, O
A6YC86	ATP synthase subunit beta	<i>Leptostira terrestris</i>	5	6	51.8	5.17	O
Q3ZJ08	ATP synthase subunit beta	<i>Pseudonocardium okinetum</i>	5	5	51.7	5.30	L
Q01859	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	<i>Oryza sativa</i>	2	3	58.9	6.37	F
P37399	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	<i>Daucus carota</i>	2	3	59.1	5.85	L
P04352	Calmodulin	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	7	12	18.3	4.42	L, O, F, S
Q7DMF0	Calmodulin-2/4	<i>Solanum tuberosum</i>	1	3	14.0	4.35	F
P28557	C-phycocyanin alpha chain	<i>Aglaohammion neglectum</i>	2	2	17.7	7.08	S
P31300	Cysteine synthase, chloroplast/chromoplast	<i>Capricorn anuum</i>	2	2	40.0	5.27	F, O, L
P00052	Cytochrome c	<i>Phaseolus aureus</i>	2	2	12.1	9.31	F
P50382	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplast	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2	2	40.3	9.09	O
P27322	Heat shock cognate 70 kDa protein 2	<i>Solanum lycopersicum</i>	2	2	70.7	5.19	L, O
P36181	Heat shock cognate protein 80	<i>Solanum lycopersicum</i>	2	2	80.1	5.03	L, O
A2VWQ1	Heat shock protein 81-1	<i>Oryza sativa</i>	2	2	80.1	5.07	O
Q0P01	Histone H2A	<i>Penaeus vannamei</i>	3	6	13.3	10.73	L, O
Q9L028	Histone H2A.6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2	2	13.6	10.15	L, O
Q43216	Histone H2B.5	<i>Triticum aestivum</i>	1	3	15.0	10.02	F
P27996	Histone H4	<i>Solaster stimpsoni</i>	2	2	11.4	11.19	L, O
P02785	Histone H4 variant TH011	<i>Triticum aestivum</i>	3	3	11.4	11.47	L, O
P06007	Photosystem II D2 protein	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2	2	39.4	5.73	L, O
37255	Photosystem II P680 chlorophyll A apoprotein	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2	3	39.4	5.73	L, O
O48843	R-phycocyanin alpha chain	<i>Porphyra tenera</i>	4	5	17.7	5.59	S
O44119	Tropomyosin	<i>Haemaphysalis americana</i>	6	7	32.9	4.77	S
Q9CZ70	Tropomyosin	<i>Perna viridis</i>	3	5	16.8	4.36	S
Q7M3Y8	Tropomyosin	<i>Turbo cornutus</i>	3	3	16.8	4.36	S
O04386	Tubulin beta chain	<i>Chlamydomonas incerta</i>	3	3	49.6	4.52	F
P20364	Tubulin beta-1 chain	<i>Daucus carota</i>	2	2	35.8	4.86	F
P37832	Tubulin beta-7 chain	<i>Oryza sativa</i>	2	3	49.6	4.87	F
P13117	Ubiquitin	<i>Neurospora crassa</i>	2	2	8.6	7.25	F
Q38680	Vacuolar ATP synthase subunit B 2	<i>Acetabularia acetabulum</i>	2	2	54.7	5.25	F

* Protein accession number.

^b Number of peptides identified.^c Number of peptide spectrum matches (PSM).^d Protein identified from the different extracts: O: Oven-dried; L: Lyophilized; F: Freshly ground; S: Sun-dried).

both calmodulins protected efficiently cells even when cells were not exposed to UVB radiations. Nevertheless, this effect was also clearly visible under UVB exposure. In addition, the calcium level was also investigated (Fig. 6D). In basal conditions, the addition of calmodulin did not modify the concentration of calcium. However, after UVB exposure, the calcium level is largely decreased when calmodulin was added, arguing for its beneficial role.

4. Discussion

Today, a growing interest is observed for bioactive molecules from seaweed. In this context, *U. rigida* possesses natural antioxidant molecules, and as such, is of high interest for the cosmetic and food industries [34]. This green seaweed, is also considered for future applications in medicine, for curing diseases, notably those arising from oxidative deterioration [7].

Several studies have examined the protein levels in algae. According to Kendel and coworkers, protein and total free amino acids represent a rather small fraction compared with other biomolecules [19,35] though higher ratios were also described. Additional works reported variability in the protein content of green seaweeds according to the season when they are collected, the ratio varying from 1 to 23% [34], whereas higher protein levels have been described in other alga. In the present study, a ratio around 14% was found, which accords well with data by Mezghani and coworkers [8].

However, we pointed out here that this protein content was strongly dependent of the recovery process used for protein extraction. Thus,

among the different methods tested, lyophilization appeared to promote a better efficiency. This observation is in line with previous studies in which lyophilization/freeze drying methods have been established as a useful approach to overcome physical or chemical instabilities of biomolecules, and in particular of proteins [36,37].

The influence of the pre-extraction procedures on the algal protein recovery depends of the cell wall physical and chemical characteristics. Indeed, a recent study reported that the protein extractability of crude rigid cell walled algae like *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata* and *Haematococcus pluvialis* was lower than the one obtained for fragile cell walled microalgae *Porphyridium cruentum* and *Athrosira platensis* [38]. Interestingly in this context, *Ulva rigida* is characterized by the stiffness of its thallus [39].

In some cases, the sun-drying and oven-drying methods were reported to be more efficient than other methods (i.e., lyophilization), but this mainly concerns the recovery of other bioactive compounds

Table 4
Details of protein identification for actin, calmodulin and cysteine synthase from the four different extracts.

Protein	Lyophilized		Oven-dried		Freshly ground		Sun-dried	
	Score	# PSM	Score	# PSM	Score	# PSM	Score	# PSM
Actin	72	3	63	2	188	6	0	0
Calmodulin	323	12	164	7	320	10	85	2
Cysteine synthase	95	2	85	2	86	1	0	0

Please cite this article as: A. Zehila, et al., Glioprotective effect of *Ulva rigida* extract against UVB cellular damages, Algal Res. (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.02.001>

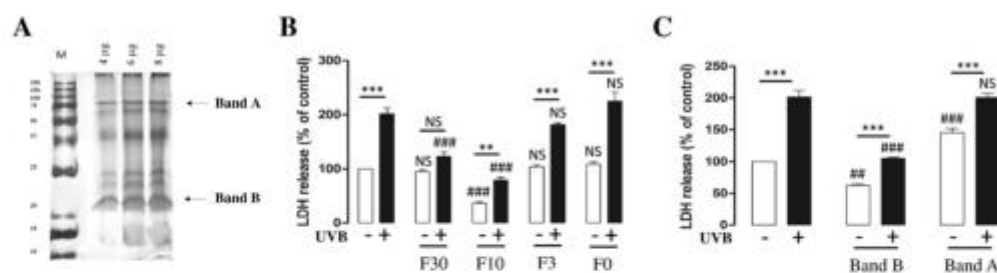


Fig. 5. Fractionation of the protein extract and protective activity of individual fractions and of two purified proteins on astrocytes cells. (A) Protein profile of the whole algal protein extract after SDS PAGE migration and silver staining. Arrows represent two protein bands that were isolated and tested for protective activity. (B) Protective activity measurements of the different protein fractions according to molecular weight cutoff allowed via Microcon® centrifugal devices (F30: MW > 30 kDa; F10: 30 kDa > MW > 10 kDa; F3: 10 kDa > MW > 3 kDa; F0: MW < 3 kDa). (C) Additional activity assays performed with two purified proteins (around 75 kDa: band A and around 20 kDa: band B). For activity tests, astrocytes cells were incubated in the presence or absence of the algal protein fractions or purified proteins for 2 h and then exposed or not to UV-B radiations for 15 min. Each value is the mean \pm SEM of at least four different dishes from three independent cultures. Details of ANOVA calculations: for the comparison between any given sample (for the different fractions) and the corresponding control sample (cells either not exposed or exposed to UVB): #p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001; NS, not significant; for the comparison between not exposed or exposed to UVB (for each fraction/band) *p < 0.01; **p < 0.001; NS, not significant.

like for instance phlorotannins from the brown Alga *Ecklonia* [40]. However, in our work sun-drying revealed a low protein content probably due to heating that promoted protein degradation. Another study, aimed at deciphering the effect of sun-drying, oven-drying and freeze-drying methods on the nutritional composition of *Sargassum hemiphyllum* seaweed, reported no significant differences for the protein content. However, the freeze-dried seaweed revealed the highest content of total amino acids and sun-dried seaweed displayed the lowest [41].

Anti-atherosclerotic, anti-hyperglycemic and anti-genotoxic activities have been already described for *U. rigida* extracts [10,11]. Here, we show that the protein extract exerts a potent antioxidant activity; the observed capacity to scavenge DPPH radical concurring well with data reported by other groups [8]. In particular, several plant molecules have been found to be effective in preventing UV-induced DNA oxidative damage through a ROS scavenging mechanism both in vitro and in animal models [42]. The present data showed that a UVB treatment of astrocytes induced modifications of cell morphology and an increase in cell death as a function of exposure time.

An outstanding result brought by the present study is the demonstration that *Ulva* protein extracts protect cultured rat astrocytes from harmful effects of UVB radiations, increasing cell viability and decreasing LDH release. According to Leach and coworkers [43], ionizing radiations generate reactive oxygen and nitrogen species after few minutes of cell exposure, leading to compromised mitochondria viability, MAPK pathways activation and DNA damage. Pérez-Sánchez reported that intracellular ROS are one of the most damaging effects of both UVB and UVA radiations on cells, with subsequent damage on lipids, proteins and mitochondrial and nuclear DNA [44]. Indeed, since the cell becomes unable to counteract the effect of intense oxidative stress, it affects its viability and its functionality.

We showed that incubation of astrocytes in the presence of increasing concentrations of *Ulva* extract prevented cell death caused by UVB and suppressed UVB-evoked changes on cell morphology. The negative effects of UVB exposure were strongly abolished by the addition of 50 μ g of *Ulva* protein extract in the incubation medium. Other works have also demonstrated that exposure of HeLa cells to *U. rigida* extract protected cells against death induced by oxidative stress caused by H₂O₂ [8]. Likewise, many plant extracts exhibited skin protective effects against UVB-induced ROS (on both cellular models and mice) through p53 activation [45]. Indeed, p53 protein was shown to play a crucial role in UVB protection, acting as a transcription factor that controls genes involved in the cell cycle, apoptosis and DNA repair [46]. In a recent study, Mezghani and Carrier [9] showed that the anti-oxidative effect was due to a

decrease of the calpain activation (mediated by a decrease of the intracellular ROS concentration), and to an accumulation of the anti-apoptotic protein Bcl-XL.

Moreover, to prevent cellular damage, astrocytes possess an array of cellular defense systems, including antioxidant enzymes, like SOD, glutathione peroxidase and catalase [47]. To better understand the mechanisms by which *Ulva* extract protects cells against UVB radiation, we investigated the effect of the extract on antioxidant enzyme levels, astrocyte calcium level and H₂O₂ scavenging capacity. These experiments clearly demonstrated that PE addition in the culture medium before UVB exposure led to a significant reduction in H₂O₂ generated following UVB exposure [48]. These results can be explained by the free radicals scavenging properties of the protein extract. Hamdi and coworkers reported that high concentrations of H₂O₂ induced astrocyte death, through in particular the decrease of SOD and catalase activities [47]. Likewise, we showed that exposure to UVB induced a high decrease of SOD and catalase activities on astroglial cultures and that the algal protein extract abolished this inhibitory effect. Additionally, it was shown in *U. fasciata* that SOD induced superoxide anion detoxification after UVB exposure [49]. The metabolic pathways ensuring the increase in SOD and catalase activity by PE is yet unknown. However, this effect may be due to a rapid increase in SOD and catalase expression or to a dephosphorylation process induced by an increase of intracellular calcium concentration [47,50]. Similar effect has been observed with high production of reactive oxygen species (ROS) in rat brain tumor 9L RBT cells. The present data accord well with this hypothesis since treatment of astroglial cells with UVB led to an accumulation of Ca²⁺, which was suppressed by a PE treatment. Alberdi et al. reported that Ca²⁺ signaling in glial cells can regulate gene expression, development and differentiation, and might initiate cell death. These authors pointed out a close relationship between perturbed Ca²⁺ homeostasis in glial cells and in the pathogenesis of neurodegenerative diseases [51].

In our work, we showed that PE either prevent or repair UVB-induced damages on astrocyte cells (protective activity being observed with either PE pre or post-treatment). Repair may be triggered by direct inhibition of DNA damage, of apoptosis intrinsic pathway activated by mitochondrial membrane damage (followed by activation of caspase 9 and downstream caspase-3) and/or by receptor-mediated death pathway (extrinsic pathway involving caspase 8 activation) [52]. A recent study suggested that UVB contributed to astrocyte death through the activation of both the intrinsic and extrinsic cell death pathways [53]. Furthermore, UVB irradiation may cause DNA damage by direct absorption (photo-oxidation) or indirectly by free radicals generation [54]. Finally, the PE pretreatment may provide physical protection by

Please cite this article as: A. Zehlila, et al., Glioprotective effect of *Ulva rigida* extract against UVB cellular damages, Algal Res. (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.02.001>

ARTICLE IN PRESS

10

A. Zehlila et al. / Algal Research 23 (2017) xxx–xxx

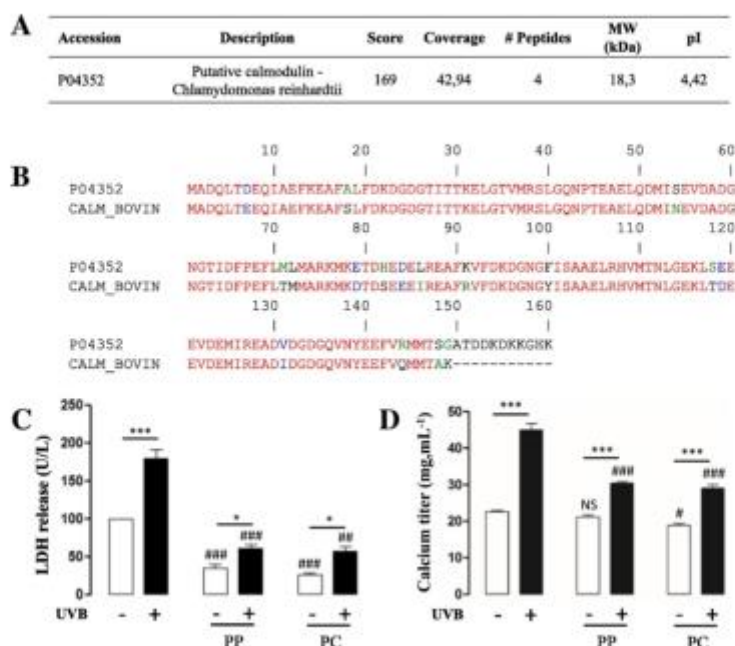


Fig. 6. Identification of a protein candidate displaying protective activity. (A) Protein identification by mass spectrometry followed by Mascot search. (B) Sequence alignment of the identified algal calmodulin and of the commercial bovin calmodulin. (C) Astrocyte cytotoxicity and (D) calcium level. For these assays, cells were incubated in the presence or absence of 20 μ g of purified calmodulin (PP) or commercial calmodulin (PC) for 2 h and then exposed or not to UV-B radiations for 15 min. Each value is the mean \pm SEM of at least four different dishes from three independent cultures. Details of ANOVA calculations: for the comparison between any given sample (for the different proteins) and the corresponding control sample (cells either not exposed or exposed to UVB without PE): #p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001; NS, not significant; for the comparison between not exposed or exposed to UVB (for each PE concentration) *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; NS, not significant.

quenching or dissipating the energy transferred from UVB [55]. Indeed, in plants and algae, but also in other some special cells like retina epithelial cells or keratinocytes, the protective processes implies detection by UVB photoreceptor which lead to activation of the expression of genes related on photo-protection in order to prevent or minimize generation of oxidizing molecules, scavenge reactive oxygen species efficiently, and repair damage occurred [56,57].

In algae, several studies have been conducted to characterize the additional potential of other biomolecules, such as polyphenols and polysaccharides, in the cellular resistance against oxidative stresses [7,11,58]. Thus, Serap and coworkers reported that the beneficial effects of some *Ulva* species can be partly attributed to the antioxidant/free-radical scavenging effect of phenolic compounds [11]. In addition, Gamze gave a summary of the anti-oxidative bioactive components of *U. rigida*, including the total phenolic content, lipid, vitamins (A, E, and C), protein, carbohydrate, and pigments [7]. In parallel, numerous papers focused on the interest of polysaccharides from seaweed like *ulvaceae* (ulvans). In particular, it was reported that sulfated polysaccharides exhibit important and diverse biological activities such as anticoagulant, antioxidant, anti-proliferative, anti-tumor, anti-complementary, anti-inflammatory, anti-viral, and anti-adhesive activities [49,58,59].

Indeed, many seaweed polysaccharides, especially acidic ones, display interesting immunomodulatory properties. Thus, Lamas and collaborators showed that acidic polysaccharides from *U. rigida* stimulate murine macrophage activities, including increased expression of

inflammatory cytokines and up-regulation of several genes associated with pro-inflammatory reactions. Noteworthy, this stimulatory capacity was lost when polysaccharides were desulfated [60]. Other works also showed that *Ulva* acidic polysaccharides were involved in antioxidant activities, like ulvans of *Ulva rigida*, which probably prevent decrease of antioxidant defenses in atherosclerosis hamsters [10,61]. In addition, sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* showed significant inhibitory effects on superoxide and hydroxyl radicals with strong reducing power and metal chelating ability. In particular, low molecular weight ulvans exhibited stronger antioxidant activity than other fractions [62]. However, Shao found that sulfated polysaccharide fractions associated to lower sulfate content showed higher antioxidant activities [49]. This work concluded that antioxidant activities of the polysaccharidic fractions were probably not due to a unique factor but rather resulted to a combination of several factors such as the uronic acid content but also the protein content [49]. This role for proteins was also proposed by Sheih and coworkers, who advanced that algae proteins were efficient to scavenge free radicals and to provide prevention against oxidative stress-related diseases such as atherosclerosis, coronary heart disease and cancer [5].

Thereafter, proteomic investigations confirmed the presence of many proteins in the PE samples. Among the identified proteins was actin, one of the most highly conserved cytoskeletal proteins in eukaryotic cells [63]. Actin plays a critical role in many cellular functions, e.g., cell motility, maintenance of cell shape and polarity to the regulation of transcription [64]. In the context of protection, it was recently

Please cite this article as: A. Zehlila, et al., Glioprotective effect of *Ulva rigida* extract against UVB cellular damages, Algal Res. (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.02.001>

ARTICLE IN PRESS

A. Zehila et al. / Algal Research 23 (2017) xxx–xxx

11

demonstrated that actin cytoskeleton contributes to the resistance of pepper against *Puccinia striiformis* stress by affecting H₂O₂ accumulation and hypersensitive response [65]. Other studies have shown that the disruption of actin cytoskeleton led to the activation of protein kinases involved in osmotic, thermal, and cold stresses [59,66]. The disruption of actin cytoskeleton might act as monitoring mechanism, which causes the activation of signaling pathways involved in defense response to stress [67].

In addition, it is known that the reorganization of actin cytoskeleton is modulated by several Ca²⁺ binding proteins such as calmodulin [68]. In our samples, we also identified the calmodulin with a high score and numerous peptides. This ubiquitous protein, regulates numerous functions mainly in a Ca²⁺ dependent manner [69]. Among other enzymes stimulated by calmodulin-Ca²⁺ complex figure a number of protein kinases and phosphatases initiating various signaling cascades [70]. It has been reported that this protein is an important stress and immune response gene in plants and Chinese mitten crab [71,72].

The cysteine synthase was also identified in algal extracts exhibiting the highest antioxidant activities. The cysteine synthase is a key enzyme in sulfur assimilation, responsible for the production of antioxidants and metal chelators such as metallothionein, phytochelatin and the most important one glutathione [72]. Cysteine synthase is a hetero-oligomeric complex of two enzymes, namely the serine acetyltransferase and O-acetylserine (thiol) lyase. This complex catalyzes biosynthesis of cysteine in plants from serine and acetyl-CoA [73]. It was reported that the cysteine synthase overexpression induced SOD gene expression in *Arabidopsis thaliana*.

After whole protein extract characterization, we performed fractionation and isolated calmodulin that displayed a particularly interesting protective activity. Calmodulin possesses structural features at the origin of its ability to bind Ca²⁺ and a wide variety of target proteins. Since its discovery [74], informations accumulated about its leading role in the control of many physiological processes such as architecture and function of the cytoskeleton, cell proliferation, inflammation, apoptosis, autophagy, metabolic homeostasis or immune response, non-exhaustively. For instance, the involvement of calmodulin in cell proliferation was first elucidated using cell model *Saccharomyces cerevisiae* [75]. Another study has also reported that mammal cells in which a viral vector leading to overexpression of calmodulin has been inserted, induced an increase in cell proliferation [76].

Most interesting in the framework of our work, calmodulin was shown to be involved in cell protection against stresses by modulating the activity of a variety of proteins including antioxidant enzymes. Thus, treatment of maize rods with different concentrations of CaCl₂ resulted in an increase of catalase activity in a dose-dependent manner [77]. Similarly in wheat, hardening of seedlings with CaCl₂ has increased protection against heat stress [78]. Obviously catalase works as a H₂O₂ cell scavenger and is essential for stress tolerance, including oxidative stress. Furthermore, the addition of a calmodulin inhibitor chlorpromazine dramatically suppressed the total enzymatic activity of the main isoform of catalase and this suppression was attenuated by the addition of exogenous calmodulin.

The combination of CaCl₂ and calmodulin in the modulation of the activity of catalase was demonstrated in several studies; for example, in rice leaves where a deficiency of calcium/calmodulin significantly reduced glutathione content and catalase activity [79]. This combination was also shown to promote increased tolerance to any kind of stress such as salt stress in mustard greens [80] or heat and cooling in *Amaranthus lividus* [81]. In addition to its protective role described in plants, this activity was also confirmed in the Chinese mitten crab [82].

All these observations sustain the protective effect of the algal protein extract, in which calmodulin was identified as a major bioactive component. In addition, complementary assays clearly demonstrate that commercial calmodulin was able to promote a very similar beneficial effect, by limiting the cytotoxicity exerted by UVB radiations.

5. Conclusions

To conclude, the present study demonstrated a potent glioprotective effect of *U. rigida* protein extract (PE) against UVB cellular damage and identified lyophilization as the best algal pre-treatment yielding the highest protecting effect. More precisely, we showed that antioxidant and proliferative effects of PE is related to the activation of endogenous antioxidant systems like SOD and catalase. Moreover, the algal protein extract also abolished oxidative damage of lipids, restored intracellular calcium balance and reduced H₂O₂ content.

Further assays identified many tens of proteins in the extract and allowed to propose calmodulin as an important contributor at the origin of these preventive effects. From this work, it cannot be excluded that other bio-compounds (such as polysaccharides or polyphenols) may also contribute to support protection against UVB radiation. However, since algal calmodulin may be produced in large quantities, it represents a valuable source of protection which will pave the route for future applications.

Author contributions

The authors T.J. and M.A. conceived and designed the experiments; A.Z.; I.B. and J.H. performed the experiments; A.S. and A.B.M. analyzed the data; O.M. and P.C. contributed reagents/materials/analysis tools; A.Z.; P.C. and T.J. wrote the paper.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was carried out as part of a collaboration between the University of Tunis El Manar (Tunisia) and the University of Rouen (France). ZA thanks the Tunisian Minister of High Education and Scientific Research; the Research Unit 00-UR-08-01 and CNRS UMR 6270 (Laboratory Polymers, Biopolymers, Surfaces, University of Rouen, 76820 Mont-Saint-Aignan, France) for supporting and funding this research.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.02.001>.

References

- [1] M. Plaza, A. Cifuentes, E. Ibáñez, In the search of new functional food ingredients from algae, *Trends Food Sci. Technol.* 19 (2008) 31–39, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2007.07.012>.
- [2] A. Agarwal, K.A. Salah, M.A. Bedaiwy, Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction, *Fertil. Steril.* 79 (2003) 829–843, [http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04848-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04848-8).
- [3] M. Valko, D. Leibritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, J. Telsch, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) 44–84, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>.
- [4] K.J. Davies, O.S. antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems, *IUBMB Life* 50 (2000) 279–289, <http://dx.doi.org/10.1080/13803728>.
- [5] L.-C. Shieh, T.-R. Wu, T.J. Fang, Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 3419–3425, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.014>.
- [6] K. Samarakoon, Y.-J. Jeon, Bio-functionalities of proteins derived from marine algae—a review, *Food Res. Int.* 48 (2012) 948–960, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.03.013>.
- [7] G. Yıldız, S. Celikler, O. Vatan, S. Dere, Determination of the anti-oxidative capacity and bioactive compounds in green seaweed *Ulva rigida* C. Agardh, *Int. J. Food Prop.* 15 (2012) 1182–1189, <http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2010.517341>.
- [8] S. Mezghani, I. Bourguiba, I. Hlaïedh, M. Amri, Antioxidant potential of *Ulva rigida* extracts: protection of HeLa cells against H₂O₂ cytotoxicity, *Biol. Bull.* 225 (2013) 1–7, <http://dx.doi.org/10.1080/BBLv225n1.p1>.

Please cite this article as: A. Zehila, et al., Glioprotective effect of *Ulva rigida* extract against UVB cellular damages, *Algal Res.* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.02.001>

ARTICLE IN PRESS

12

A. Zehlila et al. / Algal Research 23 (2017) xxx–xxx

- [9] S. Mezghani, P.N. G. A. Carrier, M. Amri, The ethanol precipitate of *Ulva rigida* protects beta cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis, *J. Food Biochem.* 39 (2015) 48–54, <http://dx.doi.org/10.1111/jfbc.12100>.
- [10] M. Godard, K. Décoré, E. Veniura, G. Soteras, J.C. Bacou, J.P. Cristol, J.M. Rouanet, Polysaccharides from the green alga *Ulva rigida* improve the antioxidant status and prevent fatty streak lesions in the high cholesterol fed hamster, an animal model of nutritionally-induced atherosclerosis, *Food Chem.* 115 (2009) 176–180, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.084>.
- [11] S. Celikler, S. T. O. Vatani, S. Ziyank-Ayralik, G. Yildiz, B. Bilaloglu, Anti-hyperglycemic and antiapoptotic potential of *Ulva rigida* ethanolic extract in the experimental diabetes mellitus, *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 47 (2009) 1837–1840, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfbc.2009.04.035>.
- [12] P. Winberg, D. Ghosh, L. Tapasa, Seaweed Culture in Integrated Multi-Trophic Aquaculture – Nutritional Benefits and Systems for Australia – 2009 (Available from: <http://ru.uow.edu.au/cgi/viewcontent.cgi?article=1004&context=umic>).
- [13] S. Guerrero, J. Cremades, Integrated Multi-trophic Aquaculture (IMTA): A sustainable, pioneering alternative for marine cultures in Galicia, 111, Regional Government of Galicia, Spain, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfbc.2012.03.007>.
- [14] J. Iothariou, J. F. van Boek, S. Payne, R. Dringen, P. Brundin, M. Leist, Progressive degeneration of human mesencephalic neuron-derived cells triggered by dopamine-dependent oxidative stress is dependent on the mixed-lineage kinase pathway, *J. Neurosci.* 25 (2005) 6329–6342, <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1746-05.2005>.
- [15] R. Resende, P.J. M. T. Frença, A. Deshpande, J. Busciglio, C. Pereira, C.R. Oliveira, Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease, *Free Radic. Biol. Med.* 44 (2008) 2051–2057, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.012>.
- [16] Y. Chen, R.A. Swanson, Astrocytes overexpressing Cu,Zn superoxide dismutase have increased resistance to oxidative injury, *Glia* 33 (2001) 343–347, [http://dx.doi.org/10.1002/1098-1136\(20010315\)33:4<343::AID-GLIA1033>3.0.CO;2-H](http://dx.doi.org/10.1002/1098-1136(20010315)33:4<343::AID-GLIA1033>3.0.CO;2-H).
- [17] Y. Hamdi, D. Vaudry, J. Leprince, A. Zarrouk, M. Hammami, H. Vaudry, M.-C. Tonon, M. Amri, O. Masmoudi-Kouki, Octadecaneuropeptide ODN prevents hydrogen peroxide-induced oxidative damage of biomolecules in cultured rat astrocytes, *Peptides* 71 (2015) 56–65, <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2015.06.010>.
- [18] M. Lu, L.-F. H. G. Hu, J.-S. Bian, Hydrogen sulfide protects astrocytes against H₂O₂-induced neural injury via enhancing glutamate uptake, *Free Radic. Biol. Med.* 45 (2008) 1705–1713, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.014>.
- [19] C. Roussel, E. Ba, A. Daniel, M. Jérôme, M. Etienne, J. Fleurence, Identification by SDS PAGE of green seaweeds (*Ulva* and *Enteromorpha*) used in the food industry, *J. Appl. Phycol.* 13 (2017) 215–218, <http://dx.doi.org/10.1023/A:1011161505839> (nd).
- [20] J. Fleurence, C.L. C. S. Mabeau, M. Maurice, A. Landrein, Comparison of different extractive procedures for proteins from the edible seaweeds *Ulva rigida* and *Ulva rotundifolia*, *J. Appl. Phycol.* 7 (1995) 377–382, <http://dx.doi.org/10.1007/BF00003940>.
- [21] B. Hsu, L.M. C. K. Ng, Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm, *Hyphaene thebaica*, *Food Chem.* 98 (2006) 317–328, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.077>.
- [22] D. Atmani, M.R. L. J. Ruiz Sanz, L. Lizcano, F. Rakkali, D. Atmani, Antioxidant potential, cytotoxic activity and phenolic content of *Cleome flammula* leaf extracts, *Planta Med.* 77 (2011) <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1282790>.
- [23] B.N. Shyamala, S. G. A. Jyothi Lakshmi, J. Prakash, Leafy vegetable extracts – antioxidant activity and effect on storage stability of heated oils, *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* 6 (2005) 239–245, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2004.12.002>.
- [24] D.R. Brown, C.M. M. Astrocytic glutamate uptake and prion protein expression, *Glia* 25 (1999) 282–292, [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(19990201\)25:3<282::AID-GLIA8>3.0.CO;2-N](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(19990201)25:3<282::AID-GLIA8>3.0.CO;2-N).
- [25] H. Castel, M. D. D. Chatelet, J. Leprince, L. Desrués, M.-T. Schouff, M. Fontaine, C. Dubessy, I. Lührmann, E. Scalbert, M. Malagon, H. Vaudry, M.-C. Tonon, P. Gandolfo, Biochemical and functional characterization of high-affinity uterine II receptors in rat cortical astrocytes, *J. Neurochem.* 99 (2006) 582–595, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04130.x>.
- [26] H.P. Misra, I. Fridovich, The generation of superoxide radical during the autooxidation of ferredoxin, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 6880–6880.
- [27] H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126, [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6875\(84\)105016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6875(84)105016-3).
- [28] H.H. Draper, M. Hadley, Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 421–431, [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6875\(90\)80135-L](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6875(90)80135-L).
- [29] B. Chance, H. Sies, A. Boveris, Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol. Rev.* 59 (1979) 527–605.
- [30] J. Stern, W.H.P. L. Serum Proteins in Mongolian, *Br. J. Psychiatry* 103 (1957) 222–226, <http://dx.doi.org/10.1192/bjp.103.430.222>.
- [31] W. Vermeir, R. N. Chemical properties of phenolic compounds, *Phenolic Compd. Biochem.* Springer Netherlands 2008, pp. 35–62, http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-5164-7_2.
- [32] A. Takahashi, J.D. Lechleiter, B. Herman, Intracellular calcium, *Physiol. Rev.* 79 (1999) 1085–1125.
- [33] Z. Li, P. S. John E. Coligan, Heat-shock proteins, *Curr. Protoc. Immunol.* A1 Appendix 1, 2004 <http://dx.doi.org/10.1002/0471142735.im01b58> (Appendix 17).
- [34] M. Farasat, R. Khavari Nejad, S.M.B. Nahavi, F. Namjooyan, Antioxidant Activity, total phenolics and flavonoid contents of some edible green seaweeds from Northern Coasts of the Persian Gulf, *Iran. J. Pharm. Res. IJPR* 13 (2014) 163–170.
- [35] M. Kende, G.W. C. S. Bertrand, C. Roussakis, N. Bourgaugnon, G. Bedoux, Lipid composition, fatty acids and sterols in the seaweeds *Ulva armata*, and *Selagin chordea* from Brittany (France): an analysis from nutritional, chemotaxonomic, and antiproliferative activity perspectives, *Mar. Drugs* 13 (2015) 5060–5078, <http://dx.doi.org/10.3390/md13095060>.
- [36] J.C. Kasper, G. W. W. Friess, Recent advances and further challenges in hypophyllization, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85 (2013) 162–169, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.05.013>.
- [37] E. Barbarino, S.O. Lourenço, An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae, *J. Appl. Phycol.* 17 (2005) 447–460, <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-005-1641-4>.
- [38] C. Saif, M. Charim, O. Fignolet, F. Silvestre, C. Vaca-García, P.Y. Postaler, Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors, *J. Appl. Phycol.* 25 (2013) 523–529, <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-012-9686-1>.
- [39] J. Shyamathi, C. Mukund, M. Thakur, R. Umamaheswara, Seaweeds of India: The Diversity and Distribution of Seaweeds of Gujarat Coast, Springer Sci. and Business Media, London, 2009.
- [40] C. Muhammad Tavir, K. Ji-Young Hossain, P. Nam Gyu, A. Dzung-Hyun, H. Yong-Ki, Distribution of phlorotannins in the brown alga *Ekolona cava* and comparison of pretreatments for extraction, *Fish. Aquat. Sci.* 14 (2011) 198–204, <http://dx.doi.org/10.5637/FAS.2011.0158>.
- [41] J.C.C. Chan, P.C.K. Cheung, P.D. Ang, Comparative Studies on the Effect of Three Drying Methods on the Nutritional Composition of Seaweed *Sargassum hemiphyllum* (Turn.) C. Ag., *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 3056–3059, <http://dx.doi.org/10.1021/jf970174b>.
- [42] A. Svobodová, D. Walterová, Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review, *Biomed. Pap.* 147 (2002) 137–145, <http://dx.doi.org/10.5507/bp.2003.019>.
- [43] J.K. Leach, G. Van Tyle, P.S. Lin, R. Schmidt-Ullrich, R.B. Mikkelsen, Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen, *Cancer Res.* 61 (2001) 3894–3901.
- [44] Á. Pérez-Sánchez, E.B.-C. N. Caturja, J. Castillo, O. Benavente-García, M. Alcaraz, V. Micó, Protective effects of citrus and rosemary extracts on UV-induced damage in skin cell model and human volunteers, *J. Photochem. Photobiol. B* 136 (2014) 12–18, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.04.007>.
- [45] A. Ferrero-Gutiérrez, A. Novell, M.T. Fernández-Sánchez, Inhibition of protein phosphatases impairs the ability of astrocytes to detoxify hydrogen peroxide, *Free Radic. Biol. Med.* 44 (2008) 1808–1816, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.029>.
- [46] D. Deczere, P. Agostinis, L.D. Peuter, H. Degreer, R. Bouillon, M. Garmyn, AKT status controls susceptibility of malignant keratinocytes to the early-activated and UVB-induced apoptotic pathway, *J. Invest. Dermatol.* 123 (2004) 207–212, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1002-202X.2004.22702.x>.
- [47] Y. Hamdi, O.M. Ka, H. Kaddour, F. Belhadj, P. Gandolfo, D. Vaudry, M. Mokni, J. Leprince, R. Hachem, H. Vaudry, M.-C. Tonon, M. Amri, Protective effect of the octadecaneuropeptide on hydrogen peroxide-induced oxidative stress and cell death in cultured rat astrocytes, *J. Neurochem.* 118 (2011) 416–428, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07315.x>.
- [48] C.-T. Shiu, T.-M. L. Ultraviolet-B-induced oxidative stress and responses of the ascorbate-glutathione cycle in a marine macroalga *Ulva fuscata*, *J. Exp. Bot.* 56 (2005) 2851–2865, <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/er277>.
- [49] P. Shao, M. C. Y. Pei, P. Sun, In vitro antioxidant activities of different sulfated polysaccharides from chlorophycean seaweeds *Ulva fuscata*, *Int. J. Biol. Macromol.* 59 (2013) 295–300, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomac.2013.04.048>.
- [50] S. Kumar, N. S. F.V. Fonseca, Y. Hou, S.M. Black, Shear stress stimulates nitric oxide signaling in pulmonary arterial endothelial cells via a reduction in catalase activity: role of protein kinase C α , *Am. J. Phys. Lung Cell. Mol. Phys.* 298 (2010) 1105–1110, <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00290.2009>.
- [51] E. Alberdi, M.V.S.-G. C. Matute, Calcium and glial cell death, *Cell Calcium* 38 (2005) 417–425, <http://dx.doi.org/10.1016/j.joicc.2005.06.020>.
- [52] C.-H. Lee, S.-B. Wu, C.-H. Hong, H.-S. Yu, Y.-H. Wei, Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis and its effects on skin residential cells: the implication in UV-based phototherapy, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 6414–6435, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms14030474>.
- [53] L. Jing, M. He, Y. Chang, L. Mehta, Q.-P. He, J.-Z. Zhang, P. Andy Li, Coenzyme Q10 protects astrocytes from ROS-induced damage through inhibition of mitochondria-mediated cell death pathway, *Int. J. Biol. Sci.* 11 (2015) 59–66, <http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.10174>.
- [54] R.T. Narendhirakannan, M.A.C. Hannah, Oxidative stress and skin cancer: an overview, *Indian J. Clin. Biochem.* 28 (2013) 110–115, <http://dx.doi.org/10.1007/s12291-012-0278-8>.
- [55] R.R. Korač, K.M. Khambholja, Potential of herbs in skin protection from ultraviolet radiation, *Pharmacogn. Rev.* 5 (2011) 164–173, <http://dx.doi.org/10.4103/0973-7847.91114>.
- [56] K.K. Niyogi, PHOTOPROTECTION REVISITED: genetic and molecular approaches, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50 (1999) 333–359, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-arplant.50.1.333>.
- [57] M. De Oliveira, V.B. Meyer-Rochow, S. Allodi, A structural study of the retinal photoreceptor, plexiform and ganglion cell layers following exposure to UV-B and UV-C radiation in the albino rat, *Microscop. Res.* 34 (2003) 395–404, [http://dx.doi.org/10.1016/S0968-4328\(03\)00081-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-4328(03)00081-7).
- [58] N. Pezura, N. L. O. Kerckhove, S. Wanlapa, Characteristics and antioxidant of *Ulva intestinalis* sulfated polysaccharides extracted with different solvents, *Int. J. Biol. Macromol.* 81 (2015) 912–919, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomac.2015.08.030>.

Please cite this article as: A. Zehlila, et al., Glioprotective effect of *Ulva rigida* extract against UVB cellular damages, *Algal Res.* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.02.001>

ARTICLE IN PRESS

A. Zehlila et al. / Algal Research 23 (2017) xxx–xxx

13

- [39] V. Sangwan, B.L. Q., J. Beyerly, H. Hirt, R.S. Dhindsa, Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways, *Plant J. Cell Mol. Biol.* 31 (2002) 629–638, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3113.02.007>.
- [40] J.M. Leiro, R. Castro, J.A. Aranz, J. Lamas, Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh, *Int. Immunopharmacol.* 7 (2007) 879–888, <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2007.02.007>.
- [41] R. Castro, M.C. Piazon, I. Zarra, J. Leiro, M. Noya, J. Lamas, Stimulation of turbot phagocytes by *Ulva rigida* C. Agardh, *Polysaccharides. Aquacul.* 234 (2006) 9–20, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.10.012>.
- [42] Z. Zhang, F. Wang, X. Wang, X.L. Liud, Y. Hou, Q. Zhang, Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity in vitro, *Carbohydr. Polym.* 82 (2010) 118–121, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.031>.
- [43] L. Zhu, Y. Z., Y. Hu, T. Wen, Q. Wang, L. Zhu, Y. Zhang, Y. Hu, T. Wen, Q. Wang, Dynamic actin gene family evolution in primates, dynamic actin gene family evolution in primates, *Biomed. Res. Int.* (2013), e030803, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/030803>.
- [44] R. Dominguez, K.C. H., Actin structure and function, *Annu. Rev. Biophys.* 40 (2011) 169–186, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-125359>.
- [45] J. Wang, H. Za, Y. Han, C. Feng, Y. Wang, Q. Ma, Evaluation of actin cytoskeleton in non-host resistance of pepper to *Fusarium striiformis* f. sp. tritici stress, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 92 (2015) 112–118, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2015.09.003>.
- [46] J. Samaj, M. O., A. Hlavacka, F. Lecourieux, I. Meskane, I. Lichtscheidl, P. Lenart, J. Salaj, D. Volkmann, L. Bögre, F. Baluska, H. Hirt, Involvement of the mitogen-activated protein kinase SLMK in regulation of root hair tip growth, *EMBO J.* 21 (2002) 3290–3300, <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/cdf349>.
- [47] C.J. Staiger, M.B. S., P. Khurana, X. Wang, D.W. McCurdy, L. Blanchin, Actin filament dynamics are dominated by rapid growth and severing activity in the Arabidopsis cortical array, *J. Cell Biol.* 184 (2009) 269–280, <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200806185>.
- [48] S. Aslam, S. B., A. Bhattacharya, The Calmodulin-like calcium binding protein EhcBPs of *Entamoeba histolytica* regulates phagocytosis and is involved in actin dynamics, *PLoS Pathog.* 8 (2012), e1003053, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003053>.
- [49] S.L. Reichow, D.M. C., J.A. Freitas, K.L. Németh-Czhalan, M. Heyden, D.J. Tobias, J.E. Hall, T. Conen, Allosteric mechanism of water-channel gating by Ca^{2+} -calmodulin, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20 (2013) 1083–1092, <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2630>.
- [70] M.W. Berchtold, A. V., The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer, *Biochim. Biophys. Acta* 1843 (2014) 398–433, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamer.2013.10.021>.
- [71] C. Cheval, D. A., J.-P. Galand, B. Ranty, Calcium/calmodulin-mediated regulation of plant immunity, *Biochim. Biophys. Acta* 1833 (2013) 1706–1771, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamer.2013.01.031>.
- [72] Q. Yang, Y. Wu, J. Zhang, W. Shi, C. Qian, X. Peng, Identification of aluminum-responsive proteins in rice roots by a proteomic approach: cysteine synthase as a key player in Al response, *Proteomics* 7 (2007) 737–749, <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200600753>.
- [73] M. Wirtz, R. H., Functional analysis of the cysteine synthase protein complex from plants: structural, biochemical and regulatory properties, *J. Plant Physiol.* 163 (2000) 273–280, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2003.11.013>.
- [74] W.Y. Cheung, C., 2'-nucleoside phosphodiesterase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38 (1970) 533–538, [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X\(70\)90747-3](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(70)90747-3).
- [75] G.H. Sun, Y. Anraku, Hal1-calmodulin is sufficient for cell proliferation. Expressions of N- and C-terminal halves of calmodulin in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 7008–7015.
- [76] A.R. Means, C.D. R., Calcium, calmodulin and cell proliferation, *Cell Calcium* 9 (1988) 313–319, [http://dx.doi.org/10.1016/0143-4109\(88\)90012-7](http://dx.doi.org/10.1016/0143-4109(88)90012-7).
- [77] M. Afyanti, H.-J. Chen, Catalase activity is modulated by calcium and calmodulin in detached mature leaves of sweet potato, *J. Plant Physiol.* 171 (2014) 35–47, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2013.10.003>.
- [78] H.-T. Liu, Z.-J. Shang, X.-Z. Li, R.-L. Ma, D.-Y. Sun, R.-G. Zhou, Calmodulin is involved in heat shock signal transduction in wheat, *Plant Physiol.* 132 (2003) 1180–1195, <http://dx.doi.org/10.1104/pp.102.018594>.
- [79] S.-C. Cho, C.H. Rao, Calcium deficiency increases Cd toxicity and Ca is required for heat-shock induced Cd tolerance in rice seedlings, *J. Plant Physiol.* 169 (2012) 892–898, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2012.02.005>.
- [80] N. Tuteja, S.K. Sopory, Chemical signaling under abiotic stress environment in plants, *Plant Signal. Behav.* 3 (2008) 525–530, <http://dx.doi.org/10.4101/psb.3.8.6180>.
- [81] S. Bhattacharjee, Involvement of calcium and calmodulin in oxidative and temperature stress of *Amaranthus lividus* L. during early germination, *J. Environ. Biol. Acad. Environ. Biol. India* 30 (2009) 557–562, <http://dx.doi.org/10.123456789/146237>.
- [82] S. Li, X. Li, X. Geng, J. Sun, Calmodulin is a stress and immune response gene in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*, *Fish Shellfish Immunol.* 40 (2014) 120–128, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2014.06.027>.

Please cite this article as: A. Zehlila, et al., Glioprotective effect of *Ulva rigida* extract against UVB cellular damages, *Algal Res.* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.02.001>

**Fiche technique des ulvanes purifiés de l'algue *Ulva armoricana*
(Origine France)**

Rapport d'analyses et d'essai n° 106038/IN11-814

Références échantillon client : Ulvanes - 50KDa - U.armoricana Date d'enregistrement : 18/07/11 Date d'analyse : 18/07/11	Nom et Adresse du destinataire ou client: Projet Interreg GIM [AP10018] Projet AP10018
--	--

Analyses	Résultat	Unité	Méthode
Matière sèche	100	% / brut	Masse constante à 103°C
Matières minérales	22	% / brut	Incinération
Masse molaire	383400	g/mol éq. pullulane	Exclusion stérique
Polyphénols	<0,1	% / brut	Folin
Galactose HPLC après méthanolyse	3,7	% sec /sec	HPLC après méthanolyse
Glucose	1,7	% sec /sec	HPLC après méthanolyse
Mannose HPLC après méthanolyse	<0,5	% sec /sec	HPLC après méthanolyse
Xylose HPLC après méthanolyse	12,7	% sec /sec	HPLC après méthanolyse
Rhamnose HPLC après méthanolyse	28,5	% sec /sec	HPLC après méthanolyse
Acide glucuronique HPLC après méthanolyse	5,8	% sec /sec	HPLC après méthanolyse

Pleubian, le 03/10/2011

Responsable du laboratoire Valorisation

Page 1 / 1



Avis au destinataire du présent rapport:

Ce rapport concerne uniquement les objets ou échantillons soumis à analyse et essai. Ce rapport ne peut-être en aucun cas reproduit totalement ou partiellement sans l'accord préalable et l'approbation du CEVA.

Résumé

Les molécules naturelles de différentes origines et essentiellement celles issues des algues marines conçoivent une panoplie de principes bioactifs naturels à fort potentiel thérapeutique. Actuellement, plusieurs recherches sont consacrées à l'isolement de nouveaux composés bioactifs à partir des ressources marines qui renferment des effets bénéfiques prometteurs pour la santé. Parmi les ressources marines, les composés bioactifs présents dans de nombreuses espèces d'algues ont des propriétés nutritionnelles et pharmaceutiques particulièrement intéressantes. Cette thèse s'intéresse aux effets bénéfiques de l'algue *Ulva rigida*. Elle concerne plus particulièrement les activités des extraits protéiques de l'algue verte *Ulva rigida*. En effet, dans la présente étude, nous avons étudié l'effet préventif d'un extrait de protéine (PE) d'*Ulva rigida* contre les dommages cellulaires induits par les UVB. Nous avons démontré qu'un traitement des astrocytes corticaux avec 50 µg de PE induit un fort effet glioprotecteur et supprime les effets nocifs des rayonnements UVB, augmentant en particulier la viabilité cellulaire. D'autres essais supplémentaires nous ont permis d'affirmer que cet extrait stimule l'activité de la catalase et de la superoxyde dismutase et inhibe la production de marqueurs de stress, tels que le H₂O₂ ou la peroxydation lipidique. Par ailleurs, la digestion protéolytique ou le traitement thermique de l'extrait d'algue ont inhibé cet effet préventif, plaidant pour le rôle prédominant de la fraction protéique. Par la suite, des études protéomiques ont permis d'identifier plusieurs protéines de l'extrait, parmi lesquelles la calmoduline s'est avérée représenter un contributeur important aux activités de protection observées à la fois sur des cultures d'astrocytes que sur des neurones en grain.

Mots clés : *ulva rigida, radiations UV-B, cellules en culture d'astrocytes de rats, glioprotection, protéines, calmoduline.*

Abstract

Natural molecules from different origins present a high therapeutic potential. Among them, molecules extracted from marine algae are particularly interesting. Several studies are currently being devoted to the isolation of new bioactive compounds from marine resources that have promising health benefits. Among the marine resources, the bioactive compounds present in many species of algae have particularly interesting nutritional and pharmaceutical properties. This thesis deals with the beneficial effects of the alga *Ulva rigida*. It relates more particularly to the activities of the protein extract of the green alga *Ulva rigida*. In this study, we studied the preventive effect of a protein extract (PE) of *Ulva rigida* against UVB-induced cell damage. We have demonstrated that treatment of cortical astrocytes with 50 µg of PE induces a strong glioprotective effect and suppresses the harmful effects of UVB radiation, in particular increasing cell viability. Other extra tests allowed us to say that this extract stimulates the activity of catalase and superoxide dismutase and inhibits the production of stress markers such as H₂O₂ or lipid peroxidation. Moreover, the proteolytic digestion or the heat treatment of the algal extract inhibited this preventive effect, arguing for the predominant role of the protein fraction. Subsequently, proteomic studies have identified several proteins in the extract, of which calmodulin has been shown to be an important contributor to the protective activities observed on both astrocyte and neuron cultures.

Key words : *ulva rigida, UV-B rays, Rat cortical astrocytes, cell culture, glioprotection, proteins, calmodulin.*