HAL
open science

Valorisation des métabolites d'algues proliférantes par voie enzymatique : applications dans les domaines de la nutrition et santé animale, végétale et humaine, de la cosmétique et de l'environnement

Anne-Sophie Burlot

To cite this version:

Anne-Sophie Burlot. Valorisation des métabolites d'algues proliférantes par voie enzymatique : applications dans les domaines de la nutrition et santé animale, végétale et humaine, de la cosmétique et de l'environnement. Biotechnologies. Université de Bretagne Sud, 2016. Français. NNT : 2016LORIS428 . tel-01511879

HAL Id: tel-01511879

https://theses.hal.science/tel-01511879

Submitted on 21 Apr 2017

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.

THESE / UNIVERSITE DE BRETAGNE-SUD
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE-SUD

Mention : Biologie Marine
Ecole Doctorale Des Sciences de la Mer

Présentée par **BURLOT Anne-Sophie**

Préparée au Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA 3884 de l'Université de Bretagne Sud

Étude de la macroalgue rouge *Solieria chordalis :* aspects écophysiologiques, production d'extraits et perspectives d'applications

Thèse soutenue le 19 décembre 2016 devant le jury composé de :

Laroche Céline
Maître de conférences, Université Blaise Pascal, Polytech Clermont Ferrand / rapportrice

Helbert William
Directeur de recherche CNRS, CERMAV Grenoble / rapporteur

Chevalier Sylvie
Professeur des Universités, Université de Rouen / examinatrice

Deslandes Éric
Professeur des Universités, Université de Bretagne Occidentale / examinateur

Bourgougnon Nathalie
Professeur des Universités, Université de Bretagne Sud / Co-directrice

Bedoux Gilles
Maître de conférences, Université de Bretagne Sud / Co-directeur

Remerciements

Ô combien il est difficile de commencer à écrire cette page par le nombre et l'importance des personnes qui ont contribué, d'une manière ou d'une autre, à l'aboutissement de ce travail de trois enrichissantes et intenses années.

Tout d'abord, j'adresse mes remerciements aux Dr. Laroche de Polytech Clermont-Ferrand, spécialiste en génie biologique (biochimie et microbiologie industrielle) et au Dr. Helbert, directeur de recherches CNRS au Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV) de Grenoble, qui me font l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse. De même que je tiens à remercier les examinateurs de ces travaux, à savoir le Pr. Chevalier du Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM) de l'Université de Rouen et le Pr. Deslandes du Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR) de l'Université de Bretagne Occidentale. Merci également au Pr. Hellio du LEMAR et au Dr. Dumay du laboratoire Mer Molécules Santé de l'Université de Nantes, spécialiste en biochimie et en génie enzymatique, d'avoir été les membres de mon comité de thèse et qui ont, par conséquent, jugé ces travaux à mi-parcours et m'ont donné des conseils et des pistes d'orientation de recherche.

J'adresse mes sincères remerciements à mes co-directeurs de thèse le Pr. Nathalie Bourgougnon et le Dr. Gilles Bedoux dont la complémentarité professionnelle est exemplaire. Il a été très agréable et productif d'être encadrée par ces deux chercheurs de l'Université de Bretagne Sud.

Pr. Nathalie Bourgougnon et Dr. Gilles Bedoux lors du congrès ISS à Copenhague en juin 2016

Parmi ses nombreuses qualités, je tiens à (re)souligner, comme l'ont déjà fait mes prédécesseurs, la motivation constante, la joie de vivre au quotidien, les remarques pertinentes et les conseils constructeurs de Nathalie. Je rajouterai à cela son dynamisme accompagné notamment d'une voix éclatante et d'une élégance féminine à prendre en exemple, sans oublier son côté très humain, sa gentillesse et sa générosité. Je suis impressionnée et admirative par tout ce qu'elle accomplit au travail, mais aussi par ce qu'elle fait à l'extérieur (photographie, livre de recettes de cuisine, foie gras aux algues, remèdes de botanistes). De plus, grâce à ses

relations, Nathalie m'a offert de nombreuses opportunités de discuter avec des personnes, venant des quatre coins du monde, s'intéressant à ma thèse et à mes projets d'avenir. Je la remercie également pour cela.

Quant à Gilles, il peut être défini, selon son premier doctorant et moi-même, comme étant l'énergie de la sagesse du bouddha incarné. Je m'explique. En effet, pour avoir partagé pendant un certain temps le même bureau, j'ai pu constater la charge de travail et les allées et venues de nombreux étudiants, professeurs, chercheurs, industriels, journalistes, élus, le sollicitant. Pourtant, à l'écoute et avec plénitude, il reste calme et patient. Ses paroles et ses actes émanent d'une sagesse toujours bonne à prendre en considération. Je retiendrai en particulier une de ses phrases qu'il m'avait dite en une fin de journée : « L'important est de toujours avancer en se donnant les moyens et en faisant ce que l'on peut ». Bien que pendant la majeure partie du temps, la force tranquille de Gilles reste canalisée, il arrive parfois que celle-ci fasse des petites escapades sur le dance floor de Sydney ou de Copenhague, entrainant avec elle et sans hésitation la foule de phycologues internationaux. Des bons et mémorables moments.

J'espère que de nombreux doctorants auront, comme moi, la chance de travailler avec ces deux enseignants-chercheurs. Je leur serai toujours reconnaissante. Merci à eux !

Comité de pilotage du projet VB2 en juin 2015 avec de gauche à droite : Tony Da Cruz (Olmix), Marie-Catherine Muzellec (Végénov), Pierre-Jacques Dauneau (Agrival), Nathalie Bourgougnon (UBS), Marie Turner (Végénov), moi-même, Gilles Bedoux (UBS), Frédéric Le Sourd (Agrival) et François Gallissot (Gallissot Missions Indusrielles). Ne sont pas présents Mathieu Isoard et Antoine Ravenel (Globe Export – Algues de Bretagne,) Pi Nyvall Collèn et Damien Berdeaux (Olmix), Alexis Guillard et Nicolas Chabord (D&Consultants).

J'adresse mes remerciements aux membres du consortium du projet VB2 et aux instances gouvernementales françaises et européennes qui ont permis la réalisation des travaux présentés dans ce manuscrit. Les échanges entre partenaires privés et publics m'ont beaucoup apporté. L'approche avec les industriels a été tout particulièrement intéressante.

Je tiens également à remercier tous les membres du LBCM ainsi que le personnel de l'UBS de Vannes que j'ai côtoyés durant ces trois dernières années. Merci aux jeunes docteurs Kévin et Ludo qui m'auront manqué après leur départ du labo. Un grand merci à Romain,

toujours prêt à rendre service, gentil, agréable et intelligent. J'adore ce qu'il fait et je serai la première lectrice de ses publications. Mme Gervois, alias Annette, ma chère collègue de biologie et de physiologie végétale et amie que j'ai eu l'énorme chance d'apprendre à connaître dès son arrivée sur la terre bretonne. Un grand merci à elle pour m'avoir aidée, pour avoir pris le temps de lire en avant-première cette thèse et pour avoir ajouté ses remarques et excellents conseils de professeure avisée.

Les deux compères, Ludovic à gauche et Kévin à droite, lors de la soutenance de Kévin en juin 2015

Annette au milieu des algues, en pleine collecte, en août 2016.

Romain travaillant sur sa présentation pour son comité de thèse lors du congrès à Copenhague en juin 2016.

Je n'oublie pas mes quatre stagiaires qui ont durement travaillé pour m'aider. Une bonne partie de leurs travaux est intégrée aux résultats présentés dans ce manuscrit. Lise, Yasmine, merci beaucoup! Thanks to the Irish Declan and Michelle, hard and nice undergraduate students from Galway University.

Merci à la future Présidente des algues d'Indonésie et attachante Maya, à Salma et son succulent couscous tunisien, à Marin-Pierre pour avoir partagé sa transformation capillaire, à Isuru, à Anne-Sophie, à Arif, à Marie, à Nolwenn, à Christel, aux Philippe D. et M., à Claudie, à Bernard, à Amélie P., à Véronique V., à Rozenn, à Sandrine, aux géologues et à tous ceux du même couloir, aux matheux et aux statisticiens pour les déjeuners, pour les « vacances » et les week-ends passés ensemble à la fac. Merci à la sympathique documentaliste et très efficace Christine Mehring, à Erwan et à Nadine toujours le sourire aux lèvres, avec qui il est toujours plaisant de commencer sa journée et dont le petit détour à l'accueil avant d'aller au labo est pleinement justifié.

The time is now to switch in English. I spent a sixth of my thesis in Canada, in Truro where I met people to who I want to say thanks. First, my sincere thanks to Dr. Prithiviraj for giving me an opportunity to spend some times in his laboratory where I learnt a lot. Thanks to all members at MBRL for their help, their friendship and support. I'll never forget my international research experience and of course people around it. Many thanks to Lady Gaga,

the peaceful man Sridar, Pramod, Pushp, Gayathri, Keval, Emily, Scott, to Dr. Borza, to my favorites Brazilians Diego, Vanessa, Filipe, Vinicius, Olivia, Pr. Leila Hayashi and to my dear friend Mahbobeh.

Lors de la 1ère mobilité en 2015, après une réunion avec Acadian Seaplant, de gauche à droite : Diego, moi-même, Pramod, Garima (Lady Gaga), Alan Critchley, Mahbobeh, personnels d'Acadian Seaplant, Sridar et Dr. Prithiviraj tout à droite. Jeff Norrie prend la photo.

Lors de la 2ème mobilité en 2016, de gauche à droite Keval, Pushp, moi-même, Mahbobeh, Olivia, Dr. Borza, Pramod et devant Filipe.

Lors de la 2ème mobilité en 2016, dans le froid canadien réchauffée par la présence chaleureuse de mes collègues et amis brésiliens avec en premier plan le Pr. Leila à gauche, Vinicius à droite et Vanessa en 4ème position derrière Vinicius.

Enfin, un énorme merci à Roly, Maloune, Emmie et à mes amies de licence Bio avec qui les retrouvailles sont toujours marquées de fous rires et d'histoires pas croyables. Merci Coco, Émilie, Estelle, Daphné et July. Merci aux handballeurs Sinagots et en particulier à mes coachs Jonesta, le philosophe technicien bienheureux comme un guadeloupéen aux discours parfois (souvent) trop longs, et tonton Xavier. Bien évidemment merci à la future équipe de France féminine composée de capt'aine Chachou, Sabine, PaOla, Romane, encore Emmie, Justine, Juliette, Clarisse, Nath, Lucie, M-C, Tiffanie, les 3 Anaïs, Audrey, Aziliz, Solenn, Laura, Paule, Annabelle, Aurélie, Marion, Solenne, Hélène et aux futures mamans Marie et Tiffenn. Merci à eux de m'avoir intégrée dans l'équipe, il y a déjà trois ans, de m'avoir fait changer d'air, de m'avoir fait rêver et pour avoir compris et accepté mes absences phycologiques.

Merci à ceux et à celles que j'ai pu malencontreusement oublier et envers qui je m'excuse par avance.

Mes derniers remerciements vont aux personnes qui me sont les plus chères pour leur amour, leur soutien et leur patience. Un immense merci, venant du fond du cœur, à mes parents, à mes deux grands frères Jean et Jacques, à ma belle-sœur Xin, à Marcela, aux petites princesses Yline et Youyou et à toute la famille Burlot-Lesné. Un grand merci également à la famille sénégalaise pour les séjours ensoleillés et à Armel pour sa présence permanente dans mon cœur. Le meilleur reste à venir.

ASB.

Table des matières

Résumé ……i
Abstract ……iii
Contribution scientifique ……v
Liste des Figures ……ix
Listes des Tableaux ……xvii
Liste des abréviations ……..xxi

Introduction générale……..1

Avant-propos : Le contexte de l'étude et les projets de recherche ……...8

1. Le projet VB2 ……8
1.1. Les partenaires privés ……...10
1.2. Les partenaires publics ……11
2. Le projet Littoralg ……..14
3. Mobilités internationales à l'Université de Dalhousie, Nouvelle-Écosse, Canada ……14

Chapitre I Les algues rouges, dont *Solieria chordalis* ……20

1. Introduction ……20
2. Histoire, distribution biogéographique et systématique ……..22
3. Environnement et écologie ……30
3.1. Rôle écologique ……..30
3.2. Milieu de vie ……...30
3.3. Proliférations ……..33
4. Morphologie, composition biochimique, physiologie et cycle de vie ……..35
4.1. Morphologies macro- et microscopiques……...36
4.2. Composition biochimique, physiologie et activités biologiques ……40
4.2.1. Les métabolites primaires ……41
4.2.2. Les métabolites secondaires ……69
4.3. Cycle de vie ……73
4.3.1. Multiplication végétative ……73
4.3.2. Reproduction sexuée ……75
5. Enjeux et applications économiques ……..78
5.1. Algues sur le marché économique ……..79
5.1.1. Les algues dans le monde ……79

5.1.2. Les algues en France ……81
5.1.3. Les algues en Bretagne ……82
5.2. Applications ……...83
5.2.1. « Légumes » et Colloïdes ……83
5.2.2. Agrofournitures et autres. ……85
5.2.3. Les AlgoBox® avec *S. chordalis*. ……86
6. Conclusion ……...87

Chapitre II Effets de la saisonnalité sur les caractéristiques biochimiques et biologiques de *Solieria chordalis* ……92

1. Introduction ……92
1.1. Les algues affectées par leur environnement ……..93
1.1.1. Influence des facteurs abiotiques ……..95
1.1.2. Influence des facteurs biotiques ……108
1.1.3. Influence des facteurs anthropiques …….....108
1.2. Écophysiologie du cycle de vie ……109
1.3. Hypothèses et cibles de recherche ……111
1.3.1. Première partie …….....112
1.3.2. Deuxième partie ……112
1.3.3. Troisième partie ……112
2. Matériels et méthodes : étude de la variabilité saisonnière de *S. chordalis* et de ses polysaccharides ……113
2.1. Matériel biologique : *S. chordalis* ……113
2.1.1. Étude sur le terrain : prélèvement *in situ*. ……113
2.1.2. Analyses microscopiques ……...115
2.2. Observations et prévisions côtières : PREVIMER et METEO France ……..115
2.3. Préparation des échantillons en vue de leur caractérisation biochimique ……117
2.3.1. Extractions acide et à l'eau pour la caractérisation de la matière première……..117
2.3.2. Extraction des polysaccharides ……..117
2.4. Analyses mensuelles de la composition biochimique ……...119
2.4.1. Détermination du taux de matière sèche de la matière première. ……119
2.4.2. Rendement d'extraction des polysaccharides. ……119
2.4.3. Dosage colorimétrique des sucres totaux. ……..120
2.4.4. Dosage colorimétrique des acides uroniques. ……122
2.4.5. Dosage colorimétrique des groupements sulfates …….....124
2.4.6. Dosage colorimétrique du 3,6-anhydrogalactose …….....126
2.4.7. Dosage colorimétrique des protéines. ……128
2.4.8. Détermination du taux de matière minérale de la matière sèche. ……130
2.5. Analyses chromatographiques et spectroscopiques ……..130
2.5.1. Profil des monosaccharides par HPAEC-PAD …….....130
2.5.2. Profil des acides aminés par GC-FID. ……135
2.5.3. Analyse des polysaccharides par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier……..135
2.6. Analyses statistiques ……137

3. Résultats et Discussion ……..137
3.1. Lieu d'étude : géomorphologie et variation saisonnière des facteurs environnementaux……..139
3.1.1. La Presqu'île de Rhuys...……139
3.1.2. Variation saisonnière des facteurs environnementaux de la Presqu'île de Rhuys …….....144
3.2. Impact des saisons sur la quantité ……149
3.2.1. Évolution de la biomasse d'algues rouges au cours des saisons …….....149
3.2.2. Variations saisonnières des morphologies macro- et microscopiques. ….....151
3.2.3. Variation saisonnière du taux de matière sèche. ……154
3.3. Impact des saisons sur la qualité. ……..157
3.3.1. Composition biochimique annuelle. …….....157
3.3.2. Impact des saisons sur la composition biochimique de la matière sèche……158
3.3.3. Récapitulatif des résultats majeurs ……165
3.4. Impact des saisons sur les polysaccharides ……...167
3.4.1. Rendement d'extraction des polysaccharides ……167
3.4.2. Analyse en Composantes Principales des spectres obtenus par spectroscopie infrarouge des polysaccharides isolés de *S. chordalis* collectée mensuellement.....169
3.5. Conclusion : aspects éco-physiologiques pour une gestion de la ressource naturelle de *S. chordalis* de la Presqu'île de Rhuys. ……...172

Chapitre III Optimisation des conditions de l'extraction assistée par enzymes en suivant une méthodologie des surfaces de réponse ……183

1. Introduction ……183
1.1. Les technologies d'extraction conventionnelles et alternatives ……...184
1.1.1. Les méthodes d'extraction conventionnelles ……..184
1.1.2. Les méthodes d'extraction alternatives. ……185
1.2. L'Extraction Assistée par Enzymes. ……187
1.2.1. Les enzymes …….....190
1.2.2. Principe de l'extraction assistée par enzymes ……191
1.2.3. Paramètres influençant l'extraction assistée par enzymes ……..192
1.3. Optimisation des conditions d'extraction par la méthodologie des surfaces de réponse. ……...195
1.3.1. Plan d'expérience : Box-Behnken ……..196
1.3.2. Statistiques et mathématiques associées au plan Box-Behnken ……..197
1.4. Hypothèses et cibles de recherches ……...198
2. Matériels et Méthodes ……...199
2.1. Matériel biologique : *S. chordalis* ……199
2.2. Matériel enzymatique ……...200
2.2.1. Les protéases ……..200
2.2.2. Les glycosidases... ……..201
2.3. Extractions ……...204
2.4. Détermination du rendement d'extraction de l'EAE ……206
2.5. Analyses de la composition biochimique ……206

2.6. Plan d'expériences de Box Behnken pour l'optimisation des conditions de l'EAE. ……206
2.7. Analyses statistiques ……207
3. Résultats et Discussions ……208
3.1. Composition biochimique de la MP de *S. chordalis* collectée en octobre 2013….209
3.2. Extraction assistée par enzymes : criblage enzymatique ……..210
3.2.1. Rendements d'extraction des extraits hydrosolubles (EHs) …….....210
3.2.2. Compositions biochimiques des extraits hydrosolubles (EHs) …….....211
3.2.3. Discussion et conclusion : sélection de l'enzyme la plus efficace pour la production d'EHs riches en matière sèche de l'algue. ……212
3.3. Méthodologie des surfaces de réponse : optimisation des conditions d'extraction selon un plan d'expériences de Box-Behnken ……215
3.3.1. Rendements d'extraction des EHs obtenus après l'application du plan d'expériences de Box-Behnken et prédiction des conditions optimales de l'EAE. ……215
3.3.2. Validation des conditions optimales de l'EAE pour une production d'EHs riches en composés. ……219
3.3.3. Influence des paramètres de l'EAE étudiés ……220
3.4. Conclusion : l'EAE, une technologie d'extraction respectueuse de l'environnement……..222

Chapitre IV Perspectives d'applications ……228

1. Introduction ……...……...228
1.1. Focus sur l'activité antivirale ……...229
1.1.1. Virus de *l'Herpes simplex* ……..233
1.1.2. Mode d'action des polysaccharides sulfatés sur VHS-1 ……235
1.1.3. Intérêts d'évaluer l'activité antiherpétique ……239
1.2. Focus sur les activités antibactérienne et immunostimulante des algues rouges chez le nématode *Caenorhabditis elegans* infecté par la bactérie pathogène *Pseudomonas aeruginosa*. ……241
1.2.1. Activités antibactérienne et immunostimulante des Gigartinales……241
1.2.2. *Caenorhabditis elegans* comme modèle d'étude …….....246
1.2.3. *Pseudomonas aeruginosa* et ses facteurs de virulence. ……...251
1.2.4. Modèle de pathogénicité *P. aeruginosa* - *C. elegans* …….....259
1.3. Production d'extraits et de composés antiviraux, antibactériens et immunostimulants issus de Gigartinales. ……263
1.3.1. Par hydrolyse ……270
1.3.2. Par extraction organique ……273
1.3.3. Par EAE ……273
1.4. Hypothèses et cibles de recherche ……275
1.4.1. Première partie …….....275
1.4.2. Deuxième partie ……276
2. Matériels et Méthodes : Applications potentielles d'extraits de S. chordalis dans les domaines de la santé et de la nutrition. ……277
2.1. Cytotoxicité et activité antivirale ……..277

2.1.1. Extraits et composés d'algues analysés ……..277
2.1.2. Cellules Vero (ATCC : CCL 81) ……279
2.1.3. Virus (VHS-1) ……284
2.1.4. Évaluations de la cytotoxicité et de l'activité antivirale par la méthode du rouge neutre …….....289
2.2. Activités antibactérienne et immunostimulante : modèle de pathogénicité *C. elegans* - *P. aeruginosa* ……294
2.2.1. Extraits d'algues analysés ……..294
2.2.2. Souche *PA14* ……..295
2.2.3. *Caenorhabditis elegans* ……296
2.2.4. Évaluation de l'activité anti-*P. aeruginosa* ……300
2.2.5. Évaluation de l'activité immunostimulante de *C. elegans* sain et infecté par *PA14*……316
2.3. Analyses statistiques ……319
3. Résultats et Discussion ……..321
3.1. Impact de la saisonnalité sur la cytotoxicité et sur l'activité anti-VHS-1, évaluée sur la matière première solubilisée et sur les polysaccharides de *S. chordalis* ……...…323
3.1.1. Cytotoxicité de la matière première hydrosoluble et des polysaccharides au cours de l'année 2015 …….....324
3.1.2. Activité antivirale évaluée sur la matière première solubilisée et sur les polysaccharides au cours de l'année 2015 ……324
3.1.3. Impact des saisons…..……325
3.1.4. Conclusion……..333
3.2. Impact de l'EAE sur la cytotoxicité et sur l'activité anti-VHS-1 évaluée sur les extraits hydrosolubles et sur leurs polysaccharides obtenus de *S. chordalis*……338
3.2.1. Criblage enzymatique……...……..340
3.2.2. Optimisation des conditions d'EAE selon le plan de Box-Behnken..……..344
3.2.3. Conclusion ……353
3.3. Impact d'extraits hydrosolubles de *S. chordalis* sur le système immunitaire de *C. elegans* et sur la virulence de *P. aeruginosa* …….....358
3.3.1. Impact sur la virulence de *P. aeruginosa* ……360
3.3.2. Un extrait hydrosoluble de *S. chordalis*, obtenu après EAE, protège et stimule le système immunitaire de *C. elegans* de l'infection par *P. aeruginosa* ……...375
3.3.3. Conclusion ……..386

Conclusion générale ……...389

Références bibliographiques ……395

Article publié (Burlot *et al*. 2016)

Lettre ouverte à *Caernohabditis elegans*

Étude de la macroalgue rouge *Solieria chordalis* : aspects écophysiologiques, production d'extraits et perspectives d'applications.

Thèse de doctorat, Biologie des sciences de la mer, Université de Bretagne Sud, 2016

Solieria chordalis (Rhodophyta, Gigartinales) s'échoue depuis de nombreuses années sur la presqu'île de Rhuys dans le sud de la Bretagne. À hauteur de plus de 2 000 tonnes par an, ces arrivées massives d'algues causent de réels problèmes écologiques et économiques pour les communes du littoral breton. Aujourd'hui, *S. chordalis* est employée essentiellement en tant que fertilisants dans les champs agricoles des communes touchées. L'objectif des travaux de recherche a été d'étudier *S. chordalis,* dans l'optique de proposer une gestion raisonnée voire durable de cette biomasse ainsi que des perspectives d'applications, notamment à base d'extraits hydrosolubles antiviraux, antibactériens et immunostimulants.

D'octobre 2013 à octobre 2015, un suivi mensuel des caractéristiques biochimiques et biologiques de *S. chordalis* de la Presqu'île de Rhuys a été réalisé. Les résultats ont montré une variation saisonnière de la biomasse sur l'estran, de la morphologie macro- et microscopique, du taux de matière sèche et de la composition biochimique de l'espèce. Néanmoins, ces variations sont similaires d'année en année, ce qui appuie l'idée d'un cycle de vie annuel de l'algue. En fonction des facteurs saisonniers environnementaux, il est désormais possible d'estimer la quantité et la composition biochimique de l'algue et de proposer des applications.

Le procédé d'Extraction Assistée par Enzymes pour ses avantages écologiques, sa spécificité et pour son efficacité catalytique a été choisi pour la production d'extraits hydrosolubles antiviraux, antibactériens et immunostimulants. Afin d'accéder à une quantité maximale de composés hydrosolubles actifs, deux étapes ont été suivies. Premièrement, la protéase commerciale Alcalase a été sélectionnée parmi huit complexes d'enzymes. En effet, Alcalase permet d'augmenter significativement de 30 % la quantité de composés hydrosolubles disponibles, par rapport à une extraction sans enzyme. Deuxièmement, une optimisation des conditions d'extraction selon un plan d'expériences a permis d'augmenter le rendement d'extraction et ainsi confirmer l'efficacité de cette technologie d'extraction éco-responsable. Près de 60 % de la matière sèche de l'algue ont été liquéfiés et solubilisés.

Les extraits hydrosolubles produits en présence d'enzymes ont montré des activités anti-herpétiques (CE_{50} de 86,0 à 145,9 µg/mL), sans montrer de cytotoxicité sur les cellules saines. Cette activité a été renforcée en isolant les polysaccharides sulfatés de ces extraits (CE_{50} d'1,3 à 9,1 µg/mL). L'activité immunostimulante a été évaluée en utilisant le modèle de pathogénicité *Caenorhabditis elegans – Pseudomonas aeruginosa*. L'application d'extraits hydrosolubles de *S. chordalis* prolonge l'espérance de vie du nématode infecté par la bactérie pathogène, notamment en stimulant l'expression de certains gènes de son système immunitaire (*zk6.7, spp-1, f28d1.3* et *f38a1.5*). En présence de ces mêmes extraits, une inhibition de la croissance bactérienne ainsi qu'une répression de l'expression de quelques gènes de la virulence de la bactérie ont aussi été observées (*rpoN* et dans une moindre mesure les gènes des systèmes *las* et *rhl*). Les extraits produits présentent donc des activités antivirales et immunostimulantes intéressantes qui permettent d'envisager des applications dans divers domaines.

Mots clés : *Solieria chordalis,* extraction assistée par enzymes, polysaccharides, méthodologie des surfaces de réponse, Virus de *l'Herpes Simplex* type 1, activité immunostimulante, C*aenorhabditis elegans.*

Study of the red and proliferative macroalga *Solieria chordalis*: ecophysiological aspects, water-soluble extracts production and potential applications.

PhD research work, Marine science biology, Université de Bretagne Sud, 2016

These last decades, *Solieria chordalis* (Rhodophyta, Gigartinales), a red and proliferative macroalga appears every year in south of Brittany on the peninsula of Rhuys. It is a question of removing more than 2 000 tons of red seaweeds, mainly composed of *S. chordalis*. These proliferations represent a true ecological problem and an economic constraint for the affected communities. Today, *S. chordalis* is essentially used as fertilizers on the agricultural fields of the affected communities. This project aims to study *S. chordalis* in order to find a way to add more value to this seaweed by proposing a rational and sustainable management as well as potential applications based on water-soluble antiviral, antibacterial and immunostimulant extracts.

From October 2013 to October 2015, *S. chordalis* was collected monthly on the same place on the peninsula of Rhuys to study its biochemical and biological characteristics. Results have shown seasonal variations in the biomass on the shore, in the macro- and microscopic morphologies, in the dry matter rate and in the biochemical composition. Nevertheless, these variations are similar every year, which underlines an annual life cycle of the seaweed. In relation with the seasonal environmental factors, it is now possible to estimate the quantity and the biochemical composition of the seaweed and to propose potential applications.

With characteristics of high catalytic efficiency, specificity, the environmental-friendly process of Enzyme-Assisted Extraction was chosen to produce water-soluble extracts with antiviral, antibacterial and immunostimulant activities. To obtain a maximum number of water-soluble and active compounds, the process was performed in two steps. First, the protease Alcalase was selected among eight different complexes of enzymes. Alcalase improved the extraction yield with a significant gain of 30 % of the water-soluble and free compounds compared to an extraction without the action of enzymes. Secondly, a response surface methodology was used to optimized the enzyme-assisted extraction. The extraction yield increased which confirmed the efficiency of the environmental friendly method of extraction. Almost 60 % of the dry matter of algae were liquefied and water-solubilized.

Water-soluble extracts produced after the action of enzymes have shown anti-herpetic activities (EC_{50} from 86.0 to 145.9 µg/mL) and no cytotoxicity was detected. This activity was improved by isolating sulfated polysaccharides from these extracts (EC_{50} from 1.3 to 9.1 µg/mL). The immunostimulant activity was evaluated by using the pathogenicity model *Caenorhabditis elegans – Pseudomonas aeruginosa*. The life span of infected nematods by pathogen bacteria increased after the application of water-soluble extracts from *S. chordalis*. Some immune genes of *C. elegans* were stimulated (*zk6.7, spp-1, f28d1.3* and *f38a1.5*). Moreover, these same extracts allowed to inhibit the bacteria growth and to suppress the expression of some genes of virulence of bacteria (*rpoN* and, to a lesser extent, some genes of the *las* and *rhl* systemes). Produced extracts present antiviral and immunostimulant activites that allow to anticipate applications for diverse domains.

Key words : *Solieria chordalis,* enzyme-assisted extraction, polysaccharides, response surface methodology, *Herpes Simplex* Virus type 1, immunostimulant activity, C*aenorhabditis elegans.*

Contributions scientifiques

En lien direct avec ce travail :

Publications

Burlot A-S, Bedoux G, Bourgougnon N (2016) Response Surface Methodology for Enzyme-Assisted Extraction of Water- Soluble Antiviral Compounds from the Proliferative Macroalga *Solieria chordalis*. Enzym Eng 05: doi: 10.4172/2329-6674.1000148.

Hardouin K, Bedoux G, **Burlot A-S,** Nyvall-Collén P, Bourgougnon N (2014) Enzymatic Recovery of Metabolites from Seaweeds. *Adv. Bot. Res.,* 71: 279 - 320.

Hardouin K, **Burlot A-S,** Umami A, Tanniou A, Stiger-Pouvreau V, Widowati I, Bedoux G, Bourgougnon N (2013) Biochemical and antiviral activities of enzymatic hydrolysates from different invasive French seaweeds. *J Appl Phycol* **26**: 1029–1042

Communications orales

[*]**Burlot A-S,** Bedoux G, Bourgougnon N (2016). Optimization of enzyme-assisted extraction for antiviral compounds isolation from proliferative seaweeds in Brittany by response surface methodology. *22nd International Seaweed Symposium Copenhagen, Denmark, 19-24 June 2016*

Burlot A-S, Bennett D, [*]Wijesekara I, Bedoux G, Bourgougnon N (2016) Are proliferative seaweeds an exploitable and sustainable resource? *22nd International Seaweed Symposium Copenhagen, Denmark, 19-24 June 2016*

[*]**Burlot A-S,** Bedoux G, Bourgougnon N (2015). Optimization of enzyme-assisted extraction for antiviral compounds isolation from proliferative seaweeds in Brittany by response surface methodology. *Journées Phycologiques de France, Université de Bretagne-Sud, Vannes, 23-25 Septembre 2015*.

[*] Orateur

*__Burlot A-S,__ Bedoux G, Marty C and Bourgougnon N (2015) Optimization of antiviral compounds isolation by enzyme-assisted hydrolysis of *Solieria chordalis* following response surface methodology. *6ème édition Polymerix. Rennes, 28-29 mai 2015*

*__Burlot A-S__ (2015) Extraction de métabolites d'algues marines par voie enzymatique : Applications dans les domaines de la nutrition, de la santé, des cosmétiques et de l'environnement. Finaliste régionale du concours international de « Ma thèse en 180 secondes ». *16ème Edition des Doctoriales Bretagne, Rennes, 16-19 février 2015.*

*__Burlot A-S,__ Bedoux G., Bougougnon N. (2014) Biochemical composition and biological activities of the proliferative red macroalga *Solieria chordalis. 5th International Society for Applied Phycology. Sydney, Australia, 22-27 June 2014*

*__Burlot A-S,__ Hardouin K, Umami A, Bedoux G, Bourgougnon N (2013). Extraction assistée par enzyme de composants d'algues : Intérêts et Avantages. *Aux journées de l'assemblée générale annuelle du GDR BIOCHIMAR, Lorient, 7-8 Novembre 2013*

Communications par affiches

Burlot A-S, Bennett D, Bedoux G, Bourgougnon N (2015) Are proliferative seaweeds an exploitable and sustainable resource? *Journées Phycologiques de France, Université de Bretagne-Sud, Vannes, 23-25 Septembre 2015.*

Burlot A-S, Bedoux G and Bourgougnon N (2015) Optimization of antiviral compounds isolation by enzyme-assisted hydrolysis of *Solieria chordalis* following response surface methodology. *6ème édition Polymerix. Rennes, 28-29 mai 2015*

Burlot A-S, Bedoux G, Douzenel P, Bourgougnon N (2014) Seasonal variation in the polysaccharides contents of the proliferative red macroalga *Solieria chordalis. 5th International Society for Applied Phycology. Sydney, Australia, 22-27 June 2014*

Burlot A-S, Hardouin K, Umami A, Bedoux G, Bourgougnon N (2013). Enzyme-assistant extraction of components from different invasive French seaweeds. *Journées de la Société Phycologique de France, Station biologique de Roscoff, 16-18 Décembre 2013*

Collaborations et autres travaux :

Publications

Hardouin K, Bedoux G, **Burlot A-S,** Donnay-Moreno C, Bergé J-P, Nyvall-Collén P, Bourgougnon N. (2016) Enzyme-assisted extraction (EAE) for the production of antiviral and antioxidant extracts from the green seaweed *Ulva armoricana* (Ulvales, Ulvophyceae) *Algal Res.* **16**, 233–239 doi: 10.1016/j.algal.2016.03.013

Kulshreshtha G, **Burlot A-S,** Marty C, Critchley A, Hafting J, Bedoux G, Bourgougnon N, Prithiviraj B (2015) Enzyme-Assisted Extraction of Bioactive Material from *Chondrus crispus* and *Codium fragile* and Its Effect on *Herpes simplex* Virus (HSV-1). *Marine Drugs* **13**: 558–580

Bedoux, G, Hardouin K, **Burlot A-S,** Bourgougnon N (2014). Bioactive Components from Seaweeds: Cosmetic Applications and Future Development. *Adv. Bot. Res*., 71: 345 – 378.

Communications orales

Bedoux G, Bouhlo R, **Burlot A-S,** Puspita M, Wijesekara I, Marty C, Terme C, Bourgougnon N (2016) Bioactive Compounds from Seaweeds: Cosmetic Applications and Perspectives. *22nd International Seaweed Symposium Copenhagen, Denmark, 19-24 June 2016*

Bourgougnon N, **Burlot A-S,** Boulho R, Freile-Pelegrin Y, Marty C, Robledo D, Bedoux G (2016) Sustainable bioprocesses for the extraction of antiherpetic polysaccharides from *Solieria chordalis*. *22nd International Seaweed Symposium Copenhagen, Denmark, 19-24 June 2016*

Hardouin K, **Burlot A-S,** Umami A, Tanniou A, Stiger-Pouvreau V, Widowati I, Bedoux G, Bourgougnon N (2013). Screening of bioactive enzymatic hydrolysates from different invasive French seaweeds. *21st International Seaweed Symposium, Bali, Indonesia, 21 – 26 April 2013.*

Hardouin K, Bedoux G**, Burlot A-S,** Marty C, Donnay-Moreno C, Bergé J-P, Nyvall-Collen P, Bourgougnon N. (2013). Biological activities of *Ulva sp.* enzymatic hydrolysates: relation between observed activities and composition of extracts. *21st International Seaweed Symposium, Bali, Indonesia, 21 – 26 April 2013*. **1er prix de la meilleure présentation orale.**

Communications par affiches

Wijesekara I, Lang M, Gemin M-P, **Burlot A-S,** Puspita M, Bedoux G, Bourgougnon N (2016) Different extraction procedures and analysis of protein from *Ulva sp.* in Brittany, France. *22nd International Seaweed Symposium Copenhagen, Denmark, 19-24 June 2016*. **2ème prix du meilleur poster.**

Hardouin K, **Burlot A-S,** Bedoux G, Nyvall-Collen P, Bourgougnon (2013). Relation between enzymatic hydrolysis conditions and the composition of *Ulva sp*. extracts. *21st International Seaweed Symposium,* Bali, Indonesia, 21 – 26 April 2013.

Animations scientifiques

Membre du comité d'organisation des Journées Phycologiques de France, Vannes, 23-25 Septembre 2015.

Membre du comité d'organisation du « 4th International Symposium On Antimicrobial Peptide ». 4-6 juin 2014, Lorient, France.

Reviewer pour le Journal of Applied Phycology

Statut national Étudiant – Entrepreneur (SNEE), 2016-2017. Réseau Pépite (Pôle Étudiant Pour l'Innovation, le Transfert, l'Entrepreneuriat)

Liste des Figures

Introduction générale

Figure 1 Organigramme du projet de doctorat mettant en évidence les quatre axes de recherche connectés les uns aux autres. ……...…...4

Avant-propos

Figure 2 Formulation des extraits algosourcés et issus de produits maraîchers pour quatre cibles commerciales, avec intégration ou non de l'Amadéite®. …….....9
Figure 3 Les quatre axes d'innovation du projet VB2. …….....9
Figure 4 Photographies des deux sites du LBCM au sein de l'Université de Bretagne Sud. …..11
Figure 5 Dimension collaborative du projet VB2. ……....13

Chapitre I Les algues rouges, dont *Solieria chordalis*

Figure 1. 1 *Solieria chordalis* (C. Agardh) J. Agardh. Photographie d'un thalle collecté à Saint Gildas de Rhuys en janvier 2015. …….21

Figure 1. 2 Distribution des espèces du genre *Solieriaceae* dans le monde. ……..24
Figure 1. 3 Roche d'1,2 milliards d'années, contenant les plus vieux fossiles d'algues retrouvés jusqu'à nos jours. Il s'agit d'une algue rouge de l'ordre des Bangiales. Elle est une preuve de formes de vie multicellulaires marquant le début de l'évolution des organismes vivants plus complexes (Musée Américain d'Histoire Naturelle, New-York, décembre 2015). …….....28
Figure 1. 4 Distribution des macroalgues et de *Solieria chordalis* sur le littoral. …….....31
Figure 1. 5 Photographies prises durant les plongées sous-marines ayant lieu en octobre et novembre 2014 dans le cadre du projet Littoralg (Perrin et Pierson 2015).....32
Figure 1. 6 Quelques photographies prises le même jour lors d'un échouage massif de *S. chordalis* en Bretagne Sud (St Gildas de Rhuys, plage de Kerfago,Morbihan, le 10 octobre 2013). …….....34
Figure 1. 7 Espèces menacées notamment par la prolifération de *S. chordalis (*Tavennec 2009, Knochel 2015). …….....35
Figure 1. 8 Morphologie macroscopique de *S. chordalis* collectée en avril 2015 à Saint Gildas de Rhuys. …….....37
Figure 1. 9 Coupe transversale d'un filament de *S. chordalis* observée au microscope optique (Grossissement x 100). …….....38
Figure 1. 10 Coupe transversale d'un filament de *S. chordalis,* observée au microscope optique mettant en avant les granules d'amidon floridéen (Grossissement x 400). …….....39
Figure 1. 11 Coupe longitudinale d'un filament de *S. chordalis* (Gabrielson et Hommerstand 1982). …….....40
Figure 1. 12 Structure des chlorophylles a et d (Kornprobst 2005). …….....43
Figure 1. 13 Exemples de structures de caroténoïdes (Kornprobst 2005).....44

Figure 1. 14 Représentation schématique de la phycoérythrine contenue dans les phycobilisomes sur la membrane des thylakoïdes des chloroplastes (modifié de Glazer 1984, Munier 2013). …….....46
Figure 1. 15 Voie de transfert de l'énergie lumineuse au sein du phycobilisome (Munier 2013) 46
Figure 1. 16 Deux acides gras polyinsaturés retrouvés chez les algues rouges.....48
Figure 1. 17 Acide dihydrohydnocarpique présent chez plusieurs *Solieriaceae* (Kornprobst 2005). …….....48
Figure 1. 18 Oxylipine chez *Chondrus crispus (*Bouarab *et al.* 2004). …….....49
Figure 1. 19 Cholestérol. …….....49
Figure 1. 20 Structures moléculaires de quelques vitamines retrouvées chez les algues rouges. …….....54
Figure 1. 21 Exemples de structures de phytohormones présentes chez les algues rouges (Kim et Chojnaka 2015). 58
Figure 1. 22 Equilibre du carbonate dans l'eau de mer (Hurd *et al.* 2014). 58
Figure 1. 23 Schéma sur le transport du carbone du CO_2 de l'atmosphère aux glucides des cellules algales eucaryotes (Hurd *et al.* 2014). 59
Figure 1. 24 Structure chimique de l'amidon floridéen. 61
Figure 1. 25 Structures chimiques de glucides de faibles poids moléculaires retrouvés chez les algues rouges (Kornprobst 2005). 62
Figure 1. 26 Métabolisme du carbone chez les algues rouges d'après Viola *et al.* 2001. 63
Figure 1. 27 Représentation schématique en 3D de la paroi des algues rouges (**A**). Les parois entourent toutes les cellules et sont visibles au microscope optique, comme par exemple sur une coupe transversale d'un filament de *S. chordalis* (**B**) (inspiré de Jouanneau 2010). 65
Figure 1. 28 Structures chimiques des unités répétitives formant l'agar (**A**) et les carraghénanes (**B**) (Kornprobst 2005). 66
Figure 1. 29 Schéma hypothétique de la biosynthèse des carraghénanes (Wong et Craigie 1978, Guibet 2007, Jouanneau 2010, Delattre *et al.* 2011, Pierre *et al*. 2014). 68
Figure 1. 30 Exemples de quelques structures chimiques de métabolites secondaires retrouvés chez les algues rouges de l'ordre des Gigartinales (Kornprobst 2005, Bedoux *et al.* 2014, Algaebase 2016). 72
Figure 1. 31 Photographie microscopique (Grossissement x 100) d'une coupe transversale d'une propagule multicellulaire observée chez *S. chordalis.* …….....74
Figure 1. 32 Thalle jeune (**A**) collecté en décembre 2014 et thalle adulte (**B**) collecté en avril 2015 de *S. chordalis.* …….....75
Figure 1. 33 Photographie microscopique d'un rameau carpogonial sur lequel est fixé un carpogone (longues flèches) et d'un résidu de trichogyne (tête de flèche) (Gabrielson et Hommersand 1982). …….....76
Figure 1. 34 Cycle de vie des algues rouges de la famille des *Solieriaceae* de l'Ordre des Gigartinales (modifié de Bast 2014). …….....76
Figure 1. 35 Photographies macro- et microscopiques d'organes reproducteurs de *Solieria* (prises par Robledo et Burlot en 2016). …….....78
Figure 1. 36 Production mondiale par groupes de macroalgues d'après l'IFREMER *(ifremer.fr, 2016).* ……..80
Figure 1. 37 Production mondiale des macroalgues cultivées en 2012 (FAO 2014.....81
Figure 1. 38 Une trentaine d'entreprises bretonnes travaillant à base d'algues (Article de presse dans le Télégramme du 6 octobre 2013). …….....83
Figure 1. 39 Familles d'applications des algues dans le monde et en Europe (CEVA 2009, modifié par Burlot, 2013). ……84

Figure 1. 40 Schéma du système AlgoBox® créé par le laboratoire des Domaines Océaniques (Cochet 2015). …….....86
Figure 1. 41 Deux types AlgoBox® installés en juillet 2014 sur la plage de Penvins dans le Morbihan, France (**a** et **b**) ; échouage massif d'algues rouges et remplissage des AlgoBox® avec *S. chordalis* (**c**) ; colonisation des AlgoBox® par la végétation (d) (Sedrati et Cochet 2015). …….....87

Chapitre II Les effets de la saisonnalité sur les caractéristiques biocimiques et biologiques de *Solieria chordalis*

Figure 2. 1 *S. chordalis* affectée par son environnement …….....94

Figure 2. 2 Modèle général de la circulation thermohaline, "Global Conveyo Belt" *(NASA 2015).* ….....95
Figure 2. 3 Organigramme du projet de doctorat mettant en évidence la deuxième étude traitant les effets de la saisonnalité sur les caractéristiques biochimiques et biologiques de la matière-première (MP) et des polysaccharides (PS) de *S. chordalis,* collectés tous les mois au même endroit pendant trois ans (2013-2015). …….....111
Figure 2. 4 Images satellites de la plage de Kerfago à Saint Gildas de Rhuys (**A**), sur la côte Atlantique (**B**) en Bretagne sud (**C**) *(DigitalGlobe, Google Earth 2016).* ……....113
Figure 2. 5 Prétraitement des algues. …….....114
Figure 2. 6 Exemple de données issues du projet PREVIMER et utilisées dans l'étude de la variation saisonnière de *S. chordalis (previmer.org, 2016).* …….....116
Figure 2. 7 Exemple de données de l'ensoleillement et des précipitations de 2014 (**A**), issues de Météo France, mesurée à la station de Lorient à 90 km de Saint Gildas de Rhuys (**B**) et utilisées dans l'étude de la variation saisonnière de *S. chordalis (meteofrance.com, 2016).* …….....116
Figure 2. 8 Extraction et isolement des polysaccharides. …….....118
Figure 2. 9 Principe et réaction du dosage des sucres totaux par la méthode de Dubois *et al.* 1956 *(Pierre 2010).* …….....120
Figure 2. 10 Gamme d'étalonnage du glucose et zone de linéarité d'après la méthode de Dubois *et al* (1956). …….....121
Figure 2. 11 Principe et réaction du dosage des acides uroniques par la méthode de Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973) modifiée par Filisetti-Cozzy *et al.* (1991) *(Pierre 2010)* …….....122
Figure 2. 12 Gamme d'étalonnage de l'acide glucuronique et zone de linéarité d'après la méthode de Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973) modifiée par Filisetti-Cozzy *et al.* (1991). …….....123
Figure 2. 13 Principe et réaction du dosage des groupements sulfate liés aux polysaccharides par la méthode de Jaques *et al.* (1968) *(Pierre 2010)* …….....124
Figure 2. 14 Gamme d'étalonnage du dextran sulfaté et zone de linéarité inspirée de la méthode de Jaques *et al.* (1966). …….....125
Figure 2. 15 Gamme d'étalonnage du fructose et zone de linéarité d'après la méthode de Yaphe et Arsenault (1965) …….....128
Figure 2. 16 Principe et réaction du dosage des protéines par la méthode de Smith *et al.* (1985) *(Pierre 2010)* …….....128
Figure 2. 17 Gamme d'étalonnage du BSA et zone de linéarité d'après la méthode de Smith *et al.* (1985). ……...129
Figure 2. 18 Incinération de la matière organique des échantillons dans un four à moufle à 685 °C (**A**) et obtention de la matière minérale (**B**). …….....130

Figure 2. 19 Colonne CarboPac PA1. Les fonctions amines quaternaires des microbilles de latex se fixent aux groupements SO_3^- du substrat de la colonne (Dionex, 2013) 131
Figure 2. 20 Fonctionnement du détecteur PAD. 132
Figure 2. 21 Système HPAEC-PAD. 132
Figure 2. 22 Chromatogramme présentant les temps de rétention des différents standard (**A**) et tableau récapitulatif de calibration (**B**). 133
Figure 2. 23 Programme d'élution de l'HPAEC-PAD. 134
Figure 2. 24 Spectromètre infrarouge (à gauche) et collecte des données sur le logiciel OMNIC.....136
Figure 2. 25 Démarche scientifique suivie pour l'étude des effets de la saisonnalité, d'octobre 2013 à octobre 2015, sur les caractéristiques biochimiques et biologiques de *S. chordalis* de la Presqu'île de Rhuys. Les cibles mentionnées dans la partie introductive de ce chapitre sont rappelées sur cet organigramme 138
Figure 2. 26 Communes de la Presqu'île de Rhuys (**A**) et cadre général du domaine littoral sud breton (**B**, modifié d'après Menier, 2004) (Dubois 2012, DigitalGlobe, Google Earth 2016) 140
Figure 2. 27 Modèle numérique de terrain (**A**) et coupe schématique du pré-continent breton (**B**). Modifié d'après Menier et Dubois (2010) *(Dubois 2012).* 141
Figure 2. 28 Photographies par satellite des quatre lieux de collectes de *S. chordalis,* utilisée pour différents travaux de recherche. Pour chaque étude, le mois et l'année de collecte sont mentionnés quand les données étaient disponibles *(*DigitalGlobe, Google Earth 2016*).* 143
Figure 2. 29 Paramètres extérieurs mesurés sur trois ans, près de la presqu'île de Rhuys. Températures mensuelles de l'eau de mer (**A**), matière minérale en suspension (**B**), salinité de l'eau de mer (**C**), force du vent (**D**), ensoleillement et précipitations (**E**), quantité de chlorophylles et pourcentage d'oxygène dissous dans l'eau de mer (**F**) *(les valeurs sont issues des données de Previmer et de Météo France).* 145
Figure 2. 30 Quantités de nitrate, de phosphate, de silicate et d'ammonium dans l'eau de mer, mesurées près de la presqu'île de Rhuys en 2013,2014 et en 2015 (*issus des données de Previmer).* 146
Figure 2. 31 Photographies de la plage de Kerfago à Saint Gildas de Rhuys et de la biomasse d'algues rouges, essentiellement constituée de *S. chordalis,* d'octobre 2013 à octobre 2015. 149
Figure 2. 32 Photographie d'un échantillon de la biomasse algale échouée sur la plage de Kerfago à Saint Gildas de Rhuys en octobre 2013. 150
Figure 2. 33 Les différentes morphologies macroscopiques et les coupes transversales microscopiques associées de *S. chordalis* au cours des saisons. 152-153
Figure 2. 34 Variation saisonnière du taux de MS de *S. chordalis* d'octobre 2013 à octobre 2015. 155
Figure 2. 35 Variation saisonnière de la composition biochimique de *S. chordalis* d'octobre 2013 à octobre 2015 et en particulier de la teneur en sucres totaux (**A**), en acides uroniques (**B**) et en groupements sulfates (**C**) 158-159
Figure 2. 36 Variation saisonnière de la composition en acides aminés de *S. chordalis* d'octobre 2013 à octobre 2015. 161
Figure 2. 37 Variation saisonnière de la composition en monosaccharides de *S. chordalis* d'octobre 2013 à mars 2015. 163
Figure 2. 38 Exemple d'un chromatogramme montrant la composition en monosaccharides de *S. chordalis* collectée en octobre 2013. 164
Figure 2. 39 Variation saisonnière du rendement d'extraction des polysaccharides obtenus à partir de la matière première collectée mensuellement durant l'année 2015. 167

Figure 2. 40 Exemples de spectres obtenus, après passage au spectromètre infrarouge, de polysaccharides isolés de *S. chordalis* ainsi que d'un carraghénane standard de type iota, dont quelques nombres d'ondes retrouvés chez les phycocolloïdes sont indiqués.....169
Figure 2. 41 Analyse en Composantes Principales des spectres infrarouges des polysaccharides issus de *S. chordalis* collectée mensuellement et des carraghénanes standards de type iota, kappa et lambda. 170
Figure 2. 42 Résumé des principaux résultats de l'étude de la saisonnalité sur les caractéristiques biochimiques de *S. chordalis*. 173

Chapitre III Optimisation des conditions de l'extraction assistée par enzymes en suivant une méthodologie des surfaces de réponse

Figure 3. 1 Schéma réactionnel général de l'hydrolyse enzymatique de type protéase (Dumay 2006) 192
Figure 3. 2 Influence de la température sur la réaction enzymatique (Dumay 2006). 193
Figure 3. 3 Effet de la concentration de l'enzyme sur une quantité de substrat fixe, transformée au cours du temps (**A**) et sur la vitesse de réaction enzymatique (**B**) (Dumay 2006). .194
Figure 3.4 Plan d'expérience de Box-Behnken à trois facteurs (paramètres) (Goupy 1997). ..196
Figure 3. 5 Organigramme du projet de doctorat mettant en évidence l'étude consistant à produire des extraits hydrosolubles (EHs) riches en composés algaux par une technologie éco-responsable, à savoir l'extraction -assistée par enzymes. Les EHs sont tous obtenus à partir d'un même matière première (MP) de *S. chordalis,* collectée en octobre 2013. Des témoins négatifs (TNs) d'extraction sans enzyme ont servi de contrôles afin de mettre en évidence l'effet des enzymes dans la libération de composés algaux dans l'eau. 199
Figure 3. 6 Protocole de l'EAE. 205
Figure 3. 7 Démarche scientifique suivie pour l'étude de l'optimisation de l'extraction assistée par enzymes (EAE) suivant une méthodologie des surfaces de réponse. Les extraits hydrosolubles (**EHs**) sont tous issus de la même matière première (**MP**) de *S. chordalis* collectée en octobre 2013, lors de grands échouages. Les deux cibles mentionnées dans la partie introductive de ce chapitre sont rappelées sur cet organigramme. 208
Figure 3. 8 Rendements d'extraction des EHs obtenus à partir de *S. chordalis,* après EAE (180 mn, 50°C, 5% E/S). 210
Figure 3. 9 Surfaces de réponses du rendement d'extraction assistée par Alcalase estimées selon le temps d'extraction, la température et le ratio E/S. 218
Figure 3. 10 Résumé des principaux résultats de l'étude sur l'optimisation des conditions de l'extraction assistée par enzymes en suivant une méthodologie des surfaces de réponse pour la production d'extraits hydrosolubles riches en composés potentiellement actifs, issus de la macroalgue rouge proliférante *S. chordalis.* 224

Chapitre VI Perspectives d'applications

Figure 4. 1 Structure d'une particule virale de *l'Herpes Simplex* (Shutterstock *en ligne 2016 modifié par Burlot AS*). 234
Figure 4. 2 Boutons d'herpès après infection du virus *Herpes Simplex* de type 1. 235
Figure 4. 2b Structure chimique de l'héparine (Sigma aldrich *en ligne* 2016)……...236

Figure 4. 3 Photographie prise au microscope électronique d'une particule virale *d'Herpes simplex* virus altérée x 80 000 (Bourgougnon 1994 et modifié par Burlot 2016). 238
Figure 4. 4 Structures chimiques des molécules synthétiques utilisées dans les traitements antiherpétiques. 240
Figure 4. 5 Anatomie de *C. elegans* adulte hermaphrodite *(modifié de Wormatlas.org par Burlot 2016*). 248
Figure 4. 6 Cycle de vie de *C. elegans* (wormbook.org, modifié par Burlot 2016). 249
Figure 4. 7 Couverture du journal international Science publié en 1998. 250
Figure 4. 8 *Pseudomonas aeruginosa* observée au microscope électronique à balayage (**A**, **B et D**) et à l'œil nu (**C**) (Stewart et William Costerton 2001; Tsang *et al.* 2003; Burlot 2015) 252
Figure 4. 9 Facteurs de virulence chez *P. aeruginosa* (de Bentzmann et Plésiat 2011). 254
Figure 4. 10 Schéma du QS de *P. aeruginosa* (Kipnis *et al.* 2006 modifié par Burlot 2016). .256
Figure 4. 11 Structures chimiques des antibiotiques utilisés contre les infections de *P. aeruginosa*. 257
Figure 4. 12 Photographies d'une partie de l'intestin de C. elegans infecté par PA14 marquée à la GFP prises au microscope à contraste interférentiel de Nomarski (A) et à fluorescence (B et C). Échelle : un ver est long d'environ 1 mm et son diamètre est d'environ 80 µm (Tan *et al.* 1999; Estes *et al.* 2010). 260
Figure 4. 13 Modèle de pathogénicité entre *C. elegans* et *P. aeruginosa* et réponses du système immunitaire du nématode infecté. 261
Figure 4. 14: Organigramme du projet de doctorat mettant en évidence les dernières études traitant les activités biologiques évaluées sur la matière-première hydrosolubilisée (**MPHS**), sur des extraits hydrosolubles (**EH**) et sur des polysaccharides (**PS**) de *S. chordalis,* collectés et produits d'après les chapitres II et III. 275
Figure 4. 15 Organigramme des différents échantillons analysés pour leur activité antivirale et leur cytotoxicité. Au total, il existe 20 échantillons. Chaque encadré coloré correspond à un ou plusieurs échantillons. Chaque échantillon a été testé en 2 RB et 4 RT (soit n=8). 278
Figure 4. 16 Photographies d'un singe vert (**A**) et de cellules Vero, *in vitro*, saines (**B**) et infectées par le VHS-1 (**C***)* (Thouvenot *et al.* 2004, modifié par Burlot 2016). 280
Figure 4. 17 Organisation de la microplaque 96 puits pour la titration du virus. **CC** : Contrôles Cellules ; **10^{-1}** à **10^{-8}** : Facteur de dilution de la suspension virale stock. 286
Figure 4. 18 Organisation de la microplaque 96 puits pour les évaluations de cytotoxicité et de l'activité antivirale. 291
Figure 4. 19 Photographie d'une microplaque 96 puis après les évaluations de la cytotoxicité et de l'activité antivirale de deux echantillons de *S. chordalis* après la coloration au rouge neutre. 293
Figure 4. 20 Courbe de croissance de PA14 au cours du temps. 296
Figure 4. 21 Photographie de la hotte dédiée aux manipulations avec *C. elegans* au Marine Bio-Products Research Laboratory de l'Université de Dalhousie au Canada (*Burlot 2014*). 298
Figure 4. 22 Organisation de la microplaque 96 puits pour évaluer et quantifier l'activité anti-PA14. 302
Figure 4. 23 Organisation de la microplaque 96 puis qui sert de support pour les séries de dilution au 10ième. 304
Figure 4. 24 Schéma des étapes suivies pour l'analyse de l'expression des gènes de virulence de PA14. 306
Figure 4. 25 Vérification de la pureté de l'ARN, étape importante avant la conversion en ADN complémentaire 308

Figure 4. 26 Système qPCR, visualisation et validation des résultats bruts par les courbes de fusion et les courbes PCR d'amplification. 312
Figure 4. 27 Schéma de la démarche expérimentale pour évaluer la survie du nématode sain (avec OP50) ou infecté par PA14. 316
Figure 4. 28 Démarches scientifiques suivies pour les trois études concernant les perspectives d'applications des extraits de *S. chordalis* de la Presqu'île de Rhuys. Les cibles mentionnées dans la partie introductive de ce chapitre sont rappelées sur cet organigramme. 322
Figure 4. 29 Analyse en Composantes Principales des facteurs environnementaux, de la cytotoxicité des MPHSs et de l'activité antivirale des MPHSs et des PSs de *S. chordalis* collectée mensuellement. 326
Figure 4. 30 Matrice des corrélations entre la cytotoxicité, l'activité anti-VHS-1 et les paramètres du milieu de vie des algues en fonction des mois de collecte (package « corrplot » de Wei et Simko, 2016). 327
Figure 4. 31 Matrice des corrélations entre les paramètres saisonniers du milieu, les compositions biochimiques de la MP et des PS, la cytotoxicité de la MPHS et l'activité antivirale de la MPHS et des PS de *S. chordalis* collectée tous les mois de 2015 (sous R avec le package « corrplot » de *Wei et Simko, 2016*). 331
Figure 4. 32 Résumé des principaux résultats de l'étude sur l'impact de la saisonnalité sur la cytotoxicité et sur l'activité antivirale de la matière première hydrosolubilisée (MPHS) et des polysaccharides (PS) de *S. chordalis.* 337
Figure 4. 33 Impact de l'extraction assistée par différentes enzymes sur l'activité antivirale. 339
Figure 4. 34 Activité antivirale des extraits de *S. chordalis* obtenus après EAE et après hydrolyse sans apport d'enzyme selon des températures, des temps et des quantités d'enzymes différentes. Le rapport E / S est représenté par les barres ; ces dernières sont regroupées selon le temps d'extraction. Pour chaque graphique, une température d'extraction est fixée à 25 °C (**A**) ; à 37,5 °C (**B**) et à 50 °C (**C**). 346
Figure 4. 35 Représentation en 3D de l'activité anti-VHS-1 sous forme de diagramme tridimentionnel (à droite) et d'un tracé de contours (à gauche) ; en fonction de la température et de la durée d'extraction (**A**), de la température et du rapport E / S (**B**) et en fonction de la durée et du rapport E / S (**C**). L'encadré au-dessus de chaque diagramme tridimensionnel indique la troisième variable fixe, selon une des solutions proposées des conditions d'extraction optimisées et prédites par le modèle. 350
Figure 4. 36 Représentation en 3D de la désirabilité d'obtenir des extraits riches en composés anti-VHS-1 sous forme de diagramme tridimensionnel (à gauche) et d'un tracé de contours (à droite) ; en fonction de la température et de la durée d'extraction (**A**), de la température et du rapport E / S (**B**) et en fonction de la durée et du rapport E / S (**C**). L'encadré au-dessus de chaque diagramme tridimensionnel indique la troisième variable fixe, selon une solution proposée des conditions d'extraction optimisées et prédites par le modèle. 354
Figure 4. 37 Résumé des principaux résultats de l'étude sur l'impact de l'Extraction Assistée par Enzymes et des paramètres d'extraction sur la cytotoxicité et sur l'activité antivirale évaluées sur les extraits hydrosolubles et les polysaccharides de *S. chordalis*. 357
Figure 4. 38 Démarche scientifique suivie pour l'étude concernant l'activité immunostimulante et l'activité antibactérienne évaluées sur des extraits hydrosolubles de S. chordalis obtenus après et sans EAE. Le modèle de pathogénicité entre *C. elegans* et *P. aeruginosa* a été utilisé. 359
Figure 4. 39 Observation qualitative de l'effet d'un extrait hydrosoluble de *S. chordalis* sur la croissance de *P. aeruginosa.* 360

Figure 4. 40 Dénombrement de colonies de PA14 après la méthode des microdilutions appliquée sur l'extrait SCEE (**A**) et les résultats quantitatifs (**B**). 363
Figure 4. 41 Dénombrement de colonies de PA14 après la méthode des microdilutions appliquée en présence de carbénicilline (**A**) et les résultats quantitatifs (**B**). 364
Figure 4. 42 Inhibition de la croissance de PA14 après application d'un antibiotique et de deux extraits hydrosolubles de *S. chordalis*. 366
Figure 4. 43 Expressions des gènes intervenant dans le quorum sensing de PA14 après 6h et 24h de contact avec les extraits de *S. chordalis*. 368
Figure 4. 44 Expressions des gènes intervenant dans la virulence de PA14 après 6h et 24h de contact avec les extraits de *S. chordalis*. 371-372
Figure 4. 45 Effet de l'extrait hydrosoluble de *S. chordalis*, SCEE, sur la formation de biofilm de PA14. 375
Figure 4. 46 Effets d'extraits aqueux de *S. chordalis* obtenus après EAE (**A**) ou dans les mêmes conditions mais sans enzyme (**C**) sur l'espérance de vie de *C. elegans* infecté par PA14 au cours du temps (**A**) et leur temps létal 50% (**B et D** respectivement) 377
Figure 4. 47 Effets d'extrait aqueux de *S. chordalis* obtenus après EAE (**A**) ou dans les mêmes conditions mais sans enzyme (**C**) sur la santé de *C. elegans*, au cours du temps (**A**) et leur temps létal 50% (**B et D** respectivement). 380
Figure 4. 48 Bilan de l'interaction entre *C. elegans* et *P. aeruginosa* en présence d'extrait hydrosoluble de *S. chordalis*.....387

Liste des Tableaux

Chapitre I Les algues rouges, dont *Solieria chordalis*

Tableau I. I Principaux arguments du choix de *Solieria chordalis* comme sujet d'étude de recherche.....22

Tableau I. II Systématique des algues selon des critères morphologiques, biochimiques et cytologiques (Feldman 2011 modifié par Burlot 2013). …….....25
Tableau I. III Classes, Ordres et nombre d'espèces d'algues rouges. Focus sur les Gigartinales.....27
Tableau I. IV Récapitulatif de la systématique de *Solieria chordalis*. ….....29
Tableau I. V Fonctions et éléments inorganiques essentiels des algues (modifié de Lobban et Harrison 1994). …….....50
Tableau I. VI Exemples de vitamines retrouvées chez les algues rouges. …….....53
Tableau I. VII Phytohormones endogènes retrouvées chez les algues 56-57
Tableau I. VIII Tonnages (en matière fraîche) et chiffres d'affaires de l'aquaculture et de la production des algues dans le monde en 2004 et en 2012. …….....79
Tableau I. IX Algues françaises utilisées pour leurs propriétés et/ou activités biologiques (Mesnildrey *et al*. 2012). …….....85

Chapitre II Les effets de la saisonnalité sur les caractéristiques biochimiques et biologiques de *Solieria chordalis*

Tableau II. I Effets du stress thermique sur la biologie et la physiologie cellulaires des algues (Eggert 2012*)*. …….....97

Tableau II. II Effets du stress osmotique sur la biologie et la physiologie cellulaires des algues (Hurd *et al.* 2014). …….....98
Tableau II. III Réponses cellulaires et physiologiques des algues en fonction de l'apport en lumière (Bondu *et al.* 2008; Hanelt et Figueroa 2012). …….....101
Tableau II. IV Réponses générales des algues rouges face aux changements d'apports en nutriments dans l'eau de mer. …….....103
Tableau II. V Impacts de la dessiccation et du mouvement de l'eau sur les algues, qui en réponse modifient leur fonctions cellulaires, morphologiques et physiologiques (Kain et Notron 1990; Reis *et al.* 2008; Hurd *et al.* 2014). ….....104
Tableau II. VI Exemples d'impacts des facteurs abiotiques sur des Gigartinales. 106-107
Tableau II. VII Composition biochimique de *S. chordalis* d'octobre 2013 à octobre 2015....157
Tableau II. VIII Valeurs des facteurs environnementaux et résultats de l'étude de la saisonnalité sur les caractéristiques biochimiques de *S. chordalis,* collectée sur la Presqu'île de Rhuys d'octobre 2013 à octobre 2015. 175-177

Chapitre III Optimisation des conditions de l'extraction assistée par enzymes en suivant une méthodologie des surfaces de réponse

Tableau III. I Composés d'intérêt extraits de Gigartinales par EAE. 189

Tableau III. II Classification des glycosidases et des protéases selon l'IUBMB. 191
Tableau III. III Plan d'expérience de Box-Behnken à trois facteurs (paramètres) et essais à mener selon les différentes modalités que prend chaque facteur (-1, 0 et 1) (Goupy 1997) 197
Tableau III. IV Activités, taux de matière sèche et prix des enzymes *(par Novozyme)* utilisées pour cette étude. 204
Tableau III. V Plan d'expérience de Box Behnken avec les valeurs de chaque paramètre, étudiées pour l'EAE avec l'enzyme la plus efficace. 207
Tableau III. VI Taux de matière sèche et composition biochimique de *S. chordalis*. 209
Tableau III. VII Compositions biochimiques des EHs après l'action de différentes enzymes (180 min, 50°C, 5 % E/S). 211
Tableau III. VIII Conditions de l'extraction assistée par la protéase Alcalase et réponses obtenues correspondant au rendement d'extraction des composés hydrosolubles de *S. chordalis* après application du plan d'expériences de Box-Behnken. 215
Tableau III. IX Analyses de variances des paramètres d'extraction pour la réponse du rendement d'extraction des EHs. 217
Tableau III. X Valeurs prédites mathématiquement selon des conditions optimales d'extraction et valeurs obtenues après expérience. 219
Tableau III. XI Résumé des conditions de l'EAE avec la protéase Alcalase et résultats des rendements d'extraction et des compositions biochimiques de EHs obtenus, avant et après optimisation. 220

Chapitre IV Perspectives d'applications

Tableau IV. I Activité antivirale reportée chez les algues rouges de l'ordre des Gigartinales. 230-232
Tableau IV. II Classification phylogénétique de *Caenorhabditis elegans(Goussen 2013)*....246
Tableau IV. III Classification phylogénétique de *Pseudomonas aeruginosa* (Frank 2012). .251
Tableau IV. IV Productions d'extraits antiviraux, antibactériens et immunostimulants reportées chez les Gigartinales (5/5). 264-268
Tableau IV. V Exemple de calcul du facteur **e**, utilisé pour la détermination du titre infectieux de la solution virale stock (inspiré par Reed et Muench 1938 ; Bourgougnon 1994). 287
Tableau IV. VI Composition du tampon Sorensen intervenant dans la solution tampon citrate-éthanol. 293
Tableau IV. VII 10 concentrations différentes (C1 à C10) de l'extrait d'algue et de la molécule de référence sont évaluées afin de quantifier l'activité antibactérienne anti-PA14. ...302
Tableau IV. VIII Amorces des gènes de virulence de PA14 utilisées dans cette étude. 315
Tableau IV. IX Amorces des gènes du système immunitaire de *C. elegans* utilisées dans cette étude. 319
Tableau IV. X Cytotoxicité et activité antivirale des MPHSs de *S. chordalis* et de ses polysaccharides au cours de l'année 2015. 323
Tableau IV. XI Bilan de l'impact des saisons sur l'activité antivirale et la cytotoxicité de la MPHS et des PSs de *S. chordalis*. 334
Tableau IV. XII Rendement d'extraction et activité anti-VHS-1 de *S. chordalis* selon différentes conditions d'extractions assistées par la protéase Alcalase. 345

Tableau IV. XIII Analyses de variance des paramètres d'extraction pour la réponse de la CE_{50} des extraits hydrosolubles. 348
Tableau IV. XIV Compositions biochimiques des extraits hydrosolubles de *S. chordalis* obtenus après une extraction à 50°C pendant 3h avec 2,5 % d'Alcalase (SCEE) et sans enzyme (SCTN). 361
Tableau IV. XV Expression quantitative de 7 gènes du SI de *C. elegans* sain et infecté par PA14 après 6h et 24h d'incubation par rapport à *C. elegans* en présence d'OP50 et d'eau après 6h de contact. 382

Liste des Abréviations

AA : Acide Aminé

CA : Chiffre d'Affaires

CC_{50} : Concentration Cytotoxique 50 %

CE_{50} : Concentration Efficace 50 %

CEVA Centre d'Études et de Valorisation des Algues

DO : Densité Optique

EAE : Extraction Assistée par Enzymes

EH : Extrait Hydrosoluble

E/S : ratio Enzyme / Substrat

FAO : Food and Agriculture Organization of the United nations : organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.

GRAS : Generally Recognized As Safe. Substance non toxique pour des applications chez l'humain. Reconnu par la FAO.

HCl : acide chlorhydrique

HS : Héparane Sulfate

IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER

MAA : Mycosporine-like Amino-Acide

MOI : Multiplicity Of Infection : multiplicité d'infection d'un virus

MP : Matière Première

MPHS : Matière Première HydroSolubilisée

MS : Matière Sèche

-OH : groupement hydroxyle

PS : PolySaccharide

QS : Quorum Sensing

RB : Réplicat Biologique

RQ : Quantification relative (en anglais Relative Quantification)

RT : Réplicat Technique

ROS : Reactive Oxygen Species : dérivé réactif de l'oxygène

SCEE : extrait hydrosoluble obtenu après EAE de *Solieria chordalis*

SCTN : extrait hydrosoluble témoin négatif de *Solieria chordalis*

SI : Système Immunitaire

SII : Système Immunitaire Inné

TN : Témoin Négatif

UBS : Université Bretagne Sud

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VHS : Virus de *l'Herpes Simplex*

Introduction générale

Avec près de 800 îles et îlots, la Bretagne dispose de 2 700 km de côtes littorales et constitue un des plus grands champs naturels d'algues marines d'Europe. Riche d'une biodiversité, environ 700 espèces d'algues sont actuellement recensées sur le littoral breton. 50 000 à 60 000 tonnes d'algues sont collectées par an dans cette région, destinées notamment à l'extraction des colloïdes par les industries agro-alimentaires et cosmétiques (Bourgougnon et Stiger-Pouvreau 2011).

Solieria chordalis est une algue rouge macroscopique qui prolifère sur les côtes sud de la Bretagne entre juin et novembre. D'après les communes touchées par les échouages massifs, la période des grandes arrivées de cette algue dépend des années, pour lesquelles les conditions météorologiques ne sont pas systématiquement les mêmes. Dans le Morbihan, plus de 2 000 tonnes d'algues rouges échouées, essentiellement composées de *S. chordalis,* sont éliminées des plages tous les ans. Certaines communes mettent en place des ramassages d'algues pour laisser les plages « propres » afin de ne pas freiner les activités économiques liées au tourisme, au nautisme et aux loisirs aquatiques, particulièrement intenses pendant la période estivale (pollutions visuelle, olfactive et sanitaire). Entre 2002 et 2015, le coût annuel du ramassage de ces algues proliférantes s'est élevé à environ 100 000 €, soit en moyenne 4 000 € par commune du littoral morbihannais (Neveu 2016). L'observation de cette biomasse d'échouage massif a été l'une des premières raisons du choix de l'algue comme modèle d'étude de ces trois années de recherche.

S. chordalis vit dans un environnement marin aquatique, mais peut se trouver, une fois arrachée de son substrat, sur l'estran. Que ce soit dans l'eau de mer ou sur les rochers, l'algue se trouve confrontée à tout un ensemble de stress biotiques, comme par exemple la présence de pathogènes, d'herbivores ou encore la compétition avec d'autres espèces algales et la colonisation bactérienne. Elle est également exposée à des stress abiotiques, comme les rayons agressifs du soleil, la dessiccation ou encore une augmentation de la salinité de son environnement. Organisme fixé à son substrat, l'algue s'est alors adaptée à son milieu de vie

en développant de nombreuses stratégies de défenses et d'acclimatation pour pouvoir survivre au cours du temps.

Les algues rouges sont les premières algues marines à avoir colonisé les fonds marins côtiers il y a entre 1,2 et 1,5 milliards d'années selon l'hypothèse de l'endosymbiose entre des cellules eucaryotiques primitives et des cyanobactéries pour former les premières cellules eucaryotes photosynthétiques (Saunders *et al*. 2004). Puis, elles se sont largement développées avec les autres lignées d'algues entre 500 et 800 millions d'années. En comparaison avec l'apparition de notre ancêtre, *l'Homo sapiens*, il y a 200 mille ans, il est aisé d'imaginer que pour s'accrocher le long de l'échelle temporelle, les algues se sont acclimatées puis adaptées à leur environnement. Par exemple, elles présentent une paroi cellulaire originale. Sa structure semi-rigide forme une armature résistante qui permet de soutenir l'organisme, d'ajuster la pression osmotique et de le protéger contre les agressions extérieures. La paroi constitue aussi un élément de structure cellulaire essentiel associé à la croissance et au développement des algues. De plus, les algues ont développé un métabolisme spécifique en produisant des composés de défense et de protection (antifouling, antibactériens, photoprotecteurs ou encore antioxydants). Ces métabolites primaires et/ou secondaires jouent un rôle important dans la structuration des communautés benthiques des milieux tempérés.

Malgré l'existence d'une bibliographie relativement riche sur *Solieria chordalis* (Rogers et Topliss 1983 ; Deslandes *et al.* 1985 ; Brown 1995 ; Fournet *et al*. 1997 ; Deslandes et Bodeau 2007 ; Ar Gall *et al*. 2008 ; Bondu *et al.* 2008 ; Bondu *et al.* 2009 ; Bondu *et al.* 2010 ; Bondu *et al.* 2014), peu de données ont été publiées sur l'espèce présente sur la Presqu'île de Rhuys, dans le Morbihan *(*Floc'h *et al.* 1987).

L'objectif de cette thèse a été dans un premier temps d'enrichir les connaissances sur cette biomasse et d'étudier les effets de la saisonnalité sur les caractéristiques biochimiques et biologiques de *S. chordalis* sur une période de deux ans.

Dans un deuxième temps, une mise en place d'un procédé d'extraction efficace permettant d'accéder aux métabolites actifs a été développée. Pour extraire les composés potentiellement actifs des algues, il faut briser les parois des cellules et rompre l'intégrité cellulaire. Dans une démarche éco-responsable, l'extraction assistée par enzymes a été utilisée. Des extraits hydrosolubles contenant des molécules libérées des parois et des cellules ont ainsi

été obtenus. Les activités anti-herpétiques, antibactériennes et immunostimulantes des extraits ont été évaluées en utilisant différents modèles biologiques développés au Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (virus de l'*Herpes Simplex* de type-1 / cellules Vero) et au Marine Bio-products Research Laboratory (modèle de pathogénicité *Caenorhabditis elegans* - *Pseudomonas aeruginosa*). L'idée était d'une part de mettre en évidence certains composés de défense synthétisés par l'algue, mais également susciter l'intérêt d'industriels de la santé ou encore de l'agrofourniture. Ainsi, à partir d'une biomasse naturelle disponible, des composés originaux à valeur ajoutée pourraient devenir exploitables.

Pour répondre à ces problématiques, les travaux de cette thèse se sont articulés autour de quatre axes, déclinés dans ce manuscrit en chapitres.

1) Le chapitre I présente un état de l'art sur les algues rouges et en particulier sur *Solieria chordalis.* Y sont décrites sa morphologie, sa biologie, sa composition biochimique, sa physiologie et son écologie.

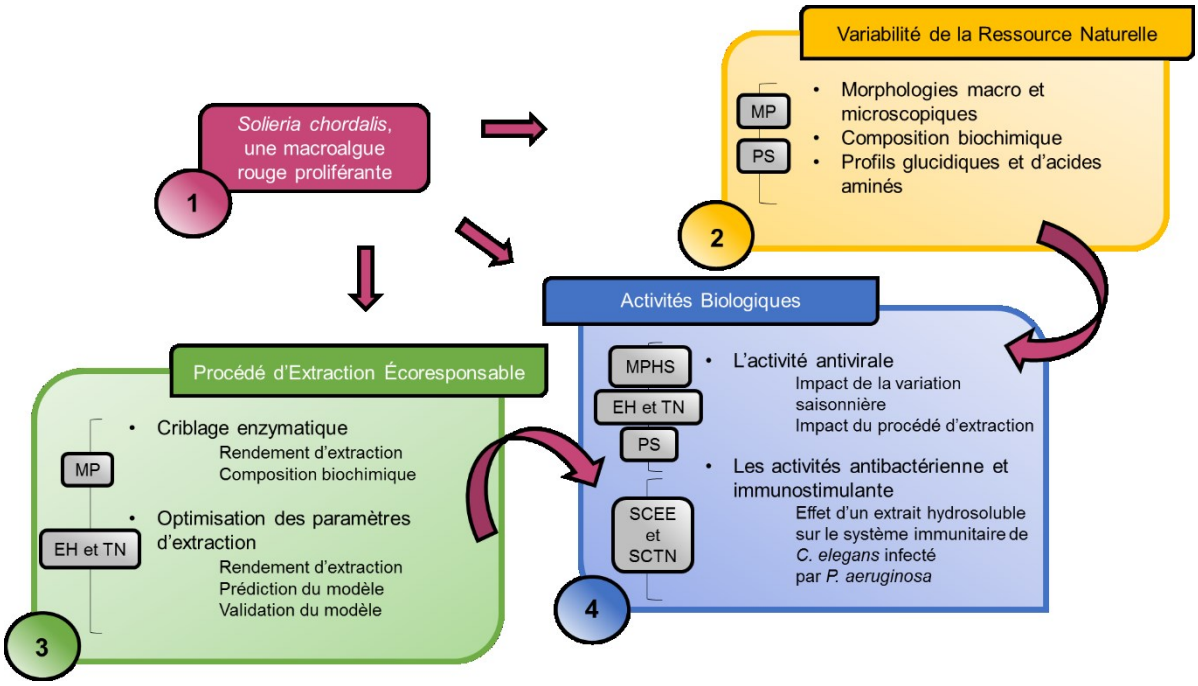
2) Le chapitre II s'intéresse à la caractérisation macro- et microscopique et à la composition biochimique de la matière première collectée chaque mois sur le même site. La variabilité saisonnière est étudiée afin de démontrer qu'il est important de bien connaître la matière première avant de considérer toute application potentielle, en particulier si celle-ci s'appuie sur une biomasse naturelle disponible à une certaine période de l'année. Cette étude de la variabilité saisonnière apporte des perspectives, voire des solutions afin de stabiliser la matière première en termes de quantité et de qualité et permet d'envisager une exploitation ciblée et raisonnée de l'algue.

3) L'extraction d'une quantité maximale de composés hydrosolubles a été entreprise dans le chapitre III à travers le procédé de l'extraction assistée par enzymes (EAE). Dans ce chapitre, davantage biotechnologique, plusieurs enzymes de spécificité et de sélectivité différentes ont été testées. Une optimisation des conditions d'extraction a ensuite été réalisée afin d'analyser l'influence des paramètres tels que la température, le temps d'extraction ou encore la concentration de l'enzyme ajoutée sur le rendement d'extraction et sur la composition biochimique des extraits obtenus.

4) Le quatrième et dernier chapitre porte sur l'évaluation des activités biologiques des extraits obtenus dans le chapitre III. Deux focus sont proposés : l'un sur l'activité antivirale et

le second sur les activités immunostimulante et antibactérienne des extraits de *Solieria chordalis*.

Les quatre axes de ce projet de recherche sont schématisés sous forme d'un organigramme présenté sur la **Figure 1.** Un aperçu de l'ensemble des travaux effectués durant ces trois années de doctorat est ainsi donné. Les chapitres numérotés correspondent aux différents encadrés colorés. Le détail des travaux menés sera précisé dans les chapitres respectifs.



Légende :
Les encadrés gris indiquent la nature de l'échantillon étudié de S. chordalis*. Ils seront décrits dans les chapitres respectifs.*
MP : matière première ; EH : extrait hydrosoluble ; PS : polysaccharides; TN : témoin négatif ; MPHS : matière première hydrosolubilisée ; SCEE : extrait hydrosoluble obtenu après l'action d'enzymes de S. chordalis *; SCTN : extrait hydrosoluble témoin négatif obtenu dans les mêmes conditions d'extraction que SCEE mais sans l'action d'enzymes.*

Figure 1 Organigramme du projet de doctorat mettant en évidence les quatre axes de recherche connectés les uns aux autres.

Comme le montre l'organigramme, les axes de recherches sont connectés. Cette interdépendance des connaissances et des résultats acquis dans chaque chapitre sera expliquée tout au long du manuscrit. Une conclusion générale de l'ensemble des travaux réalisés clôturera ce manuscrit laissant place à de nouvelles perspectives.

AVANT-PROPOS

Saint Gildas de Rhuys, Morbihan, Octobre 2013

Le contexte de l'étude et les projets de recherche

AVANT-PROPOS

Avant-propos : le contexte de l'étude et les projets de recherche.

1. Le projet VB2

1.1 Les partenaires privés

1.2 Les partenaires publics

2. Le projet Littoralg

3. Mobilités internationales à l'Université de Dalhousie, Nouvelle-Écosse, Canada

Avant-propos : Le contexte de l'étude et les projets de recherche

Les travaux présentés dans ce manuscrit sont le fruit d'une recherche scientifique de trois années. Ils ont été réalisés dans le cadre de deux projets collaboratifs indépendants : le projet VB2 (Valorisation de la Biomasse Bretonne) et le projet Littoralg. Tous deux sont portés sur l'évaluation de la ressource potentielle en algues rouges et sur la recherche de voies de valorisation pour une gestion durable sur le littoral.

1. Le projet VB2

Le projet VB2 a pour finalité d'extraire, de caractériser, de préparer, de formuler et de valider des principes actifs issus de macroalgues fraîches, dont *S. chordalis*, et de coproduits maraîchers pour les marchés de l'alimentation animale, de la protection des plantes, des cosmétiques et de la nutrition humaine. En vue de déployer la filière de valorisation de molécules issues des algues et des fruits et légumes, le projet vise à contrôler l'ensemble de la chaîne de transformation depuis la ressource jusqu'aux marchés. Pour cela, le projet se focalise sur la maîtrise de la qualité des produits et de l'homogénéité ; sur la reproductibilité des produits en développant des technologies d'extraction, de purification et de formulation des composés d'intérêt et sur la sécurité de l'accès aux marchés.

Quatre axes d'innovation du projet ont été définis.

Le premier axe concerne la mise au point des procédés de conservation de la matière première ainsi que de lavage, de calibrage de la biomasse, de production et de diversification de composites à base d'argile comme l'Amadéite ®. Aujourd'hui, l'Amadéite ® est un matériau produit à partir d'argile et de sucres extraits d'algues du type *Ulva*, grâce à un procédé d'exfoliation d'une argile intercalée. Il est utilisé pour stimuler la catalyse digestive en alimentation animale et possède également des propriétés de résistance mécanique, d'étanchéité et de résistance à la chaleur qui fait de lui un nanomatériau qui intéresse le domaine des

nanocomposites ainsi que ceux de l'industrie automobile, de la plasturgie ou encore des cosmétiques.

Le deuxième axe consiste à préparer, à caractériser et à valider des composés actifs issus d'algues ou de légumes invendus. La formulation des actifs pour augmenter la valeur ajoutée des algues et des coproduits maraîchers est étudiée dans l'axe trois (**Figure 2**).

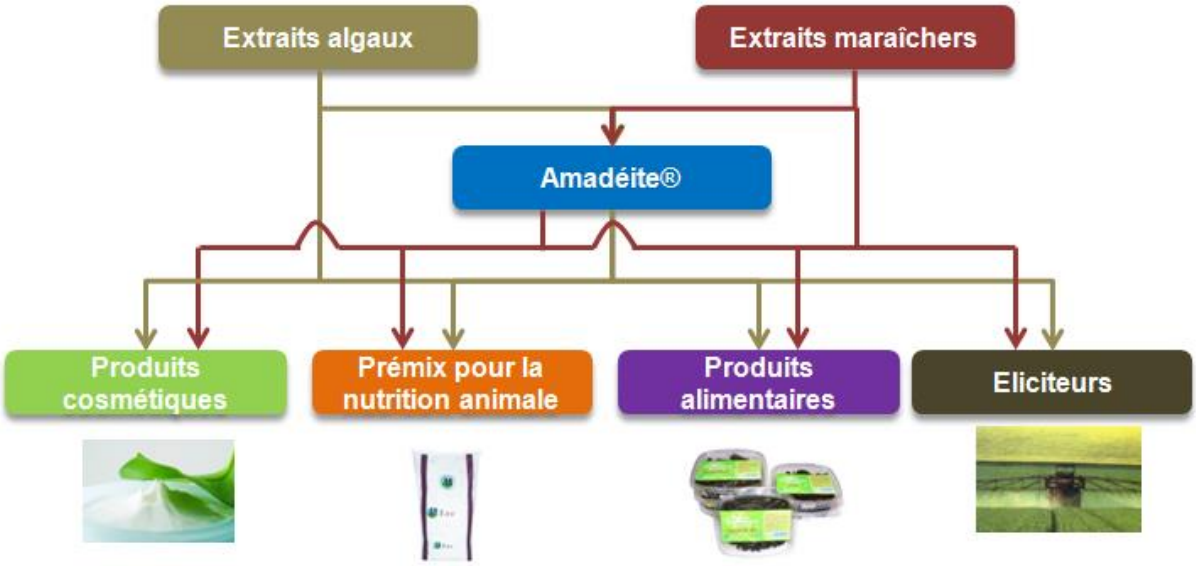


Figure 2 Formulation des extraits algosourcés et issus de produits maraîchers pour quatre cibles commerciales, avec intégration ou non de l'Amadéite®.

Enfin, les formulations trouvées dans l'axe précédent sont validées dans le dernier axe en fonction des contraintes du secteur (conformités aux différents règlements CE 178/2002 et 183/2005 pour la nutrition animale par exemple). Ces quatre axes sont liés et interagissent entre eux (**Figure 3**).

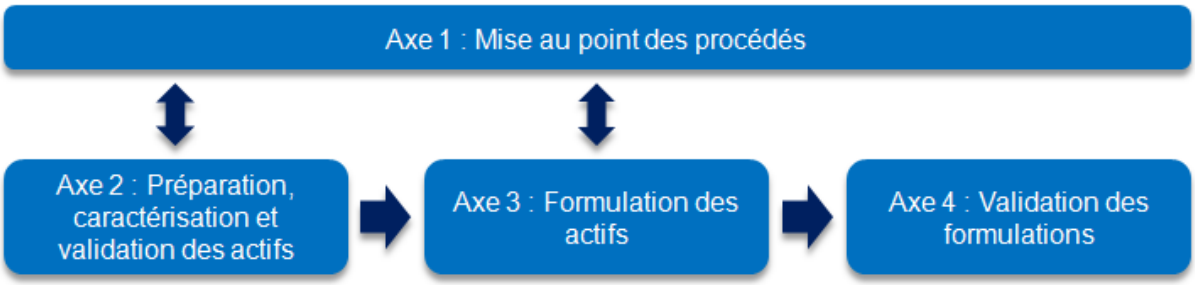


Figure 3 Les quatre axes d'innovation du projet VB2.

Ce projet collaboratif entre partenaires privés et publics présente un budget global de 2,8 millions d'euros pour une demande d'aide de 1,5 millions d'euros pour trois ans (avril 2013 – avril 2016). Ce budget est supporté par les partenaires industriels du consortium, par le Fonds Unique Interministériel (FUI), le Conseil régional de Bretagne et par les Conseils généraux du Finistère et du Morbihan. Le FUI est un programme du Ministère de l'Économie, de l'Industrie et de l'Emploi destiné à soutenir la recherche appliquée afin d'aider le développement de produits innovants susceptibles d'être mis sur le marché à court ou moyen terme.

1.1 Les partenaires privés

Le porteur du projet est la société Agrival (Chiffre d'Affaires ou CA de 680 K€ en 2015) implantée à Saint-Pol-de-Léon en Nord-Finistère. L'entreprise dispose d'une expertise avancée dans les procédés de lavage, de tri de la biomasse, de broyage, d'extraction aqueuse, de centrifugation, de clarification et purification, de concentration et de séchage. Son activité est la valorisation des coproduits (invendus, écart de tri, déchets de découpe) issus de la filière maraîchère. Cette valorisation est à destination des cosmétiques, de la nutraceutique, de la nutrition et santé humaines et animales et autres produits innovants pour l'agroalimentaire. Les autres partenaires privés sont le groupe Olmix et la société Globe Export.

Olmix (CA de 35 M€ en 2015) commercialise des produits naturels élaborés à base d'oligo-éléments, d'argile et d'algues (rouges, vertes et brunes) pour les marchés de la nutrition et de la santé animale et végétale. Le groupe sera en charge de la mise au point des techniques d'extraction et de purification conservant l'intégrité des molécules algales d'intérêt et du procédé de production de nouvelles générations d'Amadéite ®.

Globe Export Algues de Bretagne (CA de 2,5 M€ en 2015) est une société agroalimentaire spécialisée dans le commerce et la transformation d'algues depuis plus de 25 ans. Après plusieurs années de recherche, la société est devenue leader du marché de la cuisine moléculaire en mettant au point des procédés uniques au monde de sphérification (fabrication de perles d'alginate) en particulier pour le marché agroalimentaire. Le porteur du projet s'est rapproché de Globe Export pour le développement de perles de massage à base d'Amadéite®, mais aussi pour le développement d'autres produits innovants à base d'extraits d'algues en vue d'aboutir à la création d'une gamme de cosmétiques innovante.

1.2 Les partenaires publics

Les deux partenaires publics participant à ce projet sont Vegenov et le Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (LBCM) dans lequel a été effectuée cette thèse.

Vegenov, labellisé Centre de Ressources Technologiques par le Ministère de la Recherche, a été créé en 1989 à l'initiative de la filière légumière bretonne avec le soutien des collectivités. Ce centre propose des prestations de service confidentielles de recherche, de développement et d'analyses aux obtenteurs, aux entreprises semencières et aux entreprises de l'agrofourniture et de l'agroalimentaire. Le laboratoire développe plusieurs thématiques de recherche, dont l'évaluation de l'efficacité et du mode d'action de produits alternatifs de lutte contre les maladies des plantes, la maîtrise d'une vingtaine de pathosystèmes en conditions contrôlées, des études épidémiologiques des maladies des plantes, l'appui à la création variétale (outils moléculaires, culture *in vitro* et évaluation de la résistance variétale) et la détection de pathogènes végétaux.

Le LBCM, créé en 1998 et basé sur deux sites (Vannes et Lorient), est un laboratoire de l'Université Bretagne Sud (**Figure 4**).

À gauche : Centre d'enseignement et de recherche Yves Coppens de Vannes (lieu de la thèse).
À droite : Centre de recherche Chritiaan Huygens de Lorient.

Figure 4 Photographies des deux sites du LBCM au sein de l'Université Bretagne Sud.

La thématique de recherche du LBCM est centrée sur les biotechnologies bleues et les biofilms marins. Ces derniers sont des communautés d'organismes vivant dans le milieu marin et adhérant entre eux et à une surface, grâce à leurs sécrétions de matrices adhésives et protectrices. Le LBCM regroupe différentes équipes qui travaillent sur deux axes de recherche distincts :

- Biofilms et microbiome
- Les biotechnologies : valorisation de molécules marines et bioremédiation

Cependant, les voies de valorisation s'étendent au-delà de celle des biofilms. En effet, les recherches sont aussi orientées vers des espèces qui prolifèrent, comme certaines algues. Les algues marines des côtes bretonnes constituent une production végétale naturelle extrêmement importante et diversifiée. En outre, leur récolte présente un double bénéfice, l'aspect des plages plus propres et l'obtention d'une biomasse pour produire, par des technologies douces, des hydrolysats biologiquement actifs. L'extraction, la purification et l'identification de molécules d'intérêt à partir d'organismes modèles marins (procaryotes marins, algues et invertébrés marins) est un savoir-faire du laboratoire. Les travaux réalisés lors de cette thèse participent aux avancées de l'équipe opérant sur la valorisation de molécules marines par l'utilisation de biotechnologies.

Le rôle et la complémentarité de chaque partenaire sont définis en fonction des quatre axes d'innovation mentionnés précédemment (**Figure 5**)

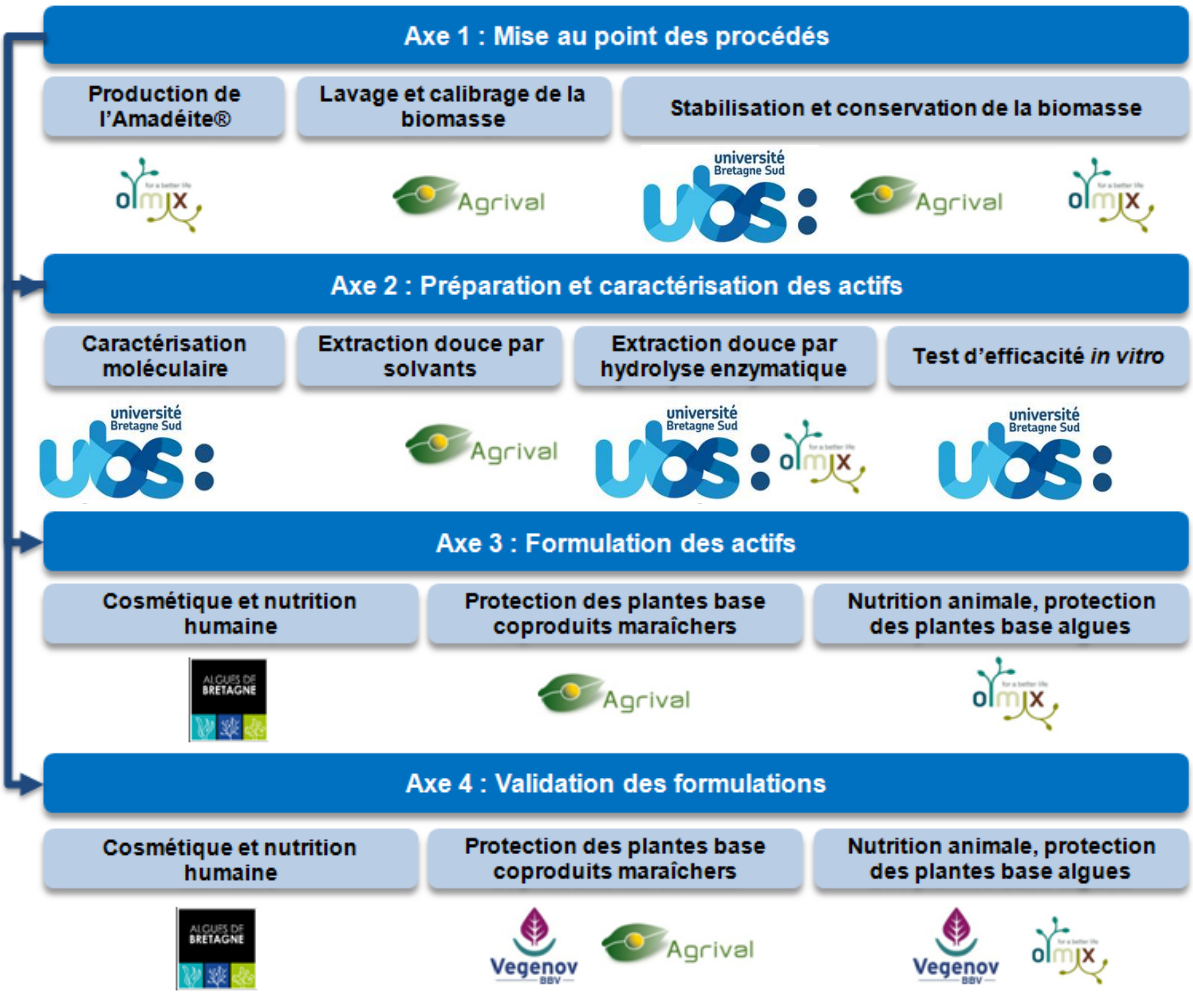


Figure 5 Dimension collaborative du projet VB2.

Dans le cadre de ce projet, le LBCM a consacré la plus grande partie de ses recherches sur l'algue rouge *Solieria chordalis* et les travaux menés ont participé aux axes 1 et 2 du projet VB2.

2. Le projet Littoralg

Le projet Littoralg est un projet collectif de recherche du pôle de compétence Homme Mer et Littoral de l'Université Bretagne Sud (UBS) avec un budget global d'environ 298 K€ pour trois ans (2014 -2017). Ce projet fédère six laboratoires de l'UBS à savoir le laboratoire porteur du projet ; le LBCM et les laboratoires partenaires que sont : l'institut de recherche en informatique et systèmes aléatoires (IRISA) ; l'institut de recherche sur les entreprises et les administrations (IREA) ; le centre de recherche en psychologie, cognition et communication (CRPCC) ; l'institut de géoarchitecture et le laboratoire domaines océaniques (DO).

Ce projet lie certaines problématiques du littoral à l'activité de l'homme et notamment celle des échouages massifs de l'algue rouge *Solieria chordalis* sur les plages du sud de la Bretagne. Ce projet s'organise autour de trois axes. Tout d'abord, la ressource potentielle en algues rouges du large jusqu'à l'échouage est évaluée pour enrichir les connaissances sur les écosystèmes associés à cette ressource et sur les conditions favorisant sa prolifération. Deuxièmement, un aspect sociétal est analysé. En effet, une des missions du projet est de comprendre les conflits d'usage, les impacts socio-économiques, le regard des usagers et des touristes, la mise en valeur du littoral face aux marées rouges et le développement de l'algoculture. Enfin, des voies de valorisation de la ressource algale, différentes de celles évoquées dans le cadre du projet VB2, sont étudiées en vue de préserver les écosystèmes et le littoral. Une application originale et innovante a été concrétisée et développée : les Algobox ®. Cette application sera détaillée dans le Chapitre I. (*Cf.* Chapitre I. 5.2. Applications, page 86)

Les travaux présentés dans ce manuscrit se sont greffés à ce projet en apportant des connaissances sur l'écophysiologie de *S. chordalis* et sur les conditions favorisant sa prolifération.

3. Mobilités internationales à l'Université de Dalhousie, Nouvelle-Écosse, Canada

Durant ces trois années de thèse, deux mobilités de trois mois chacune ont été réalisées à l'Université de Dalhousie, en Nouvelle-Écosse au Canada (septembre-décembre 2014 et septembre-décembre 2015). Une partie des recherches a ainsi été effectuée au Marine Bio-Products Research Laboratory sous la direction de Dr. Balakrishnan Prithiviraj. La thématique

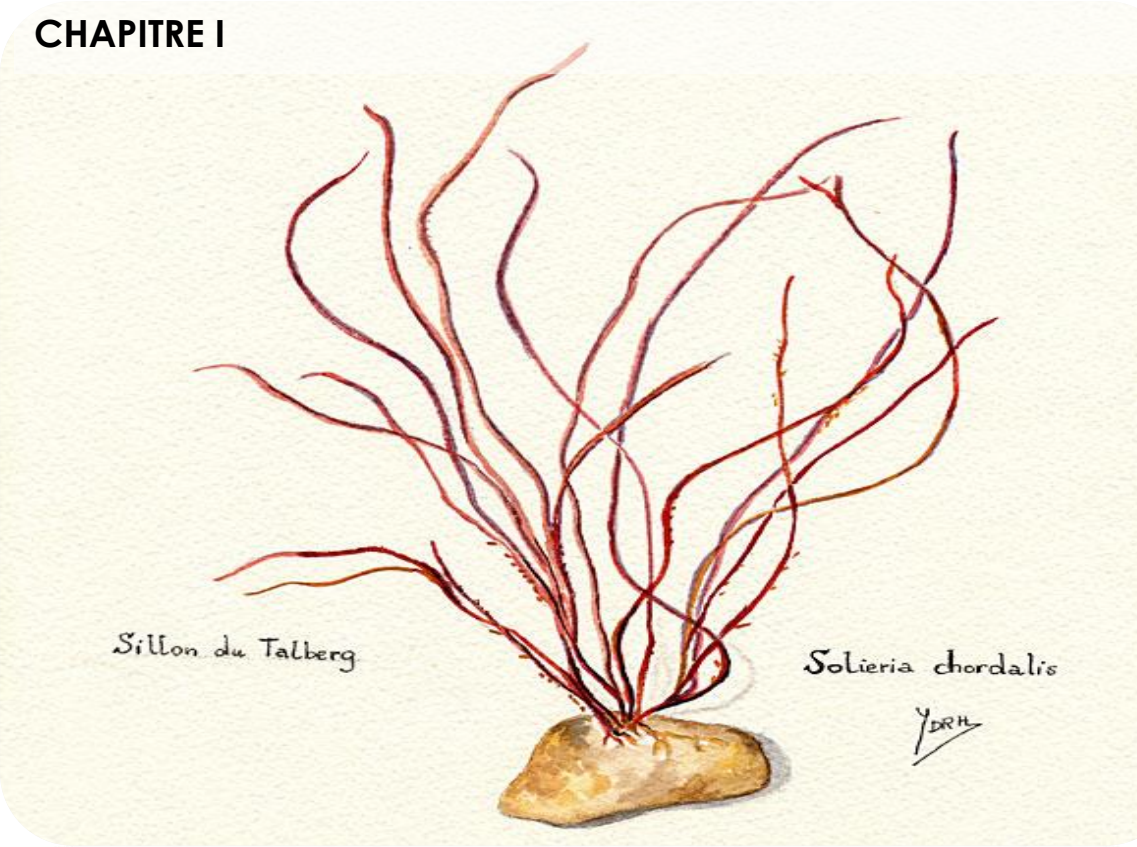
de ce laboratoire est la recherche de composés d'origine marine ayant un effet bénéfique pour les plantes et les animaux d'intérêt économique. Les chercheurs de ce laboratoire utilisent les organismes modèles *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula*, *Caenorhabditis elegans* et appliquent des composés bioactifs marins pour améliorer la performance de ces organismes modèles sous des conditions de stress biotiques et abiotiques. Suivant des approches biochimiques et moléculaires, ils cherchent à comprendre le mode d'action de ces composés actifs. Dans le cadre de la thèse, ces six mois dans ce laboratoire ont permis une étude basée sur le système de pathogénicité entre une bactérie pathogène *Pseudomonas aeruginosa* et un animal *C. elegans*. Des échantillons de *Solieria chordalis* exportés de Bretagne ont été analysés afin de déterminer s'ils possédaient un effet immunostimulant sur l'animal infecté par la bactérie pathogène et un effet antibactérien notamment en réduisant les facteurs de virulence de *P. aeruginosa.*

CHAPITRE I

Les algues rouges dont *Solieria chordalis*

Saint Gildas de Rhuys, Morbihan, Octobre 2013

CHAPITRE I



Les algues rouges, dont *Solieria chordalis*

1. **Introduction**
2. **Histoire, distribution biogéographique et systématique**
3. **Environnement et écologie**
   3.1. Rôle écologique
   3.2. Milieu de vie
   3.3. Proliférations
4. **Morphologie, composition biochimique, physiologie et cycle de vie**
   4.1. Morphologies macro- et microscopiques
   4.2. Composition biochimique, physiologie et activités biologiques
   4.3. Cycle de vie
5. **Enjeux et applications économiques**
   5.1. Algues sur le marché économique
   5.2. Applications
6. **Conclusion**

Les algues rouges dont *Solieria chordalis*

Les algues rouges, dont *Solieria chordalis*

1. Introduction

Une algue peut être définie comme étant un organisme vivant photosynthétique, thallophytique, autotrophe présent principalement dans les milieux aquatiques marins ou d'eau douce, mais également sur le milieu terrestre. L'ensemble des algues compte entre 20 000 à 30 000 espèces dans le monde, ce qui correspond à environ 18 % du règne végétal (Garon-Lardière 2004). La distinction entre macroalgues (macroscopiques et pluricellulaires) et microalgues (microscopiques et unicellulaires) est couramment faite. Ces dernières se distinguent principalement par des critères d'ordre cytologique et biochimique. Les macroalgues sont en général classées en trois groupes selon leur pigmentation. Il existe ainsi les algues vertes (Chlorophytes), les algues brunes (Chromophytes) et les algues rouges (Rhodophytes).

Les algues rouges sont des organismes eucaryotes sans flagelle et avec de l'amidon floridéen comme réserve énergétique. Elles utilisent la chlorophylle a et des pigments surnuméraires que sont principalement les phycobiliprotéines. Ce sont ces dernières qui donnent la couleur de ces algues. Environ 6 600 espèces d'algues rouges ont été décrites (Guiry 2013, Collén *et al* 2014). Elles sont, pour la plus grande majorité, pluricellulaires, macroscopiques, marines et peuvent se reproduire de façon sexuée et/ou asexuée. Les algues rouges font partie de la flore inter- et subtidale et sont trouvées sur des substrats variés. Une grande partie de ce groupe d'algues vit en milieu tempéré, mais certaines d'entre-elles ont été trouvées dans des régions froides et d'autres dans des zones tropicales (Knutsen *et al.* 1987, Dawes *et al.* 1998, Chopin *et al.* 1999a, Hurtado *et al.* 2013).

Elles représentent une ressource économique importante. D'après le rapport de 2014 de la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 23,8 millions de tonnes d'algues sont commercialisées par an dans le monde, ce qui génère un marché économique de 6,4 milliards de dollars américain. 95 % de cette production mondiale provient de l'aquaculture.

Parmi ces algues cultivées, plus des trois quarts (14 millions de tonnes) sont des algues rouges (8-9 millions de tonnes d'*Eucheuma spp.* et de *Kappaphycus alvarezii*, 2-3 millions de *Gracilaria spp*. et 1-2 millions de *Porphyra spp)* et sont essentiellement utilisées pour l'alimentation humaine et pour la production d'hydrocolloïdes (agars et carraghénanes) (FAO 2014).

Solieria chordalis, le sujet de cette étude (**Figure 1. 1**), appartient aux Florideophytes, un groupe regroupant 95 % des algues rouges pluricellulaires existantes dont la plupart ont un impact écologique important *(*Collén *et al.* 2014*).* Dans ce premier chapitre, il s'agira de décrire les macroalgues rouges et en particulier *Solieria chordalis*. Sa systématique, son environnement, sa morphologie ou encore sa composition biochimique sont détaillées afin de connaître ce modèle d'étude et d'envisager des voies de valorisation.

Figure 1. 1 *Solieria chordalis* (C. Agardh) J. Agardh. Photographie d'un thalle collecté à Saint Gildas de Rhuys en janvier 2015.

Le **Tableau I. I** donne un aperçu des principaux arguments du choix de *S. chordalis* comme sujet d'étude de recherche.

Tableau I. I Principaux arguments du choix de *Solieria chordalis* comme sujet d'étude de recherche.

- Algue rouge qui prolifère sur les côtes sud de la Bretagne (proximité géographique).
- Impacts économique et écologique des échouages sur les plages.
- Espèce décrite dans la littérature. Même famille que l'espèce modèle bien étudiée *Chondrus crispus* (Rhodophyte, Gigartinales).
- Paroi cellulaire riche en carraghénanes.
- Intérêt des industriels à valoriser les algues rouges (propriétés gélifiantes, texturantes et activités biologiques), intérêt commercial.
- Intérêt scientifique (davantage de connaissances sur la paroi, développement de procédés d'extraction, concentration de composés bioactifs).

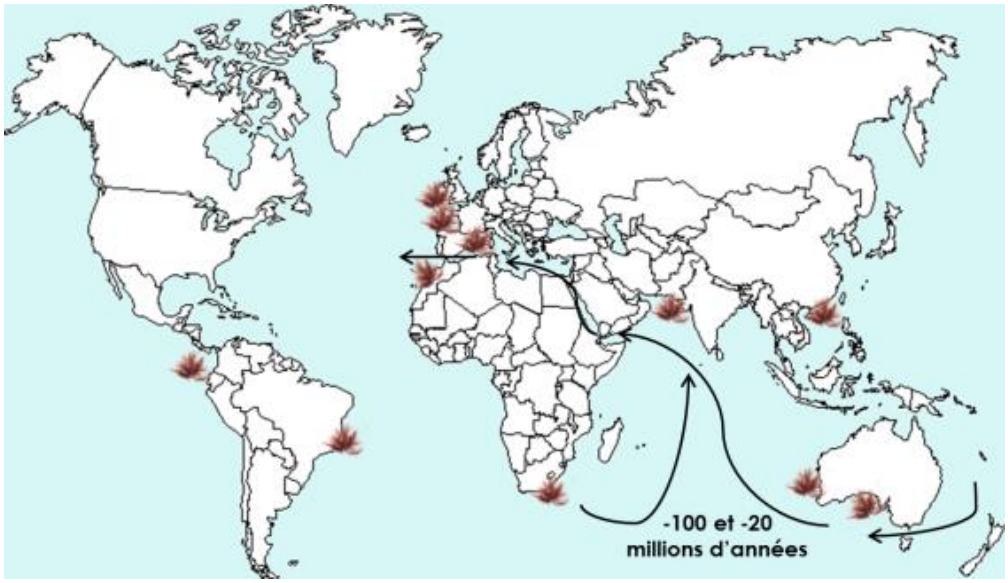
2. Histoire, distribution biogéographique et systématique.

Le genre *Solieria* a été créé par le botaniste suédois Jakob Georg Agardh en 1842 se basant sur l'espèce *Solieria chordalis* collectée à Cadiz en Espagne. Il est le fils de Carl Adolph Agardh lui aussi grand botaniste et homme politique suédois. Ces scientifiques donnent leur nom à l'algue (**Figure 1. 1**). À cette époque, le genre *Solieria* comportait quatre espèces (*S. dura, S. robusta, S. tenera et S. chordalis*). Aujourd'hui, il en comporte 9 (Gabrielson et Hommersand 1982, Xia et Zhang 1984 Algaebase 2015*)*. La classification de la famille des Solieriaceae ne fut acceptée qu'en 1993 grâce à la révision de Silva selon le respect des codes de Montréal de 1959 et celui de Sydney de 1981 (Silva 1993, Fredericq *et al.* 1999). *S. chordalis* a été trouvée pour la première fois en Angleterre en avril 1976 pendant l'inventaire de Farnham et Jephson (Farnham et Jephson 1977*)*. D'après ces chercheurs, l'algue proviendrait du nord de la France et aurait été introduite sur d'autres côtes par adhésion sur les bateaux. Il est fort possible que *S. chordalis* ait toujours été présente sur les côtes Est de l'Atlantique bien qu'il manque des données pour valider cette hypothèse (Farnham 1980).

Vingt ans après, les outils moléculaires se sont largement développés et ont permis de rassembler les espèces selon des homologies dans leur patrimoine génétique qui s'acquière et se modifie au cours de l'Évolution du monde vivant. En 1999, l'américaine Fredericq et ses collaborateurs ont classé les espèces de la famille des Solieriaceae (Gigartinales, Rhodophyta) grâce à l'analyse de leur séquence du gène *rbc*L (Fredericq *et al.* 1999). Cela a permis d'approfondir les connaissances sur la systématique et la biogéographie de ces espèces. Le gène plastidique *rbc*L (ribulose-1,5-bisposphate carboxylase/oxygénase pour RUBISCO) est très commun chez les organismes photosynthétiques et est ainsi le plus utilisé dans l'étude de la phylogénie des plantes (Bafeel *et al.* 2012*).* Les données des séquences nucléotidiques ont été générées à partir de 37 taxons[1] d'algues rouges de la famille des Solieriaceae. Les résultats sont présentés sous forme d'arbre phylogénétique regroupant les espèces proches, apparues au même moment dans l'histoire de l'évolution du monde vivant à partir d'un ancêtre commun. Deux groupes majeurs ont été identifiés. Il a été démontré que ces deux groupes définis par leur arbre phylogénétique basé sur leur séquence du gène *rbc*L pouvaient être aussi classés selon leurs caractères morphologiques et aussi selon leur distribution biogéographique. Un groupe de Solieriaceae rassemble des espèces avec des thalles ayant des filaments uniaxiaux et un autre groupe ayant des filaments multiaxiaux provenant d'un nombre indéfini de cellules apicales. Les espèces du premier groupe sont particulièrement trouvées dans le Sud et dans l'Ouest de l'Australie et certaines en Afrique du Sud. L'autre groupe identifié possède des espèces aux thalles multiaxiaux composés de filaments, dérivés de quatre ou plus cellules apicales distinctes. Ces espèces sont retrouvées dans des zones tropicales ou tempérées. D'après ces résultats, 9 espèces de *Solieria* ont été étudiées. Elles ont été retrouvées dans les océans Indo-Pacifique (*S. robusta, S. pacifica, S. dichrotoma, S. tenuis, S. jaasundii et S. dura*) et Atlantique (*S. chordalis, S. filiformis, S. robusta et S. anastomosa*). La distinction morphologique entre les espèces de l'Atlantique et celles de l'Indo-Pacifique se ferait seulement sur des différences dans la croissance apicale des thalles. Cette étude met en évidence que les données moléculaires et les données morphologiques supportent l'idée que l'ancêtre commun des membres de la famille des *Solieriaceae* vivait dans les eaux tempérées d'Australie et d'Afrique du Sud. Au cours du temps, il y a entre 100 millions et 20 millions d'années, les courants d'eaux marines ont changé

[1] Du grec *taxis* pour « placement », un taxon est un ensemble qui regroupe des organismes vivants possédant des caractères en communs. Exemple : le taxon désigné sous le nom de Rhodophyta englobe la totalité des algues rouges.

et ont pu causer les premières distributions des algues dans la mer Méditerranée, via la mer Rouge et le canal de Suez puis dans l'Océan Atlantique (**Figure 1. 2**).



Les flèches montrent les migrations des espèces au cours du temps.

Figure 1. 2 Distribution des espèces du genre *Solieriaceae* dans le monde.

Depuis, les taxons ancestraux de tous les genres composant la famille des *Solieriaceae* ont été conservés dans l'Atlantique et pour ceux qui sont trouvés actuellement dans l'océan Indo-Pacificique, ils auraient dérivé de ces taxons ancestraux. Cependant, des recherches plus approfondies seraient nécessaires pour définir exactement le statut taxonomique des espèces de *Solieriaceae* (Hommersand *et al.* 1994, Fredericq *et al.* 1999).

Sur cette même séquence génétique *rbcL*, Mineur *et al.* 2012 ont identifié *Solieria sp*. dans le Golfe du Morbihan. Les chercheurs affirment que les séquences génétiques identifiées des algues trouvées en abondance dans cet environnement sont très proches de celles référencées de *S. chordalis.*

Traditionnellement et encore de nos jours, la systématique des algues peut aussi faire intervenir de nombreux critères écologiques, physiologiques, cytologiques et biochimiques comme les structures cellulaires, le mode de reproduction, l'habitat, les polysaccharides de réserve ou encore la nature et la localisation des pigments. Malgré une extrême diversité et complexité d'un point de vue structural, macroscopique mais aussi microscopique, les algues peuvent être classées en cinq grands phylums. Comprenant les formes les plus simples et ayant évolué dans des directions très variées, les algues (rouges et vertes) occupent, dans l'ensemble du règne végétal, une place prépondérante au niveau phylogénétique. En effet, c'est à partir d'elles que dérivent tous les autres groupes végétaux. Les cinq principaux phylums sont r egroupés en fonction de leurs caractéristiques dans le **Tableau I. II.**

Tableau I. II Systématique des algues selon des critères morphologiques, biochimiques et cytologiques (Feldman 2011 modifié par Burlot 2013).

	Systématique			**Caractéristiques**		
	Phylums	*Embranchements*	*Classes*	*Organes reproducteurs*	*Pigments photosynthétiques*	*Caractères cytologiques*
Procaryotes	Prochlorophytes	Prochlorophycophytes	Prochlorophycées	Reproduction asexuée (division cellulaire)	Chlorophylles a et b dominantes et caroténoïdes	Pas de plastes individualisés, pas de cellules flagellées
	Cyanophytes	Cyanoschizophytes	Cyanophycées			
Eucaryotes	Rhodophytes	Rhodophycophytes	Bangiophycées Florideophycées	Reproductions sexuée (Sporocystes et/ou gamétocystes) et asexuée	Chlorophylle(s) a (et d) et caroténoïdes associés à des phycobiliprotéines	Des plastes individualisés, pas de cellules flagellées, amidon extraplastidial
	Chromophytes	Pyrrophycophytes	Cryptophycées Dinophycées Rhaphidophycées Euglenophycées		Chlorophylles a et c et excès de caroténoïdes (fucoxanthines)	Pas d'amidon dans les plastes, cellules flagéllées hétérocontées* Réserve de laminarines
		Chrysophycophytes	Chrysophycées Xanthophycées Bacillariophycées			
		Phéophycophytes	Phéophycées			
	Chlorophytes	Chlorophycophytes	Prasinophycées Chlorophycées Zygophycées Charophycées		Chlorophylles a et b dominantes et caroténoïdes	De l'amidon dans les plastes, cellules flagellées isocontées*

**Des cellules flagellées isocontées sont des cellules à flagelles semblables contrairement aux cellules flagellées hétérocontés.*

Les algues rouges sont des organismes eucaryotes du royaume des végétaux et font partie du phylum des Rhodophytes. Ce phylum est divisé en huit classes selon les données d'Algaebase, dont deux qui se démarquent par leur quantité d'espèces qu'elles renferment. La Classe des Bangiaceae regroupe 164 espèces et celle des Florideophyceae 6 281. Cette dernière englobe 29 ordres dont celui des Gigartinales qui comprend 820 espèces dont *Solieria chordalis.* C'est le deuxième ordre le plus important après celui des Céramiales (2 493 espèces) (**Tableau I. III**). Hommersand et ses collaborateurs ont fait une étude de systématique phylogénétique des Gigartinales encore basée sur la séquence génique *rbc*L. Les chercheurs ont analysé 43 espèces de Gigartinales. Leurs résultats supportent la révision taxonomique de leur étude précédente (Hommersand *et al.* 1994) et la classification traditionnelle des caractères morphologiques. Les Gigartinales sont des carraghénophytes rangés en trois taxons d'un point de vue moléculaire :

- Les familles des *Solieriaceae, Cystocloniaceae, Hypneaceae, Caulacanthaceae, Tichocarpaceae, Furcellariaceae,* et les genres *Turnerella* et *Opuntiella*
- Les *Gigartinaceae* et les *Phyllophoraceae;*
- Les *Endocladiaceae, Gloiosiphoniaceae* et les Phacelocarpaceae (Hommersand *et al.* 1994).

De plus, en 1999, l'équipe canadienne de Chopin a démontré que les phycocolloïdes étaient des indicateurs taxonomiques pour la phylogénie des Gigartinales (Chopin *et al.* 1999a*).* Sur l'échelle de temps géologique, les Gigartinales seraient apparues il y a entre 160 et 130 millions d'années. Quant aux premières algues rouges qui étaient unicellulaires, elles datent du Précambien, il y a 2 milliards d'années (Saunders *et al.* 2004). Les premières formes de vie multicellulaires datent d'1,2 milliards d'années. Un fossile renfermant des traces d'une algue rouge est exposé au musée américain d'histoire naturelle de New York (**Figure 1. 3**).

Tableau I. III Classes,Ordres et nombre d'espèces d'algues rouges. Focus sur les Gigartinales.

Empire		Royaume		Phylum		Classe		Ordre	
Eukaryote	*37 895* *	Plante	*16 773*	Rhodophyta	*6 595*	Bangiophyceae	*164*	Acrochaetiales	*246*
								Acrosymphytales	*15*
								Ahnfeltiales	*9*
								Balbianiales	*3*
						Compsopogonophyceae	*73*	Balliales	*4*
								Batrachospermales	*192*
								Bonnemaisoniales	*34*
								Ceramiales	*2 493*
						Cyanidiophyceae	*5*	Colaconematales	*52*
								Corallinales	*667*
								Entwisleiales	*1*
								Florideophyceae incertae sedis	*18*
								Gelidiales	*198*
						Florideophyceae	*6 281*	Gigartinales	*820*
								Gracilariales	*243*
								Halymeniales	*296*
						Porphyridiophyceae	*12*	Hildenbrandiales	*18*
								Nemaliales	*255*
								Nemastomatales	*58*
								Palmariales	*44*
						Rhodellophyceae	*6*	Peyssonneliales	*111*
								Pihiellales	*1*
								Plocamiales	*70*
								Rhodachlyales	*2*
						Rhodophyta incertae sedis	*17*	Rhodogorgonales	*2*
								Rhodymeniales	*364*
								Sebdeniales	*18*
								Sporolithales	*32*
						Stylonematophyceae	*37*	Thoreales	*15*

* Les nombres en italique représentent la quantité des espèces référencées par Algaebase *(données collectées en juillet 2014).*

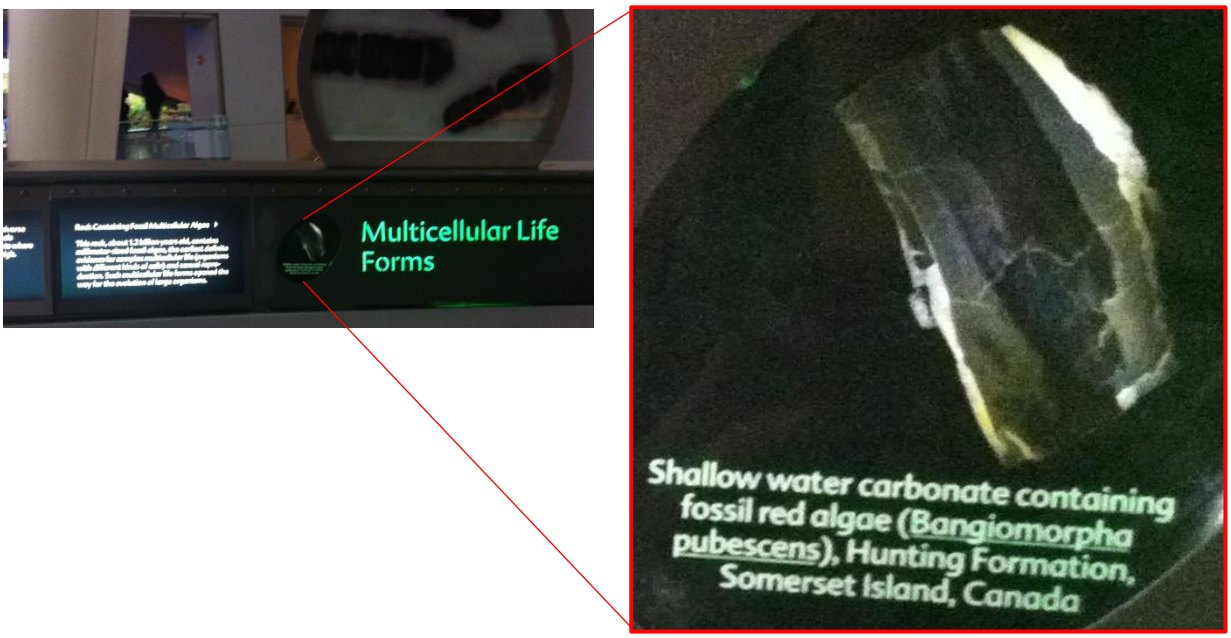


Figure 1. 3 Roche d'1,2 milliards d'années, contenant les plus vieux fossiles d'algues retrouvés jusqu'à nos jours. Il s'agit d'une algue rouge de l'ordre des Bangiales. Elle est une preuve de formes de vie multicellulaires marquant le début de l'évolution des organismes vivants plus complexes (Musée Américain d'Histoire Naturelle, New-York, décembre 2015).

La famille des *Solieriaceae* contient 18 genres dont le genre *Solieria* qui possède 9 espèces. Un récapitulatif de la classification de *Solieria chordalis* est présenté dans le **Tableau I. IV.**

Tableau I. IV Récapitulatif de la systématique de *Solieria chordalis*.

Groupe taxonomique	Nom	Nombre d'espèces	Caractéristiques	Référence
Empire	Eucaryote	37 895	Le matériel génétique est enfermé dans un noyau dans une cellule. Organismes uni- ou pluricellulaires.	Linné C. von 1788
Royaume	Plante	16 773	Organismes photosynthétiques, dont les cellules ont une paroi constituée en partie de cellulose.	Judd *et al.* 2002
Phylum	Rhodophyte	6 595	Composition pigmentaire avec de la chlorophylle a, des caroténoïdes et des pigments caractéristiques, les phycobiliprotéines (phycoérythrines)	Lobban *et al.* 1981
Classe	*Florideophyceae*	6 281	Basées sur l'ADN plastidial de la sous-unité large de la RuBisCO (séquence *rbc*L). Croissance du thalle à partir de cellules apicales. Les ramules latérales sont initiées à partir de noyaux de connexion. Cycle de vie triphasique. Les cellules reproductrices se trouvent sur la partie terminale des filaments ou sur les ramules latérales.	Saunders *et al.* 2004, Le Gall *et al.* 2007
Ordre	Gigartinales	820	Basées sur l'analyse de la séquence du gène *rbc*L. Thalles filamenteux uni- ou multiaxiaux. La cellule auxiliaire est présente avant la fécondation.	Hommersand 1994, de Reviers 2003
Famille	*Solieriaceae*	88	Possession de tétraspore zonate[2]. Basées sur l'analyse du gène *rbc*L.	Fredericq *et al.* 1999
Genre	*Solieria*	9	En coupe transversale, la médulla montre des cellules de petite taille et les cellules du cortex ne sont pas étoilées. Les ramules de dernier ordre sont disposées unilatéralement.	FAO 2014
Espèce	*Solieria chordalis*	1	Observations de 1842 par J. Agardh. Analyse de la séquence du gène *rbc*L.	Agardh 1842, Fredericq *et al.* 1999

[2] Les thalles adultes diploïdes (tétrasporophytes) produisent des tétraspores par méiose. Une tétraspore zonate peut être imaginée comme étant une masse ronde divisée parallèlement en quatre disques haploïdes. Chaque disque correspond à une seule spore donnant naissance à un thalle juvénile, le gamétophyte.

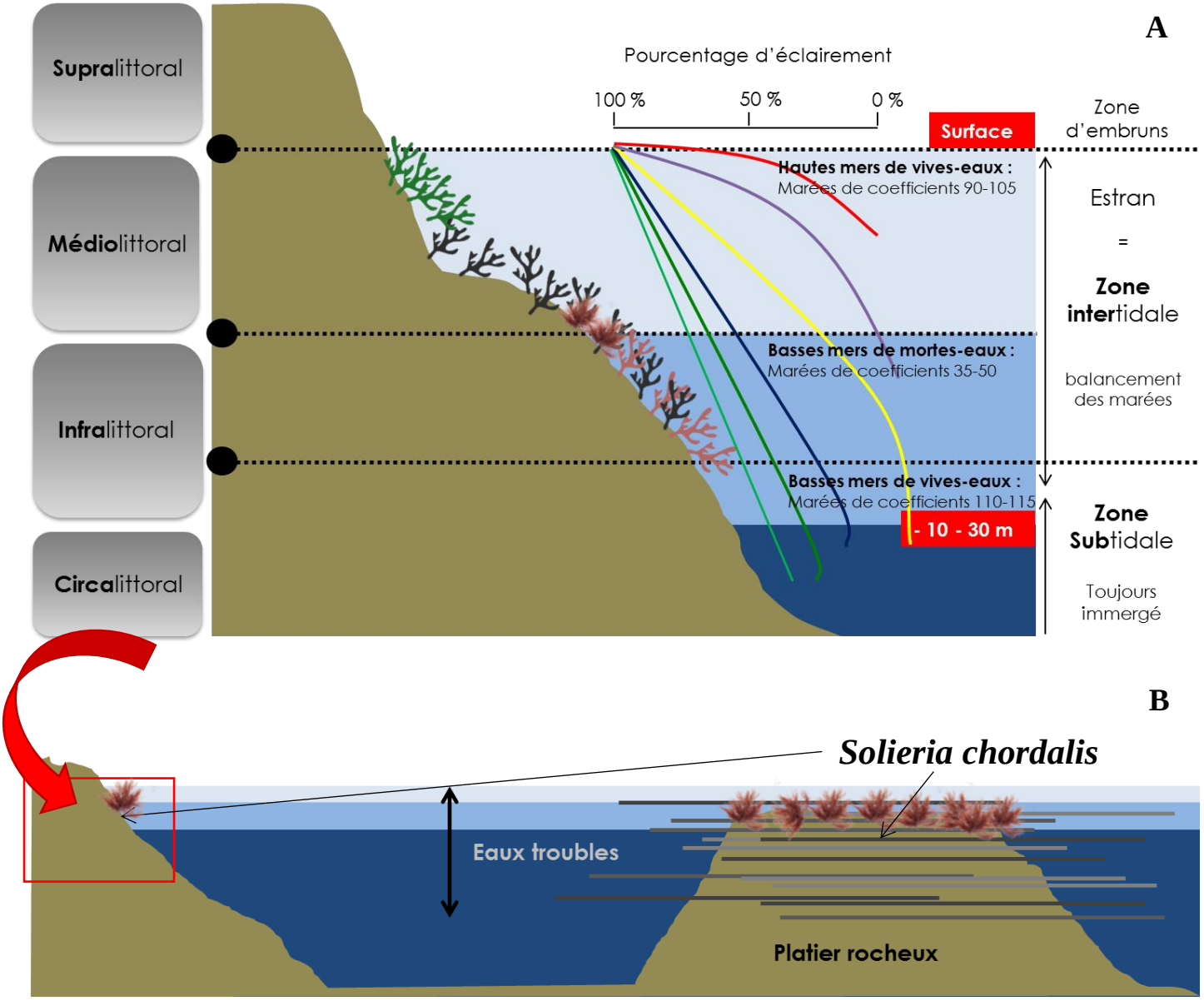
3. Environnement et écologie

3.1. Rôle écologique

Les algues ont une importance écologique capitale. Dans un environnement aquatique marin, la production de matière organique issue de la photosynthèse, par des organismes autotrophes (producteurs primaires), est assurée à hauteur de 99 % par les formes microscopiques, notamment le phytoplancton mais aussi par les formes macroscopiques (Kasting et Siefert 2002). Cette flore algale constitue alors la base de la chaîne alimentaire. Quant à la photosynthèse marine, les algues produisent une source d'oxygène. Cette dernière est consommée par les animaux marins et le zooplancton et par l'oxydation de la matière organique morte (Beaux *et al.* 2012). Néanmoins, une proportion faible de cette matière organique (environ 0,1 %) est ensevelie dans les sédiments. Cette fuite de cette matière organique a une répercussion dans le cycle du carbone et est responsable d'une grande partie de la quantité d'oxygène atmosphérique (Kasting et Siefert 2002). En effet, l'oxygène libre, dissout dans l'eau, n'est pas transformé et arrive dans l'atmosphère où l'homme pourra l'utiliser pour sa propre survie.

3.2. Milieu de vie

D'après leur distribution géographique *(Cf. Chapitre I 2. Histoire, systématique et distribution géographique)*, les espèces de *Solieriaceae* se développent préférentiellement dans des eaux subtropicales chaudes et dans des zones tempérées dans lesquelles la chaleur n'est pas permanente mais interrompues par des hivers doux. *S. chordalis* est une macroalgue marine qui peut vivre dans des eaux entre 5 et 22 °C (Floc'h *et al.* 1987). Elle peut subir des variations fréquentes de salinité, de 26 à 35 g/L, dues aux apports pluviaux qui peuvent engendrer des dessalures. En outre, *S. chordalis* subsiste à des variations en apports nutritifs (azote et phosphate) provenant en grande partie du lessivage des terres agricoles (Floc'h *et al.* 1987). D'après les observations en plongée sous-marine dans le cadre du projet Littoralg et en accord avec la littérature, *S. chordalis* peut être qualifiée de sciaphile. En effet, elle a été retrouvée dans des milieux turbides où la lumière disparaît très vite avec la profondeur. Elle se développe en deçà de 7 à 8 mètres **(Figure 1. 4).**



A *Distribution verticale des macroalgues sur le littoral et hypothèse de l'adaptation chromatique* (inspiré de Gayral et Casson 1986 et d'IFREMER en ligne 2015). *Cette dernière est représentée par les différentes courbes de couleur. Chaque courbe correspond à une radiation lumineuse de longueur d'onde spécifique. Par exemple, la courbe rouge est la radiation lumineuse à 650 nm et la courbe verte à 500 nm.*

B Solieria chordalis *est trouvée à quelques mètres de profondeurs (0-8 m) dans des eaux en général troubles. Lors du projet Littoralg, des plongées sous-marines ont été effectuées confirmant la présence d'une « prairie » de* S. chordalis *sur des platiers rocheux au large de la côte sud de la Bretagne.*

Figure 1. 4 Distribution des macroalgues et de *Solieria chordalis* sur le littoral.

Les plongeurs ont noté que sur plusieurs sites, particulièrement dans le Golfe du Morbihan, les algues rouges disparaissaient à cette limite bathymétrique. Ces espèces délimitent

ainsi le passage de l'infralittoral au circalittoral. De plus, les plongeurs ont également constaté que vers la limite supérieure de l'infralittoral, l'espace pouvait être occupé par des crustacés et des mollusques comme des moules associées à des algues brunes. Quelques algues vertes pouvaient aussi être présentes. Ces présences et ces interactions plantes-animaux-micro-organismes influencent grandement la distribution verticale des communautés algales sur l'estran (Dawes 1998, Karleskint *et al.* 2012). Pour que *S. chordalis* puisse se fixer et se développer, un substrat dur est nécessaire. La taille de ce dernier importe peu et peut être de granulométrie variable allant des rochers aux coquilles de bivalve en passant par des galets, des graviers et des cailloux.

En outre, dans des profondeurs moins élevées où la vase est présente, *S. chordalis* a été retrouvée (Perrin et Pierson 2015). Les algues sont échouées, non fixées au sédiment meuble et se déplacent au gré des courants. Dans le cadre du projet Littoralg, il a été observé sur des platiers rocheux que l'algue couvrait le substrat en de vastes « prairies » où elle est présente en exclusivité **(Figure 1. 5).** Les plongeurs ont remarqué que des épiphytes s'étaient installés sur les thalles de l'algue tels que des bryozoaires encroûtant comme *Electra pilosa* (Perrin et Pierson 2015).

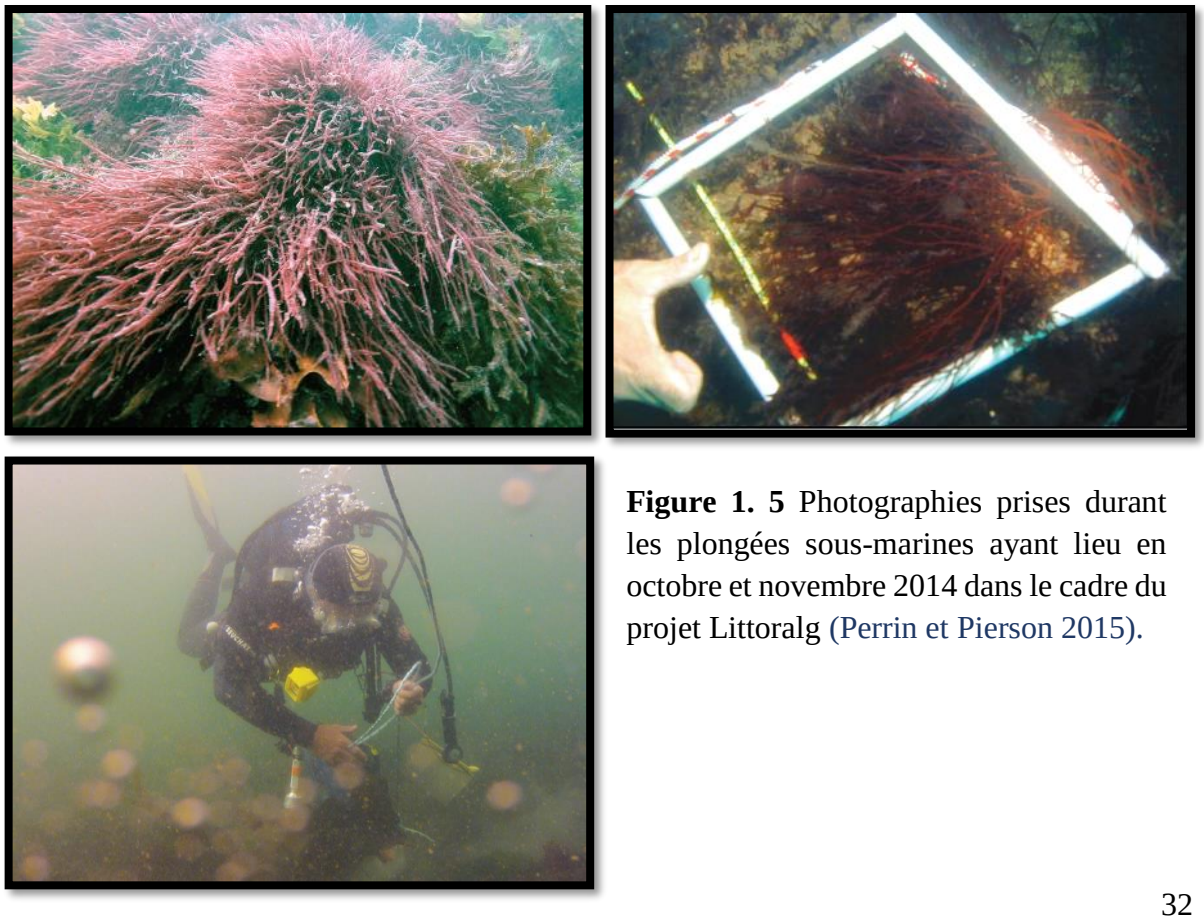


Figure 1. 5 Photographies prises durant les plongées sous-marines ayant lieu en octobre et novembre 2014 dans le cadre du projet Littoralg (Perrin et Pierson 2015).

3.3. Proliférations

En Bretagne comme dans de nombreux endroits dans le monde, des proliférations d'algues vertes, brunes ou rouges ont été observées (Liu *et al.* 2009, Bourgougnon et Stiger-Pouvreau 2011, Smetacek *et al.* 2013). Ces espèces responsables des marées d'algues ont une capacité à se développer rapidement en réponse à un excès de nutriments (les principaux sont le carbone, l'azote et le phosphate), à condition que toutes les conditions de croissance optimales soient réunies (température de l'eau, salinité, luminosité, accessibilité aux nutriments) (Foscarini *et al.* 1990). L'enrichissement anthropogénique en nutriments des eaux marines (eutrophisation) peut être considéré comme un élément important dans les problèmes écologiques que causent ces marées d'algues (Moncheva *et al.* 2001). *S. chordalis* est une espèce pérenne. Cependant, d'après des élus communaux, cela fait quelques années, plus de dix ans, que *S. chordalis* prolifèrent sur les plages de Bretagne Sud entre juin et novembre, cela dépend des années (**Figure 1. 6**) (Entretien avec Frédéric PINEL, Adjoint au maire en charge de l'environnement de St Gildas de Rhuys dans le Morbihan le 23 juin 2015).

Le Centre d'Études et de Valorisation des Algues (CEVA) a initié une étude sur la dynamique des populations de *Solieria* en Bretagne Sud pour mieux comprendre et prévoir les conditions de colonisation et d'échouage de ces algues. Les chercheurs du CEVA ont écrit un rapport relatant leurs actions qui ont permis de rassembler un ensemble de connaissances sur *S. chordalis*. Les volumes d'algues ramassés sont de l'ordre de la dizaine ou de la centaine de m^3 selon les plages et peuvent être supérieurs à 1 000 m^3 dans des cas exceptionnels. Dans le rapport du CEVA, il est mentionné que les échouages étaient le plus souvent observés lors des tempêtes d'équinoxe d'automne. Les algues sont arrachées de leur substrat puis, avec les vents et les marées locaux, elles dérivent jusqu'aux plages. Les échouages apparaissent en général une à deux fois par an. En période estivale, il est fort possible de tomber face à des quantités importantes d'algues (CEVA 2012). Il est alors aisé de comprendre que cette abondante biomasse naturelle engendre des contraintes économiques aux communautés touchées, qui doivent les enlever des plages pour ne pas freiner l'arrivée des touristes et pour éviter aux riverains des expositions possibles à l'hydrogène sulfuré, gaz toxique émis par les algues en décomposition (Bourgougnon et Stiger-Pouvreau 2011). De plus, ces échouages posent de réels problèmes écologiques. La prolifération de *S. chordalis* laisse moins d'espace pour la flore et la faune déjà existantes. Les tracteurs employés par les communautés pour ramasser les algues abîment en même temps ces écosystèmes côtiers.

Figure 1. 6 Quelques photographies prises le même jour lors d'un échouage massif de *S. chordalis* en Bretagne Sud (St Gildas de Rhuys, Morbihan, plage de Kerfago le 10 octobre 2013).

Sur les plages de Bretagne Sud, il est question de plus de 2 000 tonnes (jusqu'à 9 000 tonnes) d'algues rouges collectées par an et principalement de la *S. chordalis* (Tavennec 2009). Cette importante biomasse engendre des perturbations de l'écosystème. Elle nuit gravement par exemple à certaines espèces d'oiseaux déjà menacées comme l'aigrette garzette ou listées en voie de disparition comme le Gravelot à collier interrompu, observés sur les plages de Bretagne Sud (Tavennec 2009) (**Figure 1. 7**).

A

B

A *Aigrette garzette* Egretta garzetta
B *Gravelot à collier interrompu* Charadrinus alexandrinus

Figure 1. 7 Espèces menacées notamment par la prolifération de *S. chordalis (*Tavennec 2009, Knochel 2015).

Une ressource naturelle de *S. chordalis* est disponible en grande quantité à une certaine période de l'année. Afin d'en tirer profit et de faire face à un problème écologique et économique, il est important d'établir un état de l'art sur la composition biochimique ainsi que sur les propriétés physico-chimiques et/ou activités biologiques rapportées des différentes familles de molécules qui composent les algues rouges et tout particulièrement *S. chordalis.*

4. Morphologie, composition biochimique, physiologie et cycle de vie

S. chordalis est une algue rouge qui se caractérise par sa morphologie macro- et microscopique, par l'ensemble des constituants qui la composent et par un cycle de vie régulé par des mécanismes internes mais aussi externes. Les métabolites primaires et secondaires synthétisés par l'algue dans certaines conditions sont des molécules qui peuvent s'avérer bénéfiques pour diverses applications.

4.1 Morphologies macro- et microscopiques

S. chordalis doit son nom à sa structure en filaments ressemblant à des cordes. En effet, les espèces du genre *Solieria* ont une base filamenteuse et leurs thalles peuvent atteindre entre 10 à 25 cm de haut. Les thalles de *Solieria chordalis* possèdent en général deux ou trois ordres de branchement et sont de couleurs rouge-bordeaux à rouge-noir. Les thalles sont composés de filaments cylindriques majeurs sur lesquels des ramules vont pousser (*Cf.* **Figure 1. 1**). Les filaments et les ramules sont solides et de diamètres similaires allant de 0,5 à 2 mm. Les filaments d'un même thalle se développent simultanément à partir d'un ensemble de quatre à huit cellules apicales qui se divisent (Gabrielson et Hommerstand 1982). La base du thalle est constituée d'un ensemble de filaments enchevêtrés formant les haptères. Ces derniers vont envelopper le point d'ancrage et ainsi le solidifier. La ramification est irrégulière et souvent unilatérale. Les ramules sont amincies à la base et au sommet (**Figure 1. 8**). La morphologie macroscopique de *S. chordalis* varie au cours des saisons (**Figures 1. 1 et 1. 8**). Leur taille change ainsi que leur couleur, le nombre et la taille de leurs ramules. Les thalles juvéniles sont peu ramifiés contrairement aux thalles adultes sur lesquels vont croître de courtes ramules d'1 à 4 cm.

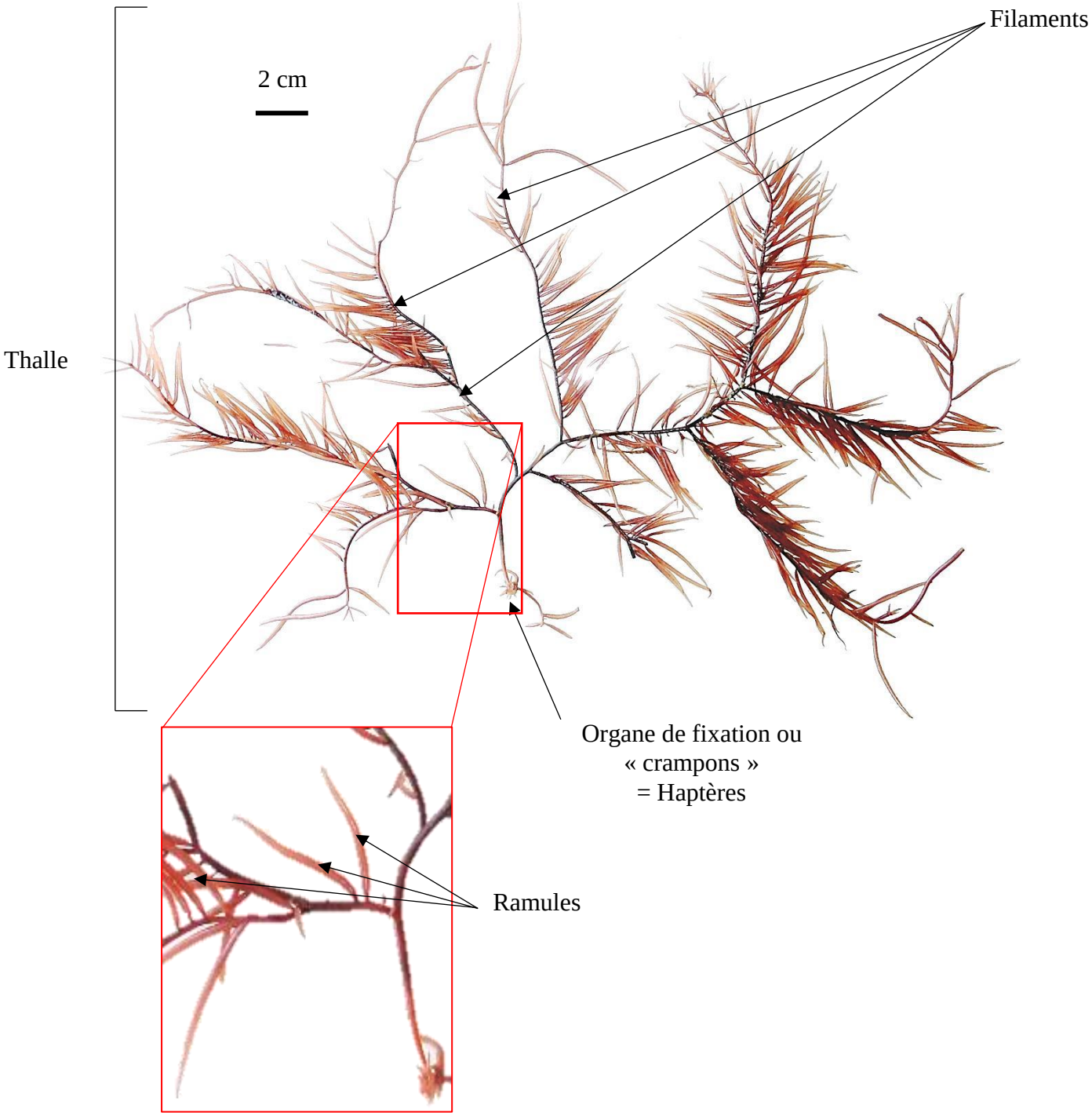
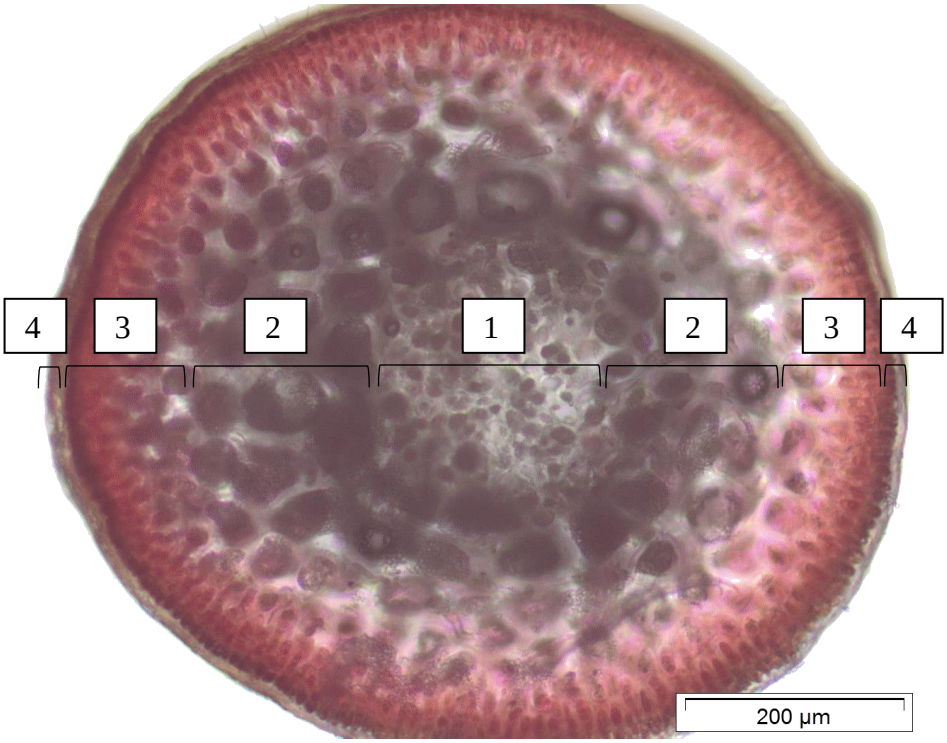


Figure 1. 8 Morphologie macroscopique de *S. chordalis* collectée en avril 2015 à Saint Gildas de Rhuys.

D'un point de vue microscopique, une coupe transversale d'un filament peut être nécessaire pour distinguer *Solieria chordalis* des espèces morphologiquement comparables comme les espèces de *Gracilaria* (Lauret *et al.* 2011). Une coupe transversale d'un filament d'un thalle de *S. chordalis* se présente sous forme de cercle rempli de matière. De l'extérieur vers l'intérieur, une couronne de petites cellules corticales colorées par les plastes est observable, puis des cellules du parenchyme qui sont incolores et plus grosses. Enfin, au centre, des tubes creux contenant des filaments enchevêtrés sont présents et forment le médulla (**Figure 1. 9**).



1 : Zone axiale
2 : Médulla
3 : Cortex : cellules corticales pigmentées et cellules sub-corticales
4 : Épiderme (cuticule)

Figure 1.9 Coupe transversale d'un filament de *S. chordalis* observée au microscope optique (Grossissement x 100).

L'intérieur du cortex est composé de trois couches de 4 à 5 ceintures de cellules sphériques et ellipsoïdales qui deviennent progressivement plus petites vers l'extérieur. Elles auraient le rôle d'entreposer l'amidon floridéen qui est perceptible au microscope optique (**Figure 1. 10**). Gabrielson et Hommerstand ont fait des coupes longitudinales de *S. chordalis*

et ont ainsi observé des cellules longues et étirées à la verticale, dans la médulla, formant une sorte de « moelle » au centre des axes du thalle de l'algue (Gabrielson et Hommerstand 1982) (**Figure 1. 11**).

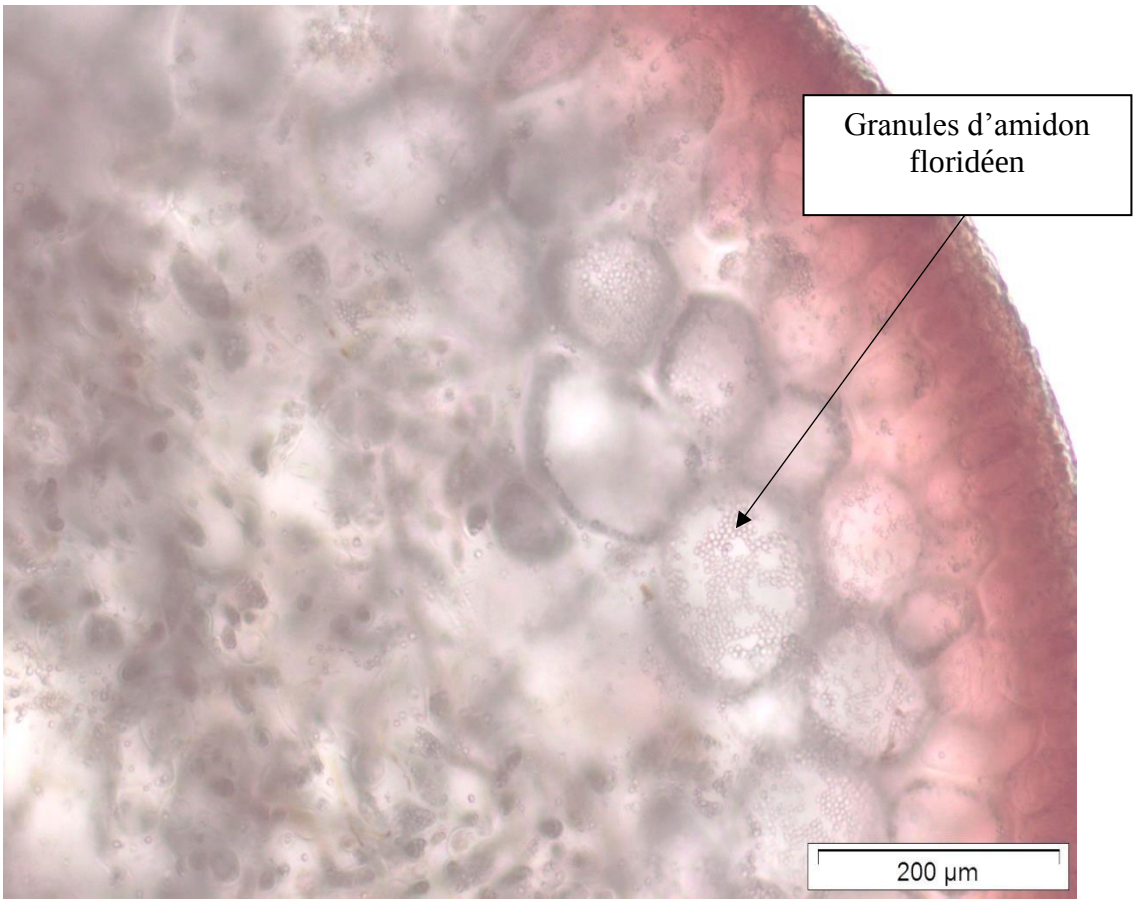
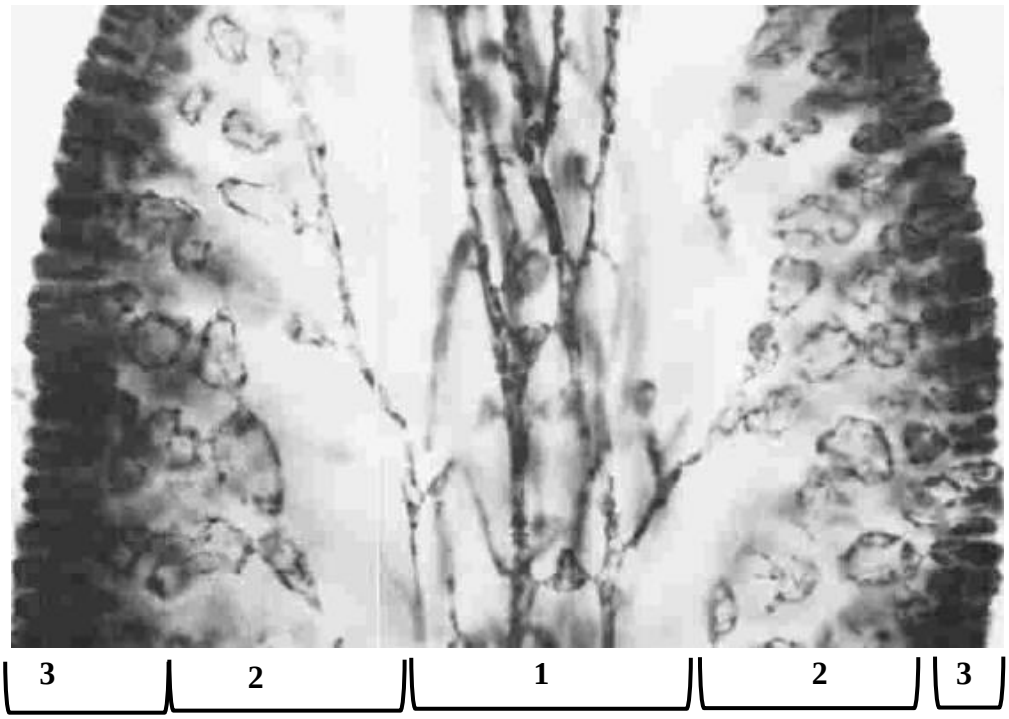


Figure 1. 10 Coupe transversale d'un filament de *S. chordalis*, observée au microscope optique mettant en avant les granules d'amidon floridéen (Grossissement x 400).



1 : Médulla, Zone axiale
2 : Cortex
3 : Epiderme

Figure 1. 11 Coupe longitudinale d'un filament de *S. chordalis* (Gabrielson et Hommerstand 1982).

4.2. Composition biochimique, physiologie et activités biologiques

Les macroalgues rouges comme tous les végétaux sont constituées essentiellement d'eau jusqu'à 90 % de leur poids (Denis 2009). En se développant, l'algue métabolise des composés qui lui sont vitaux pour sa survie, sa reproduction et son bon fonctionnement ; il s'agit des métabolites primaires. Ce métabolisme primaire est commun à tous les organismes. Chez les algues rouges, les glucides sont en grande quantité. En effet, ils composent la paroi qui entoure et protège toutes les cellules de l'algue. Dans certaines conditions, l'algue peut se sentir menacée par un stress qui peut être d'ordre biotique ou abiotique, alors elle sera capable de produire des composés qui feront face à ces stress. Ces composés appartiennent au métabolisme secondaire. Ces derniers peuvent également avoir un rôle dans la signalisation et dans la communication entre espèces.

D'après Braekman et Daloze (1983), les métabolites primaires traduisent l'unité du monde du vivant et les métabolites secondaires sa diversité (Braeckman et Daloze 1983, Kornprobst 2005).

4.2.1. Les métabolites primaires

4.2.1.1. Protéines, acides aminés, composés azotés.

Parmi les trois principaux groupes de macroalgues, ce sont les algues rouges qui possèdent le plus de protéines, à hauteur de 10 à 50 % de leur poids sec. Chez *Palmaria palmata* et chez *Porphyra tenera* (sushi), les protéines peuvent représenter respectivement jusqu'à 35 % et 47 % de la matière sèche de l'algue. Ce sont des valeurs comparables à celles des végétaux supérieurs réputés pour leur forte teneur en protéines comme le soja (Burtin 2003). Le rôle fondamental des protéines dans la nutrition, pour la physiologie et l'écologie des algues a beaucoup été étudié ces dernières années (Angell *et al.* 2015). Les protéines sont des molécules essentielles à toutes formes de vie. Elles ont de nombreux rôles dont ceux de transporter des ions, d'adhérer aux cellules, d'assister des réactions biochimiques cellulaires ou encore de détoxifier les cellules. De plus, face à des pathogènes ou en cas de blessure, les protéines des parois peuvent être impliquées dans la protection de l'algue (Garion-Lardière 2004).

La composition en acides aminés a été étudiée pour certaines. Pour la plupart des algues, deux acides aminés sont en grande quantité. Il s'agit de l'acide glutamique et de l'acide aspartique. Avec l'alanine, ces trois acides aminés sont les principaux constituants qui donnent la flaveur[3] aux algues. La présence du glutamate confère un caractère de palatabilité[4] à l'algue, spécifique au goût umami décrit pour la première fois par les Japonais. De plus, les algues rouges possèdent quelques acides aminés essentiels tels que la valine, la leucine, la méthionine, l'isoleucine et la thréonine. Leurs teneurs sont proches de celles retrouvées dans le blanc d'œuf et chez le soja (Fleurence 1999).

Depuis quelques années, la richesse des algues en protéines suscite l'intérêt de la recherche appliquée. En effet, de nombreuses activités pour divers domaines d'applications ont été démontrées. Ces dernières peuvent s'étendre de la nutrition, de la santé humaine et animale

[3] Désigne l'ensemble des sensations ressenties au niveau de la bouche à savoir le goût et les odeurs. Ces sensations sont mêlées et perçues sans distinction.
[4] Texture de l'aliment agréable au palais.

(Fleurence 1999), des fertilisants (Craigie 2011), jusqu'aux cosmétiques (Neveux *et al.* 2014). De nombreux peptides, dont les séquences en acides aminés ont été caractérisées, ont montré des bioactivités antioxydante, anticoagulante, anticancéreuse ou encore immunostimulante (Samarakoon et Jeon 2012). L'utilisation des algues comme sources de protéines a duré pendant plusieurs décennies en raison de carences, exclusivement dans les pays en développement. Ainsi, les algues sont devenues une alternative peu chère à la demande en acides aminés manquants. Les profils des acides aminés varient en fonction de l'espèce, mais la plupart des algues contient tous les acides aminés essentiels (Miŝurcová 2011).

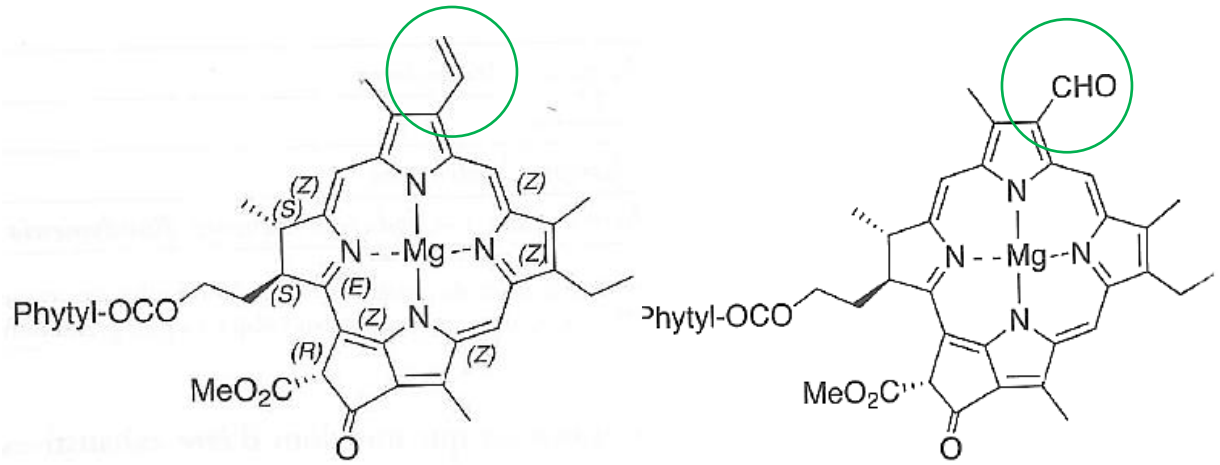
Deux études ont été menées sur les protéines de *S. chordalis*. Rogers et Topliss (1983) ont isolé une protéine de 35 kDa qui pourrait correspondre à une sous-unité d'une plus large molécule d'hémagglutinine. En effet, l'agglutine de *S. chordalis* agglomère des érythrocytes humains, mais seulement en présence d'albumine. Elle se lie spécifiquement à des récepteurs incorporant de l'acide sialique, qui est un dérivé de sucres aminés à la surface des érythrocytes de beaucoup d'animaux et jouant un rôle dans les interactions intercellulaires (Rogers et Topliss 1983). Plus récemment, Bondu *et al.* 2014 ont obtenu des hydrolysats protéiques de *S. chordalis* grâce à l'action d'enzymes. Ils ont séparé les peptides en deux groupes et ont évalué leurs activités antioxydante et hypertensive. Le 1er groupe englobe des peptides dont le poids moléculaire se trouve entre 1,4 et 3,2 kDa et montre une activité antioxidante. 61 % des peptides identifiés de ce groupe proviennent de l'hydrolyse de la RuBiSCo et 3 % proviennent de celles de la phycoérythrine, des facteurs d'élongation, des composés des photosystèmes et de la cytochrome oxydase. Quant au 2ème groupe, il regroupe des petits peptides inférieurs à 1 kDa qui possèdent des propriétés antioxydante et antihypertensive. Ils sont issus des mêmes constituants protéiques que mentionnés précédemment à hauteur de 43 % et 14 %, respectivement (Bondu *et al.* 2014).

En outre, les algues possèdent des composés azotés autres que les protéines, peptides et acides aminés. L'azote non protéique est présent dans les pigments, dans les nitrates, nitrites et dans les ions ammonium, sans oublier dans chaque cellule sous forme d'acides nucléiques (Miŝurcová 2011).

4.2.1.2. Les pigments

Les pigments sont des molécules dont le rôle physiologique est primordial. Ils captent l'énergie lumineuse nécessaire à la photosynthèse. Leur différence réside notamment dans leur structure et par conséquent dans les longueurs d'ondes absorbées. Les algues rouges possèdent principalement des chlorophylles (a et d), des caroténoïdes et des phycobiliprotéines. Leurs structures sont présentées sur les Figures **1. 12 et 1. 13.**

Les chlorophylles sont solubles dans les solvants organiques. Leurs structures comportent un cycle tétrapyrrolique et une chaîne phytol. La chlorophylle d ne diffère de la chlorophylle a que par le substituant sur un des carbones : un vinyl pour la a et un aldéhyde pour la d. La chlorophylle d a été extraite chez certaines algues rouges comme chez *Grateloupia dichotoma* (Munier 2013). Les chlorophylles sont à l'origine de la couleur verte des végétaux. Elles sont localisées dans les chloroplastes. Ces pigments assurent l'essentiel de la capture de l'énergie lumineuse alors que les caroténoïdes ont plus un rôle de protection de l'appareil photosynthétique contre un excès d'énergie lumineuse (**Figure 1. 12**).

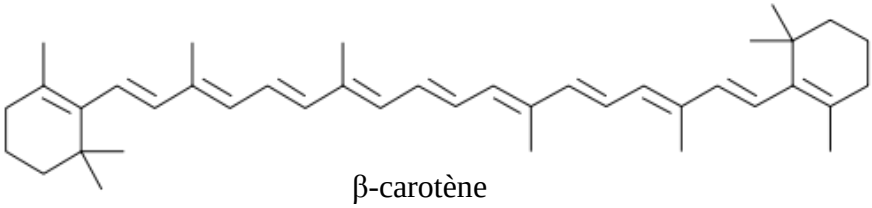


Chlorophylle a

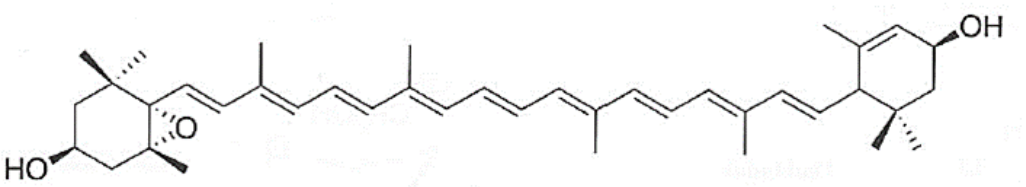
Chlorophylle d

Figure 1. 12 Structure des chlorophylles a et d (Kornprobst 2005).

Les caroténoïdes contribuent aussi à la stabilisation de la structure membranaire des chloroplastes et à la capture des photons en tant que pigment surnuméraire. Ce sont des pigments rouge, orange ou jaune liposolubles positionnés dans les chloroplastes. Ils se divisent en deux grandes familles : les carotènes et les xanthophylles. Du β-carotène a été retrouvé chez la Gigartinale *Gigartina stellata* et chez d'autres macroalgues rouges comme chez *Polysiphonia brodiaei* et *Polysiphonia urceolata* (Kornprobst 2005). Des xanthophylles sont aussi présentes comme la lutéine, la fucoxanthine, la zéaxanthine et la violaxanthine. De plus une xanthophylle spécifique caractérise les algues rouges, il s'agit de la taraxanthine qui ressemble à la lutéine (**Figure 1.13)**.



β-carotène



Taraxanthine

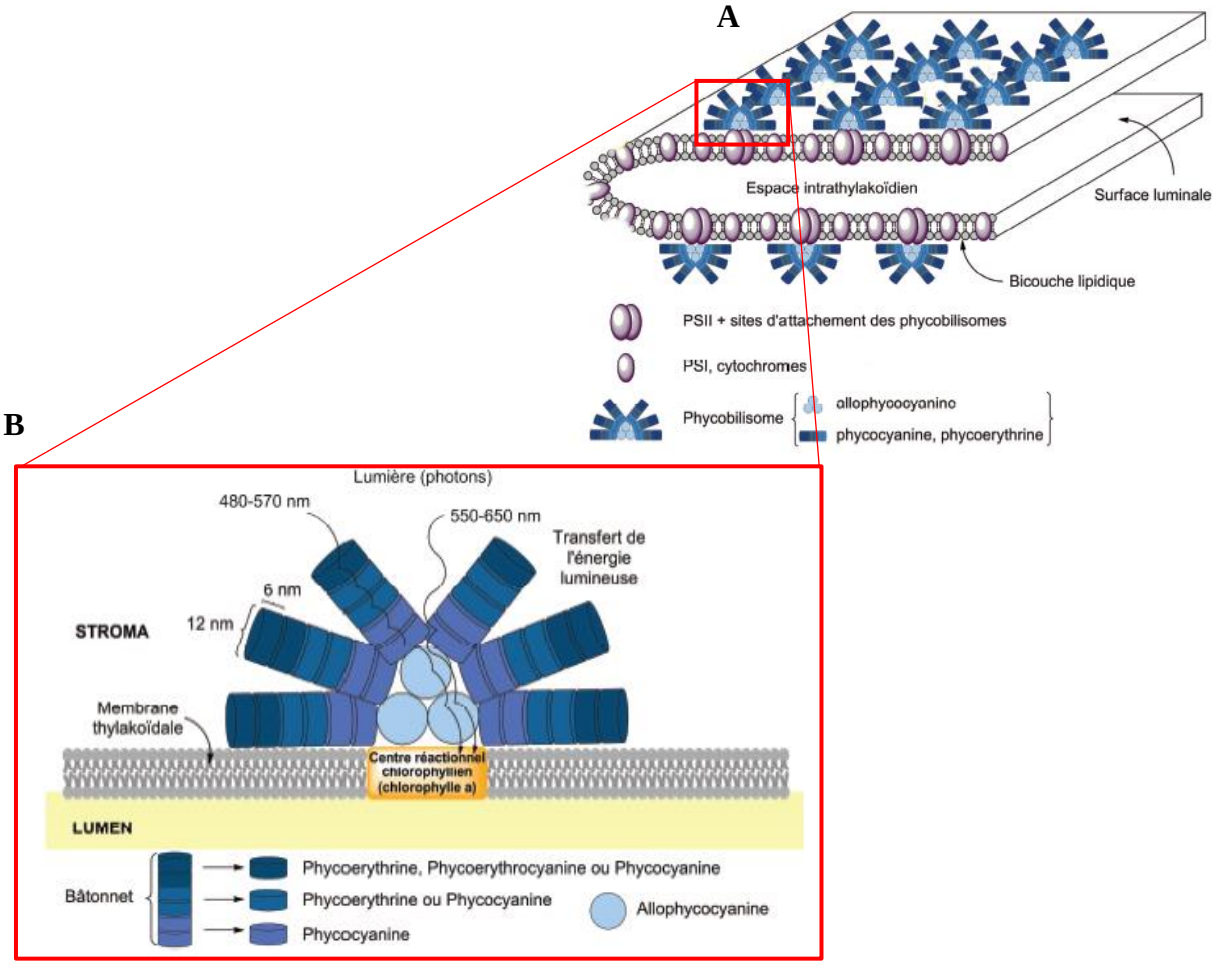
Figure 1. 13 Exemples de structures de caroténoïdes (Kornprobst 2005).

Enfin, la dernière classe de pigments présents chez les algues rouges est celle des phycobiliprotéines. Contrairement aux chlorophylles et aux caroténoïdes, les phycobiliprotéines sont hydrosolubles. Il en existe plusieurs : la phycoérythrine, la phycoérythrocyanine, l'allophycocyanine et la phycocyanine. Ces molécules sont constituées d'une partie protéique oligomérique (apoprotéine) liée à des chromophores non cyclisés et ont alors un poids moléculaire élevé. Chez l'algue rouge *Gracilaria longa*, le poids moléculaire de la phycoérythrine est de 260 kDa (Munier 2013). Dans les cellules algales, les phycobiliprotéines sont des pigments accessoires organisés en des structures supramoléculaires

connues sous le nom de phycobilisome. Ils sont trouvés à la surface externe des thylakoïdes[5] des chloroplastes. Parmi les phycobiliprotéines, la phycoérythine est la plus présente chez les algues rouges. Francavilla et ses collaborateurs ont extrait les phycobiliprotéines de l'algue rouge *Graciaria gracilis*. Ils ont montré que cette algue possédait 7 mg de phycoérythrine dans 1g de matière sèche (MS), 3,5 $mg.g^{-1}$ de MS d'allophycocyanine et 2 $mg.g^{-1}$ de MS de phycocyanine (Francavilla *et al.* 2015) (**Figures 1. 14 et 1. 15**). La phycoérythrine est ainsi retrouvée en large quantité par rapport aux autres phycobiliprotéines, ce que confirme l'étude de Sudhakar *et al.* chez *Gracilaria crassa* et celle de Dumay *et al.* chez *Palmaria palmata* (Dumay *et al*. 2013, Sudhakar *et al.* 2015).

Aujourd'hui, ce pigment naturel est utilisé principalement en Asie en tant que colorant pour l'alimentation, mais aussi pour colorer des jouets, des produits cosmétiques, des boissons ou bien pour en faire de la peinture (Dumay *et al.* 2013*).* En plus de sa propriété de colorant rose-rouge, la phycoérythrine possède une fluorescence jaune et est ainsi utilisée en recherche médicale, en immunologie ou encore en biologie cellulaire (Sekar et Chandramohan 2008, Senthilkumar *et al.* 2013). Pour finir, les phycobiliprotéines ont démontré de nombreuses bioactivités (Sekar et Chandramohan 2008*).* Par exemple, chez la Gigartinale *Portiera hornemannii*, la phycoérythrine décrite comme une protéine oligomérique de 240 kDa avec sous-unités a été mise en avant comme étant une bonne candidate pour augmenter la sensitivité de certaines cellules cancéreuses, les rendant alors plus vulnérables aux médicaments conventionnels tout en diminuant leurs effets secondaires (Senthilkumar *et al.* 2013).

[5] Ensemble de membranes présentes dans les chloroplastes sur lesquelles se déroule la phase photochimique de la photosynthèse.



A *Les phycobilisomes sont proches les uns des autres et se trouvent sur la membrane extérieure des thylakoïdes dans les chloroplastes des cellules algales.*
B *Un phycobilisome est une association de phycobiliprotéines, dont la phycoérythrine, permettant de transférer l'énergie lumineuse aux centres réactionnels des photosystèmes lors de la photosynthèse.*

Figure 1. 14 Représentation schématique de la phycoérythrine contenue dans les phycobilisomes sur la membrane des thylakoïdes des chloroplastes (modifié de Glazer 1984, Munier 2013).

Cet enchainement de phycobiliprotéines assure le transfert de l'énergie lumineuse de manière efficace depuis des chromophores absorbants dans le vert (phycoérythrine) vers ceux absorbant dans le rouge (allophycocyanine) pour enfin transmettre l'excitation chimique au centre réactionnel composé de chlorophylles.

Figure 1. 15 Voie de transfert de l'énergie lumineuse au sein du phycobilisome (Munier 2013).

4.2.1.3. Lipides et dérivés

Les lipides sont des substances d'origine biologique, solubles dans des solvants non polaires. Ils sont en général composés d'une base en longues chaines carbonées. Leur classification est complexe et n'est toujours pas arrêtée à l'heure actuelle (Leray 2010). Selon l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (UICPA ou IUPAC en anglais), les lipides seraient classés en deux grands groupes, les lipides saponifiables[6] tels que les glycérides (graisses et huiles) et les phospholipides, et les lipides non-saponifiables que sont principalement les stérols (IUPAC 2015). Les lipides constituent les membranes cellulaires et leur confère une semi-perméabilité (bicouche de phospholipides). De plus, ils servent également de réserve énergétique, de messagers cellulaires en se liant à des protéines et servent aussi en tant que substrats métaboliques.

Dans leur constitution, les algues rouges possèdent des lipides. Cependant, ils ne sont pas en grande proportion par rapport aux autres constituants de l'algue. En effet, ils ne dépassent pas 4 % de la matière sèche. Par exemple, chez les algues rouges comestibles *Palmaria palmata* et *Porphyra sp.*, ils représentent respectivement 1,8 et 1,03 % de la matière sèche (Sanches – Machalo *et al.* 2004). Chez *Laurencia papillose* et *Galaxoura cylindrica*, les lipides totaux ne dépassent pas les 1 % (0,81 % et 0,09 % de la MS) (El Baz *et al.* 2014). Une analyse des lipides a été effectuée sur *S. chordalis.* Les résultats ont montré une faible teneur de ces composés (moins de 3 % de la matière sèche de l'algue). Néanmoins, ces derniers sont représentés par d'importantes proportions d'acides gras oméga-3 et oméga-6 (Kendel *et al.* 2015).

Les algues sont pourtant une source d'intérêt économique pour leurs lipides, car la qualité de ces derniers intéresse les industries et en particulier celle de l'agroalimentaire (Gunstone *et al.* 1994). En effet, une partie des lipides retrouvés chez les algues rouges sont des acides gras polyinsaturés (AGPI ou PUFA en anglais). Les algues rouges sont riches en acides gras à 20 carbones avec quatre ou cinq doubles liaisons (Kornprobst 2005). De nombreuses études ont été menées sur les acides gras chez les plantes et les algues. Ces dernières se focalisaient sur la variation saisonnière des acides gras, leurs différences selon leur localisation dans la plante ou dans l'algue, la génomique, l'impact de différentes conditions de croissance ou encore sur des applications potentielles en aquaculture. Aujourd'hui, les recherches sont ciblées sur leurs propriétés fonctionnelles bénéfiques pour l'alimentation. Les PUFAs sont plus

[6] Les fonctions ester d'un lipide peuvent se transformer sous l'action de l'eau ou de bases en un acide, un alcool ou en un phénol.

connus sous les noms d'oméga 3 et d'oméga 6. La différence entre ces deux familles vient de la position de la première double liaison à partir de l'extrémité méthyle terminale de l'acide gras (**Figure 1. 16**).

Acide arachidonique (oméga 6) Acide eicosapentaénoïque (oméga 3)

Figure 1. 16 Deux acides gras polyinsaturés retrouvés chez les algues rouges.

Les PUFAs doivent être apportés par l'alimentation, car de nombreux animaux, dont l'être humain, sont incapables de les synthétiser. Ce sont des précurseurs indispensables à l'origine de dérivés métaboliques impliqués dans de multiples fonctions physiologiques (Lavialle et Layé 2010). Chez *Chondrus crispus* et *Polysiphonia lanosa*, plus de 20 acides gras ont été observés dont l'acide palmatique qui est en grande quantité suivi par l'acide oléique, l'acide arachidonique (oméga-6) et l'acide eicosapentaenoique (oméga-3). Ces deux algues rouges possèdent un profil lipidique complexe dont la plupart des structures de lipides ont été retrouvées chez les végétaux supérieurs (Trevor *et al.* 1989). Dembitsky et ses collaborateurs ont analysé la composition lipidique de 14 espèces d'algues marines de la mer Noire et ont montré que plus de 70 % des lipides totaux des algues rouges étaient de l'acide arachidonique et l'acide eicosapentaenoique (Dembitsky et Rozentsvet 1990). Chez trois Gigartinales de la famille des *Solieriaceae*, deux acides cyclopentaniques ont été détectés. Il s'agit du dihydrohydnocarpique (16 carbones) et du dihydrochaulmoogrique (18 carbones). Ces acides pourraient être des marqueurs chimiotaxonomiques de la famille des *Solieriaceae* (**Figure 1. 17**) (Kornprobst 2005).

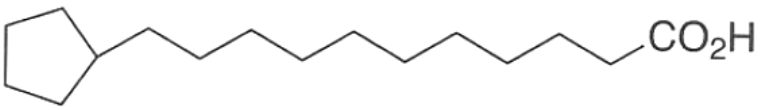


Figure 1 17 Acide dihydrohydnocarpique présent chez plusieurs *Solieriaceae* (Kornprobst 2005).

Des extraits bruts de lipides provenant d'algues rouges notamment de *Palmaria palmata*, *Laurencia popillose*, *Galaxoura cylindria* ou encore *Chondrus crispus* ont montré des activités anti-inflammatoire, antivirale, anticancéreuse, antimicrobienne, antioxydante (Banskota *et al.* 2013, Banskota *et al.* 2014, El Baz *et al.* 2014). L'incorporation d'acides gras polyinsaturés chez les animaux diminueraient les maladies vasculaires et cardiaques (Dembitsky et Rozentsvet 1990, Sanchez-Machado *et al.* 2004).

Des dérivés d'oxydation d'acides gras ont également été retrouvés chez certaines algues rouges comme chez *Chondrus crispus*. Ce sont les oxylipines (**Figure 1. 18**). Chez *Chondrus crispus*, ces composés seraient impliqués dans des mécanismes de défense de l'algue. (Bouarab *et al.* 2004, Guschina et Harwood 2006). Des stérols et en majorité du cholestérol sont également présents chez les algues rouges (Kornprobst 2005*)* (**Figure 1. 19**).

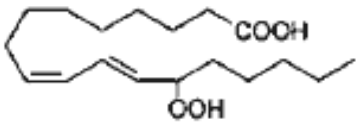


Figure 1. 18 Oxylipine chez *Chondrus crispus (*Bouarab *et al.* 2004).

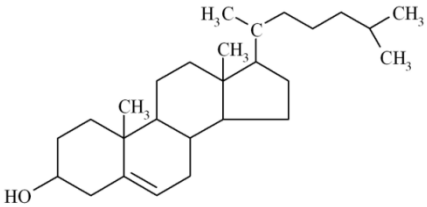


Figure 1. 19 Cholestérol.

4.2.1.4. Minéraux

Les minéraux consistent en des composés inorganiques fondamentaux pour la survie des organismes vivants comme les algues. En effet, ces dernières nécessitent de l'eau, de la lumière et de la matière minérale, en l'occurrence sous forme ionique pour leurs fonctions physiologiques. Les minéraux participent en tant que catalyseurs pour certaines étapes de la photosynthèse. Les atomes qui les composent peuvent s'incorporer dans des composés organiques vitaux (Stewart 1974, Lobban et Harrison 1994). Le **Tableau I. V** récapitule les principaux éléments inorganiques ainsi que leur(s) fonction(s) physiologique(s).

Tableau I. V Fonctions et éléments inorganiques essentiels des algues (modifié de Lobban et Harrison 1994).

Elément chimique	Symbole	Fonctions probables	Exemples de composés
Azote	N	Élément majeur, importance métabolique	Nitrate, nitrite, acides aminés, bases nucléiques, sucres aminés, amines
Phosphore	P	Structural, transfert d'énergie	ATP, GTP, acides nucléiques, phospholipides, coenzyme, intermédiaire dans les cycles métaboliques.
Potassium	K	Régulation osmotique, régulateur de pH, conformation et stabilité des protéines	Possibilité de prédominance sous forme ionique
Calcium	Ca	Structural, activateur d'enzymes, cofacteur dans les transports ioniques	Alginate de calcium, carbonate de calcium
Magnésium	Mg	Pigments photosynthétiques, activateur d'enzymes, cofacteur dans les transports ioniques, stabilité des ribosomes	Chlorophylles
Soufre	S	Structural, participe aux groupements actifs des enzymes et des co-enzymes	Méthionine, cystéine, glutathion, agar, carraghénanne, sulpholipides, coenzyme A
Fer	Fe	Groupement actif des molécules porphyrines et d'enzymes	Ferredoxine, cytochrome, nitrate réductase, nitrite réductase, catalase
Manganèse	Mn	Transport d'électrons dans le photosystème II, maintien de la structure membranaire des chloroplastes	
Cuivre	Cu	Transport d'électrons dans la photosynthèse, enzymes	Plastocyanine, amine oxydase
Zinc	Zn	Enzymes	Anhydrase carbonique
Molybdène	Mo	Réduction du nitrate, absorption ionique	Nitrate réductase
Sodium	Na	Activateur d'enzymes, rôle osmotique	Nitrate réductase
Chlore	Cl	Photosystème II, métabolite secondaire	Violacene
Cobalt	Co	Composant de la vitamine B_{12}	B_{12}
Brome	Br	Métabolites secondaires	Composés halogénés
Iode	I		

L'azote est un des éléments chimiques avec le carbone, le phosphore et le soufre les plus importants, d'autant plus qu'il peut devenir un facteur limitant dans l'environnement marin (Lobban et Harrison 1994). Les minéraux peuvent être classés en deux catégories : les macroéléments qui sont nécessaires en quantité importante et les micro- ou oligo-éléments dont la présence en petite quantité est aussi essentielle à la croissance et au fonctionnement des algues. Les macroalgues contiennent une grande partie des composés inorganiques qui se trouvent dans la mer (Evans et Critchley 2013).

Elles peuvent en contenir entre 8 et 40 % de leur matière sèche (Rajasulochana *et al.* 2010). Chez les algues rouges *Chondrus crispus*, *Porphyra tenera*, *Vertebrata lanosa* et *Palmaria palmata*, entre 20,6 et 42 % de la MS correspondent à de la matière minérale (Rupérez 2002, Maehre *et al.* 2014). Les macroéléments sont principalement représentés chez les algues rouges par le sodium, le potassium, le magnésium, le phosphore puis le calcium. Chez les espèces de *Kappaphycus*, très étudiées aux Philippines, le sodium est à hauteur de 23,4 mg pour 1 g de matière sèche, le potassium 12,4 mg, le magnésium 23,6 mg et le phosphore 19,5 mg (Rajasulochana *et al.* 2010). De même que dans l'étude de Astorga–España *et al.*, les scientifiques ont mesuré en moyenne 1,4 % de potassium et 0,3 % de calcium sur de la matière sèche de 9 espèces d'algues rouges de genres différents (Astorga-España *et al.* 2014). En outre, les macroalgues peuvent contenir plus de 60 microéléments (Evans et Critchley 2013).

Les algues possèdent de fortes concentrations en macro- et micro-éléments, plus que les plantes terrestres (Astorga-Espana *et al.* 2014). C'est pourquoi dans de nombreux pays, en particulier en Asie, elles sont consommées depuis longtemps et sont recommandées de nos jours pour les animaux et les humains afin de répondre à certaines carences minérales. L'utilisation des algues entières n'est toutefois pas toujours bénéfique. Capables d'assimiler les minéraux de leur environnement, les algues peuvent aussi stocker des métaux lourds comme l'arsenic, le mercure ou encore le cadmium qui sont nocifs. La stratégie à adopter serait alors d'extraire les composés d'intérêt de l'algue pour en produire des compléments alimentaires par exemple (Evans et Critchley 2013, Maehre *et al.* 2014).

4.2.1.5. Vitamines

Les vitamines sont des macronutriments organiques endogènes qui interviennent dans de nombreuses réactions métaboliques aussi bien chez l'algue que chez l'homme. Les algues

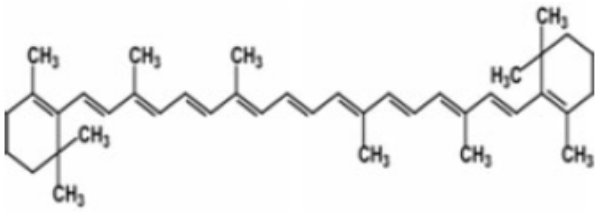
les synthétisent tandis que l'homme doit se les procurer en partie dans leur environnement. Les vitamines peuvent être de nature hydrosoluble ou liposoluble. Les vitamines hydrosolubles présentes dans les algues sont les vitamines C, B1, B2 et B12. Les liposolubles sont représentées par les vitamines E et les caroténoïdes (β-carotène chez les algues rouges, qui correspond à la provitamine de la vitamine A) (Mišurcová 2011). Le **Tableau I. VI** présente une liste, non exhaustive, des vitamines trouvées chez des algues rouges et décrit les fonctions et les intérêts de ces composés.

D'après ce tableau, les vitamines constituent une faible proportion de la matière sèche d'une algue, aux environs d'1 % ou moins. Cependant, une consommation de 100 g d'algues apporte plus que les besoins requis pour l'homme en vitamines A, B2, B12 et apportent les deux tiers des besoins en vitamine C (Hamed *et al.* 2015). C'est pourquoi, certaines algues sont utilisées en nutraceutique pour des troubles digestifs par exemple ou dans des régimes alimentaires spécifiques notamment pour les végétariens. En plus de leur importance physiologique, les vitamines d'algues A, C et E ont montré une activité antioxydante intéressante. Leurs structures moléculaires sont illustrées sur la **Figure 1. 20** ainsi que celle de la vitamine B12. Ainsi, les recherches sur l'usage des vitamines d'algues (comestibles de genre *Porphyra* par exemple) en tant qu'ingrédients fonctionnels montrent de possibles perspectives pour le développement de nutraceutiques pour les industries alimentaires (Škrovánková 2011).

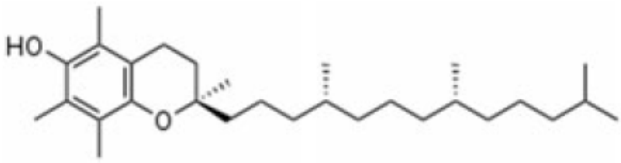
Tableau I. VI Exemples de vitamines retrouvées chez les algues rouges.

	Vitamine	Autre nom	Intérêt pour l'humain et activité attribuée	Espèces d'algues rouges	Quantité *[mg/kg de MS]*	Références
Hydrosoluble	**C**	Acide ascorbique	Prévention du scorbut. Vital pour les humains : biosynthèse de mucopolysaccharides, de prostaglandines; transport et absorption du fer. Antioxydant, protection de la vitamine E. Rôle dans la régulation de la pression sanguine et dans le système nerveux.	*Porphyra nereocystis*	530	Mišurcová 2011
				Porphyra perforata	600	
				Euchema denticulatum	2 000	
				Gelidiella acerosa	5 071,80	Syad *et al.* 2013
				Porphyra umbilicalis	12 900 *	Hamed *et al.* 2015
				Gracilaria changgi	285	Norziah et Ching 2000
	B1	Thiamine	Coenzyme	*Porphyra umbilicalis*	77 *	Mišurcová 2011, Hamed *et al.* 2015
	B2	Riboflavine	Cofacteur oxydo-réducteur d'enzymes redox importantes dans les métabolismes énergétique, lipidique, saccharidique et protéique	*Porphyra umbilicalis*	34 274 *	Mišurcová 2011, Hamed *et al.* 2015
	B12	Cobaline	Cofacteur d'enzyme Déficience en cette vitamine engendre troubles de santé : anémie, trouble gastro-intestinal	*Porphyra yesoensis*		Mišurcová 2011
				Porphyra sp.	0,3	Watanabe *et al.* 2014
				Porphyra umbilicalis	769 *	Hamed *et al.* 2015
Liposoluble	**E**	α-, β-, γ- et δ-tocophérols et α-, β-, γ- et δ-tocotriénols	Antioxydant	*Gelidiella acerosa*	1 330	Syad *et al.* 2013
				Porphyra umbilicalis	114 *	Hamed *et al.* 2015
	A	β-carotène	Réduit risques cardio-vasculaires et limite l'apparition de cellules cancéreuses Antioxydant	*Gracilaria changgi*	52	Mišurcová 2011
				Porphyra yezoensis	36	Watanabe *et al.* 2014
				Gelidiella acerosa	3,4	Syad *et al.* 2013
	K1	Phylloquinone	Coenzyme pour la formation de facteur de coagulation sanguine chez les humains	*Palmaria palmata*	2-17	Dam et Glavind 1938, Mouritsen *et al.* 2013
				Chondrus crispus	1-15,15	Mouritsen *et al.* 2013
				Porphyra spp.		

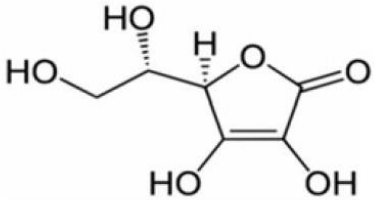
** mg/kg de la matière fraîche de l'algue.*



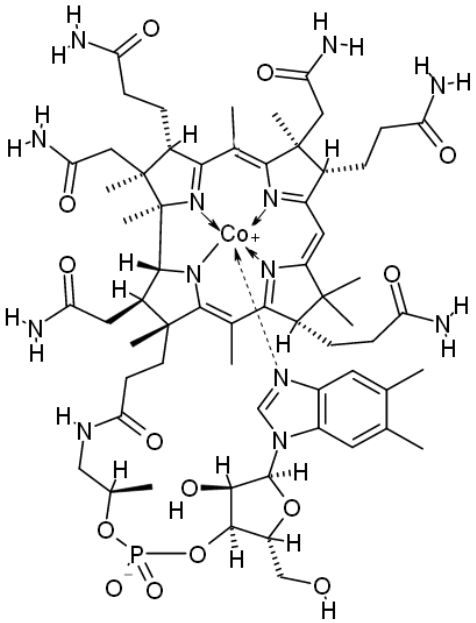
Provitamine A



Vitamine E (α-tocophérol)



Vitamine C



Vitamine B12

Figure 1. 20 Structures moléculaires de quelques vitamines retrouvées chez les algues rouges.

4.2.1.6. Régulateurs de croissance végétale - Phytohormones

Pour le bon fonctionnement d'un organisme, une régulation est réalisée à tous les niveaux (moléculaire, cellulaire et tissulaire). Elle repose en plus sur une certaine communication et organisation entre les cellules. Chez les végétaux terrestres, il existe des régulateurs de croissance qui coordonnent le développement du végétal mais aussi la plupart des voies physiologiques et les réponses au stress. Des avancées scientifiques ont identifié ces dernières années des gènes et des enzymes impliquées dans la biosynthèse et dans le mode d'action de ces composés. Chez les algues, la connaissance de ces régulateurs de croissance est limitée et des débats d'actualité ont lieu sur la question de la capacité des algues à les synthétiser (Stirk et van Staden 2014). Ces régulateurs de croissance végétale peuvent être regroupés sous

le terme de phytohormones. Leur teneur dans les algues serait comparable à celle mesurée dans les végétaux terrestres (Crouch et van Staden 1993).

Les phytohormones sont des composés endogènes de l'algue qui ont une double fonction. D'une part, ils régulent les procédés de croissance et de développement, comme la division cellulaire et d'autre part ils jouent un rôle dans le signalement des changements de l'environnement extérieur (Stirk et van Staden 2014). Aujourd'hui, une dizaine de familles d'hormones ont été étudiées chez les plantes.

Une hormone est un composé de faible poids moléculaire qui peut agir à distance à faible concentration de l'ordre du dixième de µg par kg de matière fraiche (Tarakhovskaya *et al.* 2007). Le **Tableau I. VII** rassemble les phytohormones endogènes retrouvées et étudiées chez les algues rouges. Les auxines et les cytokinines ont un rôle indispensable lors de la division cellulaire. En effet, elles contrôlent l'expression transcriptionnelle de quelques gènes impliqués dans le cycle cellulaire. De plus, le rapport des concentrations de ces deux familles de phytohormones est important car il déclenche la division cellulaire. À ces deux hormones s'ajoutent, les gibbérélines, l'acide abscissique, l'éthylène, les polyamines, le jasmonate et la rhodomorphine dont certaines structures moléculaires sont illustrées sur la **Figure 1. 21**. Il existe d'autres phytohormones telles que les isoflavones retrouvées chez *Chondrus crispus.* Ces dernières ont montré des propriétés antioxydantes (Klejdus *et al.* 2010).

L'effet qu'apportent les phytohormones d'un point de vue physiologique est tel que leur utilisation en tant que biostimulants en agriculture et en horticulture est courante à l'heure actuelle. Les plantes d'intérêt économique traitées avec des préparations commerciales d'algues ont vu leur croissance et leur développement améliorés (Sangha *et al.* 2014). Cela s'explique par la présence des minéraux, des vitamines et des carbohydrates mais aussi par l'implication de certaines substances de croissance. Une meilleure connaissance dans leur biosynthèse et dans leurs fonctions physiologiques apporterait d'énormes bénéfices en biotechnologies autorisant la manipulation du développement des algues en culture *in vitro* ou en aquaculture en vue d'obtenir un rendement et une meilleure qualité des algues de culture (Stirk et van Staden 2014).

Tableau I. VII Phytohormones endogènes retrouvées chez les algues rouges (1/2).

Famille de phytohormones	Voie biosynthétique	Rôle physiologique	Hormone - Structure	Espèces d'algues rouges	Référence
Cytokinine	Modification biochimique de l'adénine	Croissance et développement du végétal : impliquée dans la division cellulaire et dans plusieurs voies du développement, influence la mobilisation des nutriments et la dominance apicale.	Iso-pentenylladénosine	*Porphyra perforata*	Crouch et van Staden 1993
			*t*Z (*trans*-zeatin)	*Kappaphycus alvarezii* Chez 19 rhodophytes.	Stirk *et al.* 2003, Prasad *et al.* 2010, Stirk et van Staden 2014
				Gracilaria edulis	Prasad *et al.* 2010, Stirk et van Staden 2014
			iPR (isopentenyladenosine)	*Porphyra perforata*	Stirk et van Staden 2014
			iP (isopentenyladénine) conjugué	Chez 19 Rhodophytes	Stirk *et al.* 2003, Stirk et van Staden 2014
			cytokinines isoprénoides conjugués		
			*c*Z (*cis*-zeatin) conjugué		
			cytokinines aromatiques (topolines)		Stirk et van Staden 2014
			DHZ (dihydrozetin) conjugué		Stirk *et al.* 2003, Stirk et van Staden 2014
			cZRMP (cis-zeatin riboside-5'-monophosphate)	Chez 11 Rhodophytes	Stirk *et al.* 2003
Auxine	À partir du tryptophane ou de l'indole	Croissance et développement du végétal : Impliquée dans la division cellulaire, dans l'élongation et dans la différenciation. Réponses aux changements environnemen--taux.	IAA (indole-3-acide acétique)	*Porphyra perforata*	Tarakhovskaya *et al.* 2007
				Botryocladia	
				Kappaphycus alvarezii	Prasad *et al.* 2010, Stirk et van Staden 2014
			IPA (indole-3-pyruvique)	*Gracilaria edulis*	
			IAM (indole-3-acétamide)	Chez 11 Rhodophytes (Bangiales, Gelidiales, Gracilariales et Gigartinales)	Stirk et van Staden 2014
			IEt (indole-3-éthanol)	Chez 8 Rhodophytes	
			IAGlu (indole-3-acétylglutamate)	Chez 3 Rhodophytes	
			IALeu (indole-3-acétyl leucine)	*Hypnea musciformis*	

Tableau I. VII Phytohormones endogènes retrouvées chez les algues rouges (2/2).

Famille de phytohormones	Voie biosynthétique	Rôle physiologique	Hormone-Structure	Espèces d'algues rouges	Référence
Gibberéline	À partir glycéraldéhyde-3-phosphate (glycolyse)	Croissance et développement du végétal : impliquées dans des voies physiologiques. Perception des changements environnemen--taux.	GA (acides carboxylique tétracyclique diterpénoïde)	*Kappaphycus alvarezii* *Gracilaria edulis*	Tarakhovskaya *et al.* 2007, Prasad *et al.* 2010, Stirk et van Staden 2014
Acide abscissique	À partir de caroténoïdes	Croissance et développement. Impliquée dans la senescence : dégradations des protéines et des chlorophylles et inhibition de la photosynthèse. Répond aux changements environnemen--taux.	C_{15} sesquiterpene	Chez 10 Rhodophytes	Tarakhovskaya *et al.* 2007, Stirk et van Staden 2014
Ethylène	À partir de la méthionine	Rôles physiologiques dans la dégradation du végétal. Répond aux changements environnemen--taux.	gaz d'hydrocarbones insaturés	Chez 2 Rhrodophytes dont *Asparagopsis armata* *Gelidium arbuscula* *Pterocladiella capillaceae*	
Polyamine	Décarboxylation de l'arginine ou de l'ornithine	Croissance et Développement : régulation de procédés physiologiques à faible concentration (micromolaire)	putrescine spermine spermidine	*Cyanidium caldarium* *Gelidium canariensis* *Grateloupia doryphora*	Tarakhovskaya *et al.* 2007
Acide jasmonique	À partir d'acides gras polyinsaturés	Croissance et développement. Dégradation Mécanisme de défense du végétal Répond aux changements climatiques	Jasmonate libre (JA) et dérivés incluant le jasmonate méthyle volatile (MeJA) (oxilipine)	*Gelidium latifolium*	Tarakhovskaya *et al.* 2007, Stirk et van Staden 2014
Rhodomorphine	?	Adhésion cellulaire, Réparation cellule, Attraction et fusion des gamètes lors de la reproduction sexuelle.	Gycopeptide 14 kDa	*Griffithsia pacifica*	Tarakhovskaya *et al.* 2007

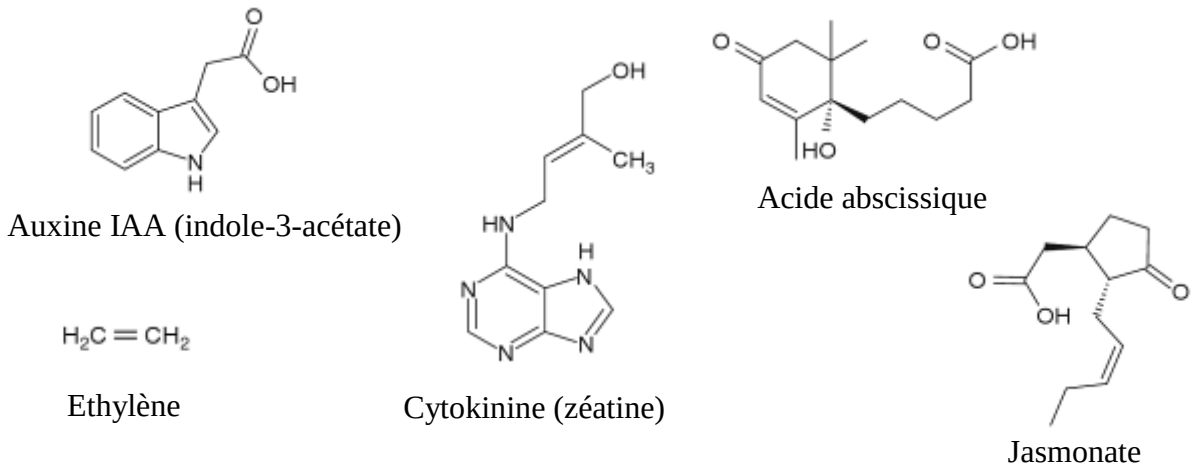


Figure 1. 21 Exemples de structures de phytohormones présentes chez les algues rouges (Kim et Chojnaka 2015).

4.2.1.7. Glucides

Les hydrates de carbone ou glucides sont des molécules primordiales dans la structure et dans le fonctionnement de tout organisme vivant. Chez les végétaux et notamment chez les algues rouges, ils sont issus de la photosynthèse. Ce processus naturel incorpore le CO_2 de l'atmosphère dans les cellules végétales et, par un ensemble de réactions photochimiques, le transforme en de la matière organique. Le dioxyde de carbone de l'air est capable de diffuser dans l'eau de mer, mais très lentement. Il est plus vite incorporé chez les algues, quand celles-ci sont immergées, sous forme de bicarbonate (HCO_3^-) (Maberly et Madsen. 1990). En effet, une fois le CO_2, de l'air ou des animaux marins qui le produisent par leur respiration, en contact avec l'eau de mer, celui-ci va alors intégrer le système tampon présenté sur la **Figure 1. 22.**

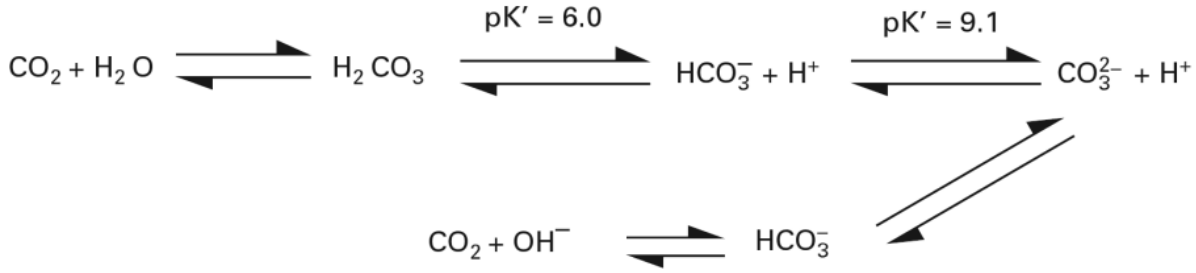
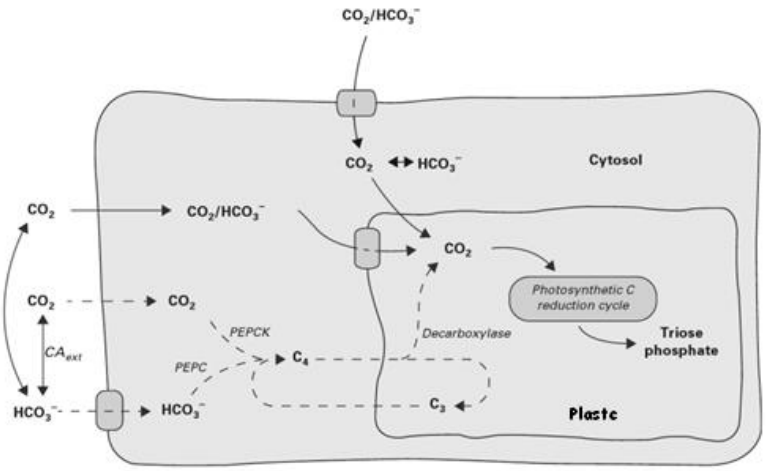


Figure 1. 22 Équilibre du carbonate dans l'eau de mer (Hurd *et al.* 2014).

Ainsi, la proportion de chaque forme de carbone est fonction du pH et par conséquent de la salinité de l'eau de mer. Le CO_2 diffuse rapidement à travers les parois et les membranes cellulaires contrairement au HCO_3^-. Néanmoins, la concentration de HCO_3^- est plus importante que le CO_2 dans l'eau de mer. C'est pourquoi, au cours de l'évolution, les algues se sont adaptées et possèdent la capacité d'utiliser le bicarbonate en tant que donneur primaire de carbone grâce à une enzyme, l'anhydrase carbonique (CA), qui transforme le HCO_3^- en CO_2. Dans les cellules, la fixation du carbone provenant du CO_2 se fait par une enzyme, la RubisCO de son nom complet ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase ayant un poids moléculaire de 68 kDa. Ensuite, lors de la phase lumineuse de la photosynthèse, la synthèse des carbohydrates se poursuit via le cycle de Calvin (phase synthétique de la photosynthèse) qui se déroule dans les rhodoplastes. Ce cycle métabolique réduit le carbone et le transforme en un premier intermédiaire hydrolysé en deux molécules de 3-phosphoglycérate qui sont réduites en un triose-phosphate, le 3-phosphoglycéraldéhyde (**Figure 1. 23**) (Valentini 2005, Hurd *et al.* 2014).



***CA** $_{ext}$: Anhydrase carboxylique. Permet d'interconvertir le CO_2 et le HCO_3^-. Peut se trouver dans les espaces intra- et extracellulaires.*
***PEPCK** : Phosphoénolpyruvate carboxykinase est une enzyme à l'interface de la glycolyse et du cycle de Krebs.*
***PEPC** : Phosphoénolpyruvate carboxylase est une enzyme qui catalyse l'addition entre le bicarbonate et le phosphoénolpyruvate pour former, entre autres, de l'oxaloacétate, une molécule à quatre atomes de carbone.*
***C4** : Un des trois modes de fixation du carbone chez les êtres vivants photosynthétiques. Ce mode fait référence à l'oxaloacétate formé à partir de la première étape du processus.*
***C3** : Un des trois modes de fixation du carbone, prédominant chez la plupart des végétaux. Une molécule de trois carbones est formée par condensation du CO_2 et du ribose-1,5-bisphosphate par la RuBisCO.*

Figure 1. 23 Schéma sur le transport du carbone du CO_2 de l'atmosphère aux glucides des cellules algales eucaryotes (Hurd *et al.* 2014).

Ce triose-phosphate est commun chez tous les végétaux et chez toutes les algues. Ce triose phosphate est transporté vers le cytoplasme où il est converti en fructose 6-phosphate (hexose) et en glucose-1- phosphate par inversion des réactions de la glycolyse. Le glucose 1-phosphate est transformé en nucléotides, l'UDP-glucose (uridine diphosphate – glucose) (Valentini 2005). Ce dernier peut être converti en UDP-galactose par l'UDP-galactose 4-épimerase retrouvée chez les algues rouges comme par exemple chez *Galdiera sulphuraria, Calliblepharis jubata* et *Solieria chordalis* (Prosselkov *et al.* 1996, Goulard *et al.* 1999).

À partir de ces deux monosaccharides, des chaînes d'oligo- et de polysaccharides sont formées par l'intervention de glycosyltranférases (Goulard *et al.* 1999). Ainsi à partir de CO_2, des nucléotides-sucres sont formés puis convertis en glucides plus complexes qui constituent les algues. Ces carbohydrates peuvent être répartis en trois familles : les carbohydrates de réserve, les carbohydrates de faible poids moléculaire et les polysaccharides pariétaux.

4.2.1.7.1. Les glucides de réserve et de faible poids moléculaire

Le terme « réserve » est employé pour désigner une accumulation de métabolites qui ne vont pas avoir de rôle immédiat. Les glucides accumulés seront utilisés plus tard lors d'évènements particuliers, comme par exemple en tant qu'osmorégulateurs lors d'un stress lié à un changement des conditions environnementales ou encore lors de la formation, de la libération, de la dispersion et de l'attachement des spores. Ces glucides peuvent être de nature insoluble ou soluble. Certaines algues rouges sont caractérisées par la présence d'amidon floridéen et par des glucides de bas poids moléculaire que sont le floridoside, l'isofloridoside et le digénéaside.

L'amidon floridéen

Les algues rouges synthétisent et stockent l'amidon sous forme de granules semi-cristallines insolubles dans le cytosol. Il a été décrit pour la première fois en 1843 par le botaniste allemand Kützing et a été appelé amidon floridéen. Contrairement à l'amidon des plantes supérieures et des algues vertes, celui des algues rouges n'a généralement pas d'amylose (McCracken et Cain 1981). Ce dernier est un α-1,4 glucane fortement apparenté aux amidons, mais avec des ramifications plus nombreuses et une polymérisation plus élevée (**Figure 1. 24**) (Kornprobst 2005).

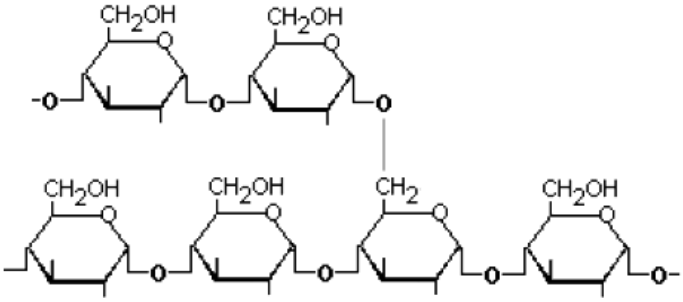


Figure 1. 24 Structure chimique de l'amidon floridéen.

Il est composé d'unités de D-glucose liées entre elles par des liaisons osidiques en α-1,4 et possède des branchements en α-1,6. La formation des polymères d'α-glucanes se fait par juxtaposition de monomères de D-glucose sous la catalyse de l'α-glucane synthase (Viola *et al.* 2001). Ainsi, l'amidon floridéen est un polymère intermédiaire entre l'amylopectine des végétaux terrestres et le glycogène des vertébrés supérieurs qui s'organisent sous forme de couches concentriques de fibrilles rangées de façon radiale avec des masses moléculaires moyennes allant de 100 à 200 MDa (Kornprobst 2005). Il représente le réservoir majeur du carbone issu de la photosynthèse et une réserve énergétique importante. Dans certaines conditions de croissance, les granules d'amidon floridéen peuvent atteindre une teneur de près de 80 % du volume total de la cellule et peuvent représenter entre 1 et 5 % de la matière sèche des algues rouges (Bondu *et al.* 2009). La principale méthode pour les extraire est celle qui élimine la plupart des galactanes formant le mucilage de la paroi cellulaire par l'acide chlorhydrique. L'amidon floridéen est ensuite extrait grâce à de l'eau chaude. L'extrait aqueux obtenu est sans mucilage et sans sel après passage sur une résine échangeuse d'anions (Viola *et al.* 2001).

Les glucides de faibles poids moléculaires

Les glucides de faibles poids moléculaires sont les premiers composés produits par la photosynthèse et forment également une réserve d'énergie. Chez toutes les espèces d'algues rouges, exceptées chez les Céramiales, deux galactosylglycérols isomères ont été retrouvés, le floridoside et l'isofloridoside. Le floridoside est présent en plus grande quantité que l'isofloridoside, bien que la quantité de ce dernier ne soit pas négligeable chez les espèces de

l'ordre des Bangiales. L'isofloridoside proviendrait de l'isomérisation[7] lente du floridoside. La seule différence entre ces deux composés réside en la liaison entre le galactose et le glycérol. Le floridoside (2-O-α-D-galactopyranosylglycerol) est considéré comme le principal glucide de faible poids moléculaire contenu dans le cytoplasme notamment chez *S. chordalis* (Bondu *et al* 2009).

S. chordalis, comme d'autres algues rouges notamment de l'Ordre des Céramiales, renferme un autre glucide de faible poids moléculaire : du digénéaside, un autre hétéroside, à base de D-mannose (Bondu *et al.* 2009) (**Figure 1. 25**)

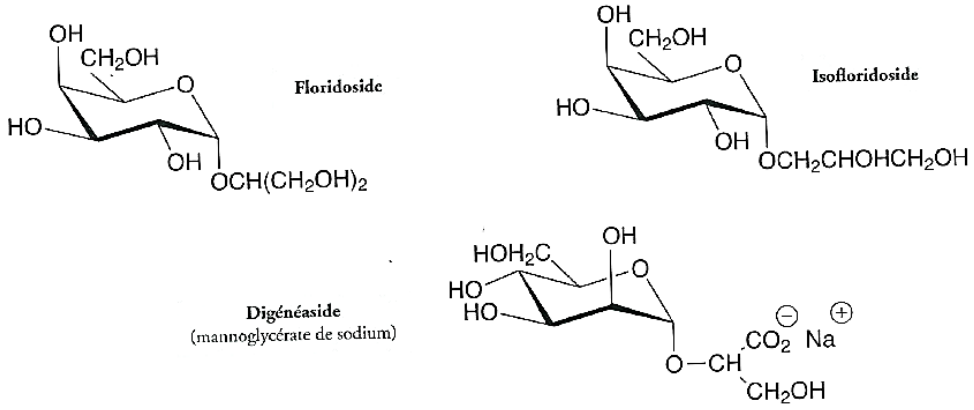
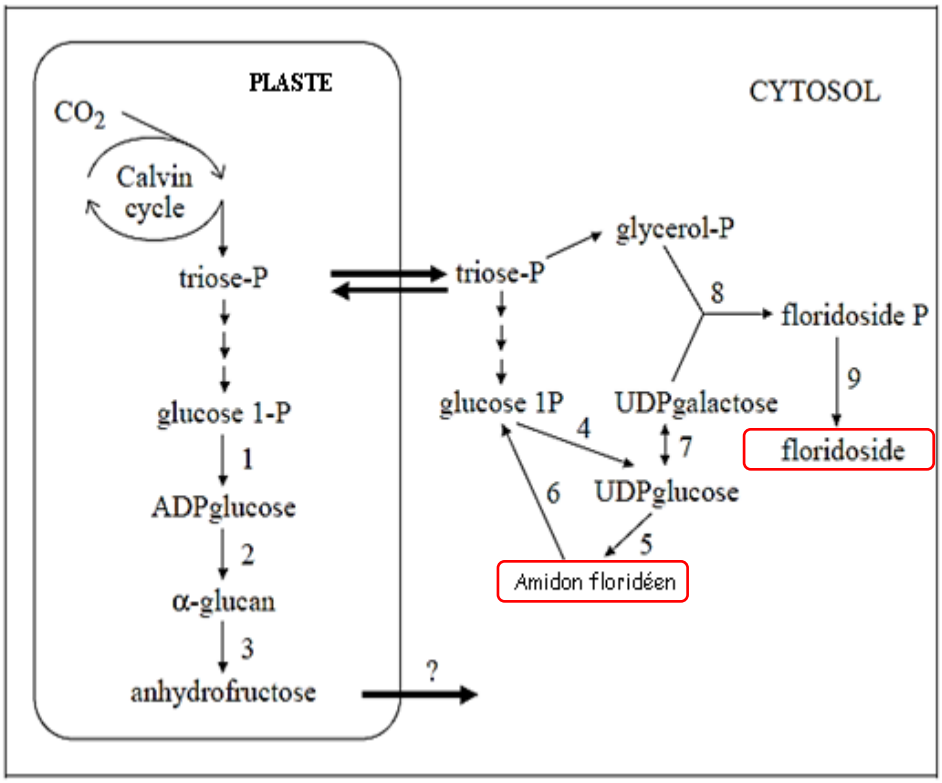


Figure 1. 25 Structures chimiques de glucides de faibles poids moléculaires retrouvés chez les algues rouges (Kornprobst 2005).

Ces petits solutés organiques hydrosolubles (environ 270 Da) sont généralement utilisés en tant qu'osmorégulateurs. Ils contribuent à l'équilibre des charges du milieu intracellulaire et génèrent aussi une source de carbone pour diverses activités métaboliques (Reed 1990). En outre, il est possible de trouver des polyols comme du mannitol et des petits saccharides comme le trehalose chez certaines algues rouges montrant la même fonction (Tiwari et Troy 2015).

[7] Isomérisation : conversion d'une molécule organique en son isomère, soit une molécule ayant la même formule brute, mais qui possède une formule semi-développée ou développée différente.

Les synthèses de l'amidon floridéen et des glucides de faibles poids moléculaires sont illustrées sur la **Figure 1. 26.**



Les numéros indiquent l'action d'enzymes.
1 : ADP-glucose pyrophosphorylase
2 : ADP-glucose α-glucane synthase
3 : α-glucane lyase
4 : UDP- glucose pyrophosphorylase
5 : UDP-Glucose α- glucan synthase
6 : α- glucan phosphorylase
7: UDP-glucose épimérase
8 : floridoside phosphate synthase
9 : floridoside phosphate phosphatase

Figure 1. 26 Métabolisme du carbone chez les algues rouges d'après Viola *et al.* 2001.

4.2.1.7.2. Les polysaccharides pariétaux

Comme les végétaux terrestres, les algues marines sont une excellente source de polysaccharides. Cependant, la paroi des algues se distingue de celle des plantes terrestres par l'abondance des polysaccharides anioniques sulfatés par rapport aux polysaccharides neutres. Grâce à leurs nombreuses structures variées et originales, les polysaccharides font l'objet de nombreuses recherches menées dans le monde entier. En effet, les polysaccharides pariétaux

des algues ont montré un panel d'activités biologiques et/ou des propriétés physico-chimiques incluant des activités antivirale, anti-coagulante, anti-tumorale ou encore anti-inflammatoire (Prajapati *et al.* 2014; Cardoso *et al.* 2016).

La paroi cellulaire représente un constituant dominant de la matrice extracellulaire. Celle d'une grande majorité des algues rouges possède une particularité, à savoir la synapse. La synapse forme une ouverture ménagée dans la cloison formée par deux cellules après division. L'ouverture est ensuite obturée par un « bouchon synaptique », qui est une structure complexe de protéines et de polysaccharides acides. De plus, elle est recouverte par la membrane plasmique de chaque cellule fille (de Reviers 2003). C'est une caractéristique qui sert pour la classification des algues. Les polysaccharides pariétaux représentent une large proportion du carbone fixé par photosynthèse. Ils interagissent en continu avec des ions et l'eau et possèdent de nombreuses fonctions vitales pour les algues. En effet, la paroi cellulaire est parfois considérée comme un organite à part entière. Elle a un rôle aussi bien structural que protecteur. Les composés la constituant interviennent dans la morphologie du thalle et dans sa flexibilité par leurs propriétés colloïdales. Ses composés participent aux échanges et aux interactions ioniques de l'algue avec son milieu, ce qui permet de réguler la pression osmotique générée par l'eau de mer et ainsi éviter les phénomènes de turgescence ou de plasmolyse des cellules algales. La paroi assure d'autres fonctions comme la défense face aux pathogènes ou aux blessures où elle peut se voir alors modifiée. Elle est constituée d'un assortiment de polysaccharides structuraux et matriciels, de glycoprotéines et pour certaines algues rouges de matière minérale.

Une représentation schématique de la paroi est donnée sur la **Figure 1. 27.**

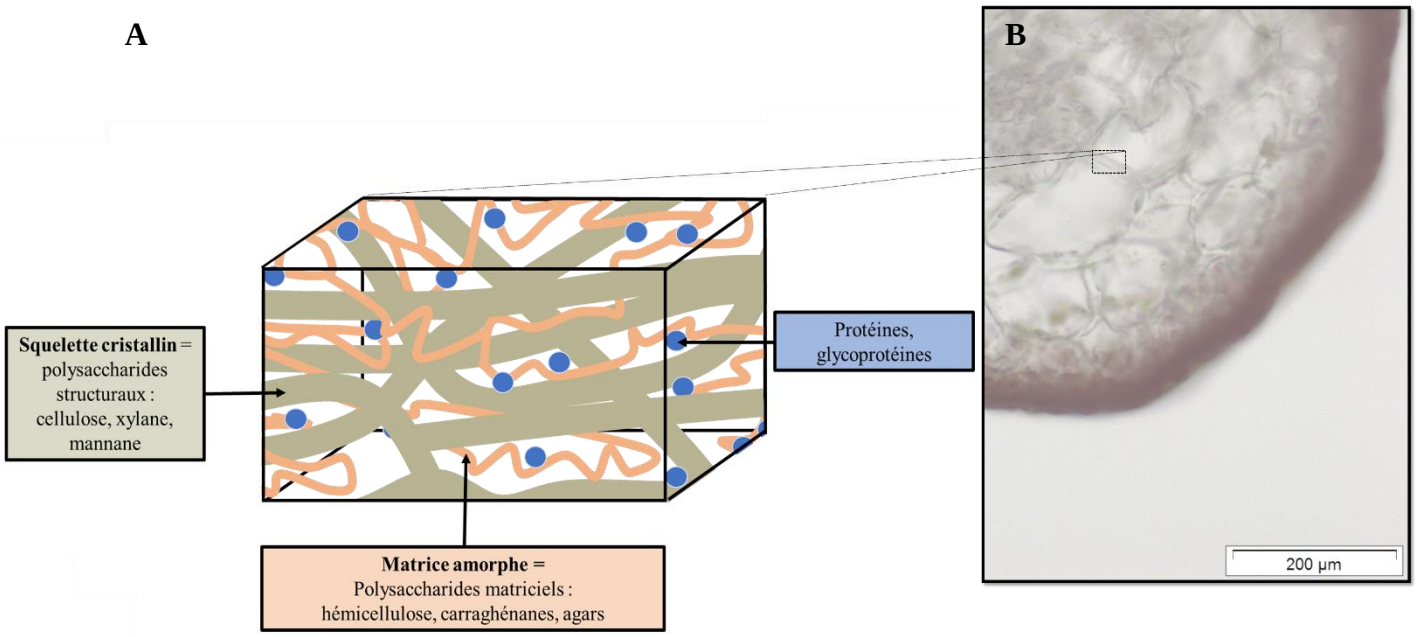


Figure 1. 27 Représentation schématique en 3D de la paroi des algues rouges (**A**). Les parois entourent toutes les cellules et sont visibles au microscope optique, comme par exemple sur une coupe transversale d'un filament de *S. chordalis* (**B**) (inspiré de Jouanneau 2010).

Glycanes rigides structuraux

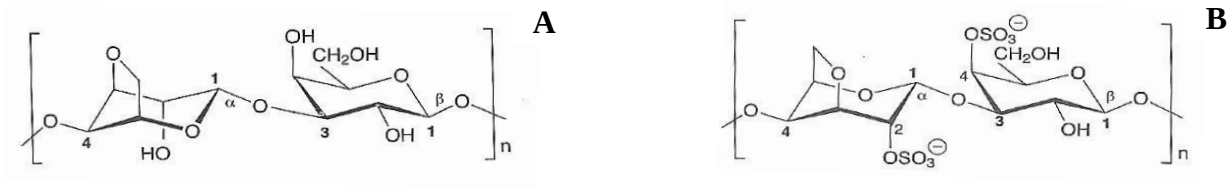
Parmi les polysaccharides pariétaux de structure, la cellulose peut constituer jusqu'à 12 % de la paroi (Domozych 2001). Au niveau moléculaire, ce polymère consiste en des unités de glucose liées entre elles par des liaisons en β(1→4). Les polymères de cellulose sont rangés en feuillets stabilisés entre eux par des liaisons hydrogènes. Ainsi, les groupements hydroxyles des unités de glucose sont moins libres et un ensemble de feuillets forme une structure cristalline insoluble très rigide. De plus, des mannanes et des xylanes peuvent être également présents.

Les mannanes sont principalement retrouvés dans les espèces de l'ordre des Bangiales. Quant aux xylanes, ce sont des polymères de xylose qui s'arrangent par trois pour former des macromolécules stabilisées par des liaisons hydrogènes entre les unités de xylose. D'après Craigie (1990), les xylanes ont été reportés seulement chez des algues rouges qui n'ont pas de cellulose. Ils remplaceraient la cellulose pendant des périodes spécifiques du cycle de vie de certaines algues (Craigie 1990, Chopin *et al.* 1999). Néanmoins, le xylose est un glucide toujours détecté après une hydrolyse acide de la paroi des algues rouges. Il serait impliqué dans

des complexes d'hétéroglycanes et pourrait avoir des fonctions importantes en participant à la formation de conjugués peptides-oligosaccharides (Craigie 1990).

Glycanes flexibles matriciels

La paroi des algues se distingue de celle des plantes terrestres par le fait que la proportion de la phase matricielle est importante et par l'abondance des polysaccharides anioniques sulfatés. Dans cette matrice amorphe sont présents de l'hémicellulose et des galactanes sulfatés. Ces derniers sont des macromolécules complexes qui peuvent interagir avec de nombreuses et diverses matrices et avec des protéines cellulaires grâce à leurs structures chimiques polyanioniques. La configuration de l'α-galactose classifie ces galactanes en deux grands groupes. L'énantiomère[8] L regroupe les agars alors que l'énantiomère D rassemble les carraghénanes. De plus, le taux de sulfatation est beaucoup plus élevé chez les carraghénanes que chez les agars (de 20 à 38 %) (Garon-Lardière 2004). Chez *S. chordalis*, seuls des carraghénanes ont été retrouvés (Deslandes *et al.* 1985). La structure d'un carraghénane est définie comme étant l'enchaînement d'un motif disaccharidique (carrabiose) constitué d'une unité β-D-galactopyranose liée en (1,3), alternant avec une unité α-D-3,6 anhydrogalactopyranose liée en (1,4) (Garon-Lardière 2004). La **Figure 1. 28** illustre un exemple de structures d'unités répétitives et constitutives d'agars et de carraghénanes.



***A** : Agarobiose ou encore α-L-anhydro-3,6-galactose lié en 1,4 à un β-D-galactose qui se lie en 1,3, est l'unité structurale de l'agar.*
***B** : Carrabiose. Tous les motifs répétés de carrabiose sont constitués de deux galactoses ou d'un galactose avec un 3,6-anhydrogalactose (de type iota dans cet exemple).*

Figure 1. 28 Structures chimiques des unités répétitives formant l'agar (**A**) et les carraghénanes (**B**) (Kornprobst 2005).

[8] Un énantiomère est une molécule « image » d'une autre molécule, face à un miroir plan.

Un carraghénane est un terme générique qui fait référence à une famille de galactanes sulfatés linéaires. Le nombre et la position des groupements sulfate de même que la présence ou non des ponts 3,6 anhydrogalactose sont à l'origine de 42 structures disaccharidiques théoriques. Néanmoins, seule une quinzaine de ces structures ont été identifiées et ont été assignées par des lettres grecques (Garon-Lardière 2004 ; Delattre *et al.* 2011). Les carraghénanes sont répartis en quatre grandes familles, selon le nombre et la position des groupements sulfate (C-2, C-4 ou C-6) et selon la présence ou non d'unités 3,6 anhydrogalactose sur le résidu lié en 4 :

- famille des kappa-carraghénanes : l'unité liée en β(1,3) est toujours sulfatée en C-4. Seule l'autre unité varie. Ainsi, cette famille est composée des κ-, des ι-, des ν- et des μ-carraghénanes.

- famille des lambda-carraghénanes : famille très sulfatée. L'unité liée en β(1,3) est toujours sulfatée en C-2. Cette famille ne comporte pas de pont 3,6 anhydrogalactose, mais un 4-α-D-galactopyranose-2,6-disulfate à la place. Cette famille est composée des λ-, des ξ-, θ-, et des π-carraghénanes.

- famille des bêta-carraghénanes : L'unité liée en β(1,3) n'est pas sulfatée. La famille regroupe les β-, γ-, α-, δ-carraghénanes qui se différencient par leur unité liée en α(1,4).

- famille des oméga-caraghénanes : L'unité liée en β(1,3) est sulfatée en C-6. La famille est composée des ω- et ψ-carraghénanes (Garon-Lardière 2004).

Les trois principaux carraghénanes industrialisés sont de type κ (kappa), ι (iota) et λ (lambda). Les deux premiers sont des polymères au caractère gélifiant tandis que le lambda-carraghénane est produit pour sa propriété texturante. Les carraghénanes les plus commercialisés proviennent d'espèces appartenant à la famille des Solieriaceae, notamment d'espèces des genres *Chondrus, Eucheuma, Gigartina, Hypnea, Kappaphycus* et *Solieria* (Kornprobst 2005, Bondu *et al.* 2010). En général, chez les espèces de *Solieria* (*filliformis* et *chordalis),* les carraghénanes contiennent un grand nombre d'unités structurales répétées d'α-(1,4)-D-3,6-anhydrogalactose-2-sulfate lié à un β-(1,3)-D-galactose-4-sulfate, soit du carraghénane de type iota (Deslandes *et al*. 1985).

La biosynthèse des carraghénanes est un processus complexe, qui est à l'origine des différentes structures. La **Figure 1. 29** représente sous forme schématique une voie potentielle

de la synthèse de ces composés (Wong et Craigie 1978, Guibet 2007, Jouanneau 2010, Delattre *et al*. 2011, Pierre *et al.* 2014).

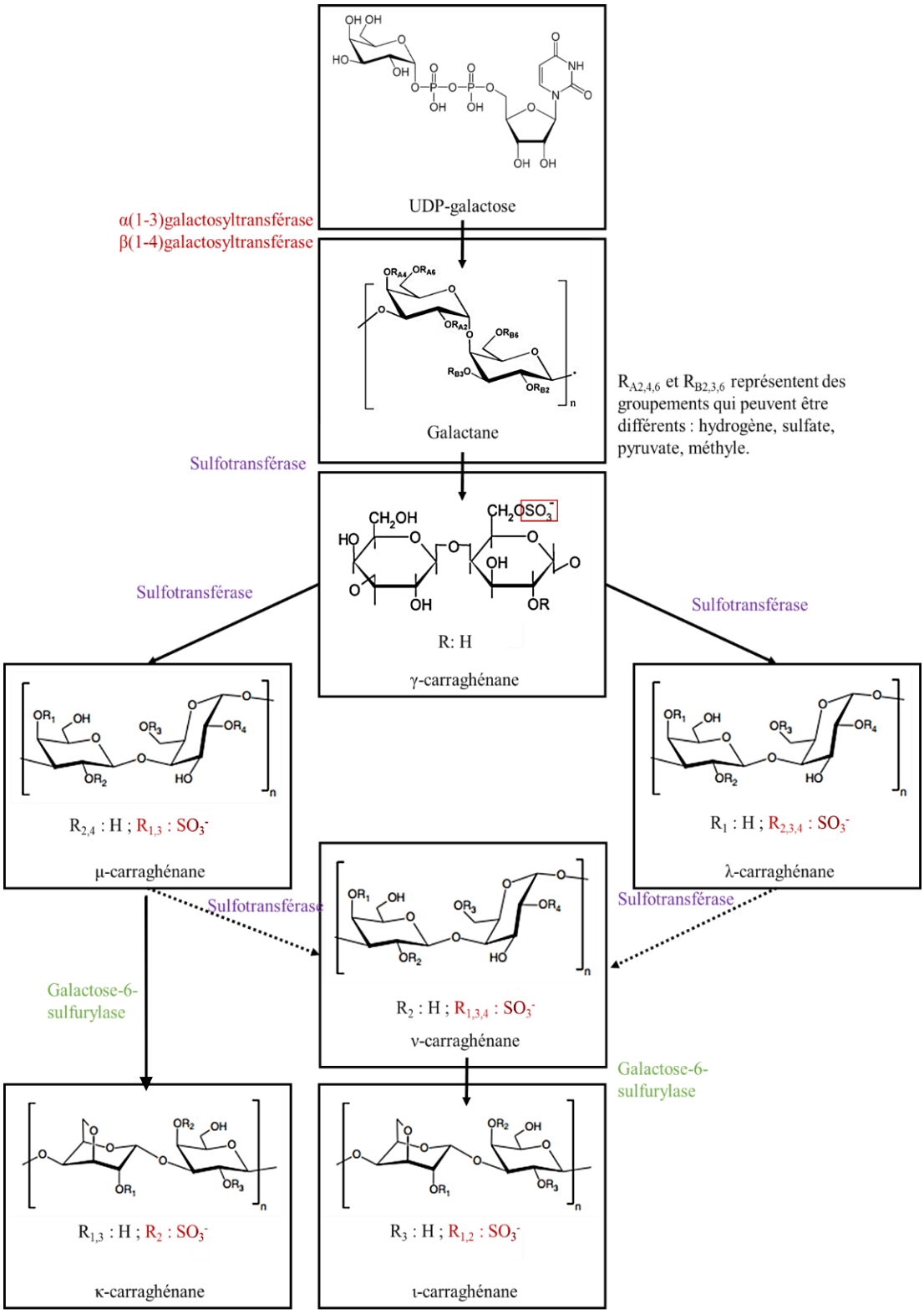


Figure 1. 29 Schéma hypothétique de la biosynthèse des carraghénanes (Wong et Craigie 1978, Guibet 2007, Jouanneau 2010, Delattre *et al.* 2011, Pierre *et al*. 2014).

Cette biosynthèse se réaliserait en trois grandes étapes :

- 1ère étape : Polymérisation de l'UDP-galactose obtenu par l'action de l'UDP-glucose-4-épimérase sur l'UDP-glucose produit par photosynthèse *(Cf.* **Figure 1. 26***)*. Cette formation de polysaccharides neutres interviendrait dans l'appareil de Golgi.
- 2ème étape : Les polymères subiraient une étape de sulfatation par des sulfotransférases (encadré rouge sur la **Figure 1. 29**).
- 3ème étape : Les galactanes sulfatés seraient transportés vers la paroi où la galactose-6-sulfurylase catalyserait la formation des ponts 3,6 anhydrogalactose. Ainsi, la gélification des carraghénanes se réaliserait dans la paroi (Jouanneau 2010)

Les types de carraghénanes trouvés chez les algues rouges varient en fonction de l'espèce, mais aussi en fonction des différentes phases du cycle de vie (Guibet 2007; Jouanneau 2010). Les types de carraghénanes peuvent servir de marqueurs chimiotaxonomiques (Soares *et al.* 2016).

4.2.2. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des composés qui sont synthétisés par les algues dans deux circonstances. D'une part, les algues produisent des substances dans des conditions de stress pour se protéger des agressions biotiques et abiotiques de leur environnement. D'autre part, ces métabolites secondaires vont servir en tant que vecteurs de communications chimiques, appelés économes. Parmi ces derniers, il est souvent fait une distinction entre les phéromones qui sont intraspécifiques et les allomones, qui sont interspécifiques. Les phéromones ont un rôle dans les approches et les rapports sexuels entre individus de la même espèce. Quant aux allomones, elles sont des substances « d'alerte » et des « armes chimiques » qui permettent d'échapper à un prédateur. Elles peuvent intervenir également dans des compétitions entre des individus de différentes espèces pour la conquête du sol ou de la lumière (Kornprobst 2005, Bedoux et Bourgougnon 2015).

La chimie des métabolites secondaires des algues rouges est la plus riche en termes de quantité et de diversité comparée à celle des autres groupes de macroalgues (Maschek et Baker

2008). Les métabolites secondaires de ces organismes portent aujourd'hui un intérêt économique pour des applications en pharmaceutique et également en tant qu'agents antifouling (Kornprobst 2005). Plus de 1 500 composés ont été reportés chez les Rhodophytes. À l'exception des phlorotannins, toutes les classes de métabolites secondaires sont représentées telles que celles des composés halogénés, des dérivés d'acides aminés ou encore des acides nucléiques (Maschek et Baker 2008).

4.2.2.1. Composés halogénés

Une des caractéristiques des algues rouges est la forte présence en composés halogénés dont 90 % sont constitués de brome ou de chlore, souvent de nature terpénique (voie du mévalonate ou voie parallèle du « non-mévalonate ») *(*Kornprobst 2005 et Asmer 2008). L'iode, connu pour être présent chez les algues brunes, a aussi été observé dans les algues rouges et notamment chez *S. chordalis* (Bondu *et al.* 2008). C'est un élément chimique indispensable pour l'être humain qui le concentre dans la thyroïde. Les composés halogénés peuvent être utilisés comme marqueurs chimiotaxonomiques. En effet, leurs structures diffèrent peu à l'intérieur d'un même ordre alors qu'elles sont très différentes d'un ordre à l'autre. Le chlore et le brome sont souvent associés sur le même squelette carboné et il est fréquent de trouver entre 2 à 6 atomes halogènes sur un même squelette carboné (Kornprobst 2005). Dans une étude de 2008, Bondu *et al*. ont étudié les composés halogénés volatils de *S. chordalis*. Ils en ont détecté neuf : $CHBr_3$, CH_2BrI, CH_2Br_2, CH_3I, CH_3CH_2I, CH_2ClI, $CHBrCl_2$, CH_2I_2 et $CHBr_2Cl$. Leurs teneurs sont comprises entre 1 à 15 000 ng/g de matière sèche / jour (Bondu *et al*. 2008).

Les composés halogénés confèrent aux algues une protection contre les pathogènes microbiens, les épiphytes et les herbivores. Ils sont certainement produits dans des cellules spécialisées à la surface du thalle, ce qui expliquerait le fait que la surface des algues est dépourvue de biofilms ou d'épiphytes (Kornprobst 2005, Bedoux et Bourgougnon 2015). Ainsi, chez *Laurencia spectabilis*, la laurencione a été isolée. Ce composé inhibe le quorum sensing de certaines bactéries (Choi *et al.* 2012). Un bromophénol a été retrouvé chez une algue rouge collectée au Sénégal *Polysiphonia ferulacea*. Il a montré des propriétés antifongique, antibiotique et aussi répulsive nécessaires à l'algue pour se protéger contre l'attaque de poissons herbivores (Choi *et al.* 2012).

Du fait de leur originalité structurale et de leurs activités protectrices, de nombreuses recherches ont été effectuées sur ces composés. Chez les Gigartinales, l'halomon est un bel exemple de monoterpène halogéné isolé de *Portieria hornemanni* possédant un intérêt pour la santé humaine. En effet, il a montré un effet cytotoxique envers plusieurs lignées cancéreuses humaines (rein, cerveau et colon) et a été testé en phase d'essais précliniques. Cependant, sa faible solubilité dans l'eau limite son incorporation et donc son efficacité envers les cellules tumorales cibles (**Figure 1. 30**) (Kornprobst 2005).

4.2.2.2. Mycosporines et Mycosporine-like amino-acides

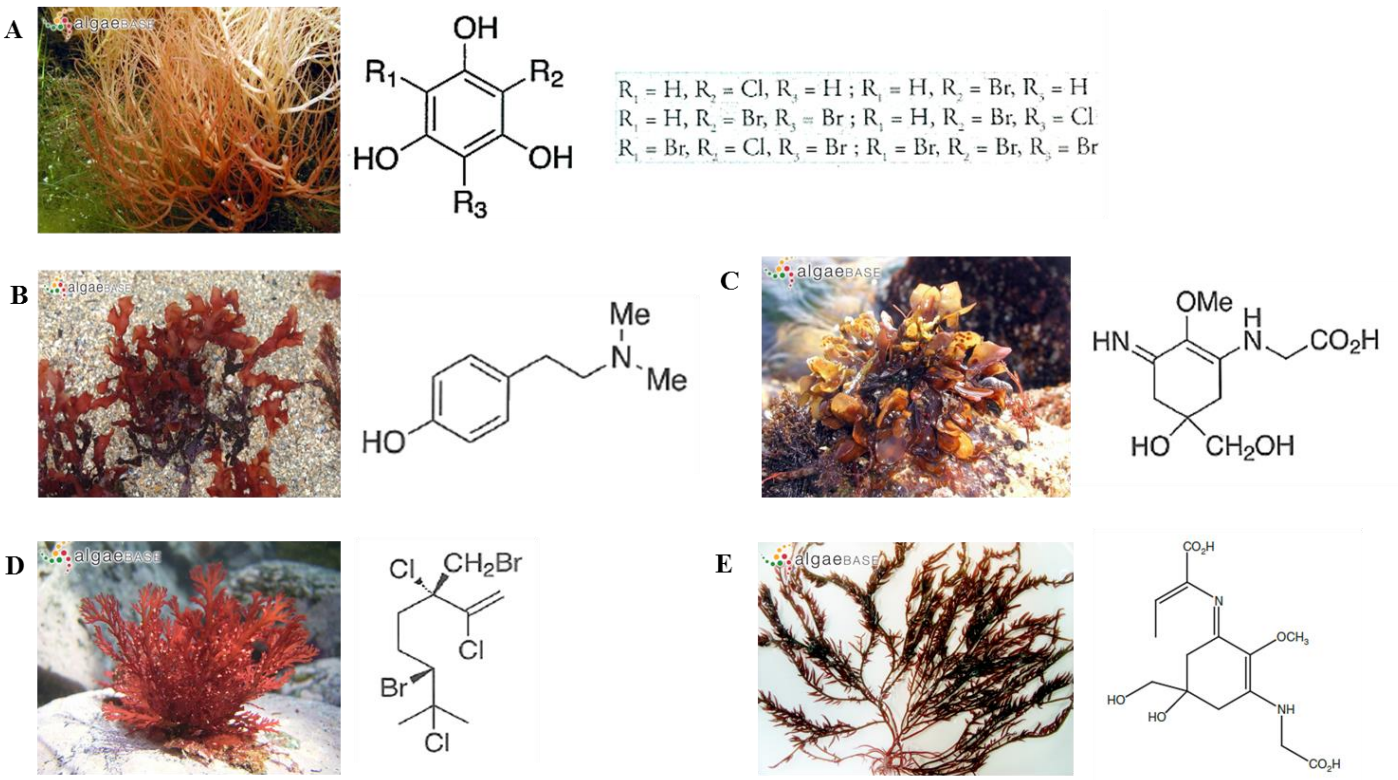
Les mycosporines doivent leur nom à des métabolites isolés pour la première fois dans des spores de mycéliums. Ces derniers ont montré une forte absorption des rayons Ultra-Violet, entre 310 et 320 nm. La première mise en évidence d'une mycosporine chez les algues rouges fut la palytine ou imino-mycosporine-glycine qui a été extraite et purifiée de l'algue japonaise *Chondrus yendoi* montrant des fortes absorbances entre 305 et 320 nm (**Figure 1. 30**) (Tsujino *et al.* 1978).

Quant aux mycosporines-like amino-acides (MAAs), elles composent une sous famille des mycosporines et correspondent à des composés intracellulaires synthétisés via la voie des shikimates. Elles résultent ainsi de la synthèse des acides aminés aromatiques impliqués dans la protection contre les radiations du soleil chez les organismes aquatiques (Bhatia *et al.* 2011). Les MAAs sont des petites molécules ayant un poids moléculaire inférieur à 400 Da. Elles sont incolores et fortement polaires. Une trentaine de MAAs différentes ont été identifiées à l'heure actuelle. Les mycosporines ont une structure caractérisée par un cyclohexénone ou par un cycloheximide conjugué avec un substituant azoté comme un acide aminé pour les MAAs. Leur spectre d'absorbance est élargi et peut s'étendre de 310 à 360 nm.

En plus d'avoir une activité photoprotectrice, les mycosporines peuvent également servir en tant qu'antioxydants, mais aussi en tant qu'osmorégulateurs et que réservoir intracellulaire de composés azotés. Chez l'algue rouge *Curdiea racovitzae*, les MAAs représentent 8 mg par gramme de matière sèche. Bedoux *et al.* (2014) ont extrait plusieurs MAAs de *S. chordalis* à l'aide de différents solvants organiques utilisables en cosmétiques. Parmi ces composés, une MAA a été identifiée. Il s'agit de l'acide palythénique qui a été caractérisé pour la première fois chez une macroalgue (**Figure 1. 30**) (Bedoux *et al.* 2014). Une application concrète des MAAs

est par exemple leur incorporation dans des formulations de crèmes solaires. Le produit commercialisé Helioguard 36, « un filtre UV naturel pour protéger du photo-vieillissement », renferme des MAAs provenant de l'algue rouge *Porphyra umbilicalis* (Bedoux *et al*. 2014).

Les composés halogénés et les mycosporines regroupent ainsi la majorité des composés issus du métabolisme secondaire des algues rouges. Cependant d'autres molécules peuvent être également synthétisées comme d'autres dérivés azotés, mais ces dernières se retrouvent en quantités très faibles. L'hordénine peut être ainsi citée. C'est une amine provenant de la Gigartinale *Phyllophora nervosa* considérée comme le premier alcaloïde détecté dans une algue marine (**Figure 1. 30**) (Kornprobst 2005).



A *: Phloroglucinol halogéné d'espèces du genre* Agardhiella *(famille* Solieriaceae*)*
B *: Hordénine de* Phyllophora nervosa
C *: Palytine de* Chondrus yendoi
D *: Halomon de* Portieria hornemannii
E *: Acide palythénique de* S. chordalis

Figure 1. 30 Exemples de quelques structures chimiques de métabolites secondaires retrouvés chez les algues rouges de l'ordre des Gigartinales (Kornprobst 2005, Bedoux *et al.* 2014, Algaebase 2016).

4.3. Cycle de vie

D'après de Reviers (2003), le cycle de vie d'une algue peut être définie « comme l'ensemble de tous les événements qui se produisent au cours du développement des populations de cette espèce » (de Reviers 2003). Une étape importante contribuant à la survie et à la perpétuité de l'espèce au cours du temps est la reproduction. Cependant, celle-ci est souvent difficile à décrire chez les algues rouges. En effet, certaines d'entre-elles vont se reproduire de manière sexuée comme les espèces de *Gracilaria* ou de *Polysiphonia*. D'autres vont se multiplier de manière asexuée (fragmentation et/ou propagules multicellulaires) comme une *Porphyra* néo-zélandaise. Enfin, une partie de ces algues vont se reproduire des deux façons comme les espèces de *Kappaphycus* et d'*Eucheuma*, qui sont deux Gigartinales de la famille des *Solieriaceae* (de Reviers 2003, Bast 2014).

Deux études ont été menées sur le cycle de vie de *S. chordalis*. En 1982, Gabrielson et Hommersand ont mis en évidence la présence d'organes reproducteurs dans des cellules corticales, preuve d'une reproduction sexuée (Gabrielson et Hommersand 1982). Cinq ans plus tard, Floc'h *et al.* émettent l'hypothèse que *S. chordalis* se reproduirait principalement par multiplication végétative, en se basant sur des observations morphologiques du thalle au cours du temps. De plus, ils ont mis en culture l'algue qui s'est multipliée grâce à la croissance de ramules latérales et à la fragmentation des thalles (Floc'h *et al.* 1987). Ainsi, *S. chordalis* utiliserait les deux voies de reproduction, sexuée et asexuée.

4.3.1. Multiplication végétative

Certaines algues rouges ont la capacité de se multiplier sans qu'il y ait fusion d'un gamète mâle avec un gamète femelle. Chez les algues rouges, il existe deux grandes voies par lesquelles un nouvel individu peut se développer sans fécondation.

Premièrement, sur les thalles peuvent apparaître des propagules multicellulaires. Ce sont des structures qui se détachent spontanément du filament parent et se développent en un nouvel individu. Des algues rouges telles qu'*Asparagopsis taxiformis*, *Heterosiphonia japonica* et *Hypnea cornuta* utilisent exclusivement cette voie de reproduction (Cecere *et al.* 2011). Ce concept de propagule multicellulaire offre de nombreux avantages. En effet, il permet de multiplier le nombre d'individus efficacement, d'atteindre de nouveaux habitats, de disperser

l'espèce sur de longues distances et ainsi devenir une caractéristique compétitive pour l'évolution de ces algues. Chez *S. chordalis*, des propagules multicellulaires ont été observées au microscope optique comme l'illustre la **Figure 1. 31**.

Figure 1. 31 Photographie microscopique (Grossissement x 100) d'une coupe transversale d'une propagule multicellulaire observée chez *S. chordalis.*

Deuxièmement, la fragmentation est une autre voie de multiplication végétative. C'est une technique courante pour reproduire les algues en aquaculture et en laboratoire. La reproduction végétative a lieu quand la nécrose des vieux segments du thalle débute, ce qui libère les petites ramules latérales qui donnent naissance à de nouveaux individus souvent riches en granules d'amidon floridéen (Cecere *et al.* 2011). Cet événement peut être généralisé à toutes les espèces comme *S. chordalis,* dont les thalles adultes disparaissent pendant certaines périodes de l'année (Hurd *et al.* 2014). *Kappaphycus sp.* et *Eucheuma sp.,* cultivées en masse pour leurs carraghénanes sont obtenues par cette technique de fragmentation. Des fragments d'environ 0,5 cm sont attachés à des cordes et se développent pour former des thalles entiers. Cette technique de propagation clonale est très employée notamment en Asie du Sud-Est et au Brésil. Elle permet d'éviter une variabilité de la composition biochimique de l'algue et ainsi « standardise » la matière première (Hayashi *et al.* 2010, Bast 2014).

4.3.2. Reproduction sexuée

Différentes morphologies de *S. chordalis* ont été repérées au cours des saisons (Gabrielson et Hommersand 1982, Floc'h *et al.* 1987). D'après Cabioc'h *et al.* (2014), les jeunes thalles sont assez peu ramifiés contrairement aux thalles adultes. Ces derniers se couvrent en période de croissance de petites propagules qui se développent en ramules épineuses atteignant 1 à 4 cm de long. Ces ramules sont disposées sur un seul côté comme les dents d'un peigne et ont un rôle primordial pour le développement de cette algue comme le montre la **Figure 1. 32** (Cabioc'h *et al.* 2006).

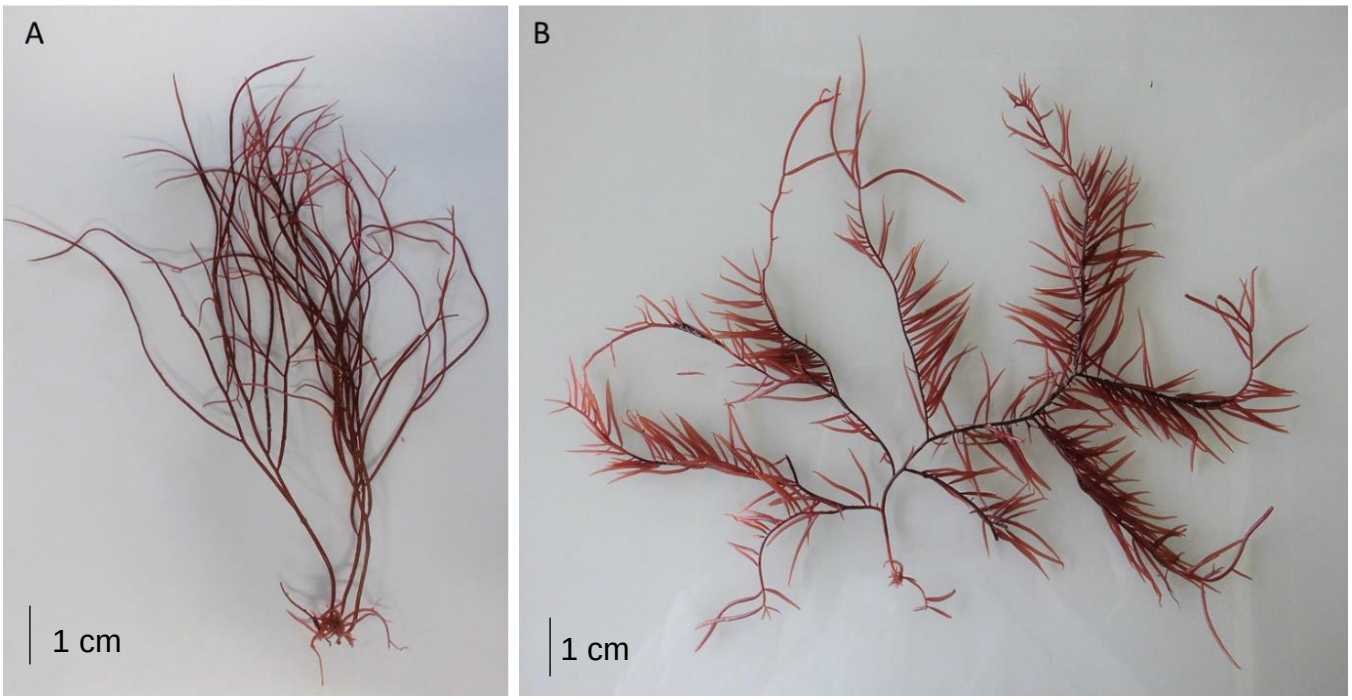


Figure 1. 32 Thalle jeune (**A**) collecté en décembre 2014 et thalle adulte (**B**) collecté en avril 2015 de *S. chordalis.*

Néanmoins, chez la majorité des algues rouges, la reproduction peut également être sexuée. Le cycle de reproduction des floridées est dit trigénétique haplodiplontique, puisqu'il est composé de trois générations : gamétophyte, carposporophyte et tétrasporophyte, dont une partie de ces générations est haploïde (n chromosomes) et une autre partie diploïde (2n chromosomes). Gabrielson et Hommersand (1982) ont montré au microscope optique des organes reproducteurs dans les cellules corticales de *S. chordalis* (**Figure 1. 33**).

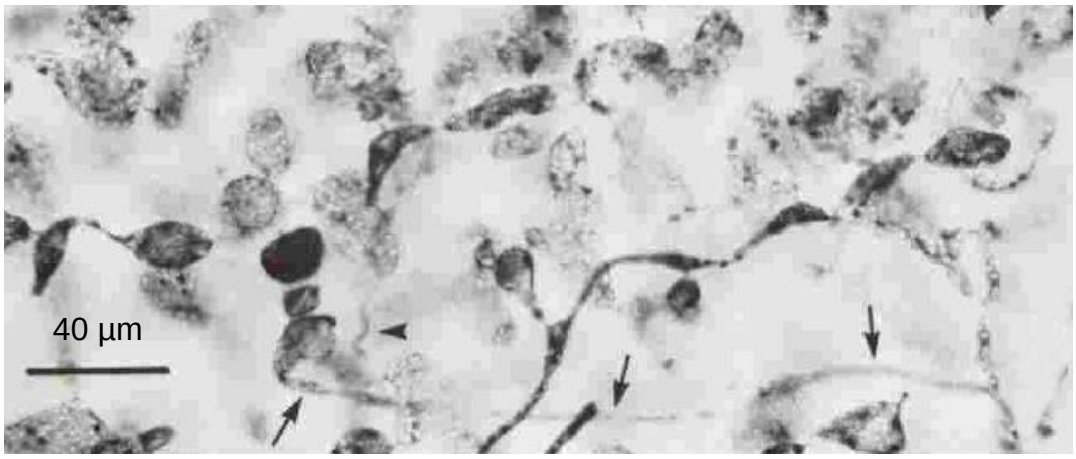


Figure 1. 33 : Photographie microscopique d'un rameau carpogonial sur lequel est fixé un carpogone (longues flèches) et d'un résidu de trichogyne (tête de flèche) (Gabrielson et Hommersand 1982).

Ainsi, le cycle de vie de l'algue serait très proche de ceux des espèces de *Kappaphyccus* et d'*Eucheuma* (**Figure 1. 34**).

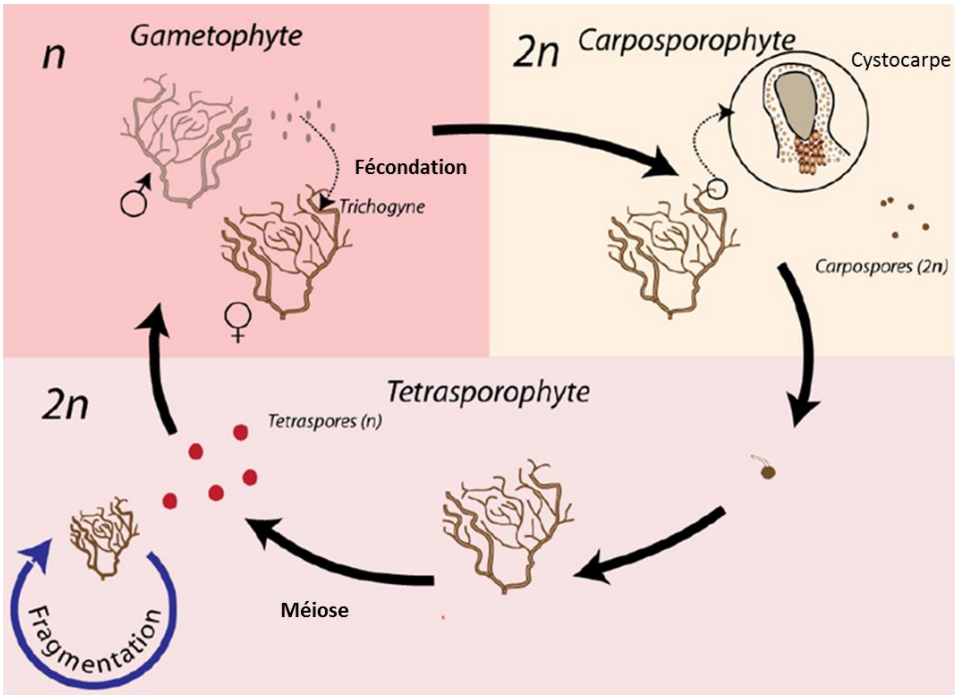
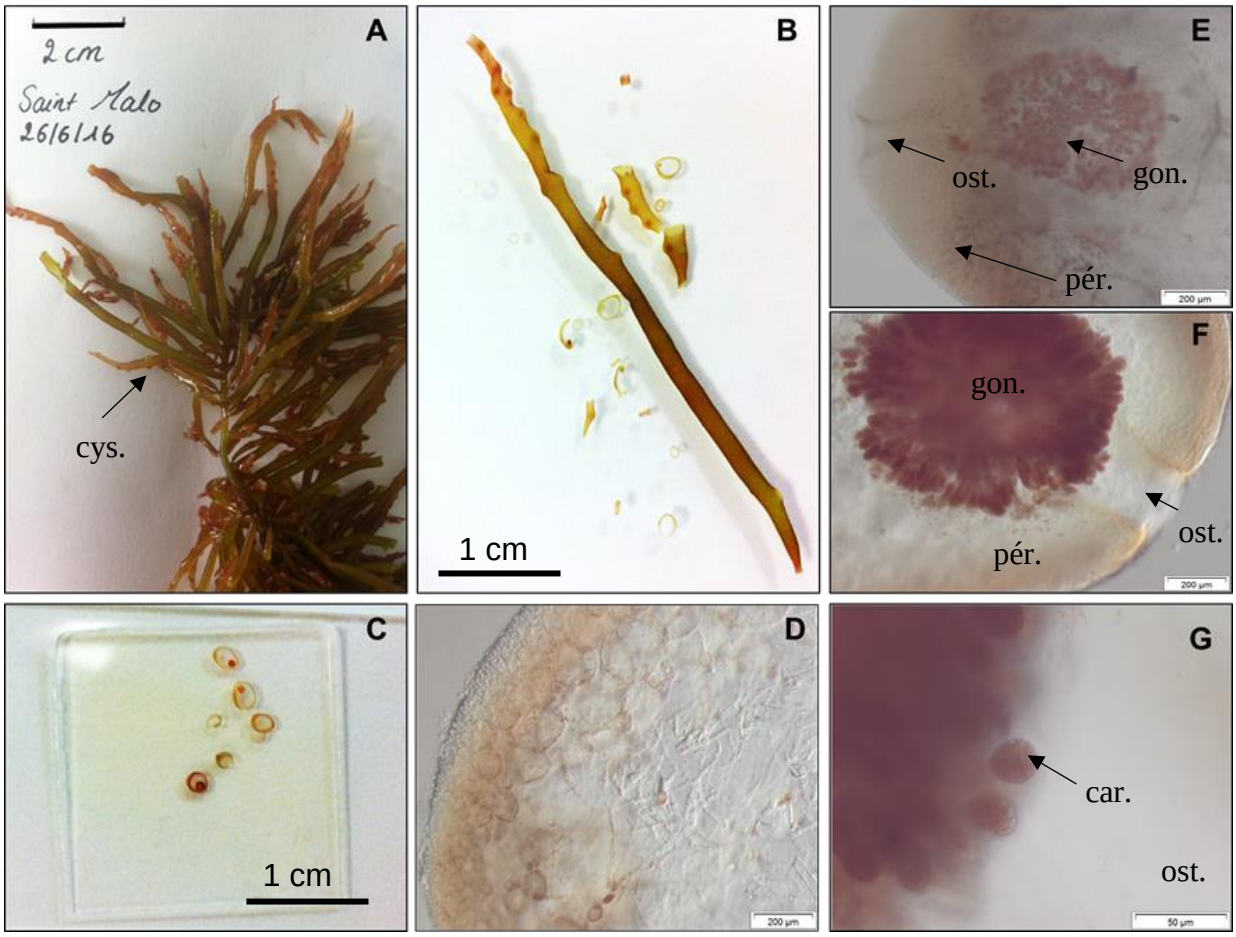


Figure 1. 34 : Cycle de vie des algues rouges de la famille des *Solieriaceae* de l'Ordre des Gigartinales (modifié de Bast 2014).

Les morphologies des gamétophytes mâles et femelles sont identiques chez *S. chordalis*, ils sont isomorphes. Le gamète femelle, l'oosphère, est contenu dans un carpogone pourvu d'un appendice allongé : le trichogyne. Lors de la fécondation, le noyau des spermaties (gamète

mâle) rencontre l'oosphère puis un carposporophyte se forme, dont une photographie de *S. chordalis* a été prise et est représentée sur la **Figure 1. 35**. Le carposporophyte est parasite du gamétophyte femelle et produit les carpospores. Une fois libérées, celles-ci germent et un thalle diploïde se développe, c'est le tétrasporophyte (**Figure 1. 34**). Une méiose a lieu dans les tétrasporocystes (organes reproducteurs divisés en quatre) et les tétraspores produites sont haploïdes. Ces spores germent et se développent en thalles haploïdes formant de nouveaux individus, de nouveaux gamétophytes qui produisent des gamètes (oosphères et/ou spermaties) *(de Reviers 2003).* Étant donné qu'il n'existe pas de cellules flagellées, les spermaties tombent de manière inerte et certaines seulement viennent en contact avec les trichogynes. En parallèle, en vieillissant, les ramules des tétrasporophytes se détachent (fragmentation) et se développent en des individus stériles après fixation sur un substrat. Ainsi, les algues rouges compensent la faible probabilité de fécondation par une stratégie de multiplication des zygotes issus de quelques fécondations réussies et par une stratégie de multiplication végétative. Les gamétophytes, les carposporophytes incluant les cystocarpes (réceptacles de fécondation) déformant quelque peu les filaments de *S. chordalis* et les tétrasporophytes sont semblables d'un point de vue morphologique (Cabioc'h *et al.* 2014).

La reproduction sexuée est un moyen coûteux en termes de production et de perte de gamètes, mais elle permet un mélange génétique contrairement à la multiplication végétative clonale. Ces deux voix de reproduction assurent la perpétuité de l'espèce.



A *: Carposporophyte de S. chordalis. Des cystocarpes sont visibles à l'œil nu (**cys**.).*
B *et* ***C*** *: Filament et coupes transversales de S. chordalis.*
D *: Coupe transversale d'un filament de S. chordalis sans cystocarpe, observée au microscope optique. Les filaments enchevêtrés contenus au centre de la section transversale sont bien perceptibles.*
E, F et G *: Coupes transversales d'un cystocarpe (**E** et **F**) avec un agrandissement sur un gonimoblaste (**G**) de S. chordalis. La fécondation du zygote conduit au développement d'un gonimoblaste (**gon.**) protégé par un péricarpe (**pér.**) Le gominoblaste porte des carposporocystes qui libère chacun une carpospore (**car.**) dans le milieu extérieur par une ouverture qui est l'ostiole (**ost**.)*

Figure 1. 35 : Photographies macro- et microscopiques d'organes reproducteurs de *Solieria* (prises par Robledo et Burlot en 2016).

5. Enjeux et applications économiques

Les ressources naturelles terrestres ont largement été exploitées jusqu'à maintenant. Quant aux ressources marines évaluées à 71 % du globe, elles restent encore nombreuses à découvrir (Bourgougnon et Stiger-Pouvreau 2011). Les industriels sont de plus en plus intéressés pour développer des nouveaux produits naturels issus de la mer et des océans ayant

la même efficacité et les mêmes ou de nouvelles activités que certains produits de synthèse, mais en ayant un impact moindre sur l'environnement et la santé.

5.1. Algues sur le marché économique

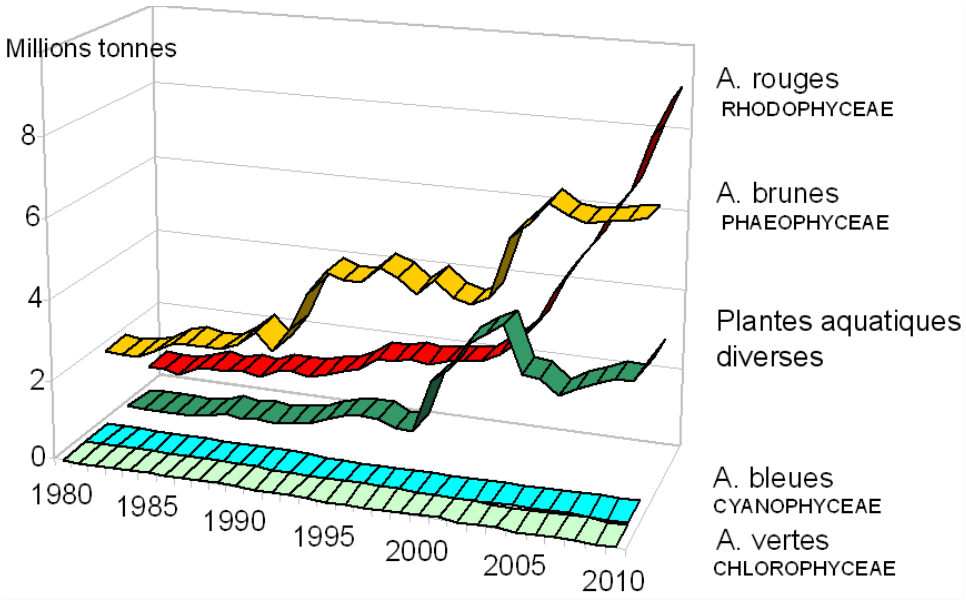
5.1.1. Les algues dans le monde

Au niveau international, en 2012, les algues (essentiellement des macroalgues) représentaient environ 30 % du tonnage et presque 4,5 % du chiffre d'affaires généré par l'aquaculture. Cette dernière pratique regroupe les productions de poissons, de coquillages, de crustacés et d'algues. En 2012, le tonnage de l'aquaculture est estimé à 90,4 millions et le chiffre d'affaires à 144,4 milliards de dollars. La production d'algues est alors estimée à 23,8 millions de tonnes et à 6,4 milliards de dollars durant cette même année. En 2013, les pays asiatiques et notamment la Chine, l'Indonésie et les Philippines participaient à hauteur de 90 % de cette production (la Chine produit à elle toute seule 13,5 millions de tonnes d'algues) (Bourgougnon et Stiger-Pouvreau 2011; FAO 2014). Par rapport aux chiffres de 2004, la production mondiale d'algues a alors plus que doublé en 8 ans (**Tableau I. VIII**).

Tableau I. VIII : Tonnages (en matière fraîche) et chiffres d'affaires de l'aquaculture et de la production des algues dans le monde en 2004 et en 2012.

	2004 (Bourgougnon et Stiger-Pouvreau 2011)	**2012** (FAO 2014)	**Augmentation en 8 ans**
Aquaculture tonnage ***(millions de tonnes)***	59,4	90,4	+ 52,2 %
Algues tonnage ***(millions de tonnes)***	11,3	23,8	+ 110,6 %
Aquaculture chiffre d'affaires ***(milliards de dollars américains)***	70,3	144,4	+ 105,4 %
Algues chiffre d'affaires ***(milliards de dollars américains)***	5,7	6,4	+ 12,3 %

95 % des algues qui circulent dans le monde proviennent de cultures. Les 5 % restants proviennent de l'exploitation des goémons[9] qui comprend la pêche embarquée et la récolte d'algues sur l'estran (FAO, 2014, Anger 2015). Sur la **Figure 1. 36**, l'accent est mis sur la valorisation des algues rouges.



En 2010, la production d'algues brunes devient constante à 6,7 millions de tonnes, alors que celle des algues rouges augmente de manière exponentielle et atteint 9 millions de tonnes.

Figure 1. 36 : Production mondiale par groupes de macroalgues d'après l'IFREMER *(IFREMER 2016).*

[9] Mélanges d'algues marines brunes, vertes et rouges laissés par le retrait des marées.

Aujourd'hui, 37 espèces sont cultivées à grande échelle dans le monde. Elles peuvent être regroupées en sept groupes selon leur nature ainsi que leur utilisation. Deux *Solieriaceae* dominent le marché. Il s'agit de *Kappaphyccus alvarezii* et *d'Eucheuma spp.* **(Figure 1. 37)** qui sont cultivées pour leurs carraghénanes.

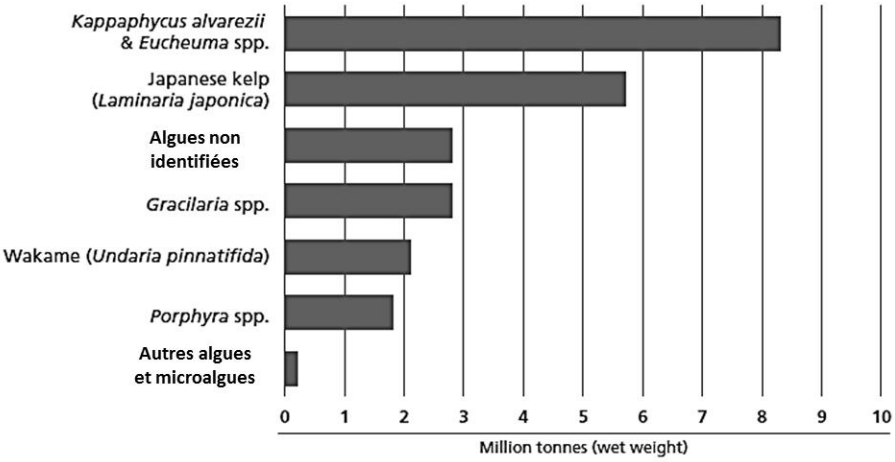


Figure 1. 37 : Production mondiale des macroalgues cultivées en 2012 (FAO 2014).

Les algues non identifiées ainsi que les *Gracilaria* sont cultivées principalement par la Chine qui les utilise pour nourrir les abalones et les concombres de mer. Quant à la *Porphyra* et à l'algue brune (*Undaria pinnatifida*), elles sont cultivées pour l'alimentation humaine. De l'algue brune *Laminaria japonica*, de l'iode et des alginates en sont extraits (FAO 2014).

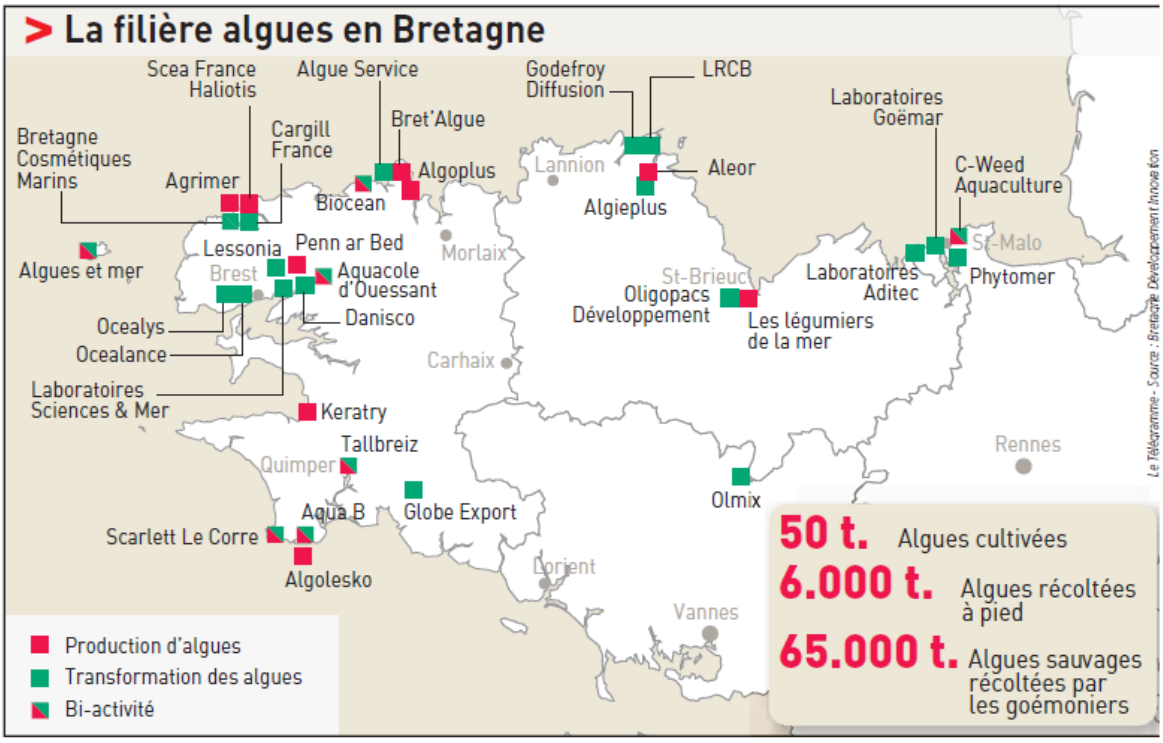
5.1.2. Les algues en France

La France se place au 9ème rang mondial des consommateurs d'algues avec 180 000 tonnes par an. La forte consommation apparente est due à l'industrie des colloïdes (Bretagne développement innovation 2012). Les algues ont été autorisées à la consommation dans les années 1990 comme « légumes », condiments ou ingrédients pour des plats préparés (Marfaing 2013). De plus, la France est le 7ème producteur d'algues dans le monde et le premier d'Europe. 90 % de la production française se font en Bretagne puis en Normandie, en Vendée et en Pyrénées-Atlantiques. Les algues produites sont essentiellement des algues brunes des familles des Laminariales et des Fucales, suivies par les algues rouges (C*hondrus crispus*, *Mastocarpus stellatus* et *Palmaria palmata*) et les algues vertes (*Ulva sp*. et *Codium*). Les Laminariales

génèrent un chiffre d'affaires entre 1,7 et 2,7 millions d'euros par an. Près de 80 000 tonnes d'algues sont produites par an dont seules 50 tonnes sont issues de l'aquaculture. Le reste provient de la collecte d'algues sauvages. Ainsi, des projets nationaux et régionaux tels que BREIZH'ALG et IDEALG (10 millions d'euros) ont été lancés ces dernières années (2011-2014 et 2010-2020 respectivement), notamment pour établir la filière algues et pour développer une aquaculture durable répondant à la demande des consommateurs. Sept fermes cultivant des algues, principalement de l'*Undaria pinnatifida* (wakamé) et de la *Saccharina latissima* (kombu), existent en France : six en Bretagne et une en Vendée (Mesnildrey *et al.* 2012).

5.1.3. Les algues en Bretagne

En Bretagne, environ 700 espèces d'algues ont été répertoriées. Elles ont été exploitées pendant des siècles, principalement par les locaux proches des côtes, en tant que fertilisants pour les terres arables (Bourgougnon et Stiger-Pouvreau 2011). Parmi les algues collectées en Bretagne, les algues brunes (environ 60 000 tonnes) dominent suivies par les algues rouges (près de 500 tonnes) et vertes (une centaine de tonnes). Principale région produisant des algues en France, de nombreux acteurs publics et industriels s'investissent. En 2007, il existait 67 établissements soit 1 635 emplois qui concernaient la valorisation des algues pour divers domaines d'applications. Deux groupes internationaux (CARGILL et DANISCO) exploitent les algues provenant de Bretagne et d'ailleurs (Bourgougnon et Stiger-Pouvreau 2011). En Bretagne, de nombreux projets de valorisation des algues étaient ou sont en cours dont Ulvans (22,7 millions d'euros), VB2 (3,4 millions d'euros) ou encore Algolife (10,6 millions d'euros) faisant collaborer industriels et centres de recherche publics bretons. La filière algues s'est alors largement développée dans la région et de nombreuses entreprises se sont mises à travailler la matière algale (**Figure 1. 38).**



Première région de production en France, la Bretagne foisonne de projets d'exploitation et de transformation des algues.

Figure 1. 38 : Une trentaine d'entreprises bretonnes travaillant à base d'algues (Article de presse dans le Télégramme du 6 octobre 2013).

5.2. Applications

5.2.1. « Légumes » et Colloïdes

D'après une étude menée en 1999 par des chercheurs néo-zélandais, 221 espèces de macroalgues sont utilisées et valorisées pour diverses applications. Sur ces 221 espèces, 145 algues étaient destinées à l'alimentation et 101 pour la production de phycocolloïdes (alginate, agar et carraghénanes). En outre, parmi ces 221 espèces, la plupart sont des Rhodophytes (125), suivies par les Chromophytes (64) et les Chlorophytes (32) (Zemke-White et Ohno 1999). Les algues collectées sont utilisées directement pour les domaines de l'alimentaire, des cosmétiques et des phytosanitaires. Elles peuvent être transformées afin d'extraire les phycocolloïdes aux propriétés gélifiantes et texturantes ou encore d'autres composés qui pourront servir en tant qu'additifs pour l'alimentation animale. Comme le montre la **Figure 1. 39**, la première utilisation des algues dans le monde est celle de « l'algue-légume » (76,1% du tonnage des algues cultivées et 88,3% du chiffre d'affaire).

Au niveau international, les trois quarts des algues sont consommés directement en tant « qu'algues légumes» contre 1% en Europe. Alors qu'au niveau européen, elles sont valorisées pour leurs phycocolloïdes tels que l'agar, les carraghénanes et les alginates en particulier par les industries agroalimentaires.

Figure 1. 39 : Familles d'applications des algues dans le monde et en Europe (CEVA 2009, modifié par Burlot, 2013).

Porphyra (Rhodophytes) communément appelé Nori (sushi), représente 12,4 % des algues cultivées. Le deuxième secteur est celui des phycocolloïdes (extraction des agars et des carraghénanes à partir d'algues rouges et des alginates à partir d'algues brunes). Ce secteur utilise 11,2 % du tonnage et produit 10,8 % du chiffre d'affaires de l'algoculture. En outre, le secteur des phytosuppléments est en pleine émergence avec 10,8 % du tonnage et 0,9 % du chiffre d'affaires.

En Europe comme en France, le principal secteur d'utilisation des algues est celui des phycocolloïdes pour les industries agroalimentaires, pour les domaines de la chimie et de la microbiologie. En France, *Laminaria digitata* est exploitée pour ses alginates utilisés en tant qu'agents texturants et stabilisants. L'agar-agar est obtenu à partir de *Gelidium spp.*, *Gracilaria spp.* et *Porphyra spp*. Les carraghénanes sont produits à partir de *Chondrus crispus* et de *Mastocarpus stellatus.*

5.2.2. Agrofournitures et autres.

D'autres algues sont exploitées en France en tant qu'agrofournitures. Par exemple, *Ascophyllum nodosum*, des espèces de Fucus ou du maërl[10] sont utilisés pour stimuler la croissance des plantes et pour leur bioactivité de résistance contre les maladies. Ces mêmes algues peuvent également servir de suppléments nutritionnels pour l'alimentation animale. Quant au maërl, il est utilisé pour corriger le pH dans le traitement des eaux (Mesnildrey *et al.* 2012).

Enfin, de nombreuses algues ou extraits d'algues, nomment *S. chordalis*, possèdent des propriétés physico-chimiques et/ou des activités biologiques, comme mentionné dans la partie sur les métabolites primaires et secondaires de ce manuscrit (*Cf.* 4.2. Composition biochimique et physiologie, page 40). Ainsi, ces métabolites actifs intéressent de nombreuses industries et peuvent être valorisés dans certains secteurs, par exemple en tant que colorants, texturant, gélifiant, antioxydant ou stimulant (**Tableau I. IX**). Ils sont alors incorporés dans des formulations de produits cosmétiques, agroalimentaires ou encore de nutrition et de santé animale et végétale.

Tableau I. IX : Algues françaises utilisées pour leurs propriétés et/ou activités biologiques (Mesnildrey *et al*. 2012).

Algue	Métabolite actif ou Activité/Propriété
Himanthalia	Vitamine C
Fucus vesiculosus	Glucane et effet tenseur (raffermissant)
Fucus spiralis	Propriété drainante
Saccharina latissima	Bio-plastique
Chondrus crispus	Carraghénanes, effet apaisant, vitamine C
Ascophyllum nodosum	Antioxydant
Pelvetia	Acides aminés, vitamine E
Corallina	Magnésum, calcium, effet apaisant
Laminaria digitata	Propriété drainante
Palmaria palmata	Effet apaisant, vitamine C

[10] Le maël est constitué d'une accumulation d'algues calcaires de la famille des Coralinaceae (Rhodophytes).

5.2.3. Les AlgoBox® avec **S. chordalis.**

Pour finir, une application originale et innovante a été concrétisée et mise en expérimentation depuis juillet 2014 sur des plages bretonnes dans le Golfe du Morbihan par le laboratoire des Domaines Océaniques rattaché à l'UBS et partenaire du projet LITTORALG. Il s'agit des AlgoBox®. Ces derniers consistent en l'installation de casiers de ganivelles remplis d'algues, en occurrence de *S. chordalis,* placés en pied de dune. Cet outil de génie-civil écologique breveté permet d'accélérer la dynamique naturelle de création de l'avant-dune. Les AlgoBox® permettent ainsi de lutter contre une érosion chronique des côtes morbihannaises, de restaurer et de préserver le trait des côtes pour une gestion durable du littoral. La **Figure 1. 40** est un schéma représentant le système AlgoBox®.

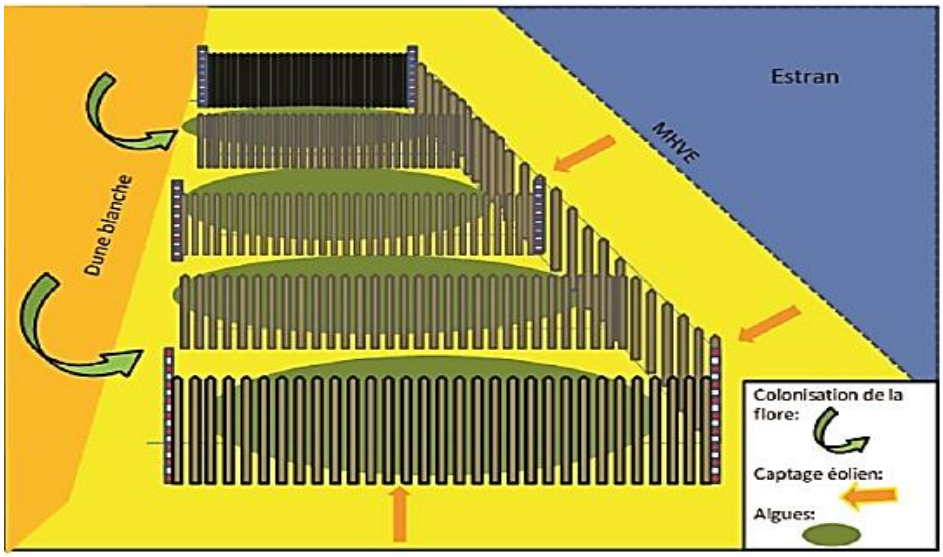


Figure 1. 40 : Schéma du système AlgoBox® créé par le laboratoire des Domaines Océaniques (Cochet 2015).

Les parois des ganivelles constituant les casiers améliorent le captage de sédiments éoliens en façade et sur les côtés. Dans un second temps, suite aux échouages massifs entre juin et novembre, les casiers sont remplis d'algues (*S. chordalis* principalement) ce qui permet d'amortir les vagues au cours de l'hiver et de favoriser le captage éolien. La dégradation des algues, au printemps, permet un enrichissement du milieu, favorable à la colonisation des plantes fixatrices telles que des *Apiaceae* (le Panicault maritime), des *Polygonaceae* (la Renouée maritime) et des *Poaceae* (l'Elyme des sables) dont le système racinaire maintient les dunes. Ces plantes favorisent également le captage éolien. Ainsi le système AlgoBox® utilise tous les éléments naturels à disposition (le vent, le sable, les algues et la végétation) pour

accélérer la formation d'une avant-dune afin d'amortir les assauts des vagues et contrer le recul de la dune principale. Le système proposé pour la plage de Penvins dans le Morbihan comportait deux grands AlgoBox® de 10m x 2m espacés par une zone témoin (**Figure 1. 41**). Le dispositif installé sur la plage a coûté 13 000 € (Sedrati et Cochet 2015).

Figure 1. 41 : Deux types AlgoBox® installés en juillet 2014 sur la plage de Penvins dans le Morbihan, France (**a** et **b**) ; échouage massif d'algues rouges et remplissage des AlgoBox® avec *S. chordalis* (**c**) ; colonisation des AlgoBox® par la végétation (**d**) (Sedrati et Cochet 2015).

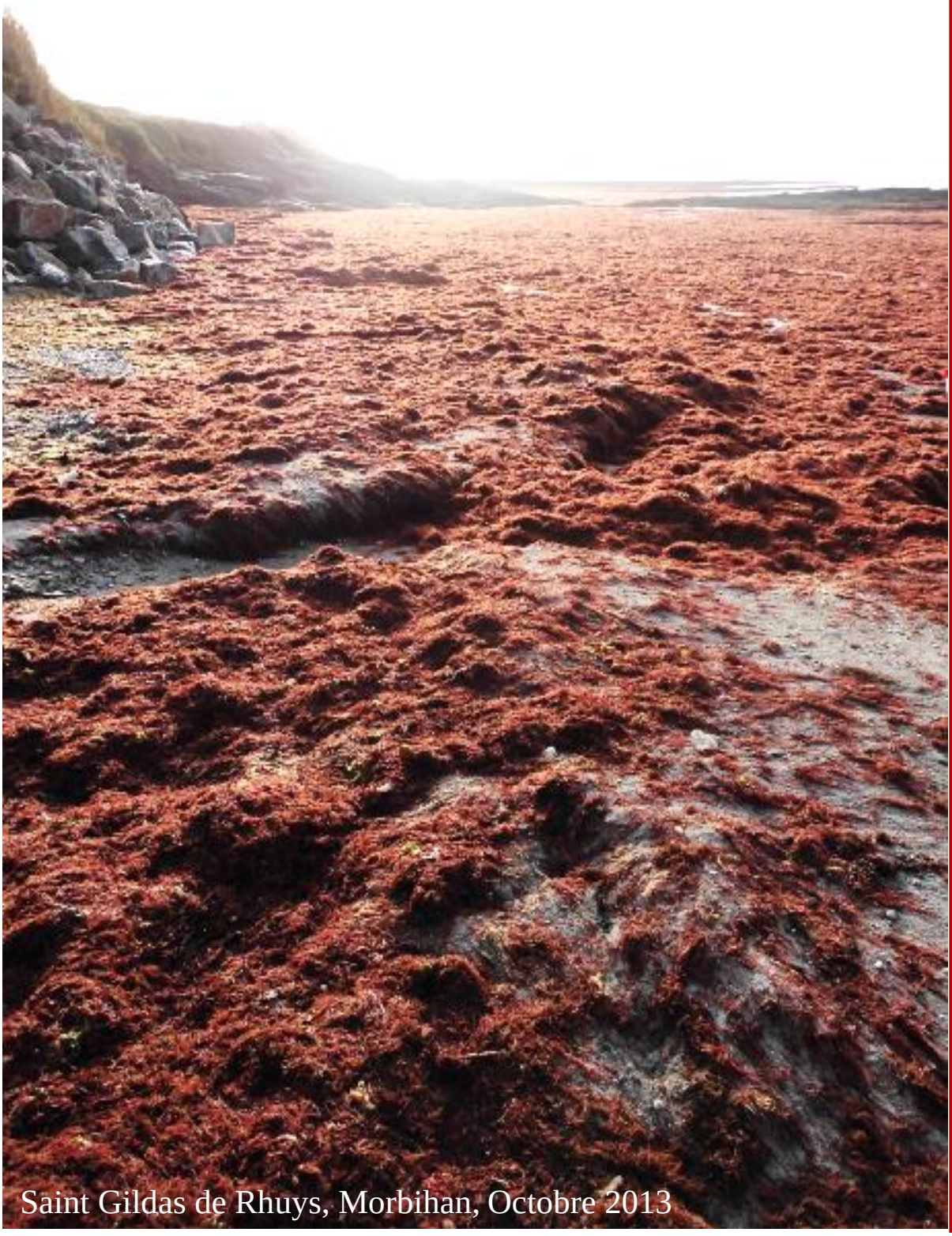
6. Conclusion

S. chordalis est une algue rouge qui se trouve en grande quantité périodiquement sur certaines plages de Bretagne sud, notamment pendant la période estivale. Ont émané de ce fait des questionnements et des pistes d'exploitation de cette biomasse naturellement disponible. En effet, les algues renferment de nombreux composés potentiellement actifs qui les constituent, les protègent et leur permettent de survivre dans un environnement marin très riche en organismes vivants et dont les paramètres physico-chimiques fluctuent en permanence quel

que soit le lieu. De plus en plus dans une logique et une réflexion de développement durable et éco-responsable, l'être humain cherche à améliorer son quotidien et son bien-être tout en anticipant les défis majeurs de notre planète. Les algues, qu'elles soient présentes sur les plages ou cultivées, représentent une réelle source organique qui offre de nouvelles perspectives. La recherche de leur exploitation peut alors répondre aux enjeux mondiaux du XXIème siècle. Nourrir 9 milliards de personnes en 2050 ou encore produire de l'énergie renouvelable sans affecter les terres arables, les ressources fossiles qui tendent aujourd'hui à s'appauvrir et sans ajouter d'eau et de fertilisants chimiques pour cultiver sont des objectifs rendus possibles grâce à cette richesse du monde marin.

Une propriété physico-chimique et/ou une activité biologique ne sont rendues possibles que grâce à une structure d'une molécule ayant une conformation et une configuration bien spécifiques. Or, un organisme vivant multicellulaire est complexe et change au cours de sa vie. Ces changements se traduisent par une variation quantitative et qualitative de ses composés qui le constituent. Ainsi, avant d'exploiter un organisme vivant révélant une activité bénéfique valorisable, il est très important d'étudier la variation de sa composition biochimique au cours du temps.

CHAPITRE II



Saint Gildas de Rhuys, Morbihan, Octobre 2013

Effets de la saisonnalité sur les caractéristiques biochimiques et biologiques de *Solieria chordalis*

CHAPITRE II

Effets de la saisonnalité sur les caractéristiques biochimiques et biologiques de *Solieria chordalis.*

1. Introduction
- 1.1. Les algues affectées par leur environnement
- 1.2. Écophysiologie du cycle de vie
- 1.3. Hypothèses et cibles de recherche

2. Matériels et Méthodes : Étude de la variabilité saisonnière de *S. chordalis* et de ses polysaccharides
- 2.1. Matériel végétal : *S. chordalis*
- 2.2. Observations et prévisions côtières : PREVIMER et METEO France
- 2.3. Préparation des échantillons en vue de leur caractérisation biochimique
- 2.4. Analyse mensuelle de la composition biochimique
- 2.5. Analyses chromatographiques et spectroscopiques
- 2.6. Analyses statistiques

3. Résultats et Discussion
- 3.1. Lieu d'étude : géomorphologie et variation saisonnière des facteurs environnementaux
- 3.2. Impact des saisons sur la quantité
- 3.3. Impact des saisons sur la qualité
- 3.4. Impact des saisons sur les polysaccharides
- 3.5. Conclusion : aspects éco-physiologiques pour une gestion de la ressource naturelle de *S. chordalis* de la Presqu'île de Rhuys.

Effets de la saisonnalité sur les caractéristiques biochimiques et biologiques de *Solieria chordalis*

1. Introduction

L'algue rouge *Solieria chordalis* s'échoue depuis des décennies en France sur la façade Atlantique, notamment sur la presqu'île de Rhuys dans le sud de la Bretagne. Dans le passé et toujours à l'heure actuelle, elle est essentiellement employée en épandages sur des terres agricoles par les collectivités touchées. Les agriculteurs acceptent de recevoir ces algues comme un apport en matière organique et en matière minérale. Pour certains, l'épandage des algues est une pratique familiale ancienne (Neveu 2016).

À quoi s'ajoutent les composés et les extraits issus de cette algue aux propriétés intéressantes pour les domaines de la santé, de la nutrition et des cosmétiques (*Cf.* Chapitre I, à partir de la page 40). Des activités antivirale (Hardouin *et al.* 2013; Burlot *et al.* 2016), coagulante (Rogers et Topliss 1983), hydratante et anti-rides (Deslandes et Bodeau 2007), antioxydante (Bondu *et al.* 2014) et immunologique (Bondu *et al.* 2010; Kendel *et al.* 2015) évaluées sur *S. chordalis* ont déjà été prouvées.

Néanmoins, les connaissances sur la biologie et la biochimie de cette espèce et l'étude de la variabilité saisonnière restent insuffisantes pour permettre une gestion rationnelle voire durable de son exploitation.

En effet, même si des travaux ont été réalisés sur la croissance végétative de l'algue (Floc'h *et al.* 1987), sur les constituants de la paroi dont les carraghénanes (Deslandes *et al.* 1985; Fournet *et al.* 1997) et sur l'impact de certains facteurs comme la salinité, la lumière ou encore le stress oxydatif sur des algues sauvages ou mises en culture (Brown 1995, Bondu *et al.* 2008 ; Ar Gall *et al.* 2008, Bondu *et al.* 2009, Bedoux *et al.* 2014), la dynamique de la

population et de l'espèce au cours du temps n'a pratiquement pas été abordée, mise à part dans les études de Floc'h *et al.* (1987) et du Centre d'Étude et de Valorisation des Algues (CEVA) en 2013. Bien que ces études mentionnent les variations concernant la morphologie du thalle et la quantité de la biomasse échouée sur les plages du Morbihan, la quantité et la composition des grandes familles de molécules (glucides, protéines, matière minérale) présentes chez *S. chordalis* restent à évaluer en fonction du temps.

Les travaux présentés dans ce chapitre ont été menés afin de répondre à cette problématique. Dans un premier temps, une étude bibliographique portant sur les paramètres environnementaux qui conditionnent la croissance des algues, tant au niveau de l'individu qu'au niveau de la population, est présentée avant de décrire le matériel et les méthodes utilisés. Les résultats de la fluctuation saisonnière de la quantité et de la composition biochimique de *S. chordalis* sont décrits et discutés. Plus précisément, l'effet de plusieurs facteurs environnementaux sur le taux de matière sèche, sur la composition biochimique globale, sur les polysaccharides et sur les profils en acides aminés et en sucres, a été analysé sur une durée de deux ans (2013-2015).

L'objectif final est de tenter d'intégrer l'ensemble des résultats pour parvenir à une connaissance globale des états quantitatifs et qualitatifs de la population et des individus de *S. chordalis,* en fonction des conditions environnementales locales au cours des saisons. Cette étude doit permettre d'anticiper et de proposer une gestion rationnelle pour de possibles exploitations de cette algue proliférante.

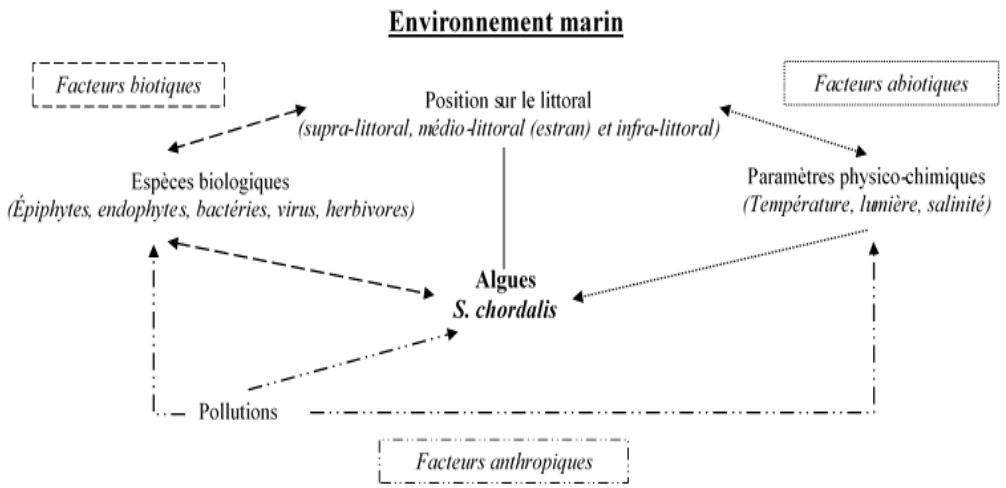
1.1. Les algues affectées par leur environnement

La plupart des algues sont sessiles, c'est-à-dire qu'elles sont attachées sur des substrats pouvant être de différentes natures. Elles sont alors confrontées à des stress chroniques et périodiques. Ainsi, elles subissent les effets des radiations lumineuses, de la dessiccation, des variations de salinités, de températures, ou encore d'apports de nutriments (Gupta *et al.* 2014 ; Williamson *et al.* 2014). Tous ces facteurs environnementaux ne sont pas stables dans l'espace et dans le temps. Les algues doivent alors ajuster fréquemment leur métabolisme pour s'acclimater sans cesse à leur environnement. Au cours du temps et à un endroit donné, elles

ont acquis des caractères spécifiques au niveau génétique pour pouvoir se développer et survivre en s'adaptant. Les changements de l'environnement ont lieu à différentes échelles et selon des gradients. Par exemple, à l'échelle globale, un gradient latitudinal existe en fonction duquel la température, la salinité ou encore l'accessibilité à la lumière varient. À l'échelle locale, soit au niveau du littoral, et à plus petite échelle, d'autres types de changements peuvent avoir un impact sur les algues, comme par exemple entre les zones intertidales à subtidales (Hurd *et al.* 2014).

Dans cette présente étude, *S. chordalis* provient du même site géographique, sur le médio- et l'infralittoral soit en zone intertidale voire subtidale. Ainsi, seuls les impacts de la variation temporelle des facteurs abiotiques sont analysés.

Les algues, étant des producteurs primaires jouant un rôle fondamental dans la chaîne alimentaire, influencent la structure des sédiments et font partie intégrante des habitats de nombreux organismes marins (Friedrich 2012, Iken 2012). Certains de ces organismes peuvent être bénéfiques ou, inversement, peuvent causer des maladies voire la décomposition de l'algue (Friedrich 2012). Enfin, le milieu de vie des algues peut aussi se voir modifié par les activités humaines, à l'origine d'une possible eutrophisation (Hurd *et al.* 2014). Comme représenté dans la **Figure 2.1**, des facteurs anthropiques peuvent, comme les facteurs biotiques et abiotiques, avoir un impact sur la biomasse algale.



Légende :
Les flèches représentent les interactions des facteurs extérieurs sur les algues dans l'environnement marin.

Figure 2. 1 *S. chordalis* affectée par son environnement.

1.1.1. Influence des facteurs abiotiques

Les facteurs abiotiques correspondent à des paramètres physico-chimiques d'un environnement (Beer *et al.* 2000). Les algues vivent dans des eaux dynamiques dont les variables de salinités, de températures ou encore d'intensités lumineuses ne sont pas constantes. Par exemple, à marée basse, les Gigartinales, comme *Chondrus crispus*, *Mastocarpus stellatus* et *S. chordalis*, sont exposées à la dessiccation, au choc hyper- ou hypo- osmotique, aux fortes ou aux basses températures ou encore à l'intensité lumineuse. La fréquence et la durée de ces stress dépendent en l'occurrence de la marée (Collen et Davison 1999).

1.1.1.1. Température

La température à la surface des océans est en moyenne de 28 °C au niveau des tropiques et atteint 0 °C aux pôles. Il n'y a pas de corrélation linéaire entre la latitude et la température, à cause des courants océaniques *(Hurd* et al. *2014).* La température ainsi que la salinité sont des facteurs liés et forment la circulation thermohaline (**Figure 2. 2**).

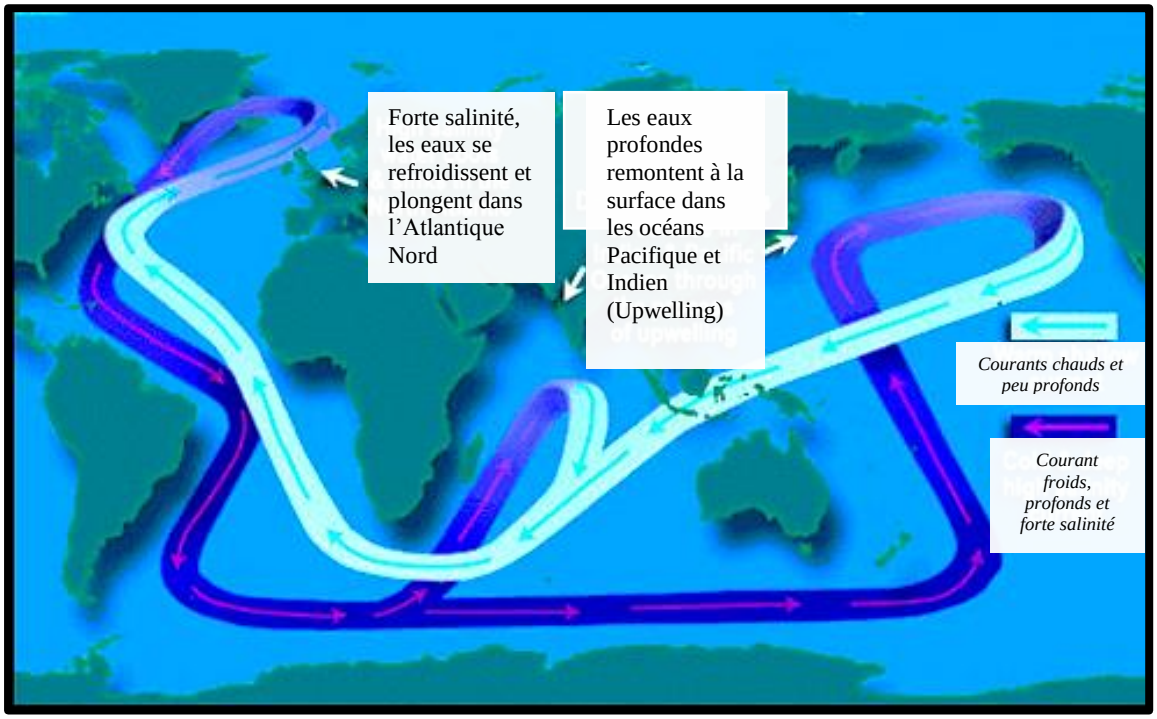


Figure 2. 2 Modèle général de la circulation thermohaline, "Global Conveyo Belt" *(NASA 2015)*

La différence de température n'est pas la même aux pôles (moins de 2°C) que dans les zones tempérées (entre 5 et 10 °C) (Lobban et Harrison 1994). En outre, à l'échelle locale, la température impacte fortement les algues se trouvant dans la zone intertidale. Une des caractéristiques de cette zone est l'exposition régulière aux conditions atmosphériques. Ainsi, la source première de chaleur est due à la radiation directe du soleil. À quoi s'ajoutent les marées, le temps de la journée et les saisons (Hurd *et al.* 2014).

La température est alors un des facteurs écologiques critiques pour la survie des algues (Flukes *et al.* 2015). Elle influence la configuration et la conformation des protéines. Les protéines de structure et les enzymes peuvent être directement affectées, ce qui engendre des effets importants sur les voies métaboliques et respiratoire, sur la photosynthèse et sur l'intégrité des cellules algales (Kain et Notron 1990). Le **Tableau II. I** donne des exemples des effets du stress thermique sur les cellules et sur les fonctions physiologiques des algues (Eggert 2012).

Les changements de température ont montré des impacts significatifs sur la croissance, sur la composition biochimique, sur les propriétés des composés et sur l'activité photosynthétique de Gigartinales, telles qu'*Hypnea cervicornis*, *Hypnea musciformis*, *Chondrus crispus*, *Eucheuma isiforme* et *Kappaphycus alvarezii.*

Par exemple, la phycoérythrine *d'H. cervicornis* se dégrade aux alentours de 30°C. La couleur de l'algue passe du rouge au jaune-marron et l'activité photosynthétique est réduite (Ding *et al.* 2013). D'autres algues peuvent s'acclimater et maintenir leur capacité photosynthétique comme c'est le cas pour *C. crispus* (Kübler et Davison 1993). Des corrélations positives ont été remarquées entre la teneur en glucides, la teneur en lipides et une élévation de la température, allant de 22,5 à 30,1 °C chez *K. alvarezii* et *H. musciformis* (Mtolera et Buriyo 2004; Kumar *et al.* 2015). Chez *E. isiforme*, le taux de la matière sèche augmente avec la température (28,4 ±1,6°C) (Freile-Pelegrín et Robledo 2006). Enfin, des composés antioxydants sont produits par *H. musciformis* pour se protéger de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) à des températures allant jusqu'à 30,2°C (Maharana *et al.* 2015).

Tableau II. I Effets du stress thermique sur la biologie et la physiologie cellulaires des algues (Eggert 2012).

	Stress hypothermique	< 15-20°C >	Stress hyperthermique
Niveau cellulaire	•Les lipides de la membrane cellulaire passent d'une phase liquide-cristalline à une phase de gel. • Changement de l'ultrastructure et de l'organisation des chloroplastes.		•Fluidisation des membranes •Désintégration de la bicouche lipidique • Augmente la perméabilité membranaire, ce qui détruit le gradient ionique et réduit les activités cellulaires. •Baisse de la stabilité, de la fonctionnalité et de l'activité des protéines (enzyme) •Déshydration cellulaire causant la dénaturation des protéines, la précipitation de molécules et des lésions membranaires.
Fonctions physiologiques	• Réduction de la capacité à capter la lumière et par conséquent réduction de l'activité photosynthétique et de l'assimilation carbonée. •Préservation de l'algue ou dysfonctionnement et mort cellulaire.		•Production de ROS •Photosynthèse : 3 sites sensibles : -photosystème II -ATP synthase - Enzymes du cycle de Calvin

1.1.1.2. Salinité

La salinité représente la somme de tous les sels dissouts (en g) dans l'eau (en kg). La salinité de l'eau de mer se situe entre 33 et 37 g/kg. Ce paramètre abiotique dépend des précipitations et de l'évaporation liées à la température. Sur les côtes du littoral, les précipitations sont responsables de flux entrants d'eau douce des fleuves et des rivières. Par conséquent, les précipitations abaissent la salinité alors qu'une élévation de température l'augmente. De manière générale, il est reconnu que la salinité et la température sont corrélées négativement avec la profondeur (circulation thermohaline, **Figure 2. 2**). Par exemple, dans

une station localisée au Danemark, les données collectées ont montré que dans les eaux profondes, à 14 m de la surface, la température est de 8°C et la salinité est forte (entre 30 et 35 g/kg), alors que dans les eaux de surface (0-4 m), la température se situe entre 18 et 20 °C et la salinité est faible (moins de 15 g/kg) (Lobban et Harrison 1994). Ainsi, la salinité a un effet direct sur la densité de l'eau, mais aussi sur la concentration en ions et par conséquent sur la pression osmotique.

L'eau de mer est hypotonique par rapport à l'intérieur des cellules des algues. Le potentiel osmotique est ainsi plus négatif dans les cellules algales. La capacité des algues à tolérer cette différence de potentiels dépend entre autre de l'élasticité de leurs parois qui leur sont caractéristiques et de la synthèse d'osmolytes (Hurd *et al.* 2014). Le **Tableau II. II** donne un aperçu de l'impact de changement de salinité. À quoi s'ajoute l'impact du vent et des marées, qui influencent grandement la salinité de l'eau de mer. La salinité est plus un paramètre local qu'un paramètre global (Karsten 2012).

Tableau II. II Effets du stress osmotique sur la biologie et la physiologie cellulaires des algues (Hurd *et al.* 2014).

	Salinité baisse	**< 35 g/kg >**	**Salinité augmente**
Potentiel osmotique	•Potentiel externe de l'eau augmente •Entrée d'eau dans les cellules algales •Augmentation du volume cellulaire et de la pression de turgescence des parois.		•Potentiel externe de l'eau baisse •Perte d'eau des cellules algales et absorption d'ions
Fonctions cellulaires et physiologiques	•Perte d'ions et de solutés organiques, ajustement osmotique et forte pression de turgescence. •En cas de forte baisse de salinité, les membranes, les organites et les enzymes peuvent être dénaturés.		•En cas de « petite » perte d'eau, plasmolyse des cellules algales. •Synthèse de solutés organiques et ajustement de la pression osmotique. •En cas de « grande » perte d'eau, la concentration interne en sels est élevée. Ajustement osmotique et forte pression de turgescence, mais si cela n'est pas suffisant alors les membranes, les organites et les enzymes peuvent être dénaturés.

Les algues sont sensibles aux changements de la salinité de leur milieu. Chez les Gigartinales *Kappaphycus alvarezii* et *Hypnea cervicornis*, la croissance est maximale pour une salinité comprise, respectivement, entre 25 et 35 g/kg et entre 25 et 30 g/kg, à condition pour ces deux algues que la température de l'eau de mer soit située entre 20 et 25°C. En outre, la synthèse des pigments (chlorophylle a et caroténoïdes) ainsi que celle des phycobiliprotéines fluctuent en fonction de la salinité. Par exemple, les phycobiliprotéines restent intactes jusqu'à 45-55 g/kg chez *K. alvarezii* alors qu'elles se dégradent chez *H. cervicornis* qui devient blanche (Ding *et al*. 2013; Araújo *et al.* 2014).

Deux études ont été menées sur l'impact de la salinité sur *S. chordalis* collectées dans le Finistère en Bretagne. Dans ces études, réalisées par la même équipe de recherche, *S. chordalis* a subi une condition hypo-osmotique (22 g/kg), une condition « de référence » (34 g/kg) et une condition hyper-osmotique (50 g/kg). En combinant les résultats des deux études, il a été démontré que dans la condition hyper-osmotique, l'algue synthétise des osmorégulateurs tels que le floridoside et le digénéaside ou encore des composés organiques halogénés volatils (*Cf.* Chapitre I. Les glucides de faible poids moléculaire, pages 61-.62). Pour ces derniers composés, l'algue les produit seulement dans des conditions à l'obscurité. Quand l'algue se trouve dans un milieu dont la salinité est de 22 à 34 g/kg, la photosynthèse est active et synthétise des glucides incluant le floridoside, qui constituent dans ce cas un osmorégulateur sur le court terme. Il est mobilisé pour des biosynthèses de composés impliqués dans l'osmorégulation sur le plus long terme comme les glucides des parois cellulaires. En condition hypo-osmotique (22 g/kg), les chercheurs émettent l'hypothèse que l'algue synthétiserait des composés organiques halogénés volatils, qui aurait un rôle dans la neutralisation des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) (Bondu *et al.* 2008; Bondu *et al.* 2009).

1.1.1.3. Ensoleillement et rayonnements photosynthétiques actifs et ultra-violets.

Les radiations solaires sont constituées d'un ensemble d'ondes électromagnétiques. Elles forment la lumière, qui est une source d'énergie pour les organismes photoautotrophes. Elle est cruciale pour la réalisation de leur photosynthèse et elle peut également servir de signal pour la régulation et le développement de certaines espèces, comme il sera vu dans la suite de ce chapitre (*Cf.* 1.2 Écophysiologie des algues, page 109). La lumière est donc un facteur abiotique vital. Les changements « de la lumière » incluant la photopériode (durée de l'ensoleillement) et la photomorphogénèse (largeur du spectre de longueurs d'ondes) ont un

impact sur le phototropisme de l'algue (forme et comportement de l'organisme photoautotrophe) (Kain et Notron 1990; Hurd *et al.* 2014). Ce paramètre est altéré par de nombreuses variables telles que la position du soleil, les nuages, les marées, les flux d'eaux douces entrant chargés en sédiments modifiant la turbidité, la profondeur à laquelle se trouve l'algue, la saison ou encore sa position dans la canopée d'algues sur l'estran (Hanelt et Figueroa 2012). Les algues rouges peuvent tolérer un grand spectre de longueurs d'ondes, notamment celles des rayonnements photosynthétiques actifs (400-700 nm) et celles des rayonnements UVs (200-400 nm). Néanmoins, si l'intensité et la durée de l'exposition à ces rayonnements solaires sont trop importants ou trop faibles, il se peut que les fonctions physiologiques de l'algue se modifient en réponse à ces stress (**Tableau II. III**).

Dans de nombreuses études sur les Gigartinales, des corrélations positives entre la lumière, l'activité photosynthétique et la croissance ont été trouvées (Mathieson et Burns 1975; Freile-Pelegrín et Robledo 2006). De plus, en activant la photosynthèse, des photoassimilats sont produits, en l'occurrence de l'amidon floridéen, comme cela a été démontré chez *S. chordalis* (Fournet *et al*. 1997). Ce que confirme la corrélation négative entre la lumière et la quantité de carraghénanes extraits d'*Eucheuma isiforme* (Freile-Pelegrín et Robledo 2006). Chez *S. chordalis*, des composés organiques di-halogénés principalement iodés sont produits après une exposition pendant 24 h à 50 µmol photon.m^{-2}.s^{-1} (Bondu *et al*. 2008). En outre, en été, sont accumulées des mycosporines amino-acides (MAA) aux propriétés anti-UV, antioxydante et osmorégulatrice chez des Gigartinales vivant à des profondeurs modérées, entre 0 et 1 mètre de la surface de la mer (Bedoux *et al.* 2014).

Tableau II. III Réponses cellulaires et physiologiques des algues en fonction de l'apport en lumière (Bondu *et al.* 2008; Hanelt et Figueroa 2012).

	Faible lumière	**< 50 µmol photon.m^{-2}.s^{-1}, 16 h :8 h (lumière : obscurité) >**	**Forte lumière**
Réponses	•Activité photosynthétique réduite. •Croissance réduite.		•L'activité photosynthétique augmente jusqu'à saturation. •La croissance augmente jusqu'à un certain seuil d'irradiance. •Photoinhibition, mécanisme dissipant l'énergie se met en place. •Photoprotection (anti-UV par exemple) •Production de ROS •Lésions, altérations et détériorations photochimiques
Fonctions cellulaires et physiologiques	•Synthèse de pigments accessoires-antennes, collecteurs de lumière.		•Synthèse d'enzymes photosynthétiques, de composants de la chaîne de transport des électrons, de composés photoprotecteurs et antioxydants

1.1.1.4. Nutriments

L'ensemble des éléments nutritifs constitue un facteur abiotique clé. En relation avec les autres paramètres environnementaux, ils influencent la croissance des algues (Harrison et Hurd 2001). Les nutriments traversent toute la surface de l'algue en contact avec l'eau de mer et sont ensuite distribués passivement dans toutes les cellules constitutives du thalle. Le carbone (C), l'azote (N) et le phosphore (P) sont les éléments les plus importants. Pour les algues cultivées, il est indispensable de connaître les rapports C:N:P afin de contrôler la productivité de la biomasse, la croissance d'épiphytes et la quantité de certains produits du métabolisme (Harrison et Hurd 2001; Gordillo *et al.* 2002*)*. Le carbone, provenant du CO_2 et assemblé avec d'autres

atomes par la photosynthèse, sert de base à la construction de molécules organiques constituant les algues. Quant à l'azote et au phosphore, les algues doivent les puiser dans le milieu. Ainsi, ces trois éléments et en particulier l'azote, représentent des nutriments critiques pour le développement des algues. Les concentrations d'azote et de phosphore varient dans l'eau de mer principalement en fonction :

- de la densité et du dynamisme des nutriments dans l'eau de mer ;
- de l'apport d'azote provenant de l'atmosphère, des animaux et des bactéries et de l'apport des nitrates provenant des pluies par le lessivage des terres ;
- par le diazote fixé par les bactéries et les cyanobactéries.

Leur concentration dans les algues par rapport à leur présence dans l'eau de mer est de 10^4 à 10^5 plus importante (Gordillo 2012; Hurd *et al.* 2014). Gordillo écrit en 2012 qu'il existe une distribution des macroalgues en fonction d'un gradient de nutriments présents dans l'eau de mer. Ainsi, des espèces qui se développent lentement sont caractéristiques des régions pauvres en nutriments alors que des macroalgues qui croissent rapidement sont retrouvées dans des eaux riches en nutriments. C'est le cas pour *S. chordalis* retrouvée sur le littoral breton. En effet, le rapport surface sur volume de l'algue est un élément qui explique l'assimilation de l'azote. Le taux d'assimilation de l'azote est plus important chez des espèces filamenteuses comme *S. chordalis* (Kain et Notron 1990). Dans les zones tempérées, la concentration des sels nutritifs est maximale en automne et en hiver puis devient minimale entre la fin du printemps et la fin de l'été (Harrison et Hurd 2001; Perini et Bracken 2014).

Le **Tableau II. IV** présente, de manière générale, les réponses de Gigartinales face aux changements d'apports en nutriments dans l'eau de mer (Harrison et Hurd 2001; Guimaraens *et al.* 2012; Hurd *et al.* 2014; Yong *et al.* 2014a).

Tableau II. IV Réponses générales des algues rouges face aux changements d'apports en nutriments dans l'eau de mer *(Cf. références citées précédemment).*

	Eau de mer pauvre en nutriments	**< Dans l'eau de mer, N= 1-10 µmol/kg P=2 µmol/kg >**	**Eau de mer riche en nutriments**
Réponses des algues	•Limite le taux de croissance •Baisse des épiphytes		•Favorise la production de la biomasse. •Augmente le rendement en phycocolloïdes

Par exemple, un apport de nutriments et notamment en fertilisants utilisés en agriculture augmente de 330 % la croissance de *Gigartina skottsbergii* comparé au contrôle sans fertilisant (382 µm ± 55 µm en présence de fertilisant riche de 11 % d'azote, de 8 % de P_2O_5, de 6 % de K_2O et d'autres éléments minéraux et 88 ± 16 µm de croissance sans fertilisant) (Mansilla *et al.* 2007). L'augmentation de la croissance a été également observée chez *Kappaphyccus alvarezii* après avoir cultivé l'algue *in vitro* sur du milieu Provasoli, riche en azote (Yong *et al.* 2014a; Yong *et al.* 2014b). Néanmoins, il peut s'avérer que certaines algues comme *Hypnea musciformis* préfèrent se développer en milieu sans excès de nutriments (concentration en azote de 2 et 3,7 µmol / L) (Guimaraens *et al.* 2012). Enfin, Freile–Pelegrin et Robledo (2006) ainsi que Yong *et al*. (2014) insinuent qu'il existe une corrélation positive entre les nutriments et la synthèse des carraghénanes chez les deux *Solieriaceae Eucheuma isiforme* et *K. alvarezii* (Freile-Pelegrín et Robledo 2006; Yong *et al.* 2014a).

1.1.1.5.Mouvements d'eau et dessiccation

L'eau est essentielle à toute forme de vie sur terre. Les structures intra- et intercellulaires ainsi que les membranes cellulaires sont maintenues par les molécules d'eau. La dessication consiste en une élimination de ces molécules, ce qui représente un stress sévère, voire létal. Sur l'estran, les algues sont confrontées à la dessication lors des marées basses. Déshydratées, les macromolécules s'aggrègent et les organites se désintègrent. La sévérité de la dessication est

causée par le temps d'émersion. Une série d'expositions à la déshydration peut progressivement tuer l'algue (Kain et Notron 1990; Hurd *et al*. 2014).

Sur le bas de l'estran ou en zone subtidale, *S. chordalis* vit dans un milieu hydrodynamique. Les mouvements de l'eau de mer sont causés par plusieurs variables comme les courants océaniques, les marées, les vagues ou encore le vent. Ces variables sont elles-même expliquées par les paramètres climatologiques, saisonniers et météorologiques. Le mouvement de l'eau est un paramère abiotique à prendre en considération car il affecte sérieusement les autres facteurs abiotiques, incluant l'acquisition des nutriments, la pénétration de la lumière et les changements de salinité et de température (Kain et Notron 1990; Hurd *et al.* 2014).

Les impacts ainsi que les réponses des algues face à la dessication et aux mouvements d'eau sont mentionnés dans le **Tableau II. V.**

Tableau II. V Impacts de la dessiccation et du mouvement de l'eau sur les algues, qui en réponse modifient leur fonctions cellulaires, morphologiques et physiologiques (Kain et Notron 1990; Reis *et al.* 2008; Hurd *et al.* 2014).

	Pas d'eau = Dessiccation	**Mouvements d'eau lents**	**Mouvements d'eau rapides**
Impacts	•Les structures des membranes cellulaires et des thylakoïdes se modifient en raison de l'augmentation de la concentration en électrolytes. •La chaîne de transport des électrons est interrompue et l'activité photosynthétique diminue. •Production de ROS.	•Accumulation de sédiments. •Les algues épuisent rapidement les nutriments aux alentours. •Bonne pénétration de la lumière.	•Apport de nutriments et de gaz dissouts aux algues. •La croissance augmente et est plus rapide. •Ils éliminent les déchets et les sédiments déposés sur les algues. •Mouvements excessifs sont délétères. Les algues peuvent se fracturer et se détériorer.
Réponses	•Acclimatation possible. •Activation des gènes de tolérance codant pour des protéines de transport, des protéines de choc thermique. •Production d'antioxydants.	•Morphologie : longueur et largeur de l'algue plus importantes.	•Tailles et formes réduites. •Flexibilité des algues plus importante due aux augmentations de la teneur en carraghénanes et de la viscosité de ces derniers.

La Gigartinale *Hypnea musciformis*, pendant l'émersion, subit une dessiccation. Pour lutter face à cette déshydration, la viscosité des carraghénanes est augmentée, ce qui favorise la rétention d'eau (Reis *et al.* 2008; Jouanneau 2010). De plus, elle synthétise des antioxydants afin de neutraliser les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) (Maharana *et al.* 2015). En 1992, il a été remarqué que *C. crispus* était douée de polymorphisme en fonction de son cycle de vie, mais aussi en fonction de l'environnement dans lequel elle se situait. Son thalle est plus petit quand les mouvements de l'eau de mer sont plus importants (Gutierrez et Fernandez 1992). Dans l'étude de Glenn et Doty (1992), trois espèces de *Solieriaceae* ont été mises à cultiver sur cinq lieux différents, mais sur le même récif plat avec un gradient naturel de mouvements d'eau de mer. Contrairement à *C. crispus*, toutes les Solieriaceae se sont développées, mais de façon plus ou moins importante. L'algue la plus exposée aux mouvements d'eau (15 cm/s) a montré le taux de croissance le plus élevé. Les coefficients de détermination des courbes des taux de croissance indique que les mouvements de l'eau pourraient représenter entre 81 et 98 % de cette variation de croissance entre les espèces et les différents lieux du récif (Glenn et Doty 1992).

L'ensemble des impacts des différents facteurs abiotiques sur les algues rouges de l'Ordre des Gigartinales, mentionnés dans cette partie du manuscrit, est résumé dans le **Tableau II. VI.**

Pour conclure sur les facteurs abiotiques, le **Tableau II.VI** met en évidence le fait que l'impact de la saisonnalité sur la biomasse algale ne s'explique pas par un unique paramètre environnemental, mais par l'ensemble des paramètres environnementaux. La réponse des algues se fait tant au niveau génétique, moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique qu'au niveau phénotypique. Cette réponse est régulée en fonction de mécanismes multifactoriels, qui sont importants à prendre en considération dans leur ensemble pour comprendre le développement des algues et anticiper sur leurs qualités (composition biochimique, relation entre les propriétés intrinsèques et l'adaptation au milieu environnemental, activités biologiques) et sur leurs quantités (biomasse et teneur en molécules).

Tableau II. VI Exemples d'impacts des facteurs abiotiques sur des Gigartinales (1/2).

Algue (lieu)	Facteur abiotique	Caractéristique	Impact sur l'algue	Référence
Kappaphyccus alvarezii (côte du nord ouest de l'Inde)	Température	22,5 à 30,1°C	Corrélation positive entre les teneurs de glucides, de lipides et la température.	(Kumar *et al*. 2015)
Hypnea musciformis (Inde)	Lumière	Soleil	La lumière et la dessication, en association avec la température, le pH, la salinité favorisent la production de ROS.	(Maharana *et al.* 2015)
	Dessication	Pas d'eau	En été, la lumière et la dessication (avec la présence du nitrate, du phosphate et du silicate) favorisent la prolifération de la biomasse.	
	Température	24-30,2 °C	Corrélation positive entre la dessiccation et la production d'antioxydants (catalase, acide ascorbique, glutathion).	
Kappaphyccus alvarezii (Pariba, Brésil)	Salinité	15-55 g (NaCl)/kg(eau)	La croissance augmente entre 25 et 35 g/kg (à 20-24°C), teneur importante en chlorophylle a entre 24 et 35 g/kg, teneur importante en phycobiliprotéines entre 45 et 55 g/kg.	(Araujo *et al.* 2014)
Solieria chordalis (Morbihan, France)	Lumière UV	UV-A (315-400 nm) UV-B (280-315 nm)	Production de MAA (antioxydante, photoprotectrice, osmorégulatrice) accumulée en été à une profondeur modérée (0-1m de la surface de l'eau)	(Bedoux *et al*. 2014)
Kappaphyccus alvarezii (Sabah, Malésie)	Nutriments	Culture *in vitro* en milieu Provasoli puis transfert en mer.	Les sels nutritifs du milieu Provasoli ont favorisé la croissance de l'algue et ls synthèse des carraghénanes.	(Yong *et al.* 2014)
Hypnea cervicornovis (Shantou, Chine)	Température	15-30°C	La température (avec la salinité et la lumière) augmente la croissance, au-delà de 30°C, R-PE dégradée, activité photosynthétique réduite, préservation de l'algue à 15°C.	(Ding *et al*. 2013)
	Salinité	25-50 g / kg	Meilleure croissance de 25 à 30 g/kg, activité photosynthétique diminue après 35 g/kg, forte teneur en chlorophylle a à 35 g/kg (et à 20°C); en caroténoïdes et phycobiliprotéines entre 20 et 35 g/kg (à 20-25°C).	
Hypnea musciformis (Brésil)	Nutriments	Azote = 2-3,7 µmol/L	Corrélation négative entre la quantité de la biomasse et les nutriments, conditions optimales de croissance dans un milieu appauvri en nutriments.	(de Guimaraens *et al.* 2012)
Solieria chordalis (Finistère, France)	Salinité	22, 34 et 50 g/kg	A 22 et 34 g/kg, du floridoside est produit par voie photosynthétique. A 50 g/kg, importante teneur en floridoside (osmorégulateur), mais produit par une autre voie métabolique.	(Bondu et al. 2009)
Solieria chordalis (Finistère, Bretagne)	Salinité	22, 34 et 50 g/kg	À 22 g/kg, la teneur en composés organiques halogénés volatils (COHV) est élevée, à 34 g/kg, la teneur en COHV augmente en présence de lumière et diminue à l'obscurité, à 50 g/kg, la teneur en COHV diminue à la lumière et augmence à l'obscurité (osmorégulateur à l'obscurité)	(Bondu *et al*. 2008)
	Lumière	50 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	Production de composés oragniques di-halogénés principalement iodés, lors d'une exposition à la lumière pendant 24h (à salinité normale).	

Ta bleau II. VI Exemples d'impacts des facteurs abiotiques sur des Gigartinales (2/2).

Algue (lieu)	Facteur abiotique	Caractéristique	Impact sur l'algue	Référence
Hypnea musciformis (Rio de Janeiro, Brésil)	Dessiccation Mouvements d'eau	Pas d'eau ou mouvements d'eau importants	Lors de la dessiccation, la viscosité des carraghénanes augmente, corrélation positive entre les mouvements d'eau, la flexibilité de l'algue, la teneur en carraghénanes et leur viscosité.	(Reis *et al.* 2008)
Gigartina skottsbergii (Détroit de Magellan, Chili)	Nutriments	Fertilisant Bayfolan (Bayer) à 0,1 mL/L	Corrélation positive entre l'apport en nutriments et la croissance de l'algue.	(Mansilla *et al.* 2007)
Eucheuma isiforme (Yucatan, Mexique)	Lumière	8,34 ± 0,72 mol photon.m^{-2}.d^{-1}	L'activité photosynthétique et la croissance de l'algue augmentent en présence de lumière, corrélation négative enre la lumière et la quantité en carraghénanes dans l'algue (car production d'amidon floridéen = photoassimilat).	(Freile-Pelegrin et Robledo 2006)
	Nutriments	0,5-12,7 µmol / L	Les nutriments (et la lumière) influencent la production de carraghénanes.	
	Température	28,4 ± 1,6°C	Corrélation positive entre la température et la croissance (<30°C).	
Hypnea musciformis (Tanzanie)	Température	autour de 29,5°C	. Corrélation positive entre la température et la quantité de carraghénanes et corrélation négative entre la température et la force du gel.	(Mtolera et Buriyo 2004)
Solieria chordalis (Finistère, France)	Lumière	50 µmol photon.m^{-2}.s^{-1}	Production d'amidon floridéen en présence de lumière (dans un milieu pauvre en nutriments).	(Fournet *et al.* 1999)
Chondrus crispus (Maine, Etats-Unis)	Température	30°C	Activité photosynthétique fonctionne.	(Kübler et Davison 1993)
Kappaphyccus alvarezii, Kappaphyccus striatum, Eucheuma striatum (Hawaii, Etats-Unis)	Mouvements d'eau	Gradient	Corréation positive entre les mouvements d'eau et la croissance des algues.	(Glenn et Doty 1992)
Chondrus crispus (Nord de l'Espagne)	Mouvements d'eau	Fort	Polymorphisme de l'algue qui devient plus petite.	(Gutierrez et Fernandez 1992)
Chondrus crispus, Mastocarpus stellatus (New Hampshire, Etats-Unis)	Lumière		Activité photosynthétique importante (à 5 ou à 15°C) jusqu'à saturation puis diminue. Les algues ne réagissent pas de la même manière. L'intensité de l'activité photosynthétique de *C. crispus* est inférieure à celle de *M. stellatus*.	(Mathieson et Burns 1971)

1.1.2. Influence des facteurs biotiques

Dans les zones inter- et subtidales, la distribution et l'abondance des algues sont également contrôlées par les facteurs biotiques. Ces facteurs peuvent être bénéfiques comme ils peuvent être néfastes pour l'algue. Ils ont un rôle, par exemple, dans la prédation et dans la compétition (Flores-Molina *et al.* 2014). En effet, certains brouteurs herbivores, comme les amphipodes et les oursins se nourrissent d'algues (Garbary *et al.* 2011). De plus, les algues peuvent se trouver en compétition avec d'autres algues pour l'acquisition de la lumière et des nutriments (Vásquez et Alonso Vega 2001). À quoi s'ajoutent des communautés microbiennes qui se servent des algues comme supports nutritifs (Ohkubo *et al.* 2006). Enfin, des associations peuvent exister entre l'algue et des endophytes, des épiphytes et/ou des parasites (Wiencke et Bischof 2012; Reis *et al.* 2003; Garbary *et al.* 2011; Flores-Molina *et al.* 2014). Les facteurs biotiques ne dépendent pas forcément du mois de l'année ou encore de l'heure de la journée, bien que des études ont mis en évidence des interactions entre les facteurs biotiques et abiotiques (Vásquez et Alonso Vega 2001; Vairappan 2006).

Par exemple, en été, en présence de lumière et à des températures extrêmes, la Gigartinales *Chondracanthus chamistoi* blanchit et se décompose. Durant cette période, beaucoup d'épiphytes et d'herbivores ont été observés. Au cours du temps, l'algue, plus vulnérable, produit moins de molécules de défense. Les invertébrés marins se nourrissant des épiphytes et d'algues sont alors plus nombreux. Cependant, il a été montré que les spores que les herbivores marins ingèrent ne sont pas digérées et sont retrouvées dans les fèces. Ainsi, ces animaux participent à la perpétuité et à la dispersion de l'algue (Vásquez et Alonso Vega 2001).

Il est plus difficile de prévoir les impacts des facteurs biotiques sur la biomasse algale. Leur étude nécessite des observations sur le long terme, aussi bien sur le terrain qu'en laboratoire.

1.1.3. Influence des facteurs anthropiques

Dans un monde où la démographie mondiale ne cesse d'augmenter, les activités humaines s'intensifient notamment en industrialisant de plus en plus le territoire terrestre puis marin. Ainsi, les algues sont exposées à des stress anthropiques de différentes formes : des stress directs comme des eaux enrichies en nutriments, des eaux polluées en pesticides, en

métaux lourds ou encore en produits chimiques ; et des stress indirects venant du changement climatique global, qui impactent les algues par l'acidification des océans, l'augmentation du CO_2 et du pH dans l'eau de mer, de la température, des radiations UVs ou par l'augmentation des tempêtes. Ces facteurs anthropiques accentuent tous les impacts décrits précédemment (production de ROS, diminution de la croissance, de la reproduction, de l'attachement au substrat ou encore de l'activité photosynthétique (Coelho *et al.* 2000; Camaya *et al.* 2014; Hurd *et al.* 2014; Flukes *et al.* 2015).

Un exemple des conséquences de ces facteurs anthropiques est celui des marées d'algues vertes, brunes ou rouges enregistrées de manière récurrente dès les années 1970. À partir des années 1990, les marées d'algues ont commencé à nuire à l'économie des sites touchés et le nombre de rapports mentionnant des phénomènes de marées d'algues, à différents endroits de la planète, a beaucoup augmenté dans les années 2000. Ces marées d'algues ont un effet nocif sur l'écosystème marin, comme il a été prouvé dans de nombreuses études (Heisler *et al.* 2008; Smetacek et Zingone 2013; Mineur *et al.* 2015). Chez *Hypnea musciformis*, il a été démontré qu'une corrélation positive entre la lumière et la présence de nitrate, de phosphate et de silicate provenant des fertilisants et du lessivage des sols, favoriserait sa croissance. Cette Gigartinale est trouvée en abondance en Chine (Maharana *et al.* 2015). Alors que d'autres espèces peuvent être menacées d'extinction, comme c'est le cas de *Solieria robusta* aux Philippines. Cette algue est menacée à cause de la dégradation des niches écologiques par les fermes d'aquaculture intensives de *Kappaphycus sp.* (Tito *et al.* 2007).

De tout temps, et peut-être encore plus aujourd'hui, les algues subissent les changements annuels, saisonniers, quotidiens de leur environnement. Certaines ont disparu, d'autres sont apparues. Corréler leur cycle biologique à leur environnement a été la stratégie pour certaines algues de s'adapter avant de s'acclimater en produisant des molécules de défense et de protection.

1.2. Écophysiologie du cycle de vie

Le cycle de vie des algues est souvent en relation avec des phénomènes se produisant dans leur environnement. Par exemple, Dawes *et al.* (1974) ont montré que la période de

croissance de trois espèces d'*Eucheuma* (Gigartinales, *Solieriaceae*) coïncidait avec une température faible de l'eau de mer, une faible luminosité et un environnement enrichi en nutriments (Dawes *et al.* 1974). Mathieson et Burns ont trouvé les mêmes résultats avec *Chondrus crispus* (Mathieson et Burns 1975). De plus, une intensité lumineuse trop élevée ainsi qu'une photopériode trop allongée inhiberaient la reproduction sexuée.

En outre, les algues de même espèce ne vont pas forcément avoir le même contenu intracellulaire à différentes étapes de leur cycle de vie. Par exemple, la quantité et la qualité des carraghénanes ne seront pas les mêmes chez *Chondrus crispus*, *Iridaea cordata* ou encore chez *Gigartina skottsbergii* selon la saison et leur stade de développement (Piriz et Cerezo 1991, McCandless *et al.* 1975; Winberg *et al.* 2014). Les résultats d'une étude sur huit Gigartinales portugaises ont mis en évidence une forte teneur en carraghénanes en été chez la plupart de ces algues et plus précisément chez *Chondrus crispus*, *Chondracanthus teedei*, *Gigartina pistillata*, *Calliblepharis jubata* et *Gymnogongrus crenulatus* (Pereira 2013). Pereira (2013) met en évidence une relation entre saisons, phases du cycle de vie et types de carraghénanes présents dans les algues, confirmant l'idée de leur interdépendance. D'après ce scientifique, le cycle de vie de ces Gigartinales, dont les différentes phases de développement sont caractérisées par une qualité et une quantité de constituants bien définies, dépend ainsi des variations saisonnières et géographiques (Pereira 2013). En 2001, Oteiza *et al.* ont montré une dominance des gamétophytes de *Sarcothalia crispata* en hiver alors que les sporophytes dominent en été (Otaíza *et al.* 2001). Enfin, une étude a montré que les taux de croissance de thalles de *Chondracanthus chamissoi* se trouvant à différentes phases de son cycle de vie étaient différents dans les mêmes conditions de culture. De 15 à 25°C, le taux de croissance du gaméthophyte femelle est supérieur à celui du sporophyte. Ces différences dans les taux de croissance en réponse à des variables environnementales peuvent expliquer la dominance d'une phase du cycle de vie par rapport à une autre (Bulboa et Macchiavello 2001).

L'écophysiologie des cycles de vie des algues rouges a son importance dans une optique d'exploitation de la biomasse. Un bel exemple est celui de l'algue rouge de l'Ordre des Bangiales *Porphyra* (Candia *et al.* 1999, de Reviers 2003). Cette algue a une importance économique notamment au Japon où elle est consommée régulièrement sous forme de sushis par exemple. Elle est cultivée à grande échelle pour l'alimentation humaine. La maîtrise des

différentes étapes du cycle de vie a permis d'améliorer la productivité des cultures (de Reviers 2003).

Ainsi, la connaissance des cycles de vie des algues est primordiale avant d'envisager toute application potentielle si celle-ci dépend d'une population sauvage, de même en aquaculture si les espèces s'avéraient intéressantes à produire en masse, pour des extraits ou des molécules à forte valeur ajoutée.

1.3. Hypothèses et cibles de recherche

Après consultation de l'évolution des facteurs environnementaux touchant le littoral de Saint Gildas de Rhuys, au cours du temps, de 2013 à 2015, les variations de la biomasse et de la morphologie macro- et microscopique de *S. chordalis* ont été étudiées pendant la même période. Enfin, les variations saisonnières en termes de quantité et de qualité des composés qui constituent l'algue, collectée chaque mois, sont analysées (**Figure 2-3**).

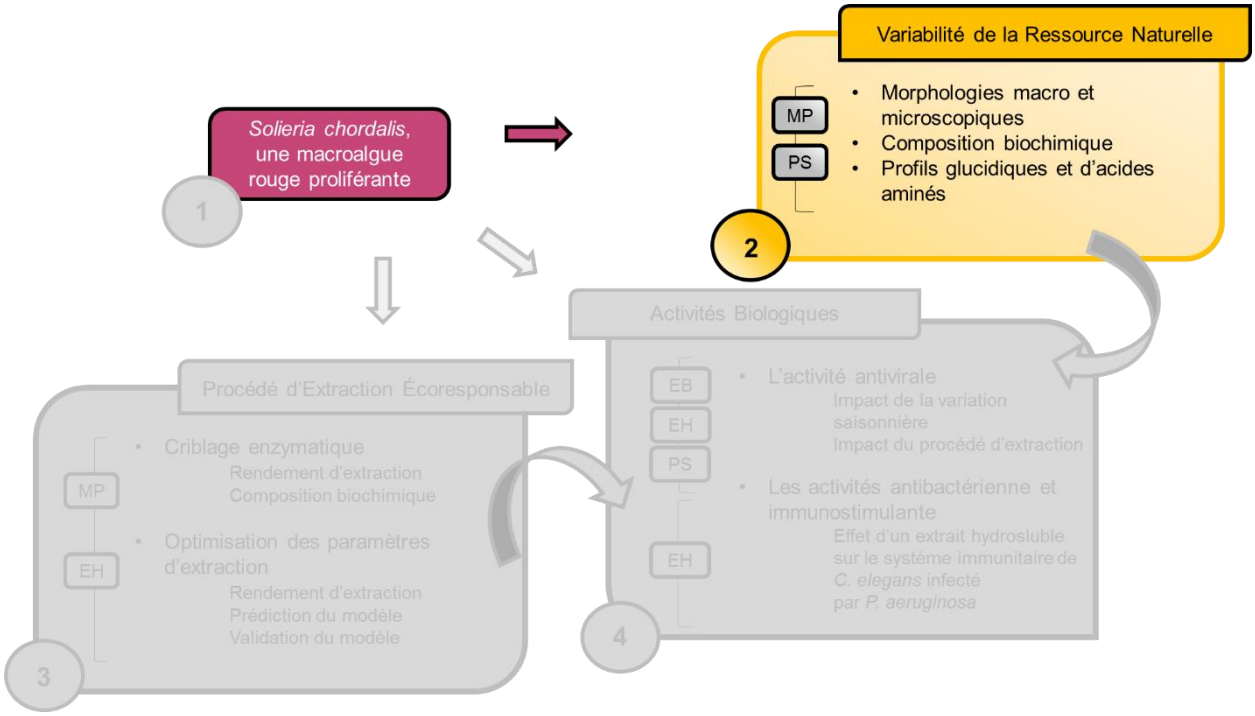


Figure 2. 3 : Organigramme du projet de doctorat mettant en évidence la deuxième étude traitant les effets de la saisonnalité sur les caractéristiques biochimiques et biologiques de la matière-première (MP) et des polysaccharides (PS) de *S. chordalis*, collectés tous les mois au même endroit pendant deux ans (2013-2015).

1.3.1. *Première partie*

Pour faire suite à l'étude du CEVA menée en 2013 et appuyer leurs résultats sur la dynamique de population de *S. chordalis,* les facteurs abiotiques, au niveau de la Presqu'île de Rhuys, ont été suivis et pris en compte, à savoir : la température de l'eau de mer ; la salinité, le nombre d'heures d'ensoleillement, les précipitations, les nutriments, la force du vent, les particules solides en suspension, le taux d'oxygène et la présence d'organismes chlorophylliens.

Cible 1 : Relevé des facteurs abiotiques de la Presqu'île de Rhuys de 2013 à 2015.

1.3.2. *Deuxième partie*

La disponibilité de la biomasse est un élément de base pour toute exploitation potentielle d'une ressource sauvage. Il faut alors déterminer et anticiper cette disponibilité en fonction de l'environnement dans lequel se trouve la matière première. De plus, un suivi de la morphologie du thalle a été réalisé. Entre les phases du cycle de vie et les espèces morphologiquement ressemblantes, les thalles possèdent différentes formes. Pour s'assurer d'une homogénéité des collectes de *S. chordalis,* des coupes microscopiques ont été effectuées.

Cible 2 : Évolution de la biomasse et de la morphologie macro- et microscopique de *S. chordalis* collectée tous les mois d'octobre 2013 à octobre 2015.

1.3.3. *Troisième partie*

Après avoir étudié la disponibilité de la biomasse, un regard est porté sur la quantité et sur la qualité des composés exploitables de *S. chordalis* en fonction de ces mêmes facteurs abiotiques. Pour une éventuelle exploitation de la matière première ou de composés d'intérêt comme les polysaccharides, la matière minérale ou les protéines par exemple, il est important de connaître leurs caractéristiques biochimiques dans une optique de stabilisation et de standardisation.

Cible 3 : Variations saisonnières des caractéristiques biochimiques de la matière première de *S. chordalis* d'octobre 2013 à octobre 2015.

Cible 4 : Variation saisonnière des caractéristiques biochimiques des polysaccharides de *S. chordalis*.

Cible 5 : Aspect écophysiologique pour la gestion de la ressource naturelle de *S. chordalis* de la Presqu'île de Rhuys.

2. Matériels et méthodes : étude de la variabilité saisonnière de *S. chordalis* et de ses polysaccharides

2.1. Matériel biologique : S. chordalis

2.1.1. Étude sur le terrain : prélèvement in situ.

Les échantillons de *S. chordalis* ont été collectés toutes les fins de mois, d'octobre 2013 à octobre 2015. Les collectes ont eu lieu au même endroit, à marée basse descendante sur la plage de Kerfago à côté du port aux Moines de Saint-Gildas de Rhuys, dans le Morbihan en Bretagne. La plage s'étend sur environ 150 mètres (**Figure 2. 4**) et a pour coordonnées GPS, une latitude de 47°29'30.5''Nord et une longitude de 2°49'52.0''Ouest (*Google Map*). Une photographie, dont l'angle de vue est le même, a été prise à chaque collecte d'algues afin de montrer la quantité de biomasse disponible.

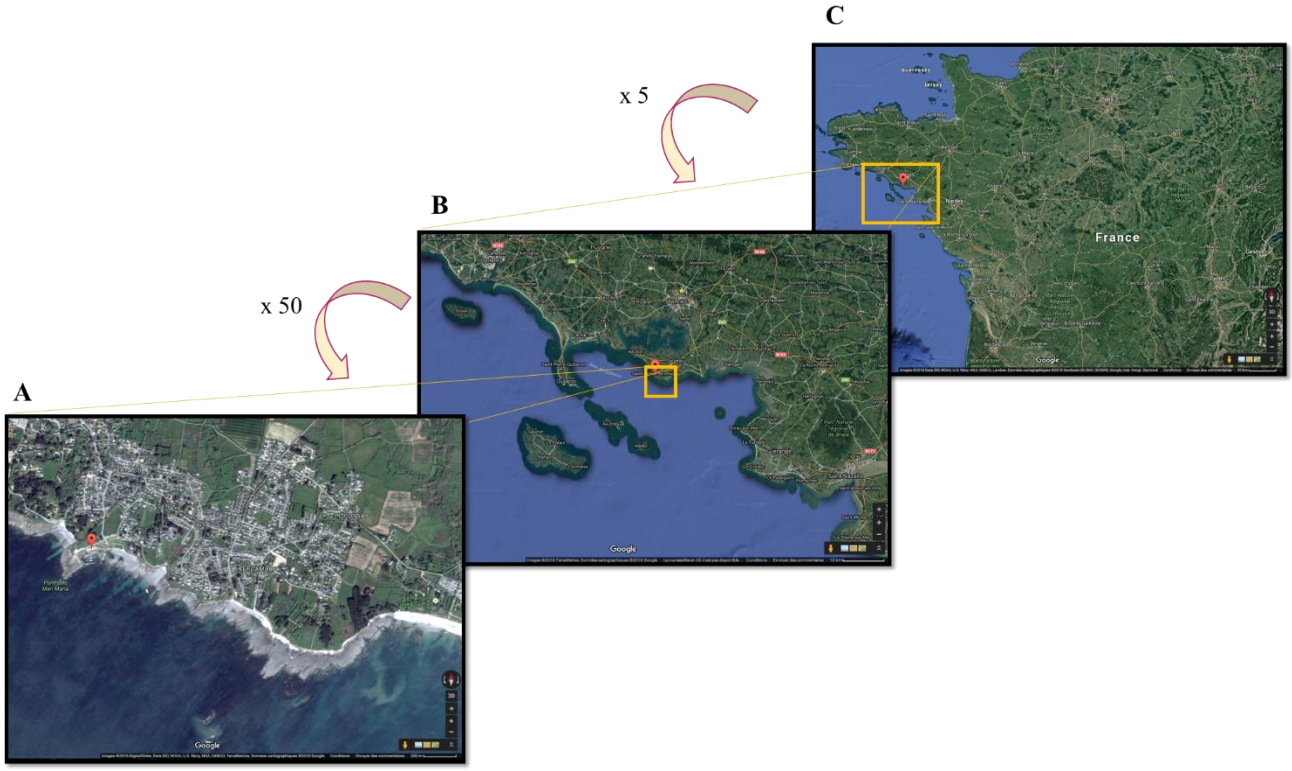
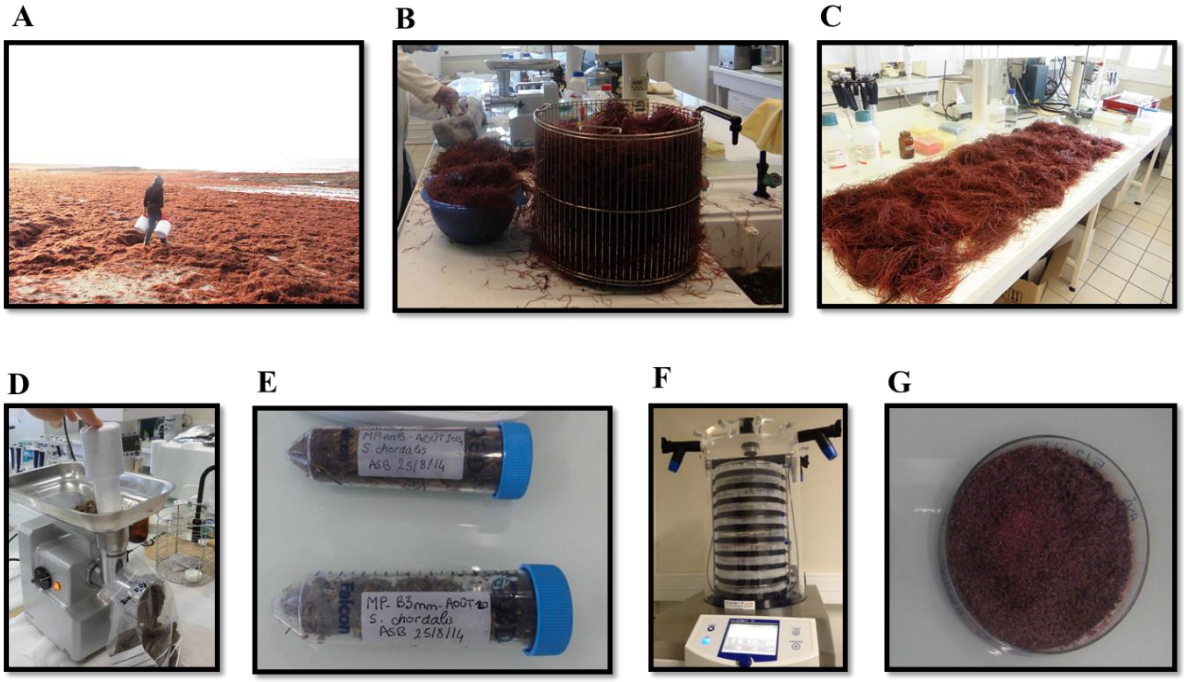


Figure 2. 4 Images satellites de la plage de Kerfago à Saint Gildas de Rhuys (**A**), sur la côte Atlantique (**B**) en Bretagne sud (**C**) (DigitalGlobe, Google Earth 2016).

Entre 2 et 5 kg d'algues ont été ramassées mensuellement. Les algues collectées dans le rideau d'eau sont lavées à l'eau du robinet, dans la même journée puis soumis au traitement décrit par la **Figure 2. 5**. Les épiphytes et les sédiments ont ainsi été éliminés. Une fois lavées, les algues ont été égouttées et séchées à l'air libre (18-22°C) afin d'éliminer toute l'eau de lavage excédentaire. Une partie est gardée et stockée à -25 °C pour les études sur la matière fraîche. Une photographie de la morphologie de l'algue est prise sur fond blanc avec une échelle et une inscription concernant la date et le lieu de collecte. Les algues restantes ont été broyées à l'aide d'un hachoir (JUPITER T8) en des particules de 3 mm de diamètre. Ces dernières sont déposées directement dans des récipients et entreposées à – 25 °C puis à – 80°C avant d'être lyophilisées (Alpha 1-4 -55°C CHRIST). La matière sèche lyophilisée a été utilisée pour la détermination de la composition biochimique. La poudre sèche est stockée à l'obscurité et à température ambiante (18-22°C).



Légende :

A *Collecte d'algues sur le terrain,*
B *Lavage et égouttage,*
C *Séchage,*
D *Broyage,*
E *Algues broyées et algues non-broyées,*
F *Les algues broyées sont lyophilisées,*
G *Algues lyophilisées, matière sèche.*

Figure 2. 5 Prétraitement des algues.

2.1.2 Analyses microscopiques

À partir de l'algue lavée, triée et égouttée, de fines coupes transversales de filaments ont été réalisées à l'aide d'une lame de scalpel. Les fines coupes ont été mises en suspension dans une goutte de PBS 1X[1] entre lame et lamelle, puis elles ont été observées au microscope optique (Olympus BX3 doté d'objectifs de grossissements x 100 et x 400). Les coupes microscopiques ont permis d'identifier *S. chordalis*.

2.2. Observations et prévisions côtières : PREVIMER et METEO FRANCE

PREVIMER est un projet qui fournit des observations et des prévisions côtières en Manche, Atlantique et Méditerranée. Le projet a débuté en 2006 et est toujours en cours de développement. Il est coordonné par l'Ifremer et le SHOM (Service Hydrographique et Océanographique de la Marine). Le projet offre un accès à un site internet où les données concernant les facteurs abiotiques sont disponibles (http://www.previmer.org/). Dans le cadre de cette étude, le modèle ECO-MARS3D a été sélectionné. C'est un modèle hydrodynamique en trois dimensions pour des applications à l'échelle régionale, couplé à un modèle biogéochimique. L'acquisition des mesures des différents paramètres physico-chimiques et biologiques se fait par imagerie satellitaire (satellites SeaWifs, MODIS de la NASA ou MERIS de l'ESA). Ce modèle tridimensionnel fournit des résultats selon une maille carrée de 4km de côté et sur 30 niveaux entre la surface et le fond. Ainsi, les données concernant la température de l'eau de mer, la salinité, les taux de nitrate, de phosphate, de silicate, d'ammonium, la concentration de la matière minérale en suspension, la concentration en chlorophylle, le taux de saturation d'oxygène, la force et le sens du vent touchant la presqu'île de Rhuys ont été collectées. Un exemple est donné sur la **Figure 2. 6**.

Dans cet exemple, la concentration en nitrate en fin avril 2015 est affichée sur la carte représentant la presqu'île de Rhuys. Elle est de 30,29 µmol/L. Les données concernant l'ensoleillement et les précipitations ont été récupérées sur le site internet de Météo France (http://www.meteofrance.com/ climat/ france/ lorient/ 56185001/ releves). Les valeurs ont été

[1] PBS 1X : tampon phosphate saline. Pour un volume final d'1L avec de l'eau distillée, 8g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na_2HPO_4 et 0,24 g de KH_2PO_4.

enregistrées à la station de Lorient et correspondent aux moyennes des relevés mensuels, comme présenté sur la **Figure 2. 7.**

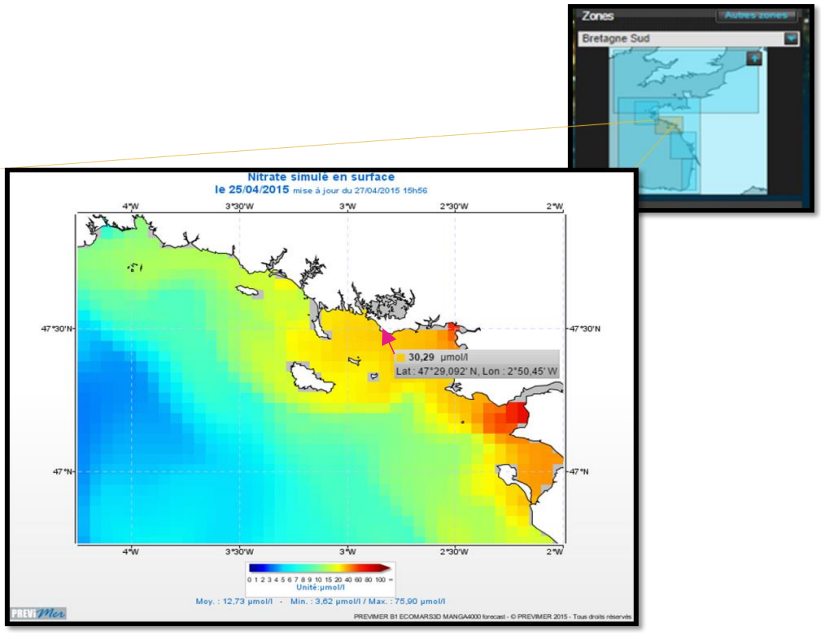
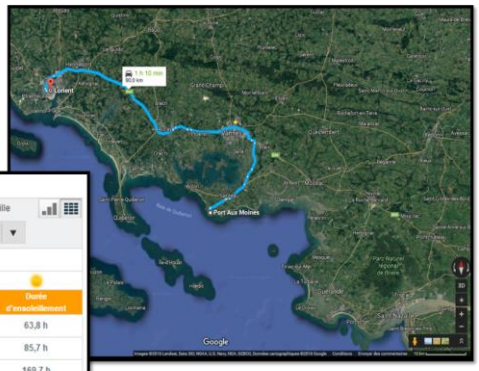


Figure 2. 6 Exemple de données issues du projet PREVIMER et utilisées dans l'étude de la variation saisonnière de *S. chordalis (previmer.org, 2016).*

B



A

DONNEES CLIMATIQUES DE LA STATION DE LORIENT

Normales · Relevés · Comparer avec une autre ville

Choisissez une période sur · 12 derniers mois · 10 dernières années · 2014

Relevés de 2014 - Lorient

	Température Minimale	Température Maximale	Hauteur de Précipitations	Durée d'ensoleillement
Janvier	4,9 °C	11,2 °C	176,8 mm	63,8 h
Février	5,7 °C	11,1 °C	200,5 mm	85,7 h
Mars	4,2 °C	13,0 °C	73,7 mm	169,7 h
Avril	7,3 °C	15,6 °C	58,4 mm	179,5 h
Mai	8,4 °C	16,9 °C	54,6 mm	220,7 h
Juin	11,9 °C	22,0 °C	43,0 mm	270,5 h
Juillet	13,6 °C	23,6 °C	79,1 mm	242,0 h
Août	12,3 °C	20,7 °C	80,3 mm	203,6 h
Septembre	12,8 °C	23,7 °C	6,2 mm	261,2 h
Octobre	11,2 °C	18,5 °C	102,9 mm	138,0 h
Novembre	8,2 °C	14,1 °C	141,6 mm	61,2 h
Décembre	5,2 °C	11,0 °C	49,0 mm	57,7 h

Figure 2. 7 Exemple de données de l'ensoleillement et des précipitations de 2014 (**A**), issues de Météo France, mesurée à la station de Lorient à 90 km de Saint Gildas de Rhuys (**B**) et utilisées dans l'étude de la variation saisonnière de *S. chordalis (meteofrance.com, 2016).*

2.3. Préparation des échantillons en vue de leur caractérisation biochimique.

2.3.1. Extractions acide et à l'eau pour la caractérisation de la matière première

Afin de caractériser la matière première de *S. chordalis* collectée chaque mois, les algues séchées et broyées ont subi une extraction acide et une extraction aqueuse à température élevée (100°C). Pour un même échantillon, les extractions ont été réalisées en triplica.

- Hydrolyse acide HCl 1 M : 10 mg de matière première lyophilisée, finement broyée dans un mortier à l'aide d'un pilon, sont mis en présence de 5 mL d'acide chlorhydrique 1M. Le mélange est laissé incubé à 100°C pendant 2h, avec une agitation manuelle toutes les 30 min. 5 mL d'hydroxyde de sodium 1M sont ajoutés afin de neutraliser le mélange. La concentration finale obtenue est alors d'1 mg/mL. La solution est stockée à 4°C et doit être utilisée dans la semaine. Cette solution sert pour les dosages des sucres neutres, des protéines, des acides uroniques et du 3,6 anhydro-galactose.

- Extraction à l'eau : 10 mg de matière première lyophilisée, finement broyée, sont mis en présence de 5 mL d'eau ultrapure. Le mélange est mis dans un bloc chauffant à 100°C pendant 2h, avec une agitation manuelle toutes les 30 min. 5 mL d'eau ultrapure sont ensuite rajoutés afin d'obtenir une solution de concentration finale égale à 1mg/mL. Cette solution sert pour le dosage des groupements sulfate.

2.3.2. Extraction des polysaccharides

Le protocole d'extraction des polysaccharides est illustré sur la **Figure 2. 8.** 5 g d'échantillon d'algue lyophilisée, broyée finement, sont insérés dans une cartouche de Soxhlet, elle-même mise à l'intérieur de l'extracteur de Soxhlet. Une extraction pendant 1h est réalisée avec de l'acétone 100 %, dont 150 mL ont été introduits au préalable dans le ballon. Ensuite, une deuxième extraction avec un extracteur de Soxhlet est réalisée pendant 1h avec 150 mL d'éthanol absolu. Des résidus appauvris en pigments, en lipides et en protéines sont obtenus. Ces résidus solides séchés sont plongés dans 125 mL d'eau distillée et subissent une extraction à 80°C pendant 2h sous agitation. Après une filtration à l'aide de gaze, le filtrat contenant les polysaccharides est récupéré et refroidi. Un volume d'éthanol absolu égal au double du volume du filtrat récupéré est versé progressivement dans le filtrat. Sous agitation manuelle vigoureuse, les polysaccharides précipitent et forment une pelote autour de l'agitateur en verre. Ce précipité

est désagrégé et lavé à l'éthanol. Les fibres obtenues sont placées à l'étuve à 60 °C pendant 1 jour. Elles sont ensuite broyées finement dans un mortier et entreposées dans un tube Eppendorf à l'obscurité, dans un endroit sec et à température ambiante (18-22°C), jusqu'à utilisation. Pour un même échantillon, les extractions des polysaccharides ont été réalisées en duplica et les rendements massiques exprimés en pourcentage de la matière sèche de l'algue ont été mesurés en triplica. Les poudres de polysaccharides sont analysées au spectromètre infrarouge puis analysées à l'aide du logiciel The Unscrambler. Les protocoles employés de ces techniques d'analyses physico-chimiques et statistiques sont détaillés dans la suite de ce manuscrit.

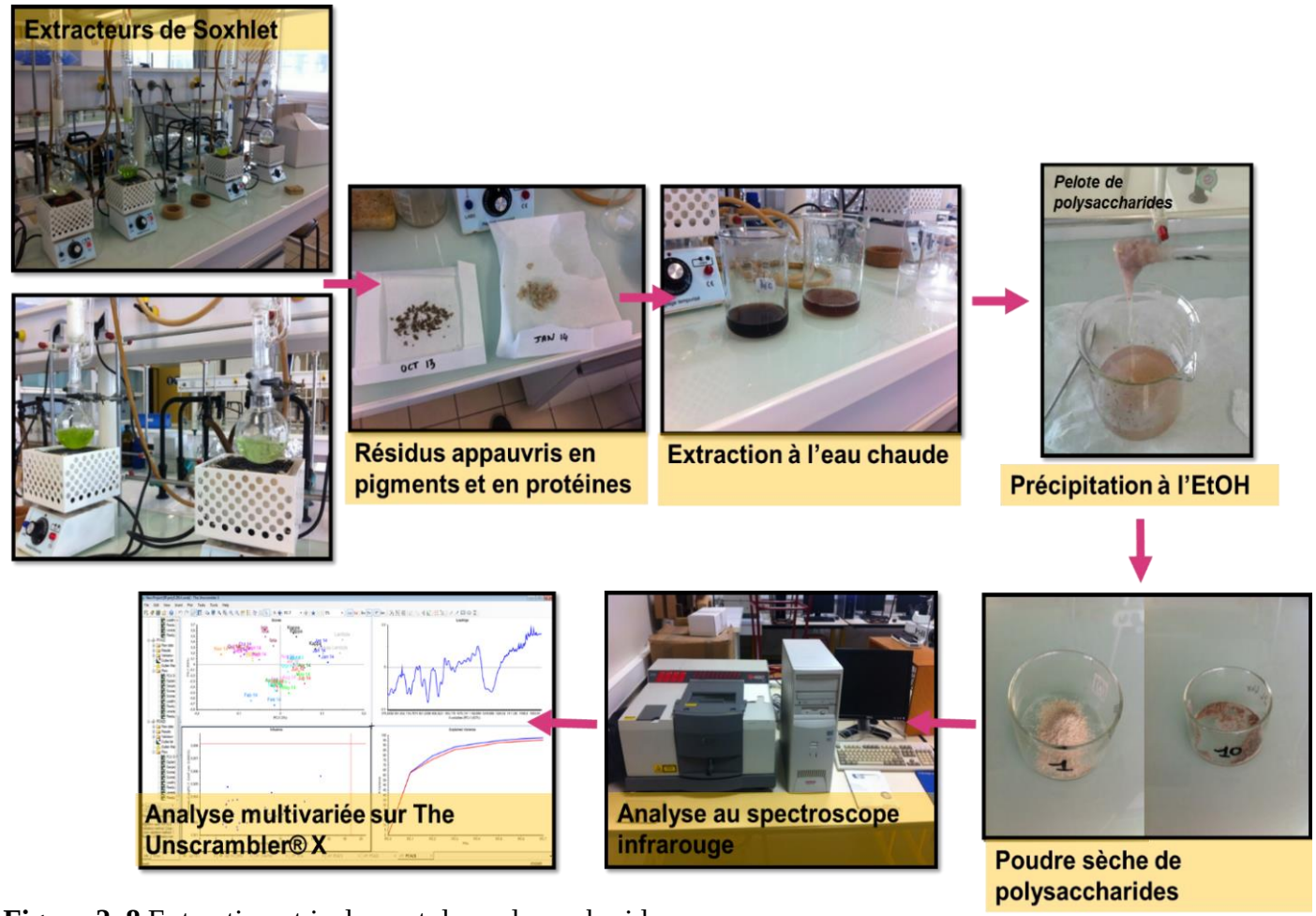


Figure 2. 8 Extraction et isolement des polysaccharides.

2.4. Analyses mensuelles de la composition biochimique

2.4.1. Détermination du taux de matière sèche de la matière première.

Tout d'abord, il faut établir le taux de matière sèche (MS) de l'algue pour faciliter l'interprétation de sa composition biochimique. Pour cela, 450 mg de matière première fraîche broyée en particules de 3mm sont mises à sécher à l'étuve durant une nuit à 100°C. La masse de l'algue est prise avant et après le séchage jusqu'à masse constante. Le taux de MS est calculé selon **l'équation A** qui suit :

Eq. A :

% MS = (Masse de l'échantillon après séchage x 100) / Masse de l'échantillon avant séchage

2.4.2. Rendement d'extraction des polysaccharides.

Le rendement des polysaccharides extraits de *S. chordalis* représente la masse du précipité séché à 60°C pendant 24 h par rapport à la masse de la matière première sèche insérée dans la cartouche du Soxhlet (*Cf.* Matériels et Méthodes 2.3.2. Extraction des polysaccharides, pages 118-119). Le rendement des polysaccharides se calcule selon **l'équation B.**

Eq. B :

$$\% \text{ Rendement des polysaccharides} = \frac{\text{Masse du précipité composé de polysaccharides après séchage} \times 100}{\text{Masse de la matière première insérée dans la cartouche de Soxhlet}}$$

2.4.3. Dosage colorimétrique des sucres totaux.

Le principe du dosage des sucres totaux, selon la méthode de Dubois *et al.* 1956, est détaillé sur la **Figure 2. 9.**

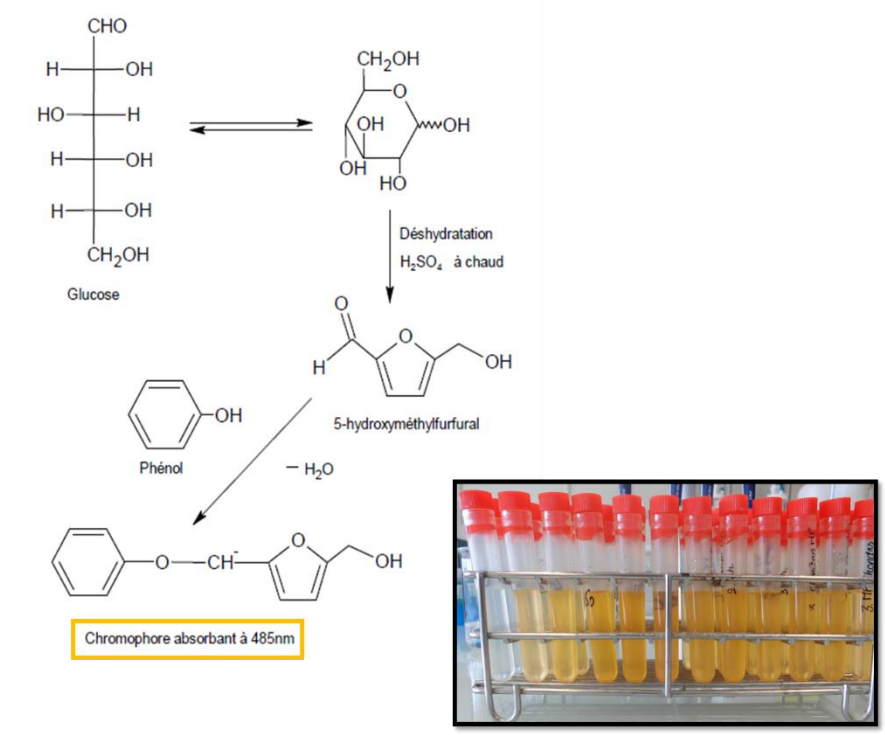


Figure 2. 9 Principe et réaction du dosage des sucres totaux par la méthode de Dubois *et al.* 1956 (Pierre 2010).

Principe : Le principe repose sur une déshydratation des hexoses et des pentoses (sur la **Figure 2.9**, le glucose est pris en exemple en tant qu'hexose), sous l'action d'acides minéraux concentrés et à chaud et sur une cyclisation formant des dérivés du furfural comme le 5-hydroxyméthylfurfural, qui réagit avec le phénol. Ainsi, un complexe jaune se forme s'il y a présence de sucres. La concentration de ce complexe est mesurée par spectrophotomètre (Spectrophotomètre UV-1800, Shimadzu Europe Gmbh, Allemagne).

Standards, réactifs et échantillons :

- Glucose (Sigma-Aldrich G5767) dans de l'eau ultra-pure (Purelab Ultra, ELGA, France) à 1 mg/mL.

- Solution de phénol 75 % (Prolabo 33624.260), Acide sulfurique 96 % (Acros organics, 302070010)

- Échantillon à analyser à 1 mg/mL issu de l'extraction acide, dont le facteur de dilution est à déterminer afin que les DO mesurées fassent partie de celles situées dans la gamme étalon.

Mode opératoire : 1 mL d'échantillon à analyser (dilué si nécessaire) est inséré dans un tube à hémolyse. 50 µL de phénol à 75% y sont ajoutés. Après avoir agité sous vortex le mélange, 2,5 mL d'acide sulfurique concentré sont ajoutés dans le tube placé sous hotte. Le mélange est refroidi (réaction exothermique) dans un bain de glace, puis mis au bain marie à 30°C pendant dix minutes. La lecture de l'absorbance se fait à 485 nm. Une gamme étalon de glucose est réalisée avant chaque série d'analyse (0, 20, 40, 60, 80 et 100 µg / mL) (**Figure 2. 10**).

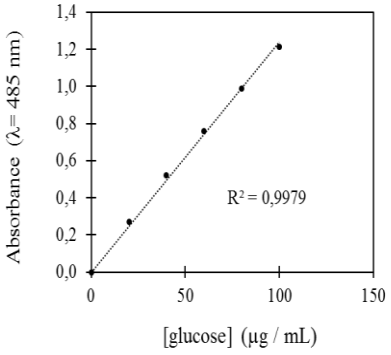


Figure 2. 10 Gamme d'étalonnage du glucose et zone de linéarité d'après la méthode de Dubois *et al* (1956).

La concentration et la teneur en sucres totaux sont calculées par rapport au taux de matière sèche de l'échantillon, selon **l'équation C** qui suit :

Eq. C :

$$\text{Teneur en sucres totaux}_{(\%\ MS)} = \frac{\text{Moyenne de DO x Facteur de dilution}}{\text{a x 10}}$$

Avec :
- La moyenne des DO, calculée au préalable, car les dosages pour un même échantillon sont répétés en triplicata.
- «a » est le coefficient directeur de la droite linéaire de la gamme étalon du standard.

- « 10 » au dénominateur correspond à un facteur de conversion d'unités. En effet, les concentrations de la gamme étalon sont exprimées en µg/mL et ces dernières sont multipliées par 100 pour déterminer la teneur en pourcentage.
-Le facteur de dilution est pris en compte par rapport à une solution d'échantillon à 1 g/L.

2.4.4. Dosage colorimétrique des acides uroniques.

Le dosage des acides uroniques, inspiré de la méthode de Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973) modifiée par Filisetti-Cozzy *et al.* (1991), est détaillé sur la **Figure 2.11.**

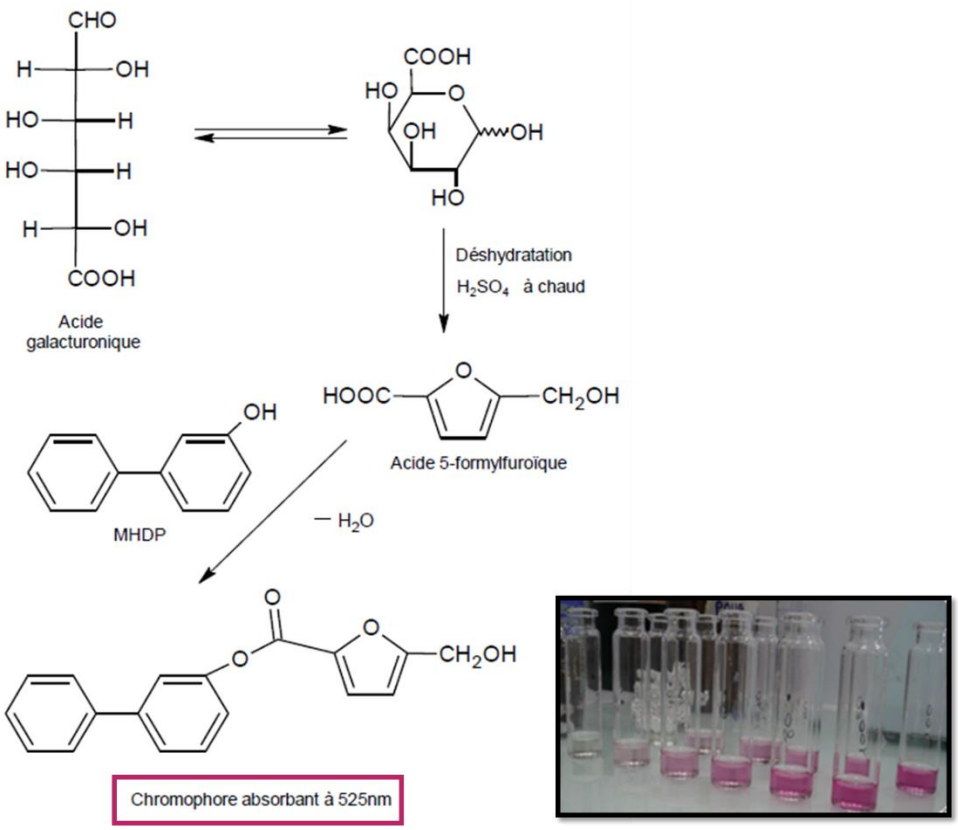


Figure 2. 11 Principe et réaction du dosage des acides uroniques par la méthode de Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973) modifiée par Filisetti-Cozzy *et al.* (1991) (Pierre 2010).

Principe : Sous l'action d'acide fort concentré à chaud, les acides uroniques subissent une déshydratation puis une cyclisation. Des dérivés d'acide 5-formylfuroïque se forment. Ces dérivés au contact du méta-hydroxydiphényle (MHDP) forment un chromophore de couleur rose absorbant à λ=525 nm. De plus, la coloration est plus vive en présence de borate, mais

reste très sensible aux interférences dues aux sucres neutres, qui se colorent en présence d'acide sulfurique concentré. C'est pourquoi, du sulfamate de potassium est ajouté pour limiter ces interférences.

Standards, réactifs et échantillons :

- Acide glucuronique (Sigma-Aldrich G5269) dans de l'eau ultra-pure (Purelab Ultra, ELGA, France) à 1 mg/mL.
- Solution de sulfamate de potassium 98 % à 4 M (Alfa Aesar, B24447), solution de tétraborate de sodium à 75 M (Merk, 524 A12408) dilué dans de l'acide sulfurique 96 %, solution de MHDP à 0,15 % dans de l'hydroxyde de sodium 0,5 % (Fisher Scientific 11983223)
- Échantillon à analyser à 1 mg/mL issu de l'extraction acide, dont le facteur de dilution est à déterminer afin que les DO mesurées fassent partie de celles situées dans la gamme étalon.

Mode opératoire : 1 mL d'échantillon à analyser (dilué si nécessaire) est inséré dans un vial. Y sont ensuite ajoutés 40 µL de sulfamate de potassium 98% à 4 M. Après avoir agité sous vortex le mélange, 2,4 mL d'une solution de tétraborate de sodium à 75 M sont introduits avec précaution. Les vials sont bouchés et incubés à 80°C pendant 20 minutes. Après ce temps, les vials sont déposés dans de la glace. Après avoir débouché les vials, 80 µL d'une solution aqueuse de MHDP à 0,15% sont mélangés. La réaction évolue pendant 10 minutes avant que la densité optique (DO) à 525 nm ne soit déterminée. Les teneurs d'acides uroniques sont calculées en appliquant **l'équation C** *(page 121)* vue précédemment. Une gamme étalon d'acide glucuronique est réalisée avant chaque série d'analyse (0, 20, 40, 60, 80 et 100 µg / mL) (**Figure 2.12**).

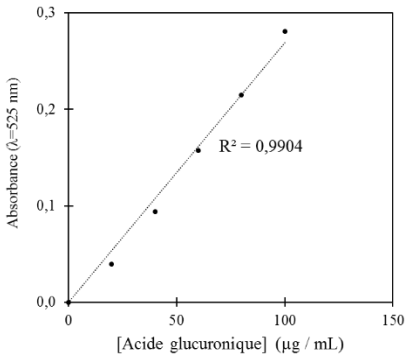


Figure 2. 12 Gamme d'étalonnage de l'acide glucuronique et zone de linéarité d'après la méthode de Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973) modifiée par Filisetti-Cozzy *et al*. (1991).

2.4.5. Dosage colorimétrique des groupements sulfates.

La quantité de sulfates liés aux polysaccharides a été déterminée par l'utilisation de la méthode de dosage colorimétrique développée par Jaques *et al.* (1968). Le principe et les réactions chimiques sont détaillés sur la **Figure 2. 13.**

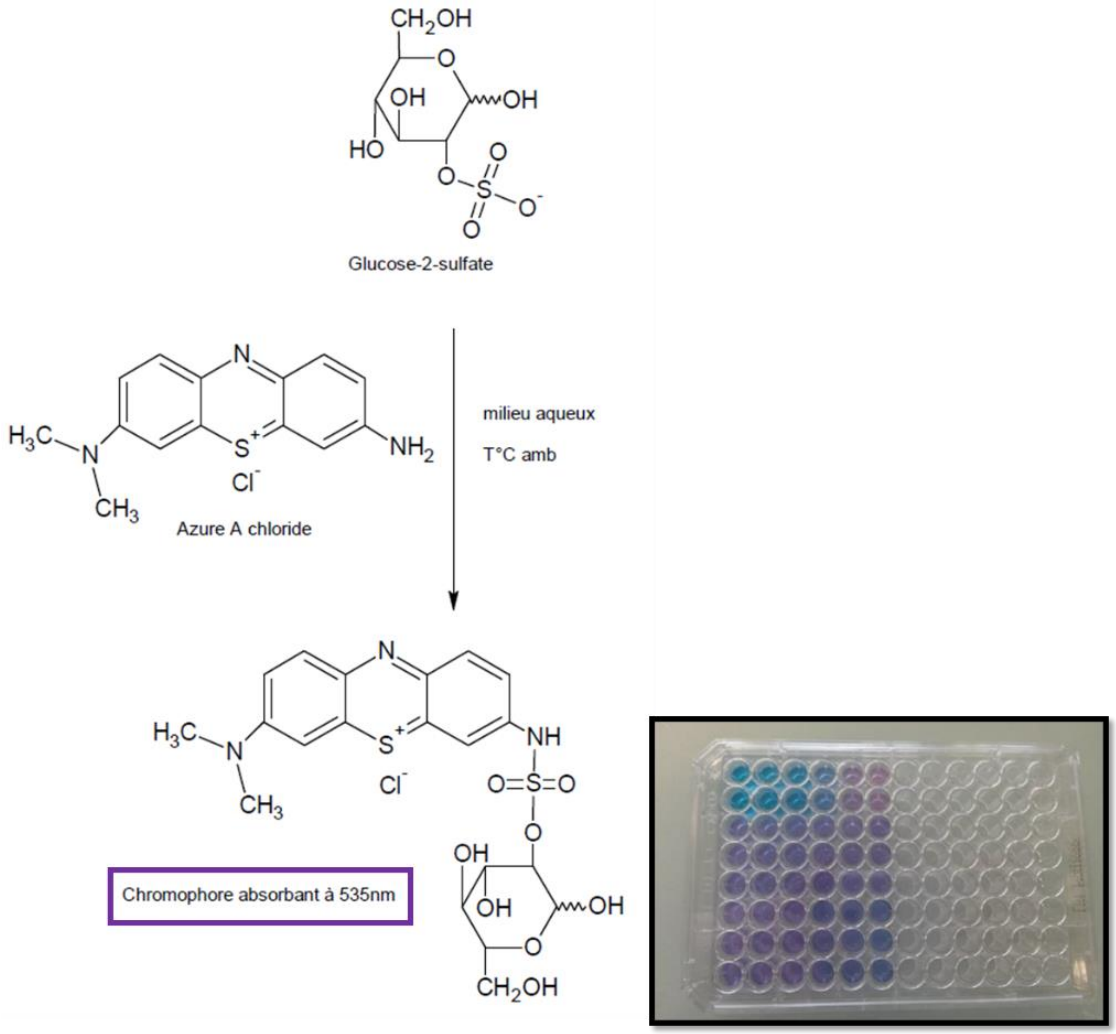


Figure 2. 13 Principe et réaction du dosage des groupements sulfates liés aux polysaccharides par la méthode de Jaques *et al.* (1968) (Pierre 2010).

Principe : La réaction, présentée sur la **Figure 2. 13,** montre que dans un milieu aqueux, le 3-amino-7-(diméthylamino) phénothizin-5-ium chloride (Azure A) va complexer les groupements sulfates. Le complexe chromophore émet une couleur violette mesurable au spectrophotomètre à λ=535nm.

Standards, réactifs et échantillons :

- Dextran sulfaté à 17% (Sigma-Aldrich D6049) dans de l'eau ultra-pure (Purelab Ultra, ELGA, France) à 1 mg/mL.
- Solution d'Azure A (Sigma-Aldrich A6270) à 10 mg/L est préparée dans de l'eau ultrapure.
- Échantillon à analyser à 1 mg/mL issu de l'extraction à l'eau ultrapure, dont le facteur de dilution est à déterminer afin que les DO mesurées fassent partie de celles situées dans la gamme étalon.

Mode opératoire : Dans un puits sur une microplaque 96 puits, 20 µL d'échantillon (dilué si nécessaire) sont mélangés avec 200 µL de solution aqueuse d'Azure A à 10 mg/L. La concentration des groupements sulfates est déterminée à partir de la droite linéaire de la gamme étalon réalisée avec le dextran sulfaté à 17% (0, 10, 20, 30, 40, 50 µg / mL) (**Figure 2.14**)

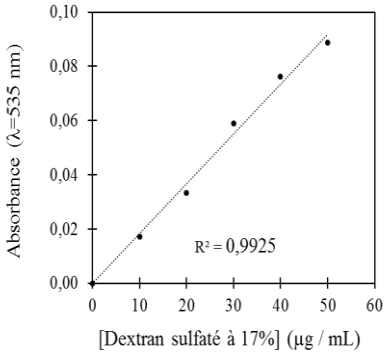


Figure 2. 14 Gamme d'étalonnage du dextran sulfaté et zone de linéarité inspirée de la méthode de Jaques *et al.* (1966).

Les teneurs des groupements sulfates liés aux polysaccharides sont calculées en appliquant l'**équation D** suivante :

Eq. D:

$$\% \text{ Teneur en groupements sulfates} = \frac{\text{Moyenne DO corrigée x Facteur de dilution x } 0{,}17}{a \times 32} \times 96 \times 0{,}1$$

Avec :

- *La moyenne DO est calculée en soustrayant la DO du blanc (0 µg/mL de dextran sulfaté),*
- *« a » est le coefficient directeur de la droite linéaire de la gamme étalon du standard,*
- *Le facteur de dilution est pris en compte par rapport à une solution d'échantillon à 1 g/L,*
- *Le facteur multiplicatif 0,17 sert à obtenir la concentration en soufre dans l'échantillon, sachant que le dextran est sulfaté à 17 %,*
- *32 est la masse molaire en g/mol du soufre,*
- *Dans cette réaction, il est considéré qu'une mole de soufre équivaut à une mole de sulfate. Il faut multiplier par 96 pour passer en concentration massique de sulfate,*
- *Le facteur multiplicatif 0,1 est un facteur de conversion d'unités.*

2.4.6. Dosage colorimétrique du 3,6-anhydrogalactose

La détermination de la composition en 3,6-anhydrogalactose des différentes formes de *S. chordalis* (MP, extrait, polysaccharides) s'est basée sur la méthode de dosage colorimétrique développée par Yaphe et Arsenault (1965).

Principe : À l'heure actuelle, le principe est connu mais la réaction ainsi que la structure finale du chromophore n'ont pas encore été élucidées. Le dosage du 3,6-anhydrogalactose repose sur la réaction de Seliwanoff. En milieu acide et à haute température (80°C), les cétoses (comme le fructose ou le 3,6-anhydrogalactose) se déshydratent plus rapidement que les aldoses (correspondant à la majorité des sucres). L'hydrolyse acide des polysaccharides et des oligosaccharides donne des sucres simples puis des dérivés furfuraliques comme le furfural. Ce dernier réagit ensuite avec le résorcinol pour former un produit condensé chromophore reflétant dans le rouge et absorbant à λmax= 480 nm (Yaphe et Arsenault 1965; Amine *et al.* 2000).

Néanmoins, les aldoses peuvent aussi réagir pour produire une couleur rose pâle. C'est pourquoi de l'acétal est ajouté en tant que réactif pour éviter ces interférences. Il permet de décaler la longueur d'onde d'absorbance par rapport à celle des aldoses. En effet, l'acétal réagirait avec le produit condensé obtenu précédemment pour former un autre chromophore au nombre de conjugaisons plus important. Ainsi, ce dernier, condensé hypothétique de résorcinol, d'acétal et de cétose, absorbe à une λ_{max}= 555 nm.

Standards, réactifs et échantillons :

- D-fructose (Sigma-Aldrich F0127) dans de l'eau ultra-pure (Purelab Ultra, ELGA, France) à 1 mg/mL.
- Solution réactive issue du mélange d'1 mL d'acétal à 330 µg/mL (Sigma-Aldrich W200220) avec 9 mL de résorcinol (Fisher 10000350) à 1,5 mg/mL et avec 100 mL d'acide chlorhydrique à 5 M (Fisher 10605882). La solution réactive est gardée à l'obscurité avant toute utilisation.
- Échantillon à analyser à 1 mg/mL, dont le facteur de dilution est à déterminer afin que les DO mesurées fassent partie de celles situées dans la gamme étalon.

Mode opératoire : Dans des tubes à essai en verre placés dans de la glace, 1 mL d'échantillon à analyser (dilué ou non, après avoir déterminer le facteur de dilution) ou de standard (gamme étalon de fructose allant de 0 à 500 µg/mL) est inséré puis 5 mL de la solution réactive sont ajoutés. Le mélange est ensuite agité puis placé de nouveau dans la glace pendant 15 min à l'obscurité. Les tubes sont transférés dans un incubateur à 20 °C pendant 4 min à l'obscurité puis à 80 °C pendant 15 min, toujours à l'obscurité. Enfin, ils sont déposés pendant 1 min et 30 sec dans la glace à l'obscurité et laissés à température ambiante avant lecture au spectrophotomètre (Spectrophotomètre UV-1800, Shimadzu, Allemagne) de la DO contre un blanc (0 µg/mL) à λ=555 nm. Pour les calculs de la teneur en 3,6-anhydrogalactose, un facteur de multiplication égal à 0,92 doit être pris en compte car d'après Yaphe et Arsenault (1965), les droites étalons du fructose et du 3,6-anhydrogalactose (0, 100, 200, 300, 400, 500 µg / mL) sont identiques à hauteur de 92 % dans les mêmes conditions d'analyse (**Figure 2. 15**).

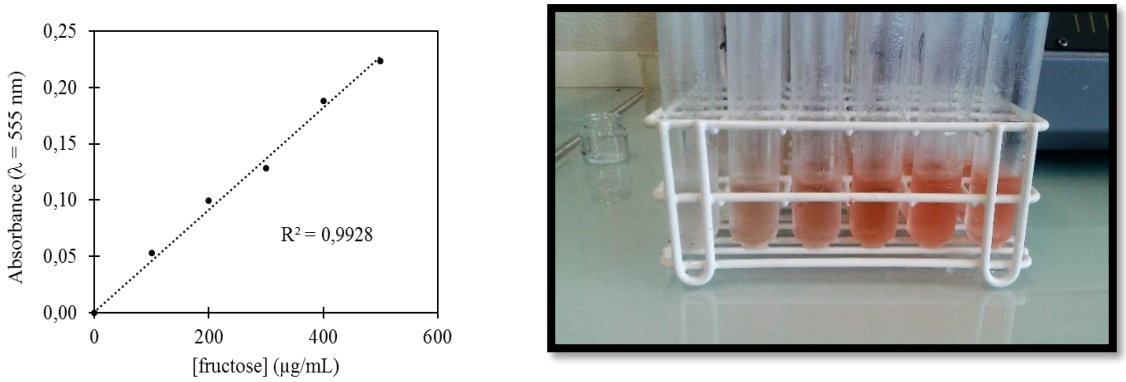


Figure 2. 15 Gamme d'étalonnage du fructose et zone de linéarité d'après la méthode de Yaphe et Arsenault (1965).

2.4.7. Dosage colorimétrique des protéines.

Le principe de ce dosage selon la méthode de Smith *et al.* (1985) est détaillé sur la **Figure 2. 16.**

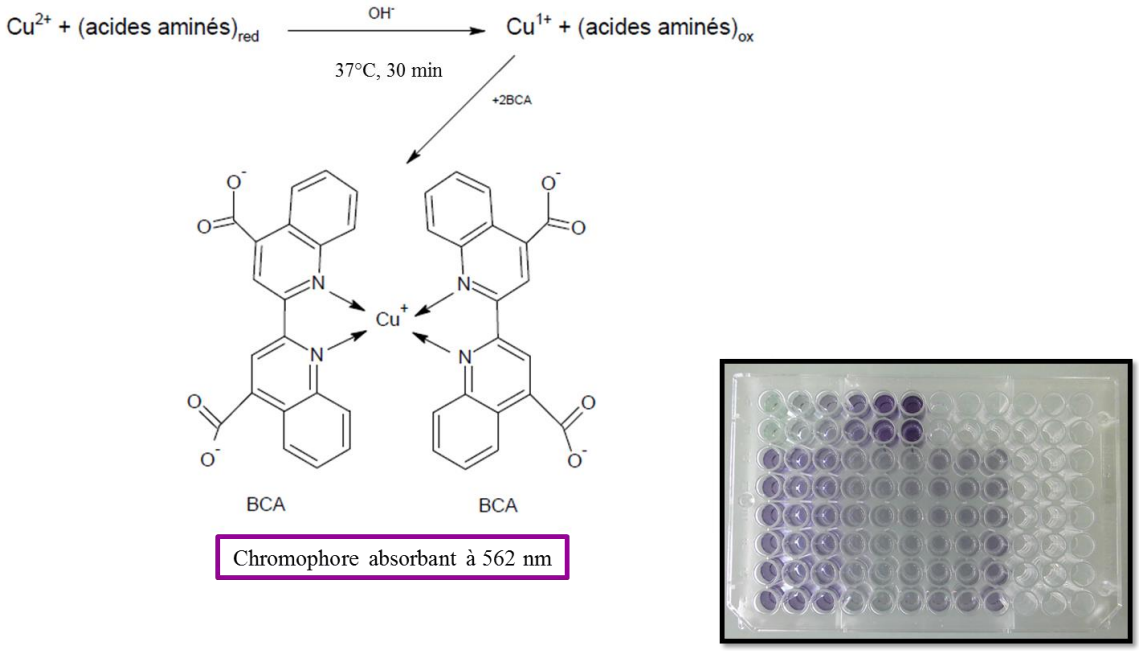


Figure 2. 16 Principe et réaction du dosage des protéines par la méthode de Smith *et al.* (1985) (Pierre 2010).

Principe : Le dosage des protéines totales est basé sur la réaction du Biuret qui se traduit par la réduction des ions Cu^{2+} en Cu^{+} par les protéines en milieu alcalin. Les ions cuivreux vont alors être chélatés par le 4,4'-dicarboxy-2,2'-biquinoline (acide bicinchoninique, BCA) pour former un chromophore absorbant à λ=562 nm.

Standards, réactifs et échantillons :

- Solution de BSA (albumine de sérum bovin), (2 mg/mL, Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, 23227) à diluer dans de l'eau ultra-pure (Purelab Ultra, ELGA, France) à 1 mg/mL.
- Kit « Pierce BCA Protein Assay », (Thermo Scientific, 23227)
- Échantillon à analyser à 1 mg/mL, dont le facteur de dilution est à déterminer afin que les DO mesurées fassent partie de celles situées dans la gamme étalon.

Mode opératoire : Sur une microplaque de 96 puits à fond plat sont ajoutés 25 µL d'échantillon (dilué si nécessaire) et 200 µL de réactif du kit (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, 23227). La microplaque est incubée à 37°C pendant 30 minutes avant de lire les DO à 562 nm au lecteur spectrophotomètre de microplaques. Les teneurs en protéines sont calculées en appliquant **l'équation C** vue précédemment *(page 121).* Une gamme étalon de BSA est réalisée avant chaque série d'analyse (0, 50, 100, 150, 200, 250 µg / mL) (**Figure 2. 17**).

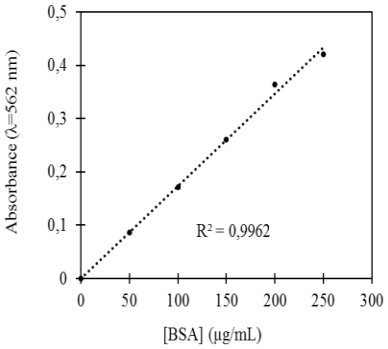


Figure 2. 17 Gamme d'étalonnage du BSA et zone de linéarité d'après la méthode de Smith *et al.* (1985).

2.4.8. Détermination du taux de matière minérale de la matière sèche.

100 mg de matière sèche d'un échantillon sont déposés dans un creuset qui est mis par la suite à 100 °C pendant 40 min. Au bec Bunsen, le creuset et son contenu sont passés à la flamme afin de calciner l'échantillon. La teneur des cendres est déterminée après incinération des 100 mg d'échantillon suivi d'un passage pendant 2 h dans un four à moufle à 685°C (Carbolites Furnaces CSF, UK) (**Figure 2. 18 A**). Les creusets sont ensuite placés dans un dessiccateur (**Figure 2. 18 B**). La différence des masses initiales et finales correspond à la masse de la matière minérale de l'échantillon.

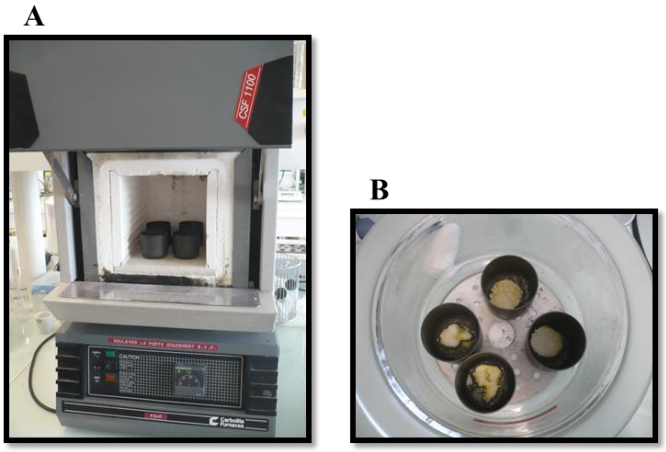


Figure 2. 18 Incinération de la matière organique des échantillons dans un four à moufle à 685 °C (**A**) et obtention de la matière minérale (**B**).

2.5. Analyses chromatographiques et spectroscopiques

2.5.1. Profil des monosaccharides par HPAEC-PAD.

La chromatographie liquide à haute performance échangeuse d'anions, couplée à un système de détection ampérométrique pulsée (en anglais High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection, HPAEC-PAD) est une technique qualitative et quantitative très performante pour l'analyse directe des monosaccharides.

Principe : L'HPAEC repose sur la propriété des sucres, qui deviennent faiblement acides en milieu très alcalin (pH>12). Ce type de chromatographie permet une séparation sélective des

monosaccharides sur une phase stationnaire échangeuse d'anions, stable à pH élevé. La colonne CarboPac PA1 (Dionex, Thermo Scientific) est adéquate pour ce genre d'analyse. Elle constitue la phase stationnaire et est composée d'un substrat de polystyrène / divinylbenzene de 10 µm de diamètre sur lequel sont agglomérées des microbilles de latex de 350 nm ayant des fonctions amines quaternaires, qui se fixent aux groupements SO_3^- de la surface du substrat, comme le montre la **Figure 2. 19**.

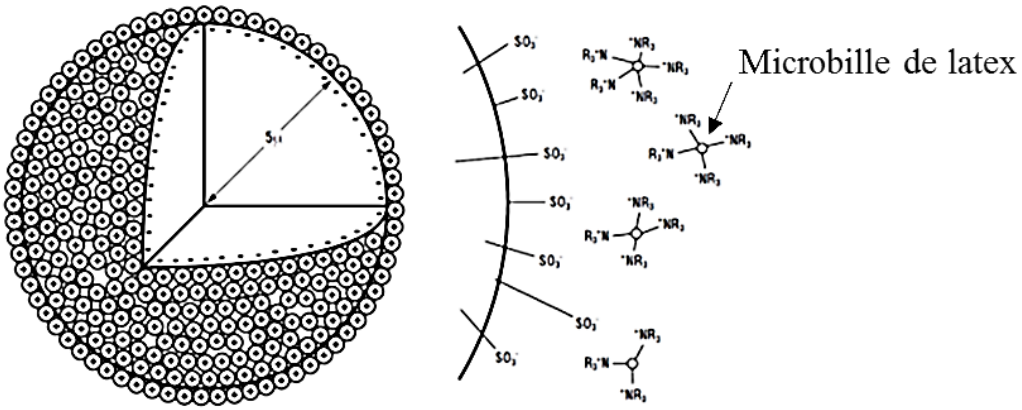
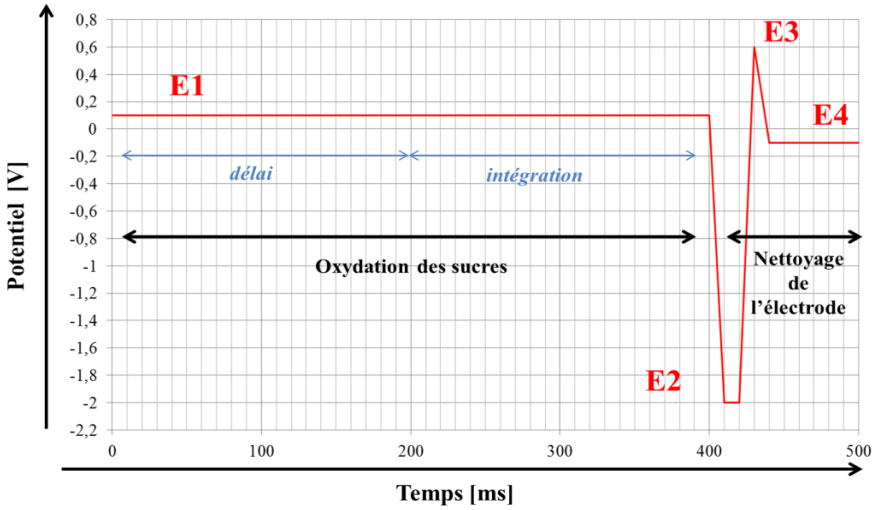


Figure 2.19 Colonne CarboPac PA1. Les fonctions amines quaternaires des microbilles de latex se fixent aux groupements SO_3^- du substrat de la colonne (Dionex, 2013).

La colonne sépare les sucres en fonction de leur pKa. Ce dernier dépend des groupements hydroxyles des sucres, de leur nombre et de leur position. Les microbilles d'amines quaternaires, qui sont chargées positivement, vont attirer les groupements -OH des sucres. En introduisant l'éluant, ici du NaOH, il va y avoir un échange d'anions entre la soude et les groupements hydroxyles des sucres. Ainsi, les monosaccharides, au pKa les plus faibles, interagissant le plus fortement avec la phase stationnaire seront élués en dernier.

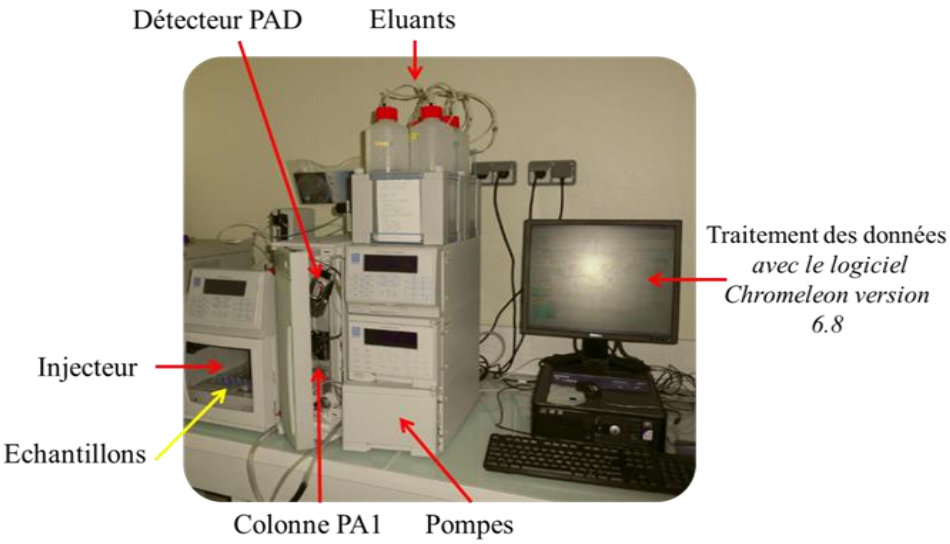
La détection par ampérométrie pulsée (PAD : Pulsed Amperometric Detection) permet de quantifier les monosaccharides après leur passage dans la colonne. Les glucides sont détectés en mesurant le courant électrique généré par l'oxydation de leurs groupements hydroxyles, à 0,10 Volt, à la surface d'une électrode en or. Ensuite, pour nettoyer l'électrode en or et pour continuer l'analyse des autres sucres, un cycle de variation de potentiels voltaïques est appliqué de la manière présentée sur la **Figure 2. 20.**



Le potentiel E1 est appliqué pendant 400 ms. Durant ce temps, l'intensité du courant lié à l'oxydation des sucres (intégration) est mesurée. Le potentiel E2, à -2,00V, permet de nettoyer l'électrode en or en décomposant les produits d'oxydation des sucres. Une fois l'électrode propre, le potentiel E3 monte à 0,60 V pour la « réactiver ». Enfin, immédiatement après, un potentiel E4 est appliqué pendant 60 ms pour réduire la surface d'or natif de l'électrode et pour permettre une meilleure oxydation des sucres. Cette vague de potentiel est répétée durant toute la durée de la chromatographie.

Figure 2. 20 Fonctionnement du détecteur PAD.

L'HPAEC-PAD est composé de plusieurs modules illustrés sur la **Figure 2. 21**.

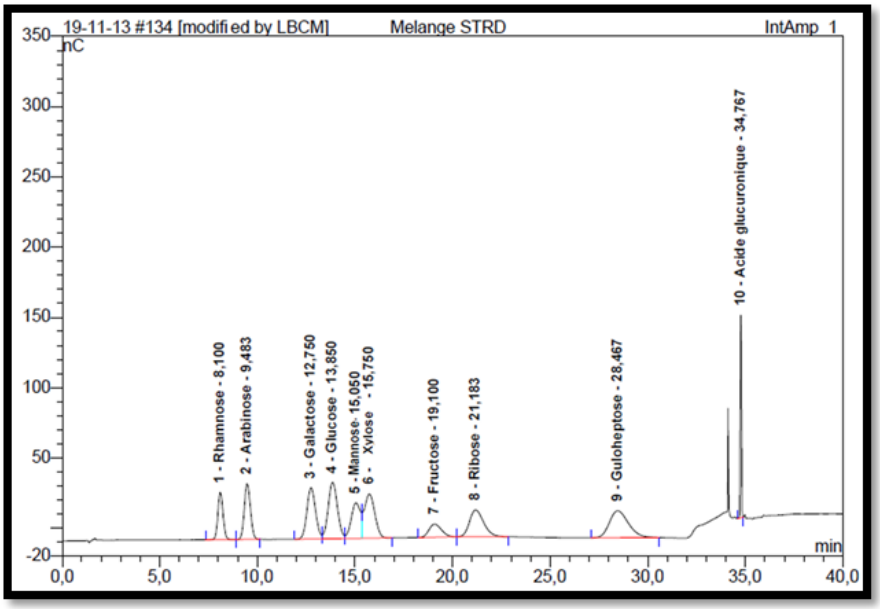


Les échantillons sont dans un passeur où ils sont injectés indépendamment les uns des autres. Ils sont injectés dans l'éluant qui, au préalable, est propulsé dans le système par des pompes. L'ensemble entre dans la colonne où les sucres sont séparés. En sortie de colonne, les sucres sont quantifiés par le PAD. Les quantifications des sucres présents dans les échantillons se calculent par des intégrations et à l'aide de standards (ribose, glucose, galactose, arabinose, rhamnose, xylose, guloheptose (étalon interne), acide glucuronique et mannose)

Figure 2. 21 Système HPAEC-PAD.

Standards : Les monosaccharides ont été identifiés et quantifiés en utilisant des droites de calibrations des standards composés de rhamnose (R3875, Sigma-Aldrich)., d'arabinose (A3256, Sigma-Aldrich)., de galactose (G0750, Sigma-Aldrich)., de glucose (G5767, Sigma-Aldrich)., de mannose (63580, Sigma-Aldrich)., de xylose (X1075, Sigma-Aldrich)., de fructose (F0127, Sigma-Aldrich)., de ribose (R7500, Sigma-Aldrich)., de guloheptose (Sigma-Aldrich) et d'acide glucuronique (G5269, Sigma-Aldrich). Des droites de calibrations ont été réalisées sur une gamme de concentration allant de 0, 25, 50, 100, 150, 200 et 250 µM. Les solutions de standards ont été préparées dans de l'eau ultrapure et filtrées à 0,20 µm. La **Figure 2. 22** montre un exemple de chromatogramme des standards utilisés à une concentration donnée (50 µM), ainsi que les coefficients de corrélation des tendances linéaires pour chaque monosaccharide standard.

A



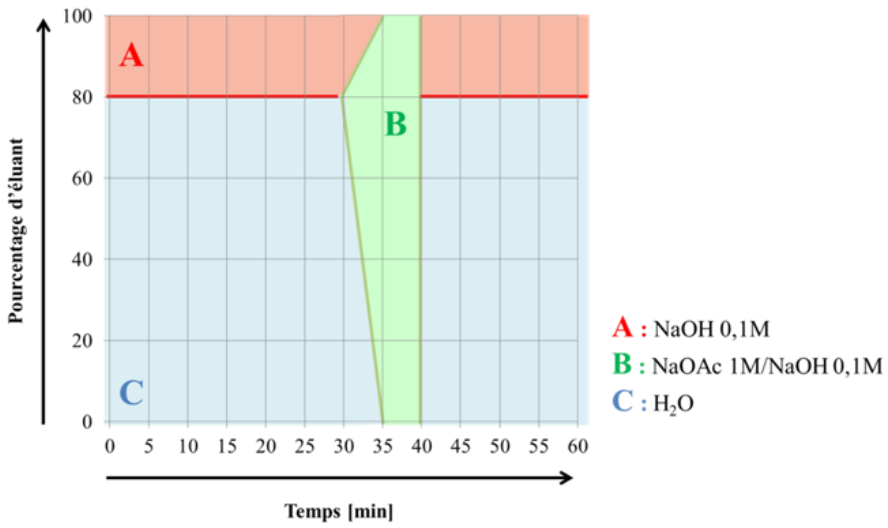
B

Nom du pic	Type de calibration	Nombre de points	Coefficient de corrélation	Coefficient de pente
Rhamnose	Linéaire	6	99,72	0,05
Arabinose	Linéaire	7	99,00	0,18
Galactose	Linéaire	7	99,69	0,22
Glucose	Linéaire	11	99,13	0,25
Mannose	Linéaire	6	99,95	0,14
Xylose	Linéaire	8	99,05	0,25
Fructose	Linéaire	6	99,97	0,18
Ribose	Linéaire	6	99,25	0,18
Guloheptose	Linéaire	7	99,35	0,36
Acide glucuronique	Linéaire	7	99,72	0,16

Figure 2. 22 Chromatogramme présentant les temps de rétention des différents standard (**A**) et tableau récapitulatif de calibration (**B**).

Mode opératoire : Les matières sèches des échantillons subissent une hydrolyse acide complète. Pour cela, 110 µL d'acide chlorhydrique à 1M (Carlo Erba, 7647-01-0) sont plongés dans 1 mL d'eau ultrapure contenant 4 mg d'échantillon. Ce mélange est réalisé dans des fioles en verre scellées ensuite à la flamme. La fiole est posée dans un bloc-chauffant, à 100°C pendant 48h. Ensuite, 110 µL de soude 1M sont ajoutés dans chaque échantillon ainsi que 780 µL d'eau ultrapure. Les échantillons à 2 g/L ainsi neutralisés sont filtrés (0,20µm) et sont insérés dans des vials spécifiques pour l'analyse par HPAEC-PAD.

La séparation des sucres présents dans les échantillons est réalisée sur la colonne Carbo Pac PA1 à un débit d'1 mL/min et à une pression de 110 bars. 30 µL d'échantillon sont injectés Le programme d'élution nécessite trois éluants : NaOH 0,1M ; NaOAc 1M dans du NaOH 0,1M et de l'eau ultrapure. Le programme d'élution est précisé sur la **Figure 2. 23**



L'élution des monosaccharides s'est faite principalement en mode isocratique. De l'acétate de sodium est ajouté après 30 minutes pour éluer les composés dans la colonne. En effet, les ions acétate, plus électronégatifs, vont s'échanger en se fixant aux microbilles d'amines quaternaires.

Figure 2. 23 Programme d'élution de l'HPAEC-PAD.

Les résultats sont présentés en tant que proportion, en pourcentage, d'un monosaccharide sur la totalité des sucres détectés. Les compositions en monosaccharides des échantillons de la matière première de *S. chordalis,* collectés d'octobre 2013 à mars 2015, ont été analysés.

2.5.2. Profil des acides aminés par GC-FID.

Le profil en acides aminés des matières sèches de *S. chordalis* a été réalisé par des chercheurs de l'IFREMER de Nantes. Ils ont utilisé une chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (Perkin Elmer, France; GC-FID) selon la méthode EZ faast™ (Phenomenex, Torrance, California, USA, Soufi-Kechaou *et al. 2012).*

Principe : Les échantillons à analyser, soit les acides aminés dans cette étude, sont vaporisés à l'entrée d'une colonne dans laquelle se trouve une phase stationnaire qui retiendra les composés plus ou moins longtemps selon leur affinité. Les composés sont transportés par un gaz vecteur. Le détecteur FID utilise une flamme hydrogène / air dans laquelle l'échantillon passe. Une oxydation des molécules organiques est produite ainsi que des particules chargées d'électricité (ions). Les ions sont collectés et produisent un signal électrique qui est ensuite mesuré.

Mode opératoire : Les acides aminés, après leur extraction sur phase solide, sont dérivés et subissent une extraction liquide/liquide. Ensuite, ils sont récupérés et sont analysés par GC-FID. La colonne utilisée est une Zebron ZB-AAA GC (composée d'un film polaire de 50% phenyl et de 50% de diméthyl-polysiloxane, 10m× 0.25mm, Agilent, CA, USA). 2 µL d'échantillon sont introduits dans l'injecteur (250°C) et la séparation s'effectue selon un gradient de température : de 110 à 320 °C (32°C/min). La température du détecteur est de 320°C et la pression d'1,7 bar. Les signaux des acides aminés ont été enregistrés en utilisant le logiciel Galaxie (Varian, CA, USA). Les acides aminés ont été identifiés et quantifiés par leur facteur de réponse relatif à celui du standard interne, la Norvaline, ajouté à 200 µmol/L.

Les résultats sont présentés en tant que proportion, en pourcentage, d'un acide aminé sur la totalité des acides aminés détectés.

2.5.3. Analyse des polysaccharides par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.

La technique est couramment employée pour l'identification de composés purs ou même pour déterminer la composition d'un mélange complexe (Pierre 2010). Dans cette étude la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) est utilisée sur les polysaccharides extraits de la matière première de *S. chordalis* collectée mensuellement. Les spectres obtenus

par le spectromètre infrarouge (IR) sont collectés et une analyse en composantes principales est réalisée avec le logiciel The Unscrambler (Camo, USA).

Principe : La spectrométrie infrarouge est une méthode physique d'analyse chimique qui se base sur le mode de vibration d'une molécule et des liaisons chimiques qui la composent dans l'infrarouge.

Standards : Carraghénanes de type iota, kappa et lambda (Degussa).

Mode opératoire : 1 à 2 mg d'échantillon sec sont mélangés à 200 mg de bromure de potassium KBr (206391000, Acros organics) dans un mortier en agate. Le mélange est homogénéisé à l'aide d'un pilon. Une pastille de ce mélange est produite à l'aide d'une matrice, dans laquelle est déposée le mélange, et d'une presse. Une pression de l'ordre de 7 tonnes est appliquée afin d'obtenir une pastille solide. La pastille est introduite dans le spectromètre infrarouge (**Figure 2. 24**).

Figure 2. 24 Spectromètre infrarouge (à gauche) et collecte des données sur le logiciel OMNIC.

L'acquisition des spectres est réalisée à l'aide du logiciel OMNIC. Ensuite, les spectres sont importés dans le logiciel The Unscrambler qui permet de rassembler les spectres proches en fonction des nombres d'ondes sélectionnées par rapport à des tables IR de phycocolloïdes de Gigartinales connues (Chopin *et al.* 1999).

2.6. Analyses statistiques

Pour les dosages biochimiques, les résultats sont exprimés en moyennes ± écart-type (n = 9). Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R en utilisant le package Agricolae de Mendiburu 2016 *(GNU GPL, depuis 1993).* Des analyses de variances à un facteur ont été réalisées suivis d'un test de Fisher de la plus petite différence (LSD) pour un seuil de significativité fixé à 5 % ($p<0,05$). Ainsi, des échantillons sont significativement différents pour une teneur en un composé particulier si la p-valeur calculée par le test est inférieure à 0,05 ($p<0,05$).

De plus, une matrice de corrélation entre les facteurs abiotiques, le taux de matière sèche et la composition biochimique des algues au cours des saisons a été utilisée pour évaluer les associations entre ces variables. Le test de Pearson est utilisé. Le coefficient de corrélation de Pearson mesure une corrélation linéaire entre deux variables continues. La p-valeur, représentative du niveau de significativité de la corrélation, est également calculée pour un produit de corrélation entre deux variables au seuil de 5 % ($p<0,05$). Les analyses statistiques ont été traitées avec le logiciel R en utilisant les packages « corrplot » (Friendly 2002 ; Wei et Simko, 2016) et « Hmsic » (Schemper 2003 ; Harrell 2016)

3. Résultats et Discussion

L'objectif principal est de collecter un maximum de données concernant *S. chordalis,* sur une période de deux ans, dans son environnement, afin de comprendre son comportement et d'anticiper sa quantité et sa qualité. L'enjeu est alors de proposer une gestion durable et raisonnable de cette ressource naturelle en vue de potentielles exploitations.

Dans un premier temps, la géomorphologie du lieu d'étude est décrite, de même que les facteurs environnementaux. Dans un deuxième temps, la biomasse et la quantité de matière sèche sont étudiées. Des observations de la morphologie des thalles et à travers des coupes microscopiques complètent cette analyse. Dans un troisième temps, les variations annuelles et saisonnières de la composition biochimique de l'algue sont détaillées, en allant jusqu'aux profils en acides aminés et en monosaccharides.

Une conclusion à cette étape fait le point entre la composition biochimique et les facteurs environnementaux caractéristiques des quatre saisons de l'année. Dans un quatrième temps, un focus est fait sur une famille de métabolites d'intérêts des algues rouges, à savoir les polysaccharides. Ainsi, leur quantité et leurs différences selon une approche structurale sont également étudiées en fonction des saisons. Enfin, l'ensemble des résultats obtenus est analysé, ce qui a permis de conclure cette étude par des hypothèses nouvelles sur les aspects éco-physiologiques et biologiques de *S. chordalis.*

La démarche scientifique suivie au cours de cette étude est schématisée sous forme d'organigramme présenté sur la **Figure 2. 25.**

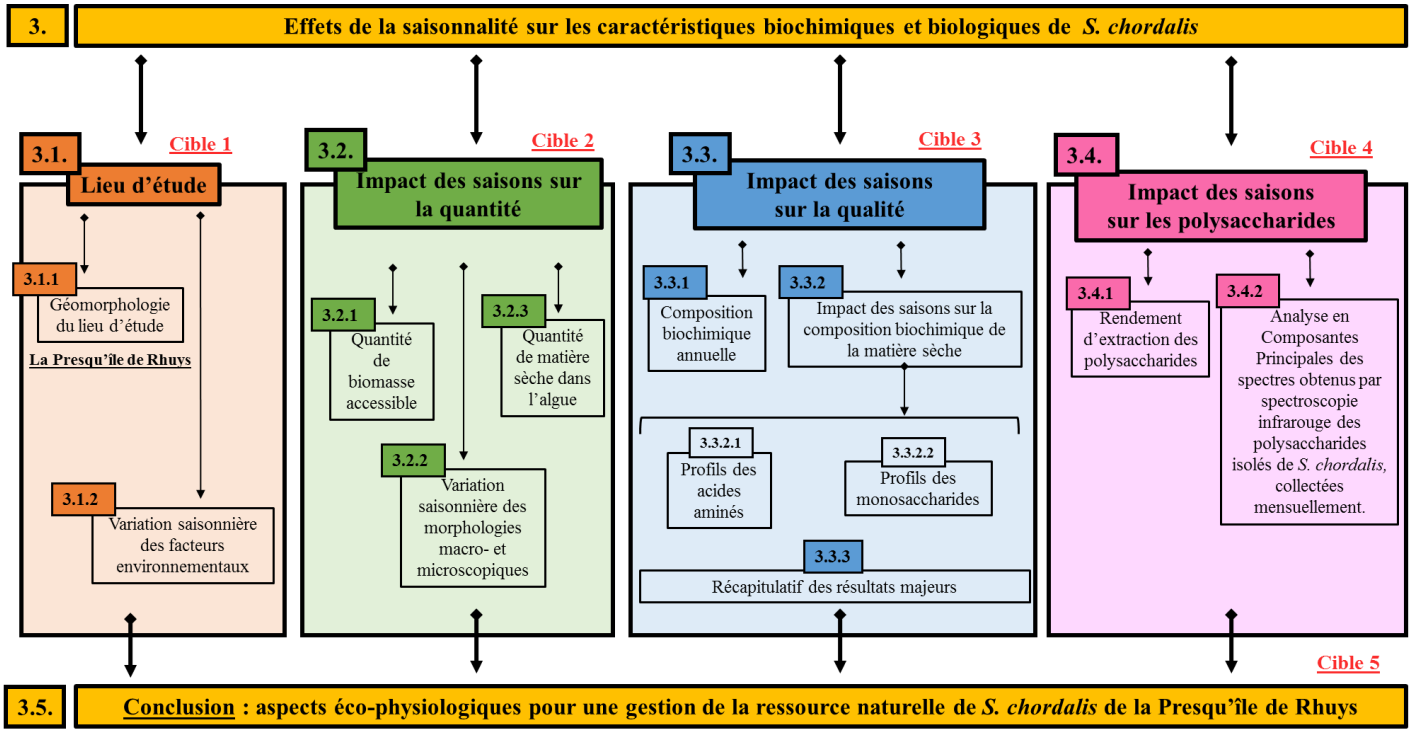


Figure 2. 25 Démarche scientifique suivie pour l'étude des effets de la saisonnalité, d'octobre 2013 à octobre 2015, sur les caractéristiques biochimiques et biologiques de *S. chordalis* de la Presqu'île de Rhuys. Les cibles mentionnées dans la partie introductive de ce chapitre sont rappelées sur cet organigramme.

3.1. Lieu d'étude : géomorphologie et variation saisonnière des facteurs environnementaux.

Avant de mesurer l'impact de la saisonnalité sur la biomasse algale, il est essentiel de connaître la géomorphologie de l'environnement dans lequel les algues étudiées sont collectées. En effet, selon l'endroit où les algues se trouvent, les facteurs abiotiques, biotiques et anthropiques n'auront pas forcément le même effet. Connaître le relief, les processus physico-chimiques et biologiques aide à la compréhension du comportement d'une espèce vivante dans un environnement donné.

3.1.1 La Presqu'île de Rhuys

Les données concernant la topographie et les caractéristiques de la Presqu'île de Rhuys sont issues des recherches menées par le laboratoire des Domaines Océaniques - Géosciences Marines et de Géomorphologie du Littoral (DO-GMGL) de l'Université de Bretagne Sud.

La Presqu'île de Rhuys se situe dans le département du Morbihan, au sud de la Bretagne. Elle est constituée de 5 communes photographiées sur la **Figure 2. 26 A** (Arzon, Saint Gildas de Rhuys, Sarzeau, Saint Armel et le Tour du Parc). La bathymétrie de la Baie de Quiberon et la Baie de Vilaine n'excède pas 20 m et évolue par palier de -10 m à -5 m puis de -5 m à 0 m aux abords des plages. L'essentiel du fond marin est occupé par des sédiments fins et par des sables grossiers. Un platier rocheux affleure tout le long du littoral sud de la presqu'île sur lequel s'accrochent des prairies de *S. chordalis* (**Figure 2. 26 B**) (Dubois 2012, Cochet 2015, Perrin et Pierson 2015).

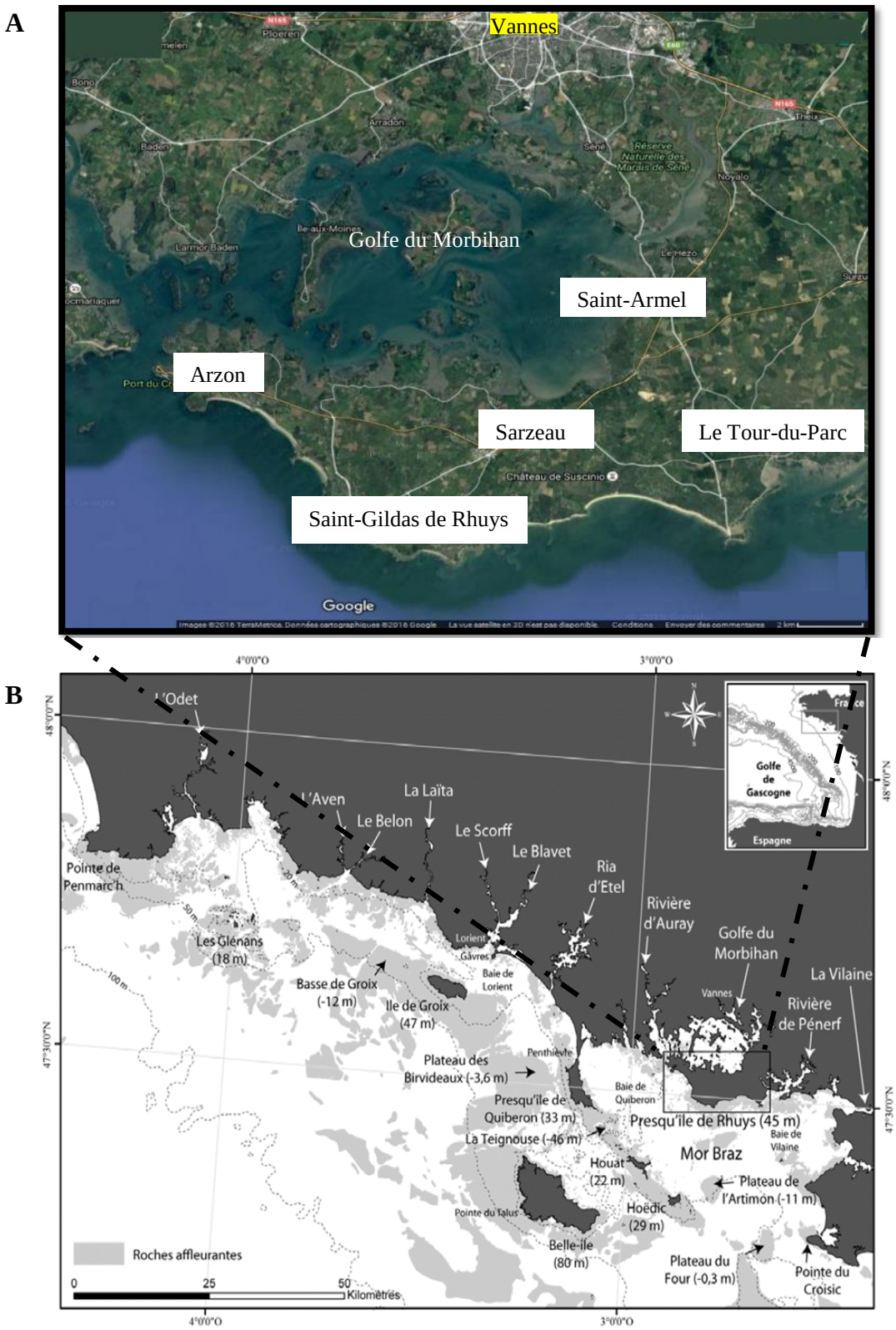


Figure 2. 26 Communes de la Presqu'île de Rhuys (**A**) et cadre général du domaine littoral sud breton (**B**, modifié d'après Menier, 2004) (Dubois 2012, DigitalGlobe, Google Earth 2016).

3.1.1.1. Régime de marée et conditions hydrologiques

Sur le littoral sud breton, le régime de marée est de type semi-diurne avec un marnage de l'ordre de 4 m sur le plateau continental. Cela implique un fort impact des courants de marées et l'aspect découpé de la côte contraint les écoulements tidaux. Ainsi, les plages de la presqu'île sont affectées par les courants de marées notamment par ceux à proximité de l'ouverture du Golfe du Morbihan (Cochet 2015). Le régime de marée de la presqu'île conditionne les conditions hydrologiques caractérisées par une étroite dépendance au contexte géomorphologique. En effet, Belle-Île forme un obstacle à la houle de même que l'alignement de la presqu'île de Houat et Hoëdic. Ces structures morphologiques, schématisées sur la **Figure 2. 27**, atténuent les houles océaniques, majoritairement orientées sud-ouest et nord-ouest (Cochet 2015). Néanmoins, des forts vents de secteur sud peuvent engendrer des houles orientées est-ouest. Ainsi, la baie Mor Braz dans laquelle sont collectés les échantillons de *S. chordalis* est un environnement semi-abrité.

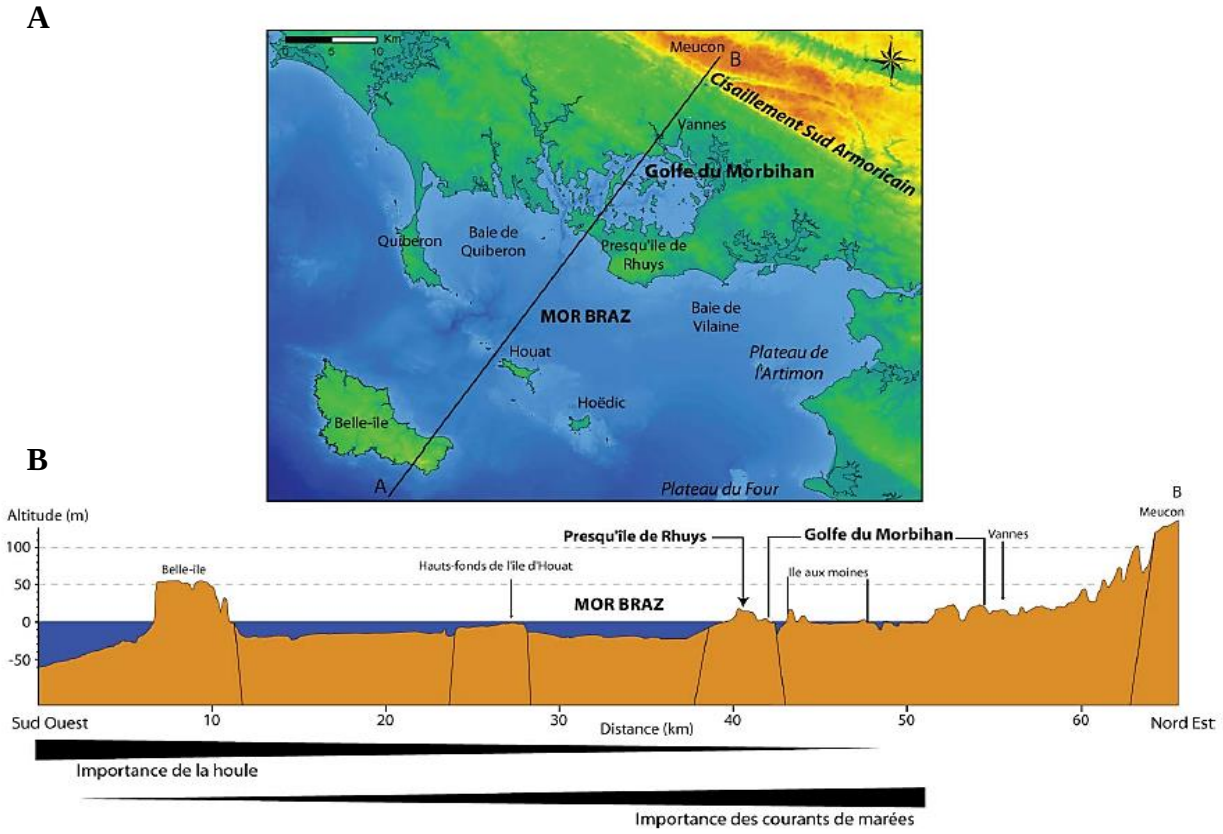


Figure 2. 27 Modèle numérique de terrain (**A**) et coupe schématique du pré-continent breton (**B**). Modifié d'après Menier et Dubois (2010) *(Dubois 2012).*

3.1.1.2. Turbidité

La turbidité est un facteur à prendre en considération dans l'accessibilité de la lumière pour les organismes vivants autotrophes. Elle dépend de la profondeur et des matières organiques et minérales en suspension dans l'eau. De nombreux fleuves et rivières s'écoulent jusqu'au littoral sud breton. Parmi eux, la Vilaine ainsi que la Loire (derrière la pointe du Croisic, **Figure 2. 26 B**) peuvent être cités. Les influx d'eau douce, chargée en matières organiques et minérales suspendues, dans la baie de Mor Braz, augmentent par conséquent la turbidité de l'eau de mer. À cela s'ajoute la structure morphologique d'une baie quasiment fermée (**Figure 2. 27**).

S. chordalis est une algue sciaphile qui peut former des prairies à 7-8 mètres de profondeur. Elle est aussi retrouvée entre 0 et 5 m en dessous de la surface de la mer. Pour se développer, elle a besoin d'être dans un milieu marin turbide, semi-abrité et préférentiellement sur un substrat dur.

La **Figure 2. 28** présente les quatre lieux de collectes de *S. chordalis* utilisée pour différents travaux de recherche. L'intérêt de ces cartes satellites est de montrer une ressemblance entre les géomorphologies. Dans ces trois sites (Presqu'île de Rhuys, Baie de Brest et Osmington en Angleterre), des structures géomorphologiques peuvent faire obstacles à la houle et aux courants. Ainsi, ces sites peuvent constituer des sites semi-abrités, propices au développement de *S. chordalis*. Floc'h *et al.* (1987) écrivent que les caractéristiques hydrologiques de la baie de Brest sont similaires à celles du Golfe du Morbihan, ce qui pourrait expliquer la présence de *S. chordalis* à ces deux endroits.

Saint Gildas de Rhuys,
Morbihan, Bretagne, France

Octobre 2013 *(Burlot* et al. *2016)*
Octobre 2013 *(Kendel* et al. *2015)*
Octobre et novembre 2012 *(Bedoux* et al. *2014)*
Mars 2012 *(Hardouin* et al. *2013)*
Golfe du Morbihan (Floc'h et al. 1987)

Osmington, Dorset, Angleterre

(Rocher et Topliss 1983)

Repère bleu :
Trez Hir,
Finistère, Bretagne, France

Août 2012 *(Bondu* et al. *2014)*
Septembre 2006 *(Bondu* et al. *2009)*
Février 2005 *(Bondu* et al. *2008)*

Repère vert :
Baie de Brest Logonna Daoulas (Roz),
Finistère, Bretagne, France

Septembre 2006 *(Bondu* et al. *2010)*
(Ar Gall et al. *2007)*
Septembre 1994 *(Fournet* et al. *1999)*
Mars et avril 1997, *à côté de Brest (Goulard et al. 1999)*
Mai 1995 *(Fournet* et al. *1997)*
Début printemps *(Brown 1995)*
Mai et juin 1984, *Baie de Brest (Deslandes* et al. *1985)*

Figure 2. 28 Photographies par satellite des quatre lieux de collectes de *S. chordalis*, utilisée pour différents travaux de recherche. Pour chaque étude, le mois et l'année de collecte sont mentionnés quand les données étaient disponibles *(*DigitalGlobe, Google Earth 2016*)*.

3.1.2. Variation saisonnière des facteurs environnementaux de la Presqu'île de Rhuys

Les résultats des variations saisonnières au cours des années 2013, 2014 et 2015 de chaque facteur environnemental étudié sont présentés sur les **Figures 2. 29 et 2. 30**. Ainsi, au niveau de la Presqu'île de Rhuys, la température de l'eau de mer, la matière minérale en suspension, la salinité, la force du vent, les précipitations, la durée d'ensoleillement, le taux d'oxygène, la quantité de chlorophylles dans l'eau de mer et les quantités de nitrate, de phosphate, de silicate et d'ammonium ont été suivis au cours des saisons.

De manière générale, pour chaque facteur environnemental étudié, des profils saisonniers similaires peuvent être constatés d'année en année, bien qu'il y ait des faits marquants propres à chaque année.

3.1.2.1. Résumé des faits marquants de 2013, 2014 et de 2015

2013 a été une année pluvieuse, ce qui a provoqué des dessalures notamment en début et en fin d'année. En effet, les pluies sont à l'origine des débits des deux fleuves, la Loire et la Vilaine, qui impactent les masses d'eau côtière du Morbihan, *(IFREMER, 2013).* Ces apports d'eau douce, en plus de causer des dessalures, enrichissent le milieu marin en nutriments. Ainsi, en 2013, les quantités d'ammonium et de matière minérale en suspension (nitrate, phosphate, silicate) augmentent fortement notamment en décembre (**Figures 2. 29 et 2. 30).**

2014 se caractérise par un hiver extrêmement pluvieux (janvier, février, **Figure 2. 29 E**). Par conséquent, une baisse de la salinité a été observée à cette même période ainsi qu'une augmentation de la quantité de la matière minérale (**Figures 2. 29 B et 2. 30**) et une biomasse d'organismes chlorophylliens élevée, se nourrissant de la matière minérale, d'avril à septembre. Ce bloom planctonique chlorophyllien a été renforcé par un autre épisode pluvieux en août et une durée d'ensoleillement plus longue en septembre (**Figure 2. 29 E**, *IFREMER 2014*).

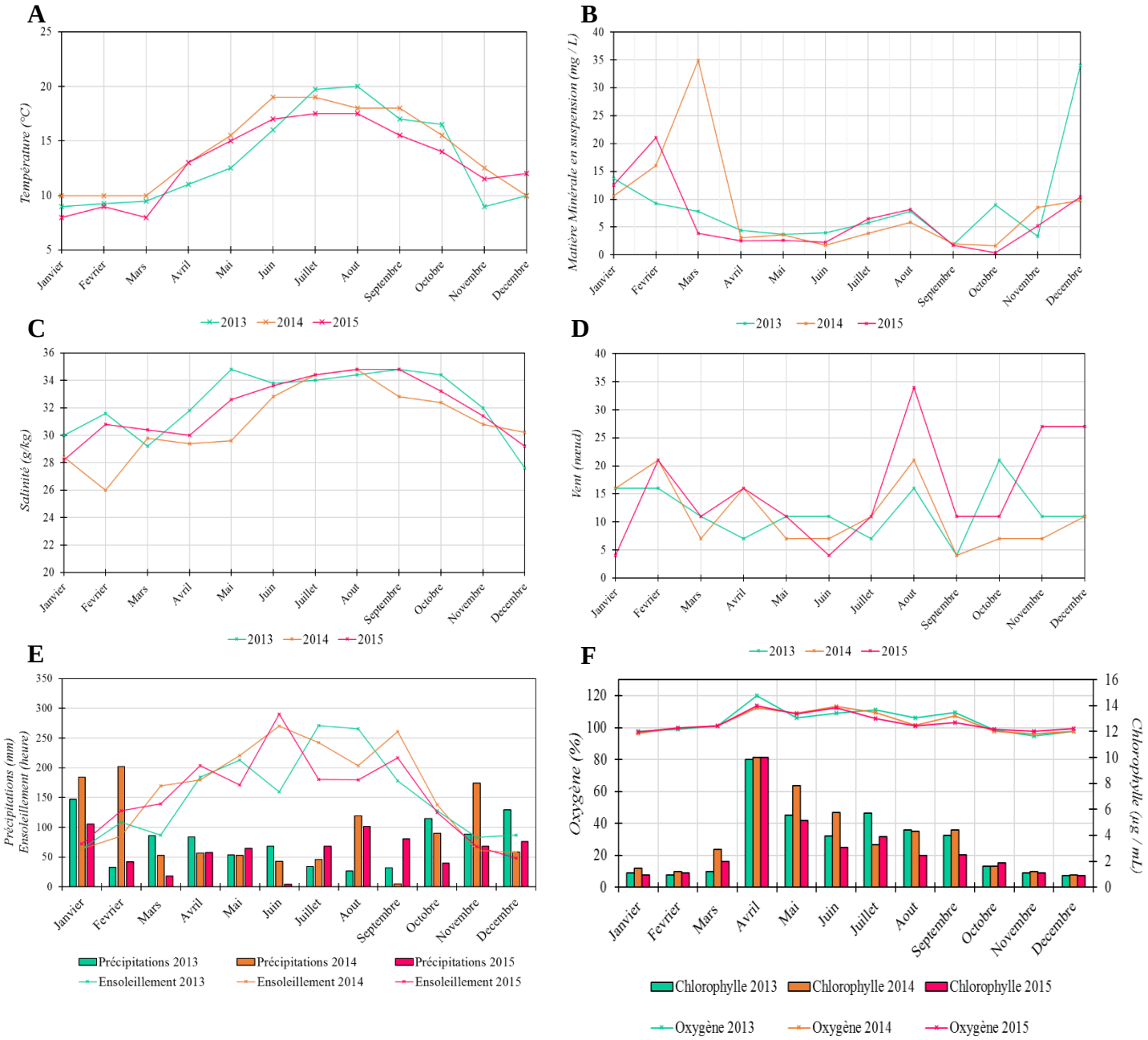


Figure 2. 29 Paramètres extérieurs mesurés sur trois ans, près de la presqu'île de Rhuys. Températures mensuelles de l'eau de mer (**A**), matière minérale en suspension (**B**), salinité de l'eau de mer (**C**), force du vent (**D**), ensoleillement et précipitations (**E**), quantité de chlorophylles et pourcentage d'oxygène dissous dans l'eau de mer (**F**) *(les valeurs sont issues des données de Previmer et de Météo France).*

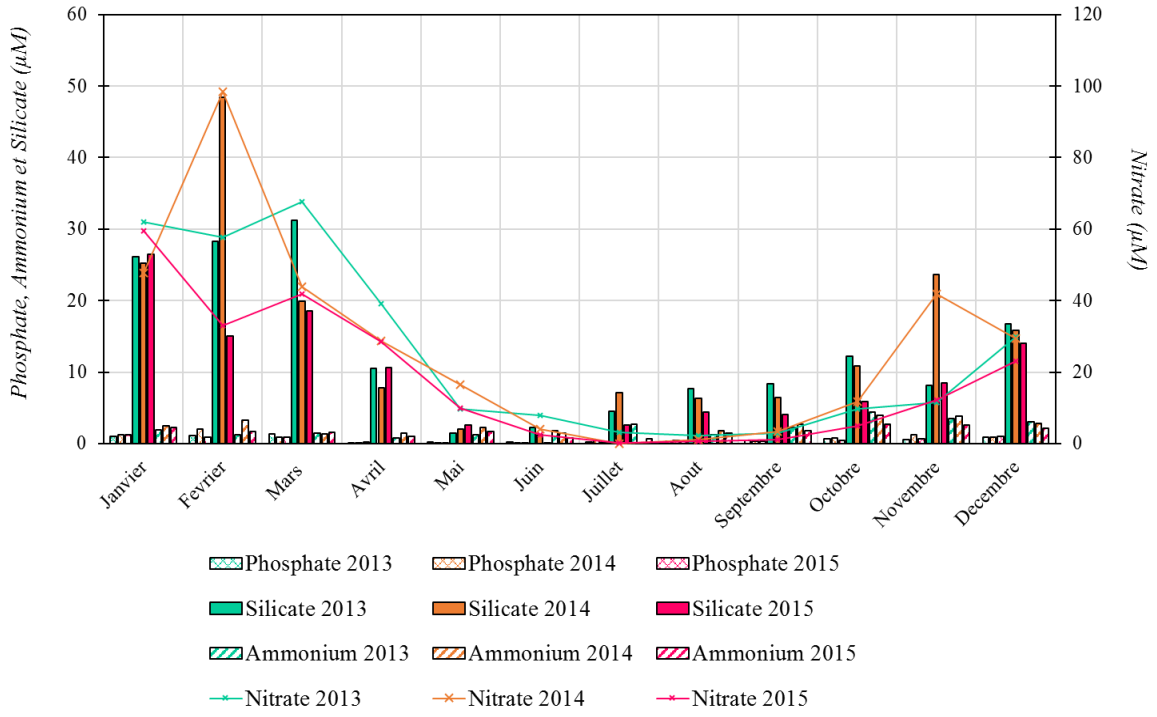


Figure 2. 30 Quantités de nitrate, de phosphate, de silicate et d'ammonium dans l'eau de mer, mesurées près de la presqu'île de Rhuys en 2013,2014 et en 2015 (*issus des données de Previmer).*

L'année 2015 n'a pas montré de faits marquants par rapports aux années précédentes, mise à part une durée d'ensoleillement plus importante que la normale de saison en juin et de forts vents en août (**Figure 2. 29 D et E**).

3.1.2.2. Évolution saisonnière des facteurs environnementaux

En analysant de manière globale les profils au cours des saisons de tous les facteurs étudiés des **Figures 2. 29 et 2. 30**, deux groupes de facteurs environnementaux se distinguent et interagissent entre eux selon une corrélation négative. Premièrement, un groupe qui rassemble la durée d'ensoleillement, la température de l'eau de mer, la salinité et dans une moindre mesure la quantité de chlorophylles présents dans l'eau de mer et le taux d'oxygène. Deuxièmement, un autre groupe de facteurs environnementaux rassemble les précipitations et

la force du vent, corrélées positivement avec la quantité de matière minérale en suspension dans l'eau de mer, comme le nitrate, le phosphate et les silicates.

Ensoleillement, température, salinité, quantité de chlorophylle et taux d'oxygène.

La température de l'eau de mer (**Figure 2. 29 A**), la salinité (**Figure 2. 29 C**) et la durée d'ensoleillement (**Figure 2. 29 E**) ont des profils saisonniers similaires, de même que la quantité de chlorophylles et le taux d'oxygène dans l'eau de mer.

La moyenne de la température de 2013 à 2015 est de 13,6 ± 3,7 °C. La température maximale a été enregistrée en août 2013 (20 °C) et la température minimale en janvier et en mars 2015 (8 °C). Étant dans un climat tempéré, les températures des trois années ont été moyennées en fonction des quatre saisons. Ainsi, la température de l'eau de mer est en moyenne de janvier à mars (hiver) de 9,2 ± 0,9 °C ; d'avril à juin (printemps) de 14,7 ± 1,4 °C, de juillet à septembre (été) de 18,0 ± 1,2 °C et d'octobre à décembre (automne) de 12,3 ± 1,4 °C.

La moyenne de la salinité de 2013 à 2015 varie peu et est de 31,8 ± 2,2 g/kg. La salinité maximale a été enregistrée à 34,8 g/kg en mai 2013, en août 2014 et 2015 et en septembre 2013 et 2015. La salinité minimale de 26 g/ kg a été mesurée en février 2014 (**Figure 2. 29 C**). La salinité de l'eau de mer est en moyenne, en hiver de 29,4 ± 1,5 g/kg ; au printemps de 32,0 ± 1,5 g/ kg ; en été de 34,4 ± 0,5 g/kg et en automne de 31,2 ± 1,0 g/kg.

Quant à la durée de l'ensoleillement, elle est en moyenne sur les trois années de 155,7 ± 67,9 heures avec une durée maximale en juin 2015 de 290,4 heures et une durée minimale en décembre 2015 de 48,4 heures. La durée d'ensoleillement est en moyenne, en hiver de 113,1±33,1 heures; au printemps de 221,8 ±26,7 heures ; en été de 192,4 ±8,1 heures et en automne de 80,3 ± 36,3 heures.

Le taux d'oxygène ne varie pas beaucoup, car il s'équilibre à la surface avec l'atmosphère et entre les espèces qui le produisent (organismes chlorophylliens photosynthétiques) et celles qui le consomment (animaux et bactéries marins) *(*Frontier *et al*. 2004*)*. L'eau de mer à Saint Gildas de Rhuys est très oxygénée. Une moyenne de 103,2 ± 6,3 % a été mesurée. Au printemps, le taux peut s'élever jusqu'à 111,6 ± 3,7 %.

La présence de chlorophylles dans l'eau de mer est synonyme de présence d'organismes photosynthétiques comme les macro- et microalgues et les végétaux marins. La moyenne est de 3,3 ± 2,7 µg /mL entre 2013 et 2015. Cependant au printemps, cette concentration atteint 6,8 ± 2,9 µg/mL et en été 3,9 ± 0,4 µg / mL (**Figure 2. 29 F**).

Ces trois facteurs abiotiques (température, salinité et ensoleillement) sont fortement corrélés positivement entre eux et avec, dans une moindre mesure, le taux d'oxygène et la présence d'organismes chlorophylliens. Plus la durée de l'ensoleillement est longue, plus la température de l'eau de mer s'élève, ce qui favorise l'évaporation et par conséquent l'augmentation de la salinité. Les organismes chlorophylliens, produisant de l'oxygène, se développent grâce à la photosynthèse.

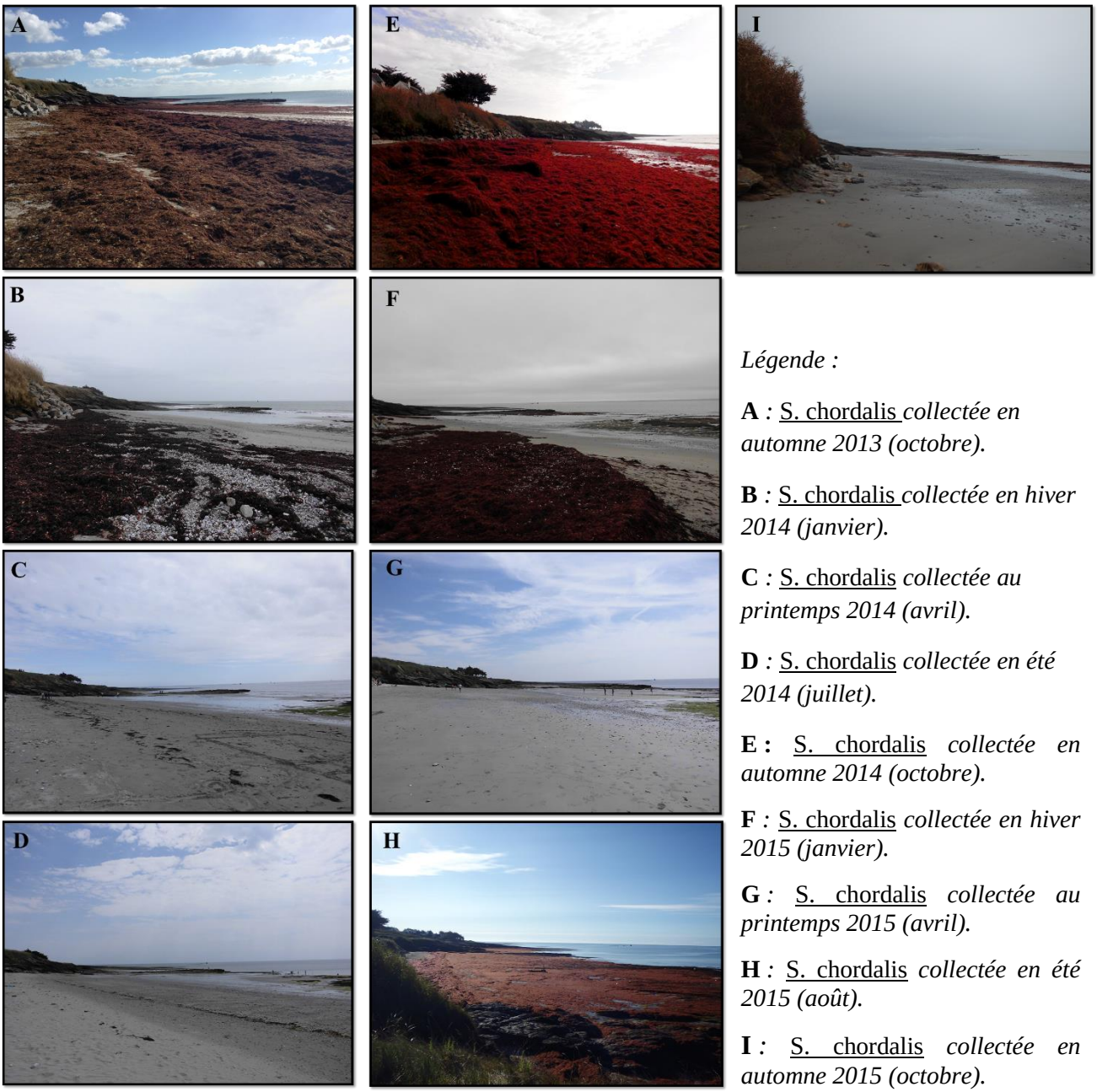
Précipitations, vent et matière minérale en suspension (nitrate, silicate, phosphate).

C'est en automne et en hiver, que les vents les plus forts (entre 13,7 ± 5,0 et 14,8 ± 1,7 nœuds) et les précipitations les plus importantes (entre 93,3 ± 15,1 et 96,8 ± 46,7 mm) ont été enregistrés. Les précipitations augmentent le débit des rivières et des fleuves qui se déversent dans l'océan. Les eaux douces des pluies lessivent les terres et arrivent alors chargées en matière minérale (nitrate, phosphate et silicate). Cela est vérifié par les données des **Figures 2. 29 B et 2. 30.** La **Figure 2. 30** montrant les concentrations en nitrate, en phosphate, en silicate et en ammonium, peut être considérée comme le détail de la **Figure 2. 30 B**. Bien que mesurée indépendamment, la concentration en matière minérale en suspension dans l'eau de mer correspond au cumul des composés précédemment cités. La concentration en matière minérale en suspension atteint 14,4 ± 1,9 mg/mL en hiver alors qu'en moyenne sur les trois années elle est de 7,9 ± 5,8 mg /mL. Comparé à l'étude de Yolanda-Freile et Robledo (2006), qui présente des concentrations en nutriments dans l'eau de mer comprises entre 0,5 et 12,7 µM sur la côte est mexicaine, l'eau de mer de la Presqu'île de Rhuys est beaucoup plus riche en matière nutritive, en particulier en nitrate en hiver (51,1 ± 11,4 µM).

3.2. Impact des saisons sur la quantité.

3.2.1 Évolution de la biomasse d'algues rouges au cours des saisons

Les observations mensuelles sur le terrain ont permis d'estimer qualitativement la quantité de biomasse algale échouée sur une plage de Saint Gildas de Rhuys et d'anticiper leur arrivage notamment en fonction des facteurs environnementaux. Des photographies prises entre octobre 2013 et octobre 2015 de la plage de Kerfago sont présentées sur la **Figure 2. 31.**



Légende :

A *:* S. chordalis *collectée en automne 2013 (octobre).*

B *:* S. chordalis *collectée en hiver 2014 (janvier).*

C *:* S. chordalis *collectée au printemps 2014 (avril).*

D *:* S. chordalis *collectée en été 2014 (juillet).*

E : S. chordalis *collectée en automne 2014 (octobre).*

F *:* S. chordalis *collectée en hiver 2015 (janvier).*

G *:* S. chordalis *collectée au printemps 2015 (avril).*

H *:* S. chordalis *collectée en été 2015 (août).*

I *:* S. chordalis *collectée en automne 2015 (octobre).*

Figure 2. 31 Photographies de la plage de Kerfago à Saint Gildas de Rhuys et de la biomasse d'algues rouges, essentiellement constituée de *S. chordalis*, d'octobre 2013 à octobre 2015.

D'après la **Figure 2. 31** un premier constat peut être fait : les échouages d'algues rouges semblent être un phénomène annuel récurrent avec de possibles décalages dans le temps des arrivées massives. D'importants échouages ont lieu de l'été à l'automne. Sur la **Figure 2. 31 I**, une quantité importante d'algues rouges reste présente au bord de mer. Ces marées d'algues sont essentiellement constituées de *Solieria chordalis*. Néanmoins, cette dernière est mélangée à d'autres espèces d'algues rouges, vertes et brunes, comme le montre la photographie de la **Figure 2. 32.**

Figure 2. 32 Photographie d'un échantillon de la biomasse algale échouée sur la plage de Kerfago à Saint Gildas de Rhuys en octobre 2013.

D'après Mineur *et al*. (2012), ces proliférations d'algues rouges ont été observées, au moins, depuis 2005. En considérant les facteurs environnementaux, les échouages s'expliquent par deux raisons. Premièrement, les pluies et surtout le vent (tempêtes automnales) aident à décrocher les algues de leur substrat. Elles viennent alors, au gré des marées et des courants, s'échouer sur les plages. En effet, l'arrivée précoce des algues en août 2015 est due aux forts vents enregistrés à cette période, qui ont constitués un fait marquant de l'année 2015. Deuxièmement, il faut que l'algue arrive à une certaine phase de son cycle de vie pendant laquelle elle est de taille mature et se détache au gré des forces mécaniques. Elle se décroche par conséquent plus facilement de son substrat. En effet, des vents importants ont aussi eu lieu en hiver, du même ordre de grandeur qu'en fin d'été (aux alentours de 20 nœuds) et pourtant aucune biomasse ne s'est trouvée sur les plages de la presqu'île de Rhuys. Ainsi, il faut que

l'algue ait passé la période estivale (Température > 14°C ; salinité > 32 g/kg ; durée d'ensoleillement > 190h ; taux d'oxygène > 105 % et quantité de chlorophylles > 3,9 µg / mL).

Des proliférations d'espèces de *Solieriaceae* ont été également observées dans le sud-ouest de la Floride, depuis 2009 (*Solieria filiformis*) et dans le sud-est de l'Australie (*Solieria robusta*) notamment en avril 2014 (CEVA 2014). Cependant, peu d'explications sont données pour expliquer ces arrivées massives sur les plages. Seuls les chercheurs américains avancent les fortes concentrations en azote et en phosphore sur une vaste zone marine. De plus, ils décrivent *S. filiformis* comme étant une algue opportuniste pouvant se fixer sur d'autres algues et se développe rapidement en présence d'azote dans le milieu (CEVA 2014).

3.2.2. Variations saisonnières des morphologies macro- et microscopiques.

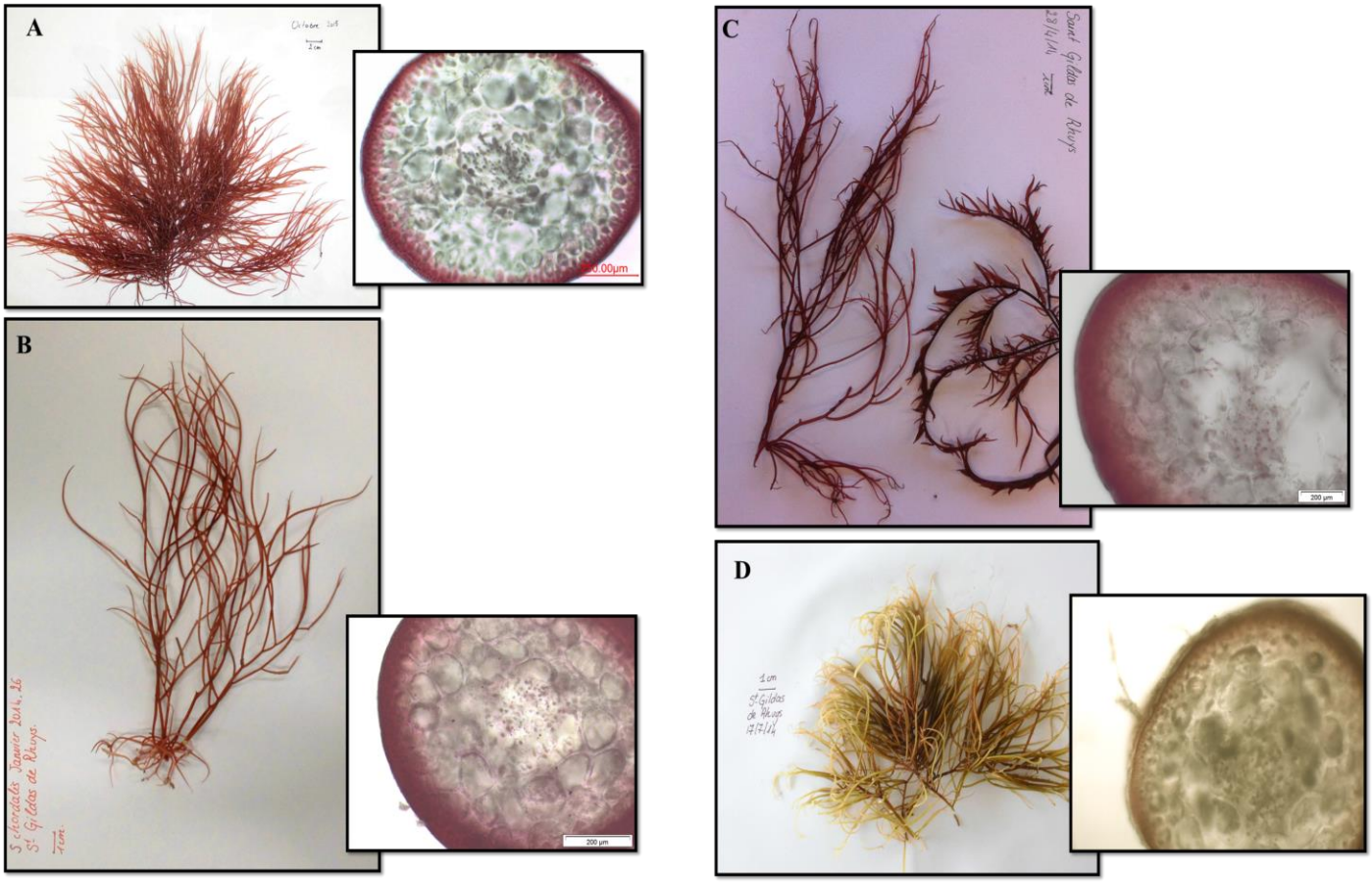
L'aspect général de *Solieria* ressemble à certaines *Gracilariaceae*, une autre famille des Florideophyceae, comme *Gracilariopsis chorda*, entraînant des confusions (Mineur *et al*. 2012). C'est pourquoi, des coupes transversales microscopiques de filaments ont été effectuées pour s'assurer de la collecte d'espèces de *Solieria chordalis* **(Figure 2. 33***)*.

Les photographies de la **Figure 2. 33**, confirment que *S. chordalis* est une espèce pérenne trouvée tout au long de l'année. En fonction des saisons, sa morphologie change. Ces différences de formes du thalle sont retrouvées d'année en année. Trois types de morphologies peuvent être définis.

- En hiver, le thalle peut avoir une taille allant de 5 cm à plus de 10 cm. Il n'a pas beaucoup de filaments et possède peu de ramules (**Figure 2. 33 B et F**). Les coupes transversales microscopiques montrent une épaisse ceinture de cellules corticales pigmentées (> 100 µm) et la présence de granules d'amidon.

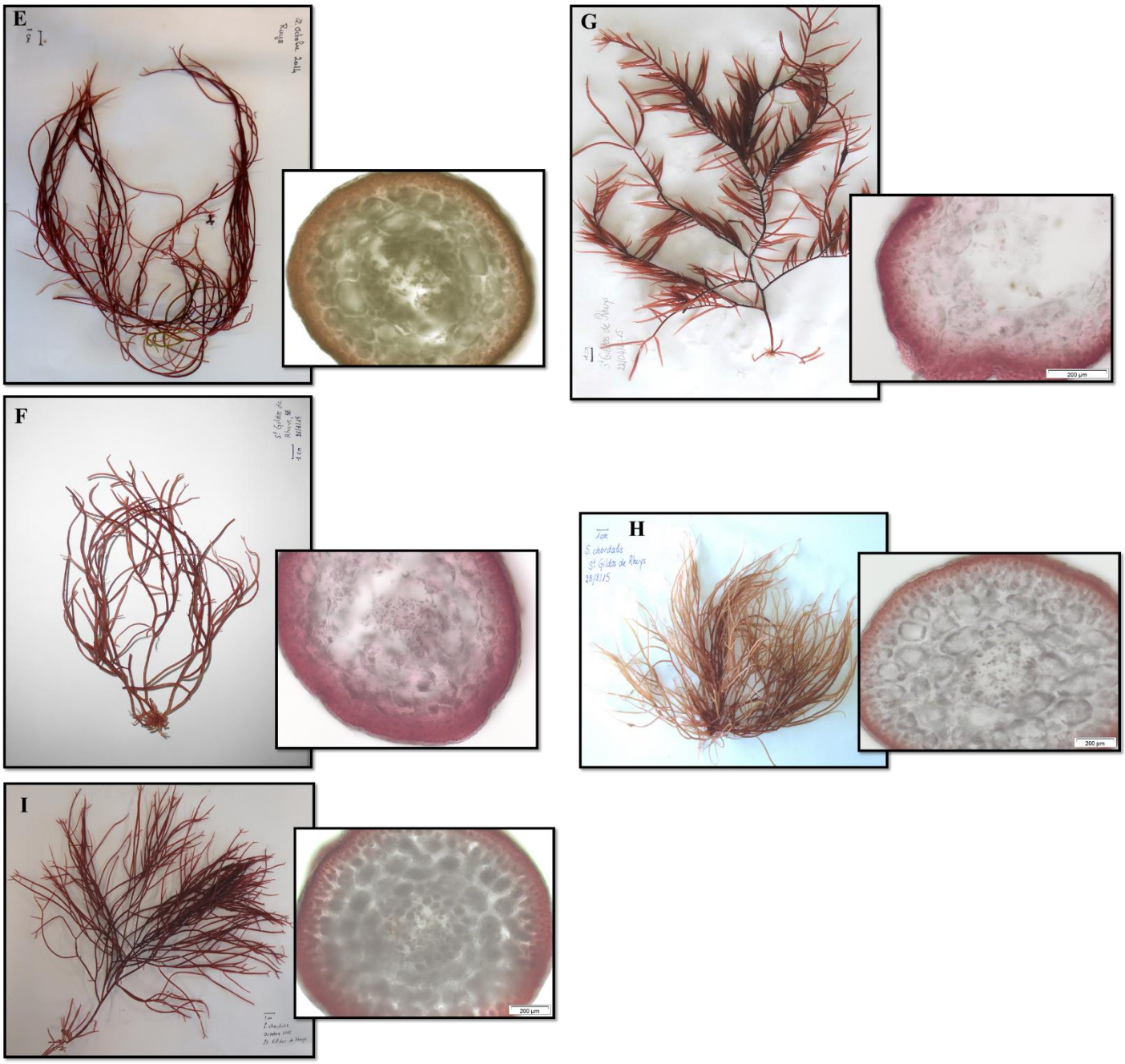
- Au printemps, le thalle montre une taille supérieure à 10 cm et possède de nombreuses ramules rattachées sur les filaments (**Figure 2. 33 C et G**). Comme il est vu sur la **Figure 2. 33 C**, les espèces ne sont pas forcément synchrones, certaines poussent plus vite que d'autres. Les coupes microscopiques montrent de la lumière au niveau du médulla et la coupe du filament présente toujours beaucoup de cellules corticales pigmentées.

- En été, le thalle est petit, entre 5 et 10 cm. Il possède beaucoup de filaments et de ramules, qui se confondent (ramules de 2 à 5 cm) (**Figure 2. 33 D et H**). Les thalles collectés en automne leur ressemblent, mais sont cependant plus grands (> 10 cm). De plus, de nombreuses ramules se détachent petit à petit (**Figure 2. 33 A, E et I**). Les observations microscopiques se ressemblent entre été et automne, bien que durant cette dernière saison, la ceinture de cellules corticales pigmentées est beaucoup plus épaisse (> 100 µm). De plus, toujours en automne, il y a plus de granules d'amidon floridéen résultant de l'activité photosynthétique intense de la saison estivale. En été, la phycoérythrine est détériorée en raison de la chaleur et des radiations solaires. C'est pourquoi le thalle apparaît vert (Hurd *et al.* 2014, Yong *et al* 2014).



Légende :
A *:* S. chordalis *collectée en automne 2013 (octobre).*
B *:* S. chordalis *collectée en hiver 2014 (janvier).*
C *:* S. chordalis *collectée au printemps 2014 (avril).*
D *:* S. chordalis *collectée en été 2014 (juillet).*

Figure 2. 33 Les différentes morphologies macroscopiques et les coupes transversales microscopiques associées de *S. chordalis* au cours des saisons (1/2)



Légende :
E : S. chordalis *collectée en automne 2014 (octobre).*
F *:* S. chordalis *collectée en hiver 2015 (janvier).*
G *:* S. chordalis *collectée au printemps 2015 (avril).*
H *:* S. chordalis *collectée en été 2015 (août).*
I *:* S. chordalis *collectée en automne 2015 (octobre).*

Figure 2. 33 Les différentes morphologies macroscopiques et les coupes transversales microscopiques associées de *S. chordalis* au cours des saisons (2/2).

Durant les collectes mensuelles, il a été remarqué que tous les types de morphologie de *S. chordalis* pouvaient être retrouvés à la même période. Néanmoins, des dominances morphologiques comme celles présentées précédemment ont été notées. Les morphologies de *S. chordalis* au cours des saisons sont similaires à celles décrites sous forme de dessins de *S. chordalis* dans une étude de 1987 (Floc'h *et al.* 1987). De même qu'elles ressemblent à celles de trois clichés photographiques de *S. chordalis* fixée sur son substrat, de la presqu'île de Rhuys pris par le CEVA en mai, en juillet et en septembre 2013 (CEVA 2013).

Les différences de morphologies semblent confirmer l'hypothèse qu'il ait un lien entre la morphologie associée au cycle de vie de l'algue et les échouages. Deux raisons peuvent expliquer cette hypothèse.

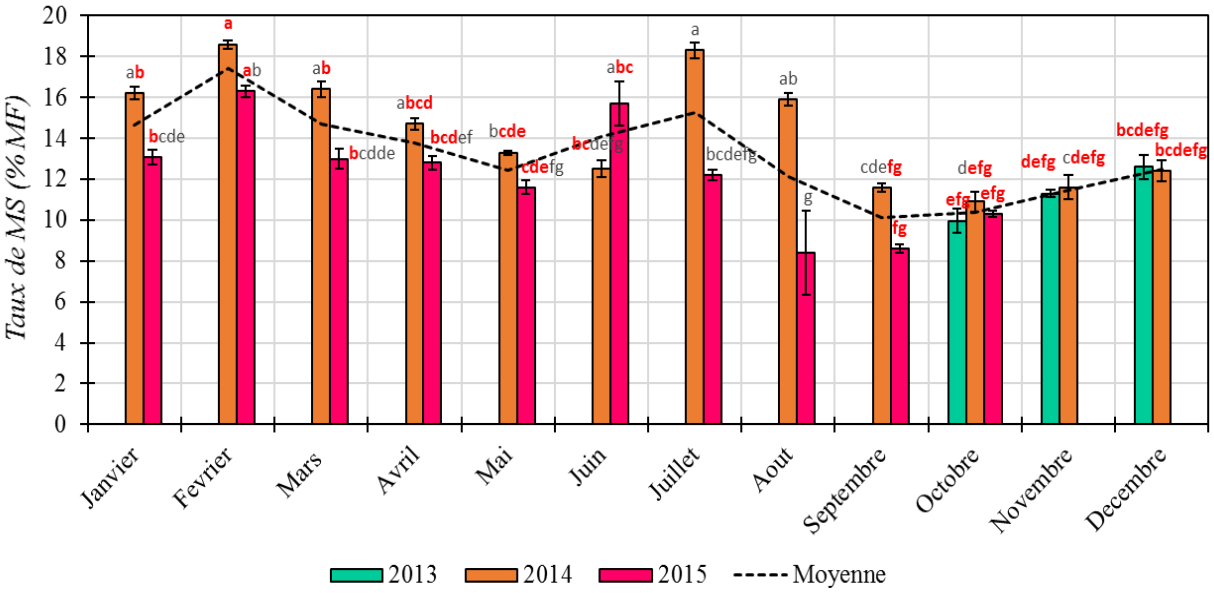
Premièrement, comme l'a aussi écrit le CEVA, *S. chordalis* présente plus de filaments et plus de ramules en été et en automne (CEVA 2013). Les ramules grandissent notamment grâce à l'activité photosynthétique de l'été, prouvée par la dépigmentation des thalles et par l'accumulation des granules d'amidon. L'algue est alors plus lourde et plus imposante en terme de morphologie. *S. chordalis* devient par conséquent plus sujette aux mouvements d'eau et sa base fixée au substrat devient plus fragile.

Deuxièmement, l'augmentation de la biomasse échouée peut s'expliquer aussi par les ramules, qui se détachent. En effet, les thalles de *S. chordalis* sont moins garnis en automne. Les ramules se fixent en général sur un substrat pour permettre le bon développement de l'algue par reproduction végétative (Floc'h et al. 1987, Hayashi *et al.* 2010, Bast 2014). Néanmoins, dans des conditions environnementales non-favorables à une fixation sur substrat, les ramules peuvent quand même se développer (Floc'h *et al.* 1987 ; Bondu *et al.* 2008, Bondu *et al.* 2009), mais les néo-thalles sont alors susceptibles d'être retrouvés dans la biomasse échouée.

3.2.3. Variation saisonnière du taux de matière sèche.

Le taux de Matière Sèche (MS) de l'algue varie au cours des saisons et au cours des années comme le prouve la **Figure 2. 34**. Sur les trois années, il varie de 11,4 ± 1,1 % (automne) à 15,6 ± 1,6 % (hiver) et sa moyenne est de 13,0 ± 1,4 % de la matière fraîche (MF). Une corrélation positive significative a été trouvée entre le taux de matière sèche de l'algue et la

matière minérale en suspension dans l'eau de mer, en particulier avec le nitrate (r = 0,61 ; p<0,05). Ainsi, l'algue synthétise plus de composés dans un milieu riche en matière minérale en suspension dans l'eau de mer comme l'ont montré également Mansilla *et al.* (2007) et Yong *et al.* (2014) chez deux Gigartinales d'un climat tempéré *Gigartina skoosbergii* et *K. alvarezii*. En effet, l'azote est utilisé pour la synthèse des protéines comme les phycobiliprotéines ou encore pour la synthèse des acides nucléiques ou de dérivés azotés comme les mycosporines-like amino-acides (MAA). L'intensité de la coloration des cellules corticales observée sur les coupes microscopiques montrent une accumulation de phycoérythrine plus importante en hiver. De plus, dans des travaux préliminaires réalisés au LBCM, des extraits de *S. chordalis* ont montré des absorbances dans les longueurs d'ondes UVs, indiquant la présence éventuelle de MAA *(communication personnelle).*



Légende

Les barres colorées, représentant les moyennes, avec des lettres différentes sont significativement différentes (n=9, p<0,05) selon le test de Fisher LSD. L'ordre des lettres est corrélé avec le taux en MS.

Figure 2. 34 Variation saisonnière du taux de MS de *S. chordalis* d'octobre 2013 à octobre 2015.

Les teneurs en MS de *S. chordalis*, d'année en année, sont conformes avec celles trouvées dans la littérature. Chez *Solieria tenera*, une étude de la variation interannuelle a montré une teneur en MS comprise entre12 et 15 % de la MF (Prasad 1986).

Au cours des saisons, les profils des taux de MS sont similaires. Trois phases se distinguent :

- de février à mai/juin (fin hiver et au printemps), le taux de MS baisse progressivement, ce qui signifie que l'algue grandit (« fast growth ») (Prasad 1986). Ses cellules s'allongent et se remplissent d'eau. Néanmoins, le taux reste élevé car les ramules se forment (**Figure 2. 33**).

- de juin/juillet à septembre (été), le taux de MS a brutalement augmenté pour diminuer plus rapidement. À cette époque, la photosynthèse est intense. Les granules d'amidon floridéen produits s'accumulent (**Figure 2. 33**). La salinité de l'eau de mer augmente et l'algue synthétise des osmorégulateurs pour contrer la pression osmotique. Quant à la baisse du taux de MS, elle peut s'expliquer par le décrochement des ramules et par la croissance des filaments et des ramules qui se remplissent d'eau.

- d'août à octobre jusqu'à février (fin été à hiver), le taux de MS est relativement faible par rapport au reste de l'année, mais il augmente petit à petit (« slow growth ») (Prasad 1986). Les ramules se sont décrochées pour s'attacher sur un substrat afin de se développer en de nouveaux filaments. Ainsi, cette phase est synonyme de croissance de l'algue qui synthétise de nouveaux composés notamment à partir de l'azote en quantité dans l'eau.

Bien que la reproduction végétative soit dominante chez *S. chordalis* (Floc'h *et al.* 1987), il est difficile de ne pas faire le lien entre les trois phases distinctes de l'évolution du taux de MS au cours d'une année avec le cycle trigénétique caractéristique des algues rouges et qui a été démontré chez certaines *Solieriaceae* (*Cf.* Chapitre I 4.3 Cycle de vie, page 73). Dans cette étude, aucune morphologie macroscopique et aucune coupe microscopique n'ont montré de structures reproductives, mise à part sur une espèce de *Solieria* collectée en juin 2016 à Saint-Malo, dans le Nord de la Bretagne (*Cf.* Chapitre I, **Figure 1. 35**, page 78). L'hypothèse reste à être vérifiée en faisant des coupes microscopiques sur un plus grand nombre d'individus. En effet, il peut être supposé par exemple un stade gamétophyte juvénile peu ramifié (Cabioc'h *et al.* 2006) puis un stade carposporophyte fécondé avec des ramules d'octobre à mai/juin. Durant cette période de l'année, la croissance est lente, car l'algue synthétise de nouveau composés notamment à partir d'azote, et les cellules se divisent en augmentant la quantité d'ADN totale, de protéines, de pigments de l'algue. Une libération des carpospores, déclenchée par un fort apport en azote, s'effectuerait petit à petit de février à mai/juin. Une fois accroché à

un substrat, les ramules et/ou les carpospores se développent rapidement en des tétrasporophytes grâce à l'activité photosynthétique importante à cette saison jusqu'à septembre. Enfin, une libération de tétraspores s'effectuerait lors du dernier mois ensoleillé, en septembre, avant que la température chute (>15°C). Les tétraspores fixées sur un substrat formeraient ainsi de nouveaux gamétophytes.

Pour finir, concernant le taux de MS d'année en année, mois par mois, il n'y a pas de différence significative, mis à part pour les mois d'été et en particulier en juillet et en août **(Figure 2. 34).** L'augmentation du taux de MS en juin 2015 peut s'expliquer par une durée remarquable, plus importante d'ensoleillement (> 290 h) alors qu'en juin 2014, cette durée était plus courte (270,5 h). En juillet et en août 2015, la durée d'ensoleillement n'excédait pas 180 h tandis qu'en 2014, elle était de plus de 200 h. L'activité photosynthétique étant plus intense en 2014, ce qui expliquerait les taux de MS importants par la production notamment en glucides.

3.3. Impact des saisons sur la qualité.

3.3.1. Composition biochimique annuelle.

La composition biochimique de *S. chordalis* est sensiblement la même d'année en année comme le prouve le **Tableau II. VII.**

Tableau II. VII Composition biochimique de *S. chordalis* d'octobre 2013 à octobre 2015.

	MS (%MF)	Sucres totaux (%MS)	Protéines (%MS)	Acides uroniques (%MS)	Groupements sulfates (%MS)	Matière minérale (%MS)
Octobre 2013-Octobre 2014	14,0 ± 2,9	30,7 ± 5,5	18,4 ± 5,2	2,9 ± 0,7	10,0 ± 6,4	28,6 ± 8,9
Octobre 2014-Octobre 2015	12,1 ± 2,3	26,6 ± 5,0	14,8 ± 3,3	3,1 ± 0,6	14,5 ± 5,1	28,8 ± 8,9
Moyenne Octobre 2013-Octobre 2015	13,0 ± 1,4	28,6 ± 2,9	16,6 ± 2,6	3,0 ± 0,1	12,6 ± 2,6	28,7 ± 0,2

Légende
MF : Matière Fraîche
MS : Matière Sèche

S. chordalis est essentiellement composée d'eau, près de 90 %. La matière sèche est riche en matière minérale (28,7 %) et en sucres totaux (28,6 %). En faisant la somme des teneurs en sucres totaux, en acides uroniques et en groupements sulfates, les polysaccharides sulfatés représentent près de 50 % de la matière sèche de l'algue. Les protéines constituent quasiment un cinquième de la matière sèche (14,8 à 18,4 %), ce qui représente un peu moins de la teneur mesurée chez *Solieria robusta* collectée au Pakistan, comprise entre 25 et 32 % de la MS (Khanzada *et al.* 2007).

3.3.2. Impact des saisons sur la composition biochimique de la matière sèche.

Les écarts-types des teneurs moyennes des différentes familles de composés dosés du **Tableau II. VII** montrent qu'il y a une variation mensuelle, en particulier pour la teneur en matière minérale (8,9 % de dispersion de la teneur au cours de l'année), en sucres totaux (entre 5 et 5,5 % de dispersion autour de la moyenne) et en groupements sulfates (entre 5,1 et 6,4 %). Les variations mensuelles de la teneur des différentes familles de composés dosés sont présentées sur la **Figure 2. 35**.

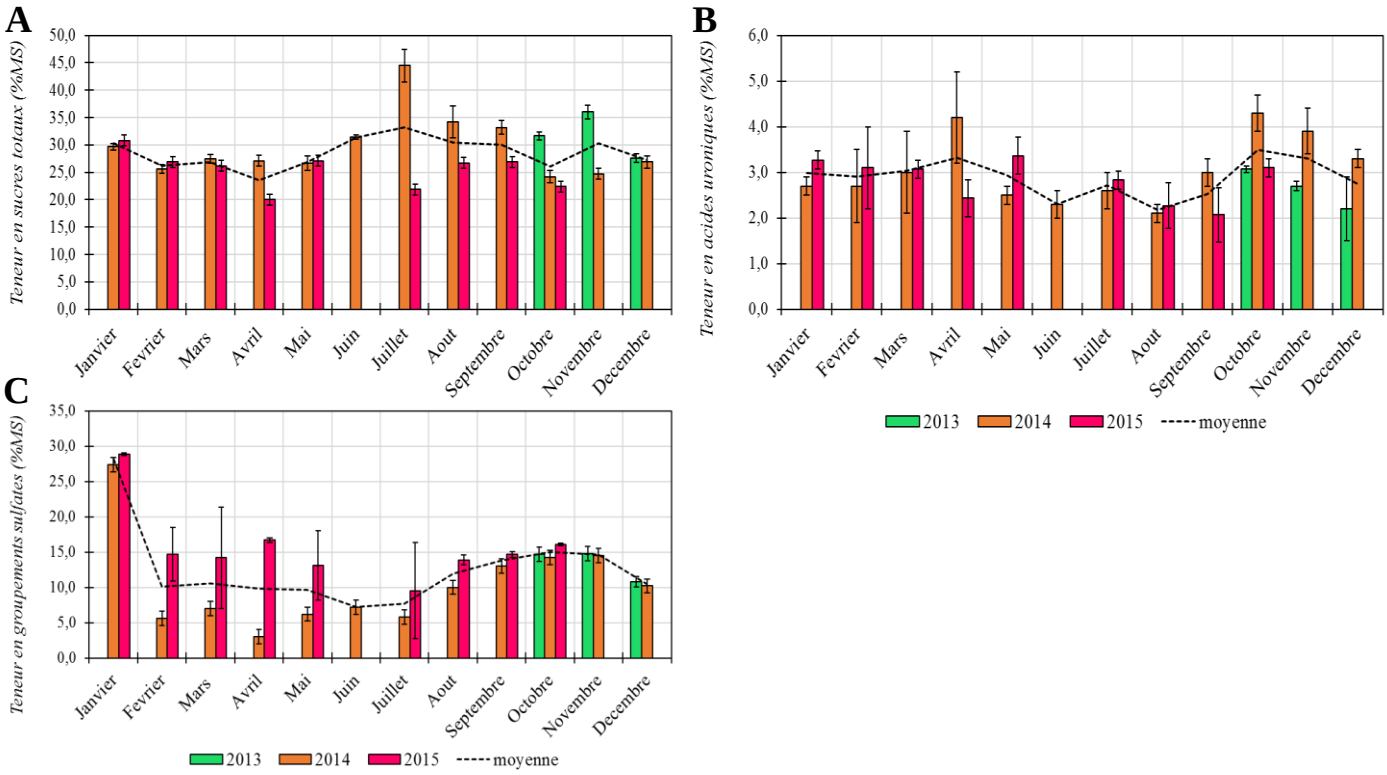


Figure 2. 35 Variation saisonnière de la composition biochimique de *S. chordalis* d'octobre 2013 à octobre 2015 et en particulier de la teneur en sucres totaux (**A**), en acides uroniques (**B**) et en groupements sulfates (**C**) (1/2).

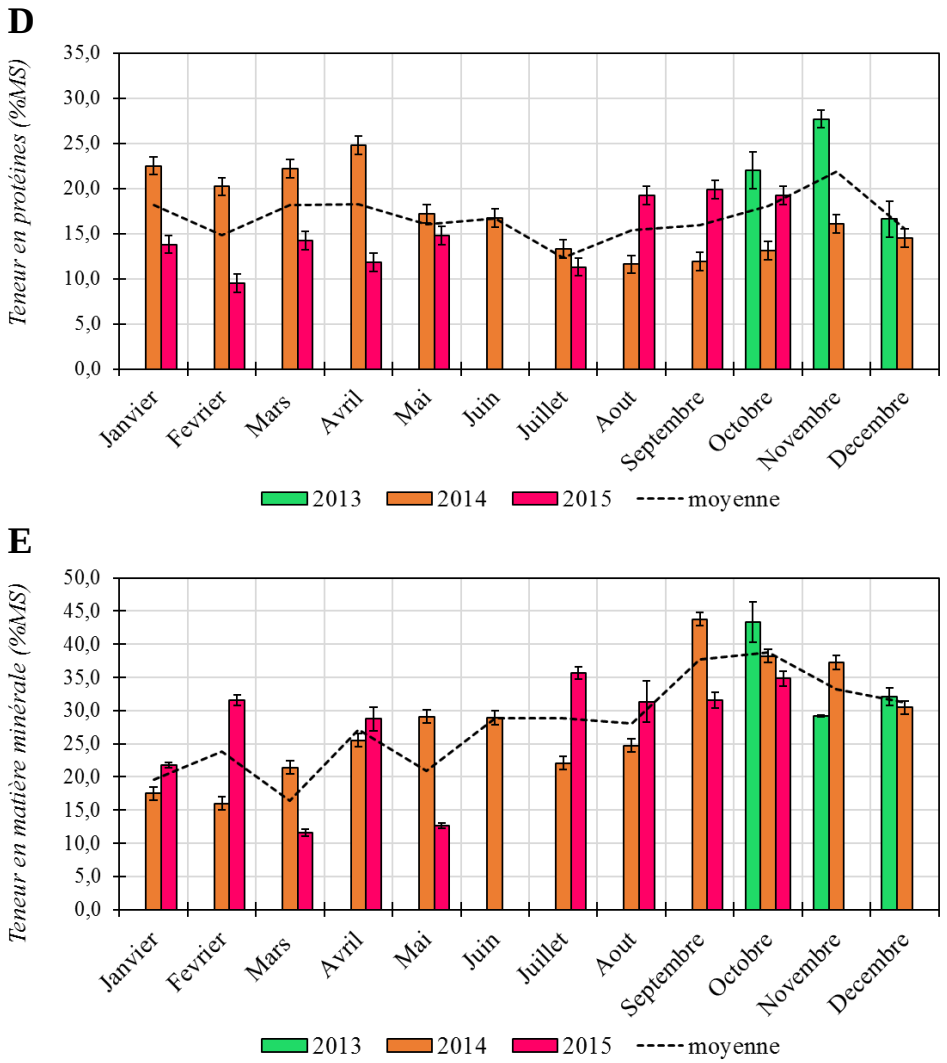


Figure 2. 35 Variation saisonnière de la composition biochimique de *S. chordalis* d'octobre 2013 à octobre 2015 et en particulier de la teneur en protéines (**D**) et en matière minérale (**E**) (2/2).

En moyenne, la teneur en sucres totaux varie de 27,8 ± 2,2 (en hiver) à 31,2 ± 1,7 (en été) (**Figure 2. 35 A**). Des corrélations positives entre la teneur en sucres totaux et la température de l'eau (r= 0,49, p < 0,1) et la salinité (r = 0,47, p < 0,1) ont été observées ainsi qu'avec la durée de l'ensoleillement (r= 0,38).

La teneur en acides uroniques (**Figure 2. 35 B**) est assez faible de manière générale chez les algues rouges comme chez *S. chordalis* (Bourgougnon *et al.* 1993; Hardouin *et al.* 2013). Elle varie peu et est comprise entre 2,5 ± 0,3 en été et 3,2 ± 0,4 % de la MS en automne.

Néanmoins, une corrélation positive significative a été mesurée entre la teneur en acides uroniques et la teneur en ammonium dans l'eau de mer ($r = 0,52$, $p < 0,1$) alors que des corrélations négatives significatives ($p < 0,1$) ont été calculées avec la température ($r = -0,55$), la salinité ($r = -0,52$) et la durée d'ensoleillement ($r= -0,53$).

Quant aux groupements sulfates liés aux polysaccharides, une tendance similaire de la variation saisonnière de leur teneur est perceptible d'année en année (**Figure 2. 35 C**). La teneur des groupements sulfates varie au cours des saisons. Celle-ci augmente notamment en automne et atteint, en moyenne, 13,4 ± 2,5 % de la MS de *S. chordalis* et diminue en été (2,5 ± 0,3 % de la MS). En outre, une forte teneur en sulfates a été mesurée en janvier 2014 et 2015. Elle pourrait être corrélée avec les pluies intenses ($r= 0,55$, $p< 0,1$) et avec un enrichissement en éléments nutritifs dans l'eau de mer (Phosphate $r=0,63$, silicate $r= 0,65$, ammonium $r=0,62$ avec une valeur $p < 0,05$ et nitrate $r=0,57$ avec une valeur $p < 0,1$).

Les polysaccharides représentent une forte proportion de la MS de beaucoup de macroalgues rouges. Chez *Porphyra sp.*, près de 46 % de la MS sont constitués de glucides, de même que chez *Palmaria palmata* (45 à 74 % de la MS) (Morgan *et al.* 1980; Nisizawa *et al.* 1987). Dans cette présente étude, les pourcentages des teneurs en sucres totaux, en acides uroniques et groupements sulfates sont similaires à ceux trouvés dans l'étude sur *S. chordalis* collectée en mars 2012 d'Hardouin *et al. (2013).* Leur somme équivaut aux pourcentages des teneurs en polysaccharides sulfatés cités précédemment (45 % de la MS).

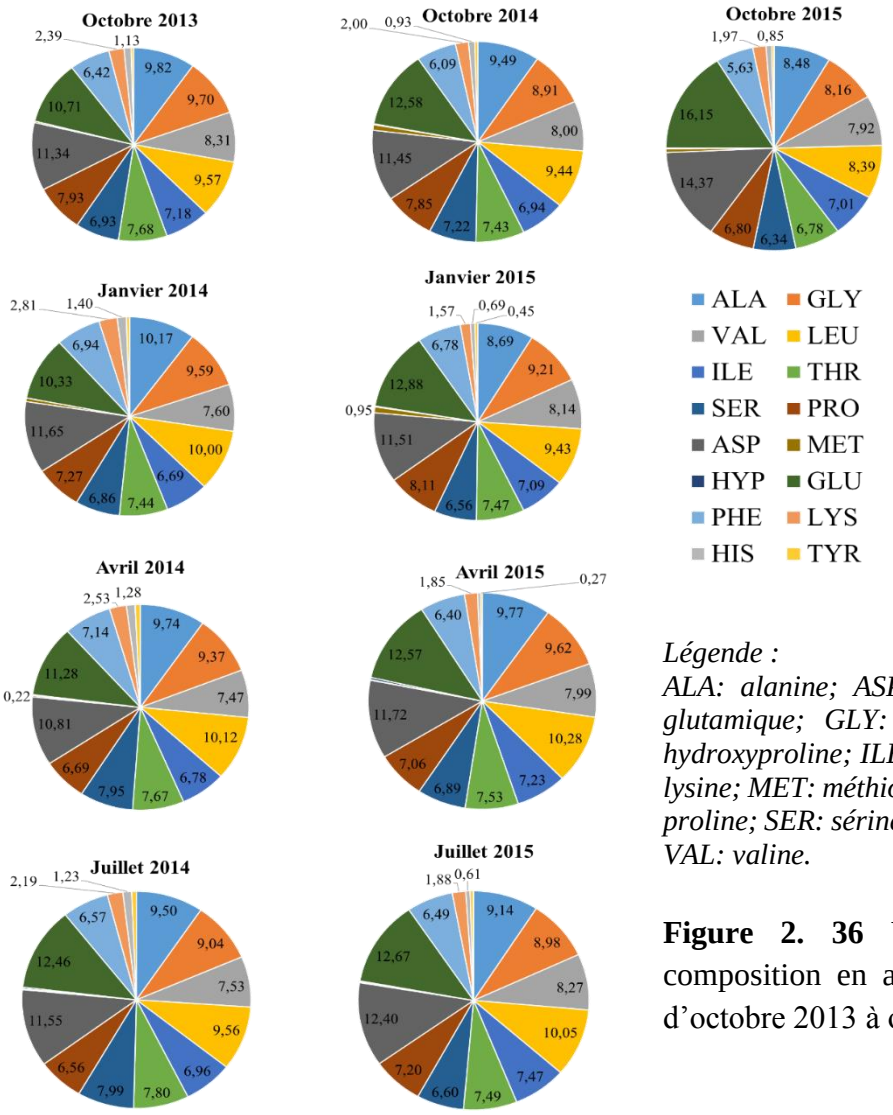
La teneur en protéines varie de 14,5 ± 2,0 % de la MS (en été) à 18,5 ± 3,2 % en automne. Des différences non négligeables sont observables d'année en année (**Tableau II. VII**). Ainsi, une différence annuelle moyenne de 4 % est obtenue. Les échantillons de *S. chordalis* collectés d'octobre 2013 à octobre 2014 sont plus riches en protéines que les échantillons collectés d'octobre 2014 à octobre 2015. Ce résultat est expliqué par les fortes pluies qui ont marqué le début d'année 2014 et qui ont entrainé les nutriments azotés comme le nitrate ($r= 0,30$) et l'ammonium ($r=0,55$, $p < 0,1$). En effet, les protéines sont synthétisées à partir de l'azote que les algues prélèvent dans leur milieu.

La teneur moyenne en matière minérale est égale à environ 30 % de la MS de *S. chordalis*. Les teneurs en matière minérale observées dans cette étude sont du même ordre de grandeur que celles trouvées chez d'autres macroalgues rouges (*Cf.* Chapitre I 4.2.1.4. Minéraux , page 49*)*. Néanmoins, même si cette teneur annuelle ne change pas d'année en

année, elle change en fonction des saisons (**Figure 2. 35 E**). En effet, l'écart-type est de 8,9 % pour les deux années étudiées (**Tableau II. VII**). *S. chordalis* renferme plus de matière minérale en automne (34,4 ± 3,9 % de la MS) qu'en hiver (20,0 ± 3,7 % MS). La forte teneur en matière minérale présente dans les algues est corrélée positivement avec la salinité de l'eau de mer (r=0,49, p < 0,1) et négativement avec la présence de nitrate (r = -0,68, p < 0,05) et de silicate (r = -0,63, p < 0,1).

3.3.2.1. Variation saisonnière de la composition en acides aminés

La chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme a été utilisée pour identifier et détecter 16 Acides Aminés (AA). La cystéine, l'arginine et le tryptophane ne sont pas déterminés par cette méthode. Les résultats sont exprimés comme étant le pourcentage d'un AA sur la totalité des AAs détectés. La **Figure 2. 36** illustre la composition en AA de neuf échantillons de *S. chordalis* collectés chaque saison, d'octobre 2013 à octobre 2015.



Légende :
ALA: alanine; ASP: acide aspartique; GLU:acide glutamique; GLY: glycine; HIS: histidine; HYP: hydroxyproline; ILE: isoleucine; LEU: leucine; LYS: lysine; MET: méthionine; PHE: phénylalanine; PRO: proline; SER: sérine; THR: thréonine; TYR: tyrosine; VAL: valine.

Figure 2. 36 Variation saisonnière de la composition en acides aminés de *S. chordalis* d'octobre 2013 à octobre 2015.

La caractérisation des profils en AA révèle de faibles variations entre les différents échantillons. Les AAs peuvent être divisés en quatre catégories selon leur proportion dans l'échantillon (>10 %, 9 et 10 % ; 2 et 8 % ; moins d'1%). Ainsi, ces résultats donnent de l'information sur la composition des protéines de *S. chordalis*. Deux AAs ont été identifiés comme étant majoritaires. Il s'agit de l'acide glutamique (moyenne annuelle de 12,4 ± 0,8 % de la totalité des AAs) et de l'acide aspartique (11,5 ± 0,4 %). Ensuite viennent des acides aminés essentiels comme la leucine (9,7 ± 0,2), l'alanine (9,5 ± 0,3) et la glycine (9,1 ± 0,2) puis dans une moindre mesure la valine (8,0 ± 0,3), la thréonine (7,5 ± 0,3), l'isoleucine (7,2 ± 0,5), la proline (7,2 ± 0,5), la sérine (7,1 ± 0,3), la phénylalanine (6,3 ± 0,4) et la lysine (2,1 ± 0,2).

Comme il a été vu dans le premier chapitre de ce manuscrit, ces résultats coïncident avec les études antérieures sur le profil en AAs des algues (*Cf.* Chapitre I 4.2.1.1 Protéines, acides aminés, composés azotés page 41). Il peut être noté quelques variations, mais celles-ci sont minimes, comme par exemple entre les proportions en acide glutamique et en acide aspartique. La faible variation des profils en AAs au cours des saisons indique que la qualité des protéines reste stable. En outre, il peut être remarqué que la méthionine, bien que sa proportion soit faible (0-1 %) varie au cours des saisons. Sa proportion est plus élevée en octobre (2014-2015) et en janvier, alors qu'elle est quasi inexistante en avril et en juillet. La méthionine est un des AAs essentiels pour l'homme et possède un atome de soufre. La synthèse de cet acide aminé pourrait être alors associée à un cycle physiologique de l'algue. Chez les végétaux par exemple, la méthionine intervient dans de nombreuses réactions de méthylation du métabolisme (développement cellulaire, méthylation de l'ADN, protéines) (Ravanel *et al.* 1998). Cela n'a pas encore été vérifié chez les algues.

3.3.2.2. Variation saisonnière de la composition en monosaccharides

Les résultats de l'analyse de la composition en monosaccharides ont été obtenus par chromatographie échangeuse d'anions couplé à un système d'ampérométrie pulsée et sont présentés sur la **Figure 2. 37.** Les valeurs sur les diagrammes circulaires représentent les moyennes des pourcentages des différents monosaccharides identifiés par rapport à la totalité des monosaccharides détectés.

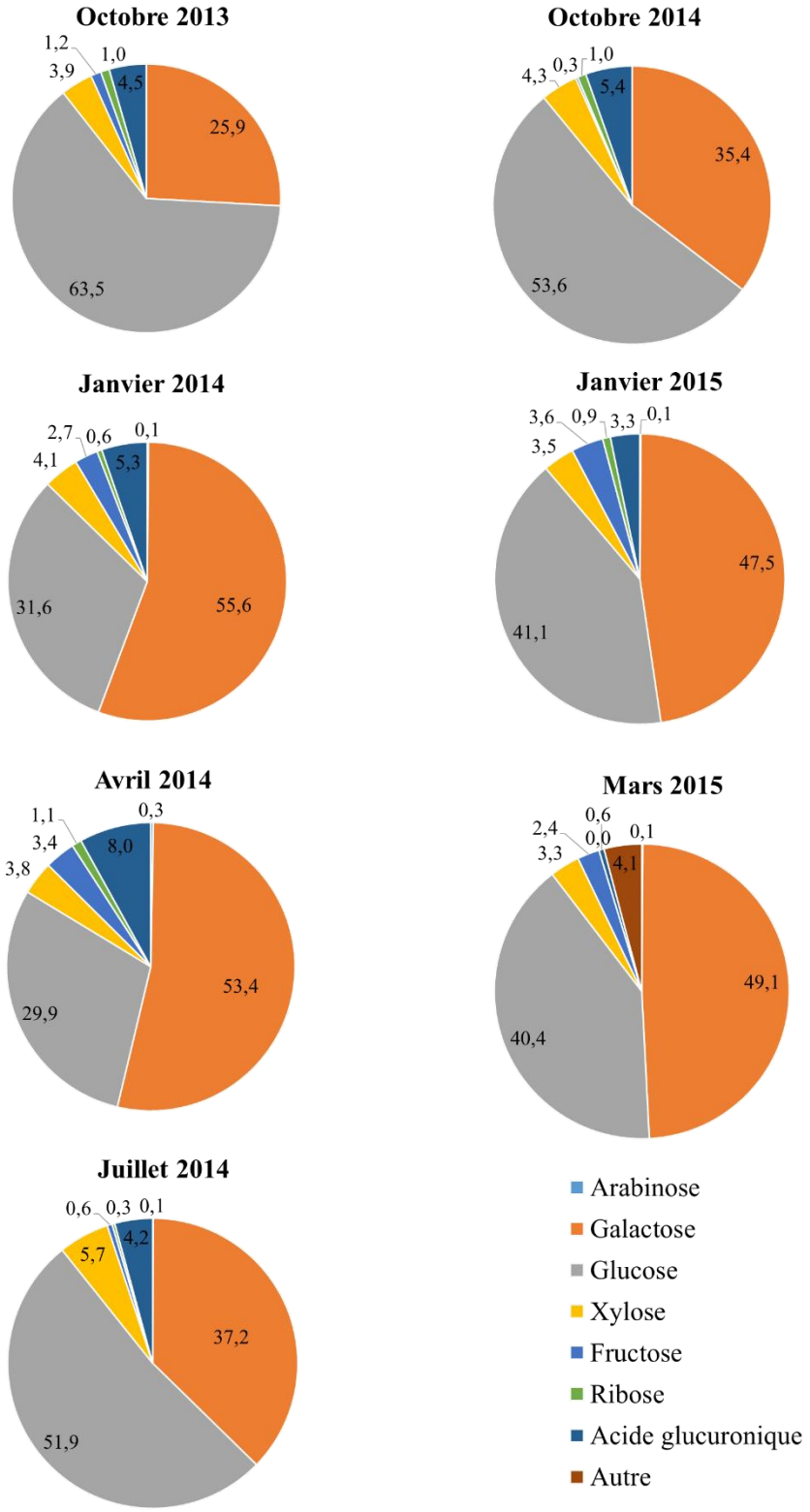


Figure 2. 37 Variation saisonnière de la composition en monosaccharides de *S. chordalis* d'octobre 2013 à mars 2015.

Le fructose et le ribose ont été identifiés à de très faibles proportions (moins de 4 %), alors que d'autres monosaccharides ont été détectés, mais ils n'ont pas été identifiés. Ils sont regroupés dans la catégorie « Autres », en marron sur les diagrammes circulaires. Ils peuvent représenter jusqu'à 7 % de la totalité des monosaccharides détectés. Des glucides chargés et non-identifiés ont été détectés avec un temps de rétention proche de celui de l'acide glucuronique (**Figure 2. 38**). De l'acide galacturonique pourrait être présent chez *S. chordalis* comme il a été retrouvé chez la Gigartinale *K. alvarezii* (Masarin *et al.* 2016). Des analyses structurales supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer cette hypothèse. Des glucides ont également été détectés à des temps de rétention très courts, avant les 10 premières minutes d'élution. Il pourrait s'agir des anhydrogalactoses qui sont moins retenus dans la colonne, car ils possèdent moins de groupes fonctionnels accessibles.

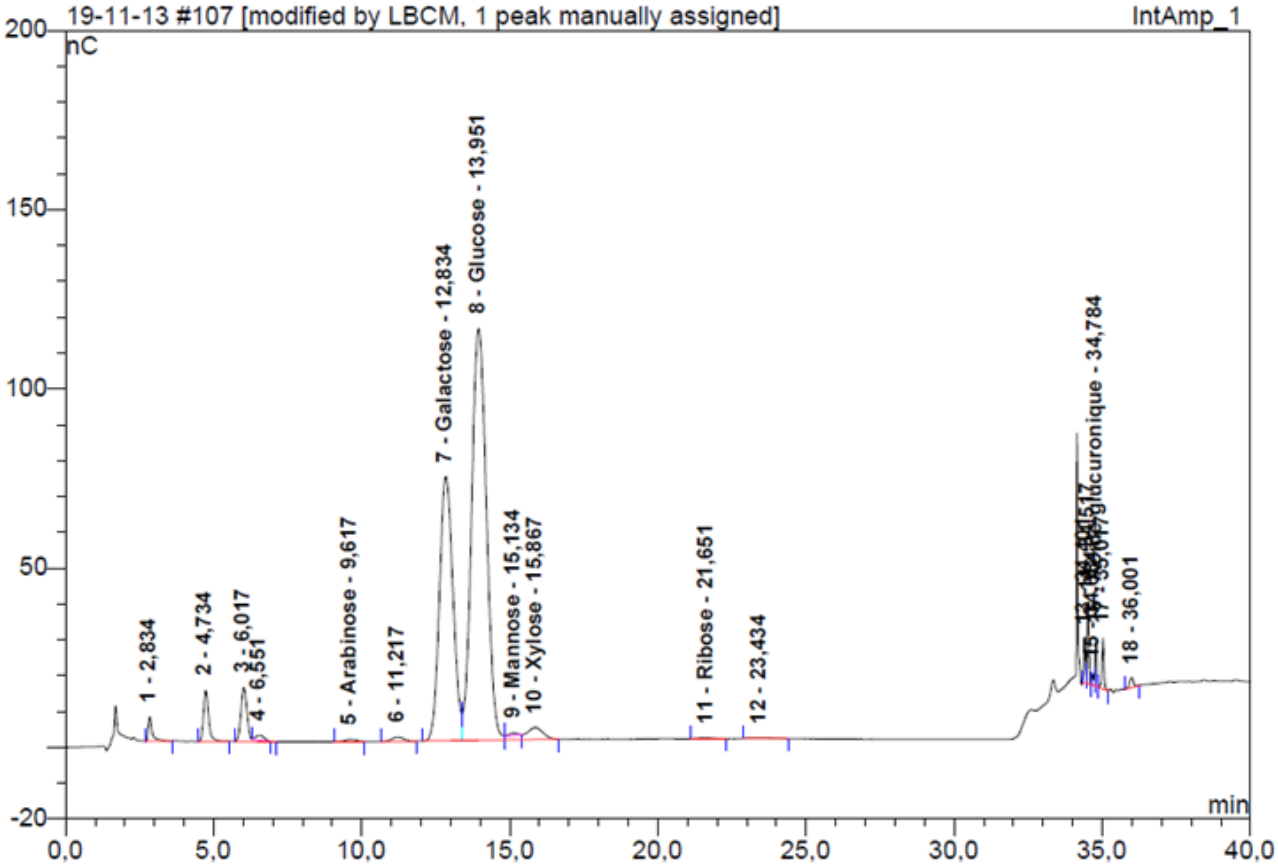


Figure 2. 38 Exemple d'un chromatogramme montrant la composition en monosaccharides de *S. chordalis* collectée en octobre 2013.

Deux monosaccharides représentent plus de 80 % des sucres présents chez *S. chordalis* à savoir le glucose et le galactose. Une variation et une alternance de proportions entre ces deux monosacharides sont remarquables. En effet, le glucose, qui constitue l'amidon floridéen, la cellulose et l'hémicellulose, représente la grande majorité des sucres présents dans l'algue en été (59,9 ± 7,0 %) et en automne (56,3 ± 3,9 %). Alors que le galactose, principale unité des carraghénanes et du floridoside, se trouve en majorité dans l'algue pendant l'hiver (46,5 ± 6,7 %) et le printemps (51,7 ± 2,5 %). À quoi s'ajoute l'acide glucuronique dont la proportion est plus importante en hiver (3,3 ± 0,1) et au printemps (2,8 ± 0,5). Les fortes proportions de galactose et d'acide glucuronique en hiver et au printemps supportent une synthèse pariétale durant ces saisons (*Cf.* Chapitre I 4.2.1.7.2. Les polysaccharides pariétaux p.63).

3.3.3. *Récapitulatif des résultats majeurs*

La composition biochimique de *S. chordalis* collectée sur la Presqu'île de Rhuys présente de nombreuses variations au cours des saisons.

Les profils du taux de MS et la teneur en groupements sulfates liés aux polysaccharides sont similaires. Les polysaccharides sulfatés représentent en effet une forte proportion de la MS de plusieurs algues rouges (Morgan *et al.* 1980 ; Nisizawa *et al.* 1987). Ils ont en effet un rôle important dans le maintien du thalle et dans la protection contre les agressions de nature biotique et abiotique provenant de son environnement.

En été, la photopériode est plus longue. Ainsi, l'activité photosynthétique de l'algue est plus intense. De l'amidon floridéen, composé d'unités glucosidiques est alors produit en grande quantité et s'accumule petit à petit dans le cytoplasme des cellules.

En automne, les algues sont grandes en taille, matures et plus fragiles. Elles contiennent encore beaucoup d'amidon floridéen et les ramules qu'elles possédaient sont libérées. De plus, pendant la période estivale, la salinité a augmenté à cause notamment de l'évaporation de l'eau par les photopériodes plus longues à cette période de l'année (milieu hyper-osmotique). Pour répondre à ce stress osmotique et éviter la plasmolyse des cellules, l'algue synthétiserait et accumulerait des composés osmorégulateurs comme les floridosides. Ce sont de petits

composés dont la structure est basée sur des unités de galactose (Goulard *et al*. 2001). Ils ont une propriété de rétention d'eau (Deslandes *et al.* 2006).

La teneur en protéines est corrélée négativement avec la teneur en sucres totaux. Ce résultat est expliqué par les précipitations qui sont plus intenses en automne et en hiver. En effet, les pluies lessivent les terres. D'importants volumes d'eau douce chargée d'éléments nutritifs azotés tels que le nitrate et l'ammonium provenant des fleuves et des rivières comme la Vilaine et la Loire, arrivent dans les eaux côtières dans lesquelles se trouvent *S. chordalis.* L'algue assimilerait alors l'azote abondant durant cette période pour produire des protéines telles que les phycobilliprotéines, nécessaires à la capture de l'énergie lumineuse, qui est réduite à cette période de l'année. Une période de croissance lente de l'algue caractérise en effet cette période avec un taux de MS faible qui augmente progressivement. En outre, l'arrivée d'eau douce fait baisser la salinité. L'osmolarité de l'eau de mer change (milieu hypo-osmotique). Pour répondre à cet autre type de stress osmotique et éviter le phénomène de turgescence des cellules, l'algue synthétiserait des petits composés. Dans un milieu riche en matière inorganique, il pourrait s'agir de dérivés azotés (mycosporine-like amino-acides MAA) (Bedoux *et al.* 2014), de dérivés d'acides aminés (bétaïne et taurine) (Niwa *et al.* 2007) ou encore de composés halogénés (Bondu *et al.* 2008). En effet, Bondu *et al*. (2007) ont montré notamment par RMN que le métabolisme du carbone était inhibé par le métabolisme de l'azote en condition de stress osmotique. De plus, les glucides de réserve, comme l'amidon floridéen, accumulés durant la période estivale sont mobilisés. Ils fournissent d'une part de l'énergie pour la synthèse de composés, et d'autre part des unités constitutives. L'action de l'UDP-galactose-épimérase forme des glucides pariétaux nécessaires aux nouvelles cellules, à savoir les carraghénanes, riches en galactose (Goulard *et al.* 1999 ; Freile-Pelegrin et Robledo 2006). Une étude utilisant la méthode du C_{14} a démontré cette désintégration de l'amidon floridéen pour former des carraghénanes (Fournet *et al.* 1999), ce que confirme les profils en monosaccharides de cette présente étude. À quoi s'ajoute la forte teneur en acides uroniques durant cette période. Composant en partie les bouchons synaptiques des parois cellulaires (*Cf.* Chapitre I. 4.2.1.7.2. Les polysaccharides pariétaux, page 63), l'augmentation de leur teneur est par conséquent synonyme de synthèse pariétale (de Reviers 2003).

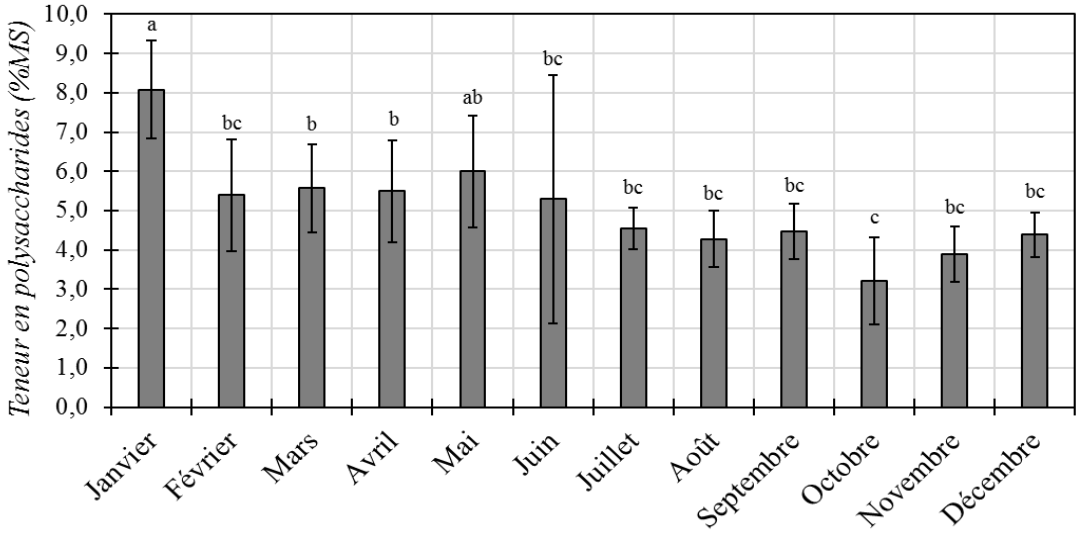
Au printemps, *S. chordalis* grandit et ses cellules se remplissent d'eau. De plus, des ramules commencent à se former sur les filaments. Le taux de MS reste élevé. La durée

d'ensoleillement est élevée par rapport au reste de l'année et la salinité de l'eau de mer augmente. L'algue continue de se développer et sa taille augmente. La synthèse des parois cellulaires reste active et ses cellules s'allongent. Une teneur en sucres totaux riches en galactose expliquerait la synthèse de carraghénanes et d'osmorégulateurs comme le floridoside. Cette période est également marquée par la présence d'organismes chlorophylliens (potentiels compétiteurs pour la lumière et agresseurs). Des petits composés de nature azotée ayant un rôle dans la capture de radiations lumineuse (MAA) et dans les stratégies de défense et de réparation de l'algue (MAA, composés halogénés) pourraient être également synthétisés (Bondu *et al.* 2008 ; Bedoux *et al.*, 2014 ; Bedoux et Bourgougnon 2015). Des analyses chromatographiques d'exclusion stérique, en vue de déterminer les profils de poids moléculaires des composés seraient intéressantes à envisager.

3.4. Impact des saisons sur les polysaccharides

3.4.1 Rendement d'extraction des polysaccharides

Les polysaccharides (PS) de *S. chordalis* ont été isolés de la matière première collectée durant l'année 2015, après une extraction sur Soxhlet et après une précipitation à l'eau à 80°C pendant 2h, suivie d'une précipitation à l'éthanol. Les rendements d'extraction sont présentés sur la **Figure 2. 39**.



Légende :
Les barres grises représentant les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (n=6, p<0,05), selon le test de Fisher LSD (logiciel R, package agricolae de de Mendiburu *2016).*

Figure 2. 39 : Variation saisonnière du rendement d'extraction des polysaccharides obtenus à partir de la matière première collectée mensuellement durant l'année 2015.

Une légère variation du rendement d'extraction des PSs de *S. chordalis* est perceptible. En effet, les rendements varient de 3,2 ± 1.1 % (octobre 2015) à 8,1 % ± 0,1 (janvier 2015). Ces résultats (moyenne annuelle de 5,0 ± 1,2 % de la MS) ne correspondent pas avec le rendement en PSs de *S. chordalis* mesuré par Deslandes *et al.* (1985) et par Bondu *et al.* (2010). Ils sont très faibles. En effet, Deslandes *et al.* (1985) ont trouvé un rendement de carraghénanes de 24 % de la MS et Bondu *et al.* (2010) un rendement d'extraction en PSs provenant de *S. chordalis* de 14,6 % alors que ce rendement peut atteindre entre 17,8 et près des 40 % de la MS chez certaines Gigartinales (Deslandes *et al.* 1985; Bondu *et al.* 2010; Bouhlal *et al.* 2011; Ye *et al*. 2015). Il peut être associé au fait qu'il a été voulu, volontairement, que le protocole utilisé dans cette présente étude soit rapide et sans dialyse. L'isolation des polysaccharides, dans cette présente étude, n'a duré que 4 h, alors que le temps d'extraction nécessaire est en général de plus d'une dizaine d'heures voire de jours (Bourgougnon *et al.* 1993 ; Freile-Pelegrin et Robledo 2006). Il avait pour but d'éliminer grossièrement les pigments, les lipides et les protéines et d'isoler les polysaccharides sans aller forcément jusqu'à la purification d'une des familles glucidiques de *S. chordalis*.

En hiver et au printemps, des rendements plus élevés en PSs ont été mesurés (de 5,6 à 6,3 % de la MS), comparés à ceux obtenus à partir de la matière première collectée en été puis en automne (3,8 à 4,0 % de la MS). La précipitation à l'éthanol permet de concentrer les polysaccharides sulfatés, comme les carraghénanes présents chez *S. chordalis* (Carlucci *et al*. 1997; Talarico *et al*. 2004; Matsuhiro *et al*. 2005; Bouhlal *et al*. 2011; Ghannam *et al.* 2013). Le résultat de la variation saisonnière du rendement en polysaccharides appuie le fait qu'une synthèse pariétale débuterait dès l'automne. De plus, le profil des rendements en PSs est similaire à celui de la MS de l'algue (*Cf.* **Figure 2. 34**, page 155). Cela vient appuyer ce qui a été mentionné précédemment en conclusion concernant la composition biochimique de l'algue. En effet, en hiver puis au printemps, quand l'algue se développe en augmentant notamment le nombre de ses cellules et en produisant des ramules, de nouvelles parois, entourant chaque nouvelle cellule, sont synthétisées.

3.4.2. Analyse en Composantes Principales des spectres obtenus par spectroscopie infrarouge des polysaccharides isolés de S. chordalis *collectée mensuellement.*

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a été utilisée, dans cette présente étude, dans le but de comparer les polysaccharides de *S. chordalis* collectée mensuellement selon une approche structurale et statistique.

Certains spectres des polysaccharides isolés de *S. chordalis* collectée mensuellement pendant l'année 2014 sont présentés sur la **Figure 2. 40**. Ils ont été comparés avec des spectres de carraghénanes standards de type iota, kappa et lambda.

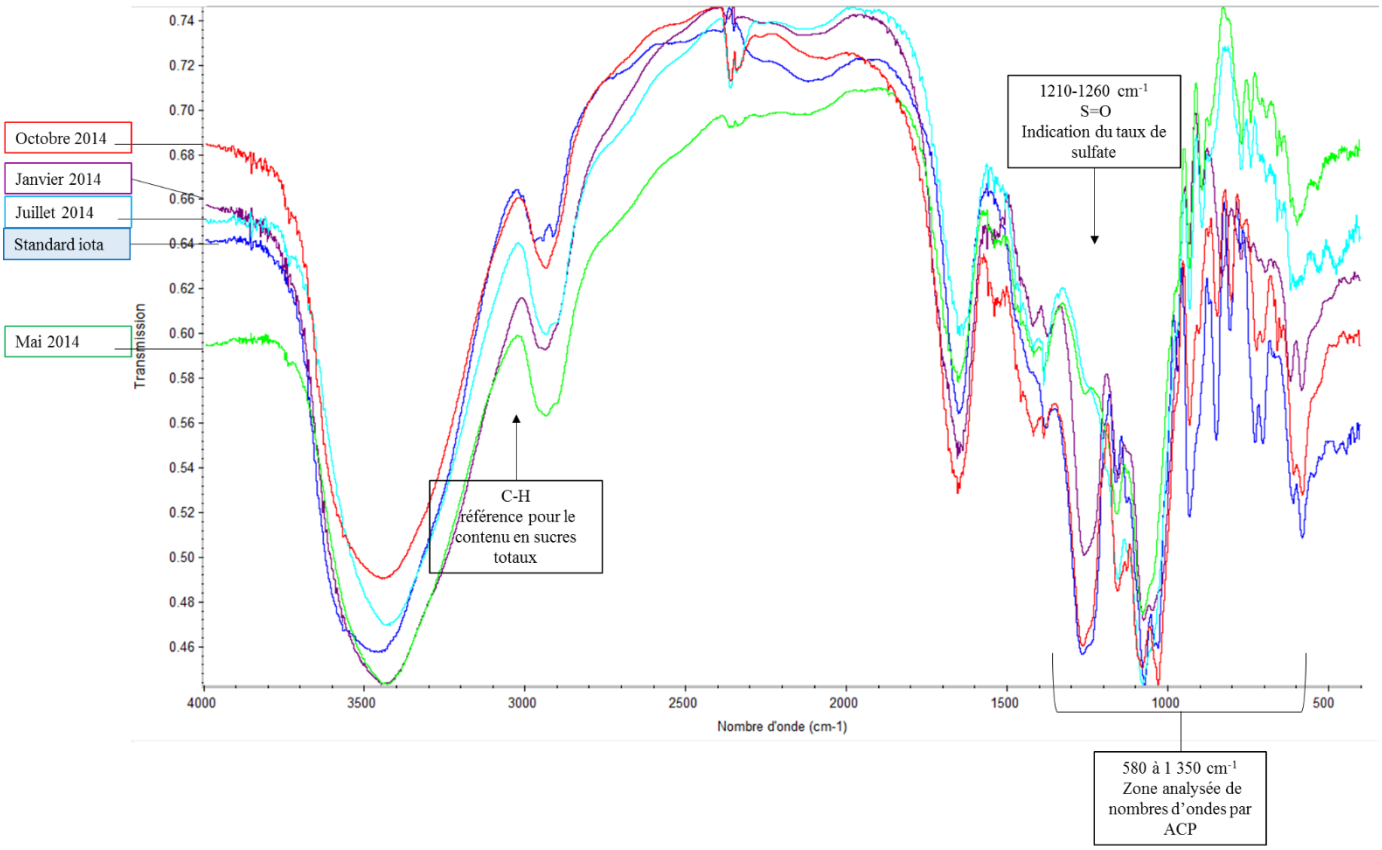


Figure 2. 40 Exemples de spectres obtenus, après passage au spectromètre infrarouge, de polysaccharides isolés de *S. chordalis* ainsi que d'un carraghénane standard de type iota, dont quelques nombres d'ondes retrouvés chez les phycocolloïdes sont indiqués.

De manière générale, les spectres des polysaccharides issus des échantillons d'algues sont superposables. Les nombres d'ondes caractéristiques des phycocolloïdes fournis par la littérature sont retrouvés (Chopin *et al.* 1999a). Néanmoins, entre 580 et 1 350 cm^{-1}, les spectres

se chevauchent, synonyme d'une variabilité saisonnière des composés dont les vibrations dans l'infrarouge, caractéristiques des liaisons chimiques, diffèrent.

Une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée afin de faciliter l'interprétation de cette variabilité, à l'aide du logiciel The Unscrambler. Ainsi, elle a permis de rassembler les polysaccharides qui sont proches par rapport à leurs spectres infrarouges et donc par rapport à leur structure. L'ACP a été appliquée à partir d'un tableau croisant des individus correspondant aux polysaccharides isolés de *S. chordalis* collectée tous les mois de l'année 2014 et des variables quantitatives que sont les spectres obtenus par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier sur un intervalle de nombres d'ondes allant de 580 à 1 350 cm^{-1}. Une variabilité importante entre les spectres explique ce choix d'intervalle analysé de nombres d'ondes (**Figure 2. 40**). Une représentation des individus issue de l'ACP est obtenue et illustrée sur la **Figure 2. 41**.

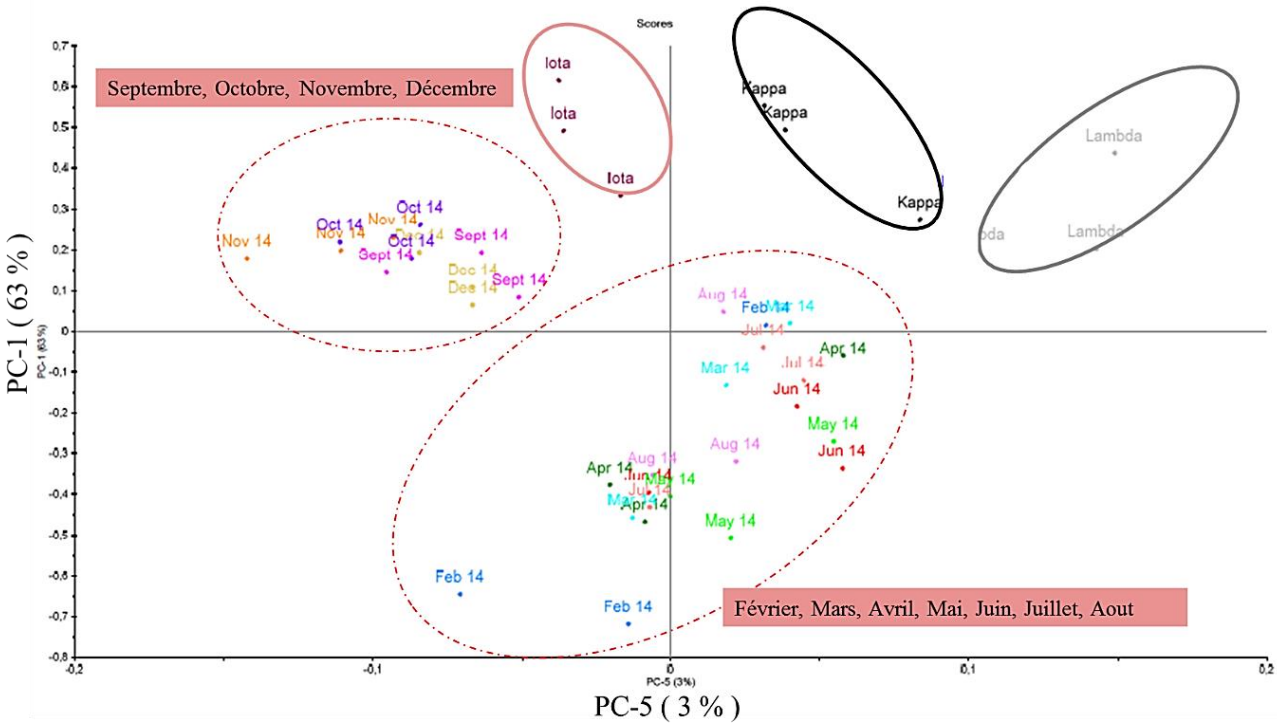


Figure 2. 41 Analyse en Composantes Principales des spectres infrarouges des polysaccharides issus de *S. chordalis* collectée mensuellement et des carraghénanes standards de type iota, kappa et lambda.

D'après la **Figure 2. 41**, les axes des composantes principales de ce plan (PC-1 et PC-5) expriment 66 % de la variabilité totale entre les PSs en fonction de leur spectres infrarouges. Les résultats de l'ACP montrent clairement deux groupes de PSs. Un groupe rassemble les PSs isolés des échantillons collectés à la fin de l'été et en automne (de septembre à décembre). L'autre groupe est un peu plus dispersé et rassemble les PSs des échantillons de *S. chordalis* collectés de février à août. Une variation saisonnière est alors bien perceptible dans les caractéristiques des PSs. Cette variation des PSs pourrait être associée au cycle de vie de *S. chordalis*. En automne, l'algue aurait atteint son stade mature, ce qui est confirmé par l'identification des iota carraghénanes qui sont proches de ce groupe. Deslandes *et al*. (1985) ont reporté que *S. chordalis* possédait qu'un seul et dominant type de carraghénane, le iota. Cependant, les résultats de cette présente étude suggèrent qu'il existe d'autres types de carraghénanes et sûrement des hybrides et des carraghénanes précurseurs comme peut-être les ν-carraghénanes, voire les λ-carraghénanes qui sont plus sulfatés *(*Wong et Craigie 1978, Delattre *et al.* 2011, Pierre *et al.* 2014, Rhein-Knudsen *et al.* 2015, *Cf.* Chapitre I. 4.2.1.7.2. Les polysaccharides pariétaux, page. 63). Hardouin *et al*. (2014) viennent appuyer cette hypothèse en reportant que les espèces du genre *Solieriaceae* possèdent principalement des ι-carraghénanes, mais aussi des ι-carraghénanes méthylés, des α-pyruvate carraghénanes et des carraghénanes précuseurs de type ν. En outre, dernièrement, une étude menée au LBCM appuie cette hypothèse de la présence de ν-carraghénanes chez *S. chordalis* de la Presqu'île de Rhuys notamment par des analyses RMN (Boulho *et al.* 2016, soumis).

Néanmoins, les méthodes d'extraction et de purification des carraghénanes de *S. chordalis*, utilisées dans cette étude méritent d'être optimisées. Les vibrations des liaisons entre atomes constituant d'autres polysaccharides comme l'amidon floridéen ou la cellulose, peuvent interférer dans l'ACP et expliquer cette distribution.

Des études sur la caractérisation des PSs extraits de *S. chordalis* et purifiés au cours des saisons doivent être entreprises pour confirmer cette présence de carraghénanes hybrides et/ou précurseurs pendant la croissance lente de l'algue qui débute en fin automne-hiver.

3.5. Conclusion : aspects éco-physiologiques pour une gestion de la ressource naturelle de S. chordalis *de la Presqu'île de Rhuys.*

Le sujet de cette partie portait sur l'étude de la variation saisonnière des caractéristiques biochimiques et des composés d'intérêt comme les polysaccharides sulfatés de la macroalgue rouge proliférante *Solieria chordalis*. Cette étude a permis de collecter beaucoup de données sur une période de deux ans. Elle est fondamentale dans un effort de promouvoir le potentiel économique et écologique de cette algue, qui prolifère chaque année sur les plages du littoral sud breton. En effet, avant toute application ou toute exploitation potentielle d'une biomasse naturelle, il est très important de caractériser sa composition biochimique et de connaître les facteurs environnementaux l'impactant, étant donné que les propriétés physico-chimiques et/ou activités biologiques en dépendent. *S. chordalis* est en effet affectée par son environnement. C'est dans une optique de stabilisation, voire de standardisation, d'une biomasse naturelle, que cette étude a été menée, notamment dans le cadre du projet VB2 (*Cf.* Avant-propos, 1. Le projet VB2, page 8).

Aujourd'hui, les communes affectées par les proliférations de *S. chordalis* emploient de moyens coûteux afin de les éliminer des plages pour ne pas freiner le tourisme et pour satisfaire les riverains. Les algues de prolifération sont essentiellement utilisées comme fertilisants sans coût de revient.

Grâce aux résultats obtenus de cette étude et aux données de la littérature, il est désormais possible de prévoir et de gérer la quantité et d'avoir une idée sur la qualité des composés de *S. chordalis* au cours d'une année. Un résumé de l'ensemble des résultats, donnant finalement des informations sur la biologie et sur l'écophysiologie de l'algue, est récapitulé sur la **Figure 2. 42**.

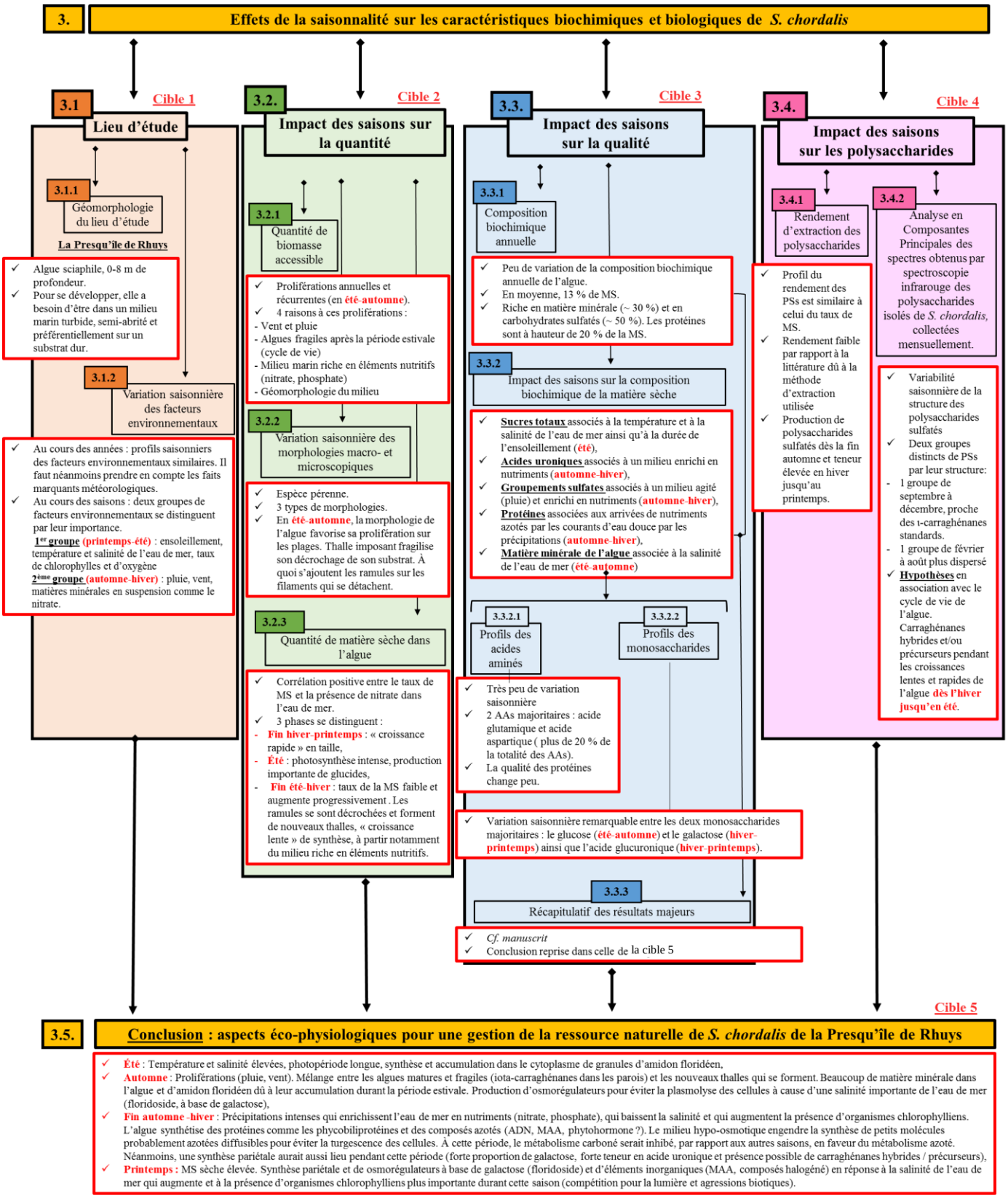


Figure 2. 42 Résumé des principaux résultats de l'étude de la saisonnalité sur les caractéristiques biochimiques de *S. chordalis.*

Ainsi, en observant la géomorphologie d'un lieu et en accédant aux prévisions météorologiques, il est possible de prédire la présence et les possibles échouages de *S. chordalis.* Cette anticipation permet alors une meilleure gestion du littoral.

Selon ses besoins et ses objectifs, un industriel qui souhaiterait exploiter cette ressource naturelle, abondante périodiquement, au niveau de la Presqu'île de Rhuys, pourra se référer à la **Figure 2. 42**. Par exemple, s'il recherche une matière abondante riche en matière minérale en vue de l'exploiter pour une application dans le domaine de l'agrofourniture (nourriture pour bétail ou fertilisants), alors l'algue échouée en automne pourra le satisfaire. S'il cherche des composés à valeur ajoutée en particulier, comme par exemple des molécules hydratantes (floridoside), il pourra alors partir d'une algue d'automne, ou du printemps. Ainsi, des composés actifs comme des photoprotecteurs, des antioxydants, des antibactériens, des antiviraux pourront être recherchés à partir d'algues collectées en hiver et au printemps. En été, l'algue riche en sucres totaux et en particulier en glucose peut être à la base de recherches pour en faire du biocarburant.

Bien évidemment, il s'agit essentiellement d'hypothèses. De nombreuses recherches doivent être effectuées afin de les valider ou de les réfuter. Néanmoins, cette **Figure 2. 42** peut servir de base pour de nouvelles perspectives d'exploitation de *S. chordalis.*

Pour compléter ces données et ces hypothèses, une étude sur l'impact de la saisonnalité de l'activité antivirale de *S. chordalis* a été réalisée au cours de ce doctorat. Elle est présentée dans le **Chapitre IV.**

Enfin, cette étude de la saisonnalité apporte de nombreuses informations sur les conditions de vie et de culture de *S. chordalis*. Des pistes d'algoculture en fonction de l'exploitation de l'algue souhaitée peuvent être envisagées, notamment en contrôlant les facteurs extérieurs, dont toutes les valeurs, moyennées calculées sur une période de deux ans, sont données sur la **Tableau II. VIII**.

Tableau II. VIII Valeurs des facteurs environnementaux et résultats de l'étude de la saisonnalité sur les caractéristiques biochimiques de *S. chordalis,* collectée sur la Presqu'île de Rhuys d'octobre 2013 à octobre 2015 *(1/3).*

			Hiver *(janvier, février, mars)*	**Printemps** *(avril, mai, juin)*	**Eté** *(juillet, août, septembre)*	**Automne** *(octobre, novembre, décembre)*	**Moyenne années** *(2013-2014-2015)*
Facteurs environnementaux							
	Température	*(°C)*	9,2 ± 0,9	14,7 ± 1,4	18,0 ± 1,2	12,3 ± 1,4	13,6 ± 3,7
	Salinité	*(g/kg)*	29,4 ± 1,5	32,0 ± 1,5	34,4 ± 0,5	31,2 ± 1,0	31,8 ± 2,2
	Ensoleillement	*(h)*	113,1 ± 33,1	221,8 ± 26,7	192,4 ± 8,1	80,3 ± 36,3	155,7 ± 67,9
	Oxygène	*(%)*	99,2 ± 1,9	111,6 ± 3,7	106,1 ± 3,0	97,5 ± 1,3	103,2 ± 6,3
	Chlorophylle	*(µg/L)*	1,4 ± 0,5	6,8 ± 2,9	3,9 ± 0,4	1,3 ± 0,4	3,3 ± 2,7
Facteurs environnementaux	Vent	*(nœud)*	13,7 ± 5,0	10 ± 2,8	13,2 ± 9,2	14,8 ± 1,7	12,9 ± 5,0
	Précipitations	*(mm)*	96,8 ± 46,7	53,7 ± 14,0	57,0 ± 22,5	93,3 ± 15,1	75,2 ± 45,2
	Matière minérale en suspension	*(mg / mL)*	14,4± 1,9	3,1 ± 0,4	4,8 ± 2,8	9,1 ± 7,8	7,9 ± 5,8
	Nitrate	*(µM)*	54,1 ± 11,4	15,1 ± 12,8	1,1 ± 1,1	21,8 ± 11,3	23 ± 22,1
	Phosphate		1,2 ± 0,3	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,5
	Silicate		25,6 ± 6,3	4,1 ± 4,5	5,2 ± 0,3	13,9 ± 3,7	12,2 ± 9,7
	Ammonium		2,1 ± 0,6	1,4 ± 0,4	1,4 ± 1,0	3,4 ± 0,5	2,1 ± 1,0
Biomasse disponible et morphologie macro- et microscopique							
Biomasse	Observations sur le terrain		Laisse de mer importante, pas d'échouage	Pas d'échouage	Début des échouages	Échouages importants	
Morphologies	macroscopique		Grand thalle > 10 cm, peu de filaments, peu de ramules	Grand thalle > 10 cm, peu de filaments, beaucoup de ramules	Thalle entre 5 et 10 cm, beaucoup de filaments, beaucoup de grandes ramules de 2-5 cm	Grand thalle > 10cm, beaucoup de filaments, les ramules se détachent	
	microscopique	*coupe transversale d'un filament*	Epaisse ceinture de cellules corticales pigmentées > 100 µm, un peu de lumière dans le médulla, présence de granules d'amidon	Epaisse ceinure de cellules corticales pigmentées >100 µm, beaucoup de lumière dans le médulla, très peu de granules d'amidon	Fine ceinture de cellules corticales pigmentées <100 µm, pas de lumière dans la médulla, présence de granule d'amidon	Epaisse ceinture de cellules corticales pigmentées > 100 µm, pas de lumière dans la médulla, beaucoup de granules d'amidon	

Les cases oranges mettent en évidence les valeurs élevées.

Tableau II. VIII Valeurs des facteurs environnementaux et résultats de l'étude de la saisonnalité sur les caractéristiques biochimiques de *S. chordalis*, collectée sur la Presqu'île de Rhuys d'octobre 2013 à octobre 2015 *(2/3).*

			Hiver *(janvier, février, mars)*	**Printemps** *(avril, mai, juin)*	**Eté** *(juillet, août, septembre)*	**Automne** *(octobre, novembre, décembre)*	**Moyenne années** *(2013-2014-2015)*
Matière sèche							
Taux de MS		*(% MF)*	15,6 ± 1,6	13,4 ± 0,9	12,5 ± 2,6	11,4 ± 1,1	13,0 ± 1,4
Cycle de vie	végétative		Peu de ramules	Beaucoup de ramules	Croissance des ramules, en taille	Fragmentation et libération des ramules	
	reproductive	*(hypothèse à vérifier sur un plus grand nombre d'individus)*	*Gamétophytes / Carposporophytes*	*Gamétophytes /Carposporophytes*	*Trétrasporophytes*	*Tétrasporophytes/Gamétophytes*	
Composition biochimique de la MS	Sucres totaux	*(%MS)*	27,8 ± 2,2	28,8 ± 6,4	31,2 ± 1,7	27,9 ± 2,2	28,6 ± 2,9
	Groupements sulfates		16,3 ± 10,3	8,9 ± 1,5	11,2 ± 3,2	13,4 ± 2,5	12,6 ± 2,6
	Acides uroniques		3,0 ± 0,1	2,9 ± 0,5	2,5 ± 0,3	3,2 ± 0,4	3,0 ± 0,1
	Protéines		17,1 ± 1,9	17,0 ± 1,2	14,5 ± 2,0	18,5 ± 3,2	16,6 ± 2,6
	Total des acides aminés détectés par GC-FID		11,1 ± 1,1	10,5 ± 1,7	7,2 ± 1,8	9,3 ± 1,0	9,5 ± 1,4
	Matière minérale		20,0 ± 3,7	25,7 ± 4,2	31,5 ± 5,4	34,4 ± 3,9	28,7 ± 0,2
	Autres		*15,8*	*16,7*	*9,1*	*2,6*	*11,1*
	3,6 Anhydrogalactose	*(%MS)* *année 2015*	17,7 ± 3,7	17,7 ± 3,7	17,0 ± 5,0	17,8 ± 5,0	17,5 ± 3,7
Profil en acides aminés	Glutamate	*(g/100g d'acides aminés détectés)*	13,5 ± 3,9	12,1 ± 0,6	12,0 ± 1,0	12,0 ± 1,5	12,4 ± 0,8
	Aspartate		11,5 ± 1,2	11,5 ± 0,6	12,0 ± 0,7	11,1 ± 0,2	11,5 ± 0,4
	Alanine		10,0 ± 0,4	9,6 ± 0,2	9,3 ± 0,1	9,2 ± 0,4	9,5 ± 0,3
	Leucine		9,7 ± 0,9	9,8 ± 0,2	9,8 ± 0,2	9,3 ± 0,3	9,7 ± 0,2
	Glycine		9,0 ± 0,8	9,1 ± 0,2	9,0 ± 0,1	9,4 ± 0,1	9,1 ± 0,2
	Valine		7,6 ± 0,3	7,9 ± 0,1	8,0 ± 0,3	8,3 ± 0,3	8,0 ± 0,3
	Threonine		7,2 ± 0,7	7,7 ± 0,1	7,7 ± 0,3	7,6 ± 0,2	7,5 ± 0,3
	Isoleucine		6,9 ± 0,2	7,3 ± 0,2	7,2 ± 0,1	7,3 ± 0,4	7,2 ± 0,2
	Sérine		6,7 ± 1,0	7,4 ± 0,1	7,1 ± 0,5	7,1 ± 0,1	7,1 ± 0,3
	Proline		6,8 ± 0,7	6,7 ± 0,1	7,4 ± 0,6	7,7 ± 0,3	7,2 ± 0,5
	Phénylalanine		6,5 ± 1,0	6,6 ± 0,3	6,6 ± 0,4	5,8 ± 1,3	6,3 ± 0,4
	Lysine		2,2 ± 0,0	2,2 ± 0,2	2,1 ± 0,0	1,8 ± 0,3	2,1 ± 0,2
	Histidine		1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1
	Méthionine		0,5 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,2	1,3 ± 1,3	0,6 ± 0,5
	Tyrosine		0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,1
	Hydroxyproline		0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,7 ± 1,2	0,3 ± 0,3
Profil en monosaccharides	Galactose	*(g/100g de monosaccharides détectés)* *d'octobre 2013 à mars 2015*	46,5 ± 6,7	51,7 ± 2,5	30,1 ± 6,5	32,5 ± 3,4	40,2 ± 4,8
	Glucose		39,3 ± 3,7	33,2 ± 3,3	59,9 ± 7,0	56,3 ± 3,9	47,2 ± 4,5
	Xylose		4,4 ± 1,3	4,2 ± 0,2	6,0 ± 2,7	4,1 ± 0,2	4,7 ± 1,1
	Acide glucuronique		3,3 ± 0,1	2,8 ± 0,5	0,4 ± 0,3	1,0 ± 0,8	1,8 ± 0,4
	Fructose		0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,3	0,6 ± 0,3	0,9 ± 0,2	0,7 ± 0,2
	Autre		5,8 ± 1,8	7,1 ± 1,0	1,5 ± 2,3	5,1 ± 0,7	4,9 ± 1,5

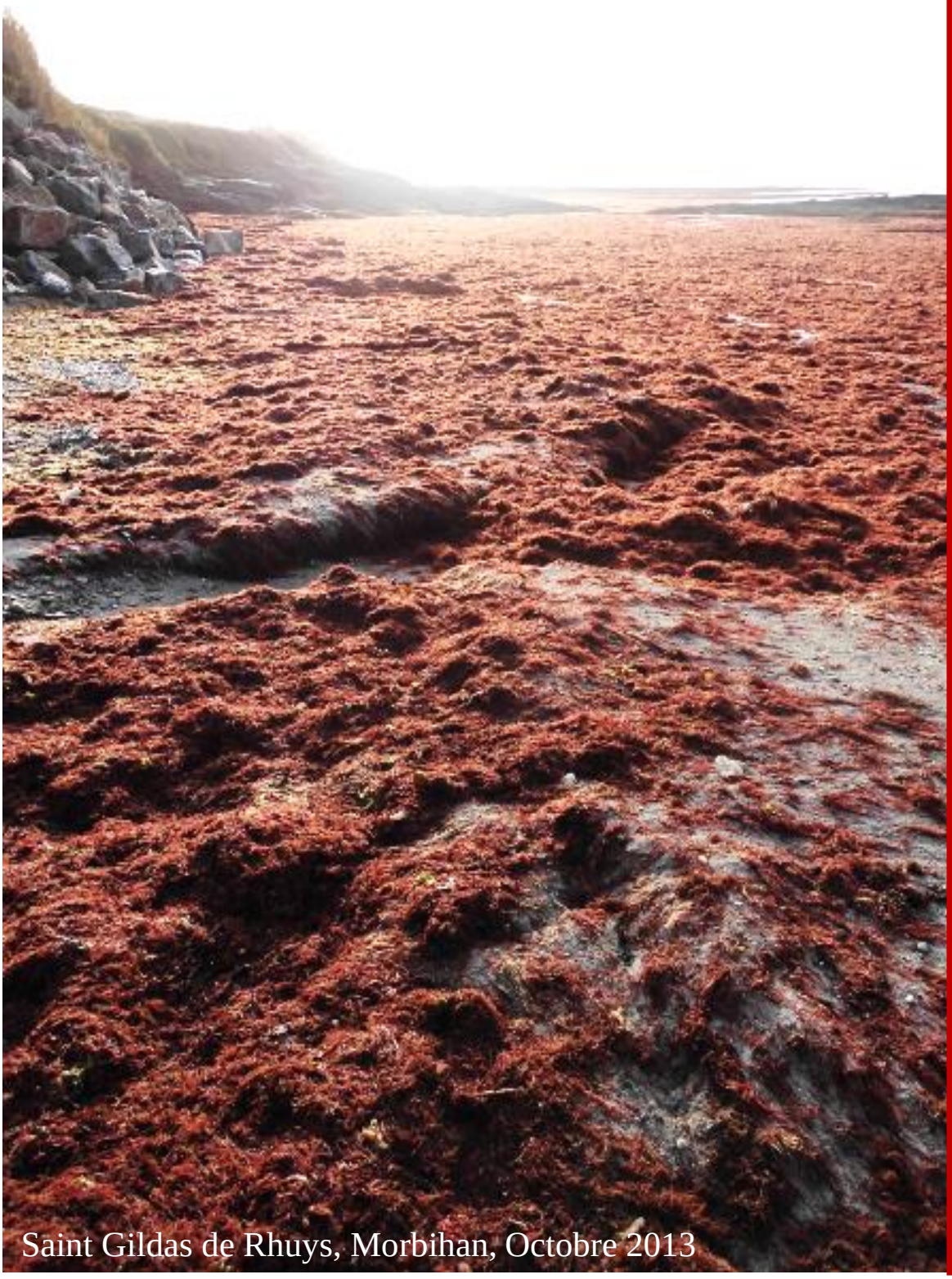
Les cases oranges mettent en évidence les valeurs élevées.

Tableau II. VIII Valeurs des facteurs environnementaux et résultats de l'étude de la saisonnalité sur les caractéristiques biochimiques de *S. chordalis*, collectée sur la Presqu'île de Rhuys d'octobre 2013 à octobre 2015 *(3/3).*

		Hiver *(janvier, février, mars)*	**Printemps** *(avril, mai, juin)*	**Eté** *(juillet, août, septembre)*	**Automne** *(octobre, novembre, décembre)*	**Moyenne années** *(2013-2014-2015)*
Polysaccharides sulfatés						
Rendement en polysaccharides	(% MS) *année 2015*	6,3 ± 1,5	5,6 ± 0,4	4,0 ± 0,2	3,8 ± 0,6	5,0 ± 1,2
Spectre IR	*année 2014*	Spectres structuraux IR qui se ressemblent *(carraghénanes hybrides et/ou précuseurs ?)*			Spectres structuraux IR qui se ressemblent montrant un type de PS bien distinct par rapport aux autres saisons. *(iota carraghénane dominant)*	
Biologie et écophysiologie						
Biologie et écophysiologie	**Hypothèses**	● Croissance lente de l'algue, synthèse pariétale, synthèse de protéines (présence de phytohormones de faibles poids moléculaires ?). ● présence de carraghénanes précurseurs et/ou hybrides ? ● Acclimation face à un stress hypo-osmotique: production de petits composés azotés (et halogénés ?)	● Développement du thalle, croissance en taille, production de ramules, ● présence de carraghénanes précurseurs et/ou hybrides ? ● début du stress hyper-osmotique : production de petits composés comme le floridoside, ● compétition avec d'autres organismes chlorophylliens (production de MAA ?), ● impact facteurs biotiques (production de molécules de défense ? composés halogénés ?)	● Activité photosynthétique intense, synthèse et accumulation d'amidon floridéen, ● croissance rapide, ● présence de carraghénanes précurseurs et/ou hybrides ? ● salinité élevée corélée positivement avec une forte teneur en matière minérale dans l'algue.	● Algue mature et fragile, ● dominance du iota-carraghénane ● ramules se décrochent et début de la croissance lente de synthèse de composés, à partir d'éléments nutritifs présents dans l'environnement de l'algue.	

Les cases oranges mettent en évidence les valeurs élevées.

CHAPITRE III



Saint Gildas de Rhuys, Morbihan, Octobre 2013

Optimisation des conditions de l'extraction assistée par enzymes en suivant une méthodologie des surfaces de réponse

CHAPITRE III

Lyophilisats de la matière première et d'extraits hydrosolubles de S. chordalis

Optimisation des conditions de l'extraction assistée par enzymes en suivant une méthodologie des surfaces de réponse

1. Introduction
- 1.1. Les technologies d'extraction conventionnelles et alternatives
- 1.2. L'Extraction Assistée par Enzymes (EAE)
- 1.3. Optimisation des conditions d'extraction par la méthodologie des surfaces de réponse
- 1.4. Hypothèses et cibles de recherche

2. Matériels et méthodes
- 2.1. Matériel biologique : *S. chordalis*
- 2.2. Matériel enzymatique
- 2.3. Extractions
- 2.4. Détermination du rendement d'extraction de l'EAE
- 2.5. Analyses de la composition biochimique
- 2.6. Plan d'expérience de Box-Behnken pour l'optimisation des conditions de l'EAE.
- 2.7. Analyses statistiques

3. Résultats et discussions
- 3.1. Composition biochimique de la MP de *S. chordalis* collectée en octobre 2013
- 3.2. Extraction Assistée par Enzymes : criblage enzymatique
- 3.3. Méthodologie des surfaces de réponse : optimisation des conditions d'extraction selon un plan d'expériences de Box-Behnken
- 3.4. Conclusion : l'EAE, une technologie d'extraction respectueuse de l'environnement

Optimisation des conditions de l'extraction assistée par enzymes en suivant une méthodologie des surfaces de réponse

1. Introduction

Comme il a été vu dans les deux premiers chapitres, *S. chordalis* représente une biomasse sauvage encore peu exploitée à l'heure actuelle. Pourtant, au vu des études qui ont été réalisées, il est possible d'augmenter la plus-value de l'espèce en accédant à ses composés, qui ont montré des propriétés physico-chimiques et/ou des activités biologiques pour divers domaines d'applications (Rogers et Topliss 1983; Bondu *et al.* 2010; Hardouin *et al.* 2013; Bedoux *et al.* 2014; Berthou *et al.* 2015; Kendel *et al.* 2015).

L'utilisation des algues comme biomasse ou comme source de composés d'intérêt nécessite un certain nombre d'étapes technologiques ; comme celle de la récolte ou de la culture ; celle des procédés de transformation de la biomasse en des produits d'intérêt ; celle du post-traitement pour la stabilité et la conservation des produits et enfin celles de la mise sur le marché et de la commercialisation *(Cf.* Avant-Propos 1. Le projet VB2 page 8 ; ADEME 2014).

Dans le cadre de ce doctorat, les recherches se sont focalisées sur l'étape technologique concernant la transformation de la biomasse dans le but d'accéder aux extraits riches en composés potentiellement actifs. Pour cela, une technologie d'extraction éco-responsable a été utilisée en suivant une méthodologie des surfaces de réponse afin d'optimiser cette étape de transformation. Il s'agit de l'Extraction Assistée par Enzymes, décrite dans cette partie introductive de ce chapitre.

Quelles que soient les méthodes de traitements d'une matière première en un produit à valeur ajoutée, les critères de performance considérés sont de manière générale : l'absence de détérioration ou de dénaturation des produits, l'obtention de fractions aisément séparables, la

faible consommation énergétique, la rapidité du procédé et le faible coût d'investissement (ADEME 2014).

1.1. Les technologies d'extraction conventionnelles et alternatives

En plus des composés hydrosolubles présents dans le milieu intracellulaire des algues, il existe aussi d'autres métabolites potentiellement actifs dans les parois, qui entourent chaque cellule (Yaich *et al.* 2011; Wijesinghe et Jeon 2012). Pour accéder à ces métabolites d'intérêt, les membranes ainsi que les parois cellulaires doivent être brisées. Cependant, la présence, dans les parois, d'une quantité importante de divers polysaccharides interconnectés et liés avec des protéines et/ou des glycoprotéines *(Cf.* Chapitre I. 4.2.1.7.2. Les polysaccharides pariétaux, page 63), réduit l'efficacité des méthodes d'extraction conventionnelles, comme l'hydrolyse ou l'extraction organique (Robic *et al.* 2009 ; Yang *et al.* 2011).

1.1.1. Les méthodes d'extraction conventionnelles

Les techniques d'extraction conventionnelles utilisent en général des solvants organiques ou de l'eau. Il existe l'extraction par distillation, par agitation magnétique, par ébullition, par macération, par un extracteur à reflux de Soxhlet, ou encore par broyage et par chauffage à reflux (extracteur de Soxhlet).

L'efficacité d'une extraction est affectée par de nombreux paramètres comme la température, la durée de l'extraction, la nature du solvant (polarité, osmolarité, viscosité), la pression ou encore le pH. Ces paramètres doivent être optimisés afin d'améliorer la solubilité des composés biologiques et l'efficacité de transfert de masse.

Généralement, ces techniques conventionnelles d'extraction nécessitent du temps, une forte consommation d'énergie et permettent d'obtenir seulement un faible rendement d'extraction. Néanmoins, ces méthodes, toujours très courantes au laboratoire et en industrie, sont faciles d'utilisation et peu onéreuses (Vinatoru 2001 ; Yang *et al.*, 2011). En outre, parmi ces techniques classiques, l'hydrolyse chimique est une des plus anciennes et une des plus courantes. Elle peut être réalisée soit avec un acide fort (acide chlorhydrique ou sulfurique) soit avec une base forte (soude). Les hydrolyses chimiques se déroulent en général dans des

conditions extrêmes, avec des fortes concentrations d'acides ou de bases et à des températures élevées (100°C) (Nguyen 2009). Ces procédés conventionnels utilisés chez les algues ne sont pas toujours très efficaces, puisque les rendements d'extraction n'atteignent que les 8 à 30 % de la matière sèche de l'algue entière (Wijesinghe et Jeon 2012). Pour augmenter les rendements d'extraction, de nombreuses étapes, souvent longues et coûteuses, peuvent être ajoutées et suivies. En outre, l'utilisation des solvants organiques est réglementée et génère des problèmes de toxicité et de traitement des déchets.

L'enjeu actuel est alors d'innover et de développer des méthodes d'extraction plus efficaces et plus respectueuses de l'environnement (Tripoteau 2015). Des alternatives ont été recherchées et prennent place dans les industries (Jeon *et al.* 2011). Ainsi, depuis une vingtaine d'années, des technologies alternatives se sont développées comme l'extraction par ultrasons, par micro-ondes, par fluides supercritiques ou encore comme l'extraction assistée par enzymes, connue également sous l'appellation d'hydrolyse enzymatique (Hardouin *et al.* 2014; Grosso *et al.* 2015).

1.1.2. Les méthodes d'extraction alternatives.

Dans les revues de Michalack et Chojnacka (2014) et de Grosso *et al*. 2015, de nombreuses technologies alternatives et efficaces d'extraction de molécules d'origine marine sont détaillées. De brèves explications du principe ainsi que des exemples d'applications sur les algues rouges de trois méthodes d'extraction de plus en plus utilisées sont données. Il s'agit de l'extraction par ultrasons, de l'extraction assistée par micro-ondes et de l'extraction par un fluide supercritique. L'extraction assistée par enzymes sera présentée par la suite dans une partie, qui lui sera entièrement consacrée.

1.1.2.1. L'extraction par ultrasons

Le principe de l'extraction par ultrasons repose sur des ondes sonores, qui au-delà de 20 kHz génèrent des vibrations mécaniques dans un solide, un liquide ou un gaz et forment des bulles de vapeur (phénomène de cavitation). Grâce à ces effets mécaniques et à l'éclatement des bulles, les ultrasons permettent de rompre les parois cellulaires et réduisent les tailles des

composés. Ils facilitent ainsi la libération des composés d'intérêt. Le solvant pénètre plus aisément dans le matériel biologique, ce qui améliore le transfert de masse (Rafiquzzaman et al. 2016; Le Guillard *et al.* 2016). Cette méthode d'extraction a été utilisée par exemple sur *Grateloupia turuturu* afin d'accéder à la phycoérythrine (Le Guillard *et al*. 2016) et sur *Hypnea musciformis*. Chez cette dernière Gigartinale, l'extraction par ultrasons a permis d'augmenter de 19 % l'extraction des carraghénanes par rapport à une méthode conventionnelle (traitement alcalin et dans de l'eau à température élevée) (Rafiquzzaman *et al.* 2016). Le principal inconvénient est la consommation énergétique élevée (ADEME 2014).

1.1.2.2. L'extraction assistée par micro-ondes

L'extraction assistée par micro-ondes consiste en un transfert rapide d'énergie et en un chauffage simultané de l'échantillon biologique avec le solvant. En absorbant l'énergie des micro-ondes, l'eau présente dans la matrice végétale favorise la rupture des cellules facilitant ainsi la libération des composés d'intérêt de la matrice. Cette technique a été appliquée pendant 10 à 20 min sur *Hypnea musciformis* afin d'extraire les carraghénanes (Vázquez-Delfín *et al.* 2014). Un rendement un peu plus faible (de 21,5 %) a été obtenu comparé à la technique d'extraction conventionnelle qui dure 3 h (37,8 %, traitement alcalin et dans de l'eau à température élevée) (Vázquez-Delfín *et al.* 2014). Néanmoins, les mêmes types structuraux de carraghénanes ont été retrouvés. L'extraction assistée par micro-ondes consomme beaucoup d'électricité et les coûts d'investissement sont élevés (ADEME 2014). Cependant, le principal avantage est le gain de temps d'extraction.

1.1.2.3. L'extraction par un fluide supercritique

Cette technique d'extraction utilise un fluide, le plus souvent de l'eau ou du dioxyde de carbone (CO_2), à son état supercritique, atteint sous haute température et sous forte pression. Les propriétés physiques d'un fluide supercritique, comme sa densité, sa viscosité et sa diffusivité, sont intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz. Ainsi, une faible viscosité et une diffusivité élevée d'un fluide supercritique permettent à ce dernier de pénétrer dans les cellules algales entraînant leur lyse. Comme solvant, le CO_2 est intéressant puisqu'il est inerte, disponible, facile à éliminer du produit d'intérêt et il n'est pas toxique, pas

inflammable et peu couteux. De plus, en utilisant cette technique d'extraction, le CO_2 est valorisé (ADEME 2014, Michalak et Chojnacka 2014). Néanmoins, l'extraction au CO_2 supercritique n'est pas adéquate pour les composés d'intérêt polaires, bien qu'il soit toujours possible d'ajouter des co-solvants afin d'augmenter la polarité d'extraction (Michalak et Chojnacka 2014). Par exemple, les acides gras oméga-3 d'*Hypnea charoides* sont extraits par CO_2 supercritique comme les isoflavones antioxydants retrouvées chez *Chondrus crispus* (Cheung 1999; Klejdus *et al.* 2010). Bien qu'elle soit éco-responsable, cette technologie représente un coût d'investissement important, une consommation énergétique élevée et un procédé sensible fonctionnant à haute pression (ADEME 2014).

Ces technologies d'extraction alternatives sont plus écoresponsables, bien que pour certaines, elles nécessitent une consommation énergétique élevée, qui indirectement a un impact sur l'environnement. À quoi s'ajoutent des coûts d'investissement importants et des procédés sensibles et limités par la nature des composés d'intérêt à extraire par exemple.

1.2. *L'Extraction Assistée par Enzymes.*

L'Extraction Assistée par Enzymes apparaît alors comme une technologie d'extraction alternative prometteuse. Elle possède de nombreux avantage. En effet, elle est efficace dans l'extraction de composés qu'elle libère dans l'eau dans un temps réduit (3 à 24 heures). Elle est réalisée sous des conditions physico-chimiques douces, à des températures situées entre 25 et 60 °C, à des pH entre 4,5 et 9 et elle est transposable à de larges échelles de production (du laboratoire à l'industrielle) (Jeon *et al.* 2011 ; Hardouin *et al.* 2014). De plus, elle est sélective et spécifique par l'application d'enzymes issues de microorganismes marins et terrestres (bactéries et champignons). Elle permet également d'apporter une appellation «biologique» aux extraits selon les enzymes utilisées (Enzymes GRAS[1]). Cependant, aujourd'hui, cette technologie reste encore onéreuse (ADEME 2014). De nombreuses recherches sont actives afin de la rendre plus rentables économiquement. D'une part, des travaux sont menés sur la recherche d'enzymes spécifiques de la paroi cellulaire afin d'augmenter les rendements d'extraction de composés ciblés issus d'algues (Nyvall Collén *et al.* 2011; Genicot *et al.* 2014;

[12] GRAS Generally Recognize As Safe ; traduit de l'anglais, ces enzymes sont reconnues notamment par l'organisation américaine de l'alimentation et des médicament (FAO) comme étant saines pour des applications chez l'humain.

Kopel *et al.* 2014; Grosso *et al*. 2015) ; et d'autre part dans la récupération et la réutilisation des enzymes après avoir stabiliser le produit obtenu (Hardouin *et al.* 2014).

L'hydrolyse enzymatique est une technique d'extraction permettant de fragmenter spécifiquement une matière première dans le but d'extraire des composés d'intérêt en présence d'enzymes, d'eau et du matériel biologique.

La propriété d'hydrosolubilité des extraits obtenus est intéressante, car elle favorise la digestibilité et l'accessibilité des composés potentiellement actifs des algues pour les plantes, les animaux et les humains (Dumay *et al.* 2013, Hardouin *et al.* 2014).

Les revues de Jeon *et al.* (2011) et d'Hardouin *et al.* (2014) dressent une synthèse récapitulant un grand nombre d'études menées sur l'Extraction Assistée par Enzymes appliquée aux algues. Cette technique a été utilisée essentiellement sur les algues brunes, rouges et sur les algues vertes (Jeon *et al.* 2011 ; Hardouin *et al.* 2014). L'EAE a été choisie dans quatre études menées sur des Gigartinales pour obtenir des extraits actifs. Elles sont présentées dans le **Tableau III. I.**

Tableau III. I Composés d'intérêt, extraits de Gigartinales par EAE.

Algues (Lieu de collecte)	Enzyme utilisée pour l'EAE	Conditions de l'EAE	Composés ciblés	Domaines d'applications	Résultats	Référence
Chondrus crispus (de culture Acadian Seaplant Limited, Nouvelle-Écosse, Canada)	Glycosidases et protéases de Novozyme	3 heures à 50 °C avec 0,5 % d'enzymes.	Extraits actifs contre le virus de l'herpès de type 1	Pharmaceutique, nutraceutique	● 40 à 70 % de la MS retrouvée dans les extraits hydrosolubles après EAE comparé à un témoin sans enzyme (20-25 % MS). ● Concentrations antivirales comprises entre 77,6 et 126,8 µg/mL pour les extraits après EAE et 129,7 µg / mL pour le témoin sans enzyme.	(Kulshreshtha *et al.* 2015)
Solieria chordalis (Morbihan, Bretagne, France)	Glycosidases et protéases de Novozyme	5 heures à 50 °C avec 0,5 % d'enzymes par rapport à la matière fraîche de l'algue.	Extraits actifs contre le virus de l'herpès de type 1	Pharmaceutique, nutraceutique	● Plus de 20 % de la matière sèche de l'algue sont retrouvés dans les extraits hydrosolubles après EAE, ce qui est supérieur à ce qui a été trouvé dans le témoin sans enzyme. ● Concentrations antivirales comprises entre 29,3 et 101,1 µg/mL pour les extraits après EAE et 23,0 µg / mL pour le témoin sans enzyme.	(Hardouin *et al.* 2013)
Solieria pacifica (Kochi, Japon)	Cellulase (Cellulosine T2)	Pré-traitement hydrothermique à 200 °C et EAE à 37 °C, à pH 4,5 pendant 2 jours avec 0,05 g d'enzymes pour 20 cm^3 d'algue prétraitée.	Glucose	Biocarburant	● Rendement de glucose par rapport à la cellulose obtenue après le pré-traitement est de 87,8 % de plus par rapport à un témoin sans EAE.	(Okuda *et al.* 2008)
Chondrus crispus (Finistère, Bretagne)	κ-carraghénase	45°C à un pH compris entre 6,5 et 6,8 dans du tampon Tris HCl 0,1M avec 2 % d'enzymes par rapport à la matère fraîche de l'algue .	Protéines	Alimentaire, nutraceutique	● Rendement en protéines 10 fois plus important comparé à un témoin sans EAE.	(Fleurence *et al.* 1995)

1.2.1. Les enzymes

Une enzyme est une protéine permettant de catalyser une réaction chimique. Comme tout catalyseur, elle accélère le processus réactionnel sans être un réactif ou un produit et est retrouvée intacte à la fin de la réaction (Dumay 2006, Tripoteau 2015). Une enzyme spécifique d'une réaction catalyse toujours la même transformation sur les mêmes substrats. Cette caractéristique des enzymes a permis de les classifier selon une nomenclature donnée par l'union internationale de biochimie et biologie moléculaire (International Union of Biochemistry and Molecular Biology – IUBMB). Un numéro EC (Enzyme Commission number) comportant 4 nombres est attribué à chaque enzyme en fonction de ses caractéristiques :

- Le premier nombre indique le type de réaction catalysée,
- Le second indique le substrat général de la réaction,
- Le troisième indique le substrat spécifique,
- Le dernier indique le numéro de série de l'enzyme.

Ainsi, les principales classes d'enzymes sont les oxydoréductases (EC 1), les transférases (EC 2), les hydrolases (EC 3), les lyases (EC 4), les isomérases (EC 5) et les ligases (EC 6) (Dumay 2006, Tripoteau 2015).

Pour extraire les composés actifs des algues, il faut tout d'abord dégrader les polymères pariétaux. Pour cela, des enzymes spécifiques sont employées. Il s'agit d'enzymes de la famille des hydrolases, car ces réactions biochimiques ont lieu en milieu aqueux. De plus, pour dégrader les parois, les glycosidases (EC 3.2) et les protéases (EC 3.4) semblent les plus appropriées (Hardouin *et al.* 2014 ; *Cf.* Chapitre I. 4.2.1.7.2. Les polysaccharides pariétaux page 63). Le **Tableau III. II** résume les différents types de réactions catalysées par les enzymes utilisées dans le cadre de cette présente étude.

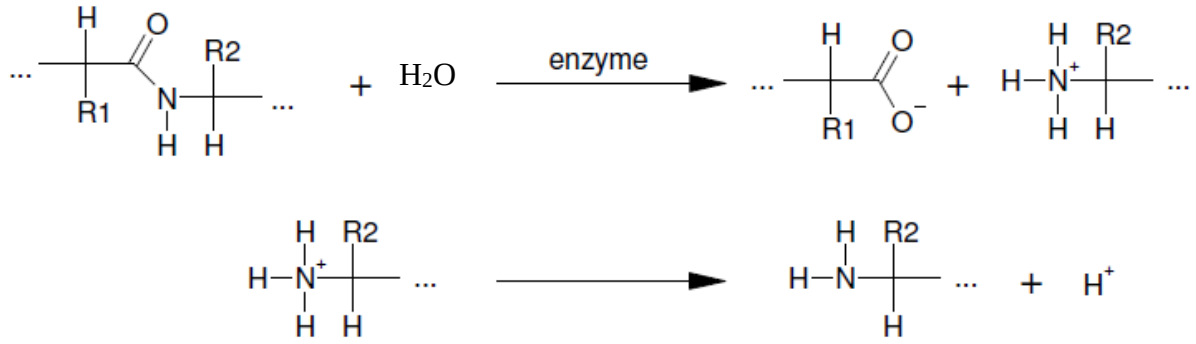
Tableau III. II Classification des glycosidases et des protéases selon l'IUBMB.

Numéro	Substrat général (en rouge) et spécifique (en noir)
EC 3.2	Glycosidases
EC 3.2.1	Glycosidase et notamment les enzymes hydrolysant les composés O- et S-glycosylés
EC 3.2.2	Hydrolysant des composés N-glycosylés
EC 3.2.3	Hydrolysant les composés S-glycosylés S-Glycosyl compounds (discontinued)
EC 3.4	**Protéases et peptinases**
EC 3.4.11	Aminopeptidases
EC 3.4.13	Dipeptidases
EC 3.4.14	Dipeptidyl-peptidases and tripeptidyl-peptidases
EC 3.4.15	Peptidyl-dipeptidases
EC 3.4.16	Sérine carboxypeptidases
EC 3.4.17	Métallo-carboxypeptidases
EC 3.4.18	Cystéine carboxypeptidases
EC 3.4.19	Oméga peptidases
EC 3.4.21	Sérine endopeptidases
EC 3.4.22	Cystéine endopeptidases
EC 3.4.23	Aspartique endopeptidases
EC 3.4.24	Métallo-endopeptidases
EC 3.4.25	Thréonine endopeptidases
EC 3.4.99	Endopeptidases au mécanisme inconnu

1.2.2. *Principe de l'Extraction Assistée par Enzymes*

Lors d'une hydrolyse enzymatique, les hydrolases de type protéases vont rompre les liaisons peptidiques entre deux acides aminés adjacents dans la séquence primaire d'une protéine, générant ainsi au moins deux peptides, comme l'illustre la **Figure 3. 1**. De plus, l'action de protéases engendre la libération de protons, ce qui induit une acidification du milieu. Ce principe est valable pour les hydrolyses se déroulant à pH supérieur à 6,5, pour que le degré de dissociation des ions $R\text{-}N^{+}H_3$ soit suffisant (Dumay 2006). Lorsque le pH est inférieur, la réaction s'inverse et ce sont des ions HO- qui seront libérés.

Les hydrolases de type glycosidases brisent les liaisons osidiques entre deux oligo- ou monosaccharides provenant de polysaccharides. Elles dégradent alors les parois et libèrent le contenu cellulaire. Il existe plusieurs spécificités de glycosidases (cellulase, endo-1,3(4)-β-glucanase, endo-1,4-β-glucanase, exo-1,3(4)-β-glucanase ou encore 1,4-α-amylase).



Parmi les enzymes utilisées pour l'hydrolyse des protéines, il y a les exopeptidases qui hydrolysent les liaisons peptidiques à l'extrémité des chaînes et libèrent ainsi l'acide aminé au niveau du N-terminal ou du C-terminal. Quant aux endopeptidases, elles exercent leur action à l'intérieur des chaînes peptidiques. En fin de réaction enzymatique, comme tous les catalyseurs, l'enzyme se retrouve intacte dans le milieu réactionnel. Elle est alors soit inactivée par traitement thermique ou par une variation de pH dans un système discontinu, soit réutilisée dans un système fermé continu.

Figure 3. 1 Schéma réactionnel général de l'hydrolyse enzymatique de type protéase (Dumay 2006)

1.2.3. *Paramètres influençant l'Extraction Assistée par Enzymes*

Une fois la nature de l'enzyme choisie, les conditions de l'extraction doivent être mises en place. Elles sont instaurées par des paramètres tels que la température, le pH, qui doivent être optimaux pour l'enzyme (Jeon *et al.* 2011, Hardouin *et al.* 2014), la durée de l'extraction, le prétraitement de la matière première ou encore le ratio enzyme sur substrat. Ces paramètres peuvent avoir un impact considérable sur la dégradation des polymères pariétaux et sur la libération des composés potentiellement actifs (Dumay *et al.* 2013)

1.2.3.1. Influence de la température sur la réaction enzymatique

L'efficacité d'une Extraction Assistée par Enzyme est expliquée notamment par la vitesse de la réaction enzymatique. Elle correspond au rapport de la formation du produit (ou de la transformation du substrat en produit) sur un temps donné dans un volume défini. L'étude de cette vitesse de réaction en fonction de la température montre clairement deux phases, illustrées sur la **Figure 3. 2.**

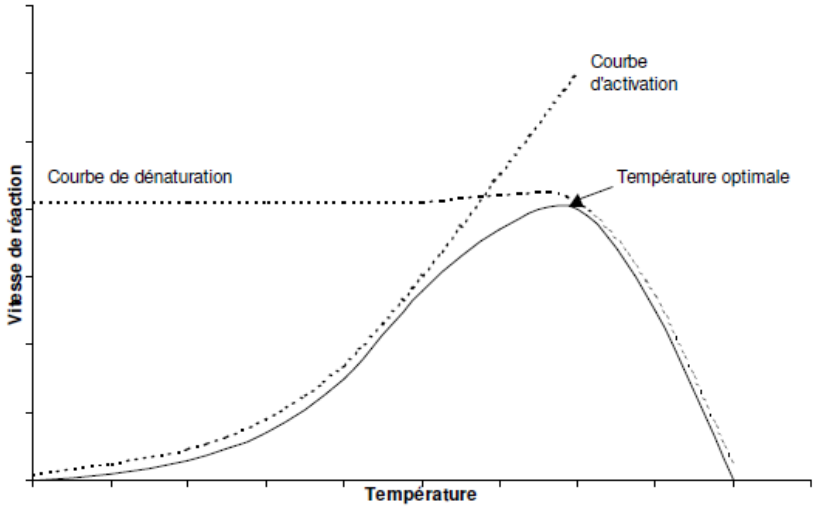


Figure 3. 2 Influence de la température sur la réaction enzymatique (Dumay 2006).

Une élévation de la température du milieu réactionnel fait accélérer la vitesse de réaction enzymatique en fournissant l'énergie nécessaire pour son activation. Néanmoins, comme il est indiqué sur la **Figure 3. 2**, à partir d'une certaine température, cette vitesse de réaction enzymatique chute. Cela s'explique par un changement dans la structure tridimensionnelle de l'enzyme qui devient alors inactive. Une enzyme est par conséquent caractérisée par une température d'activation optimale. Celle-ci est déterminée par rapport à une courbe passant par une valeur maximale de la vitesse de réaction, proche de l'intersection des courbes d'activation et de dénaturation de l'enzyme en fonction de la température. Cette valeur maximale de la vitesse de réaction se produit à une température donnée qui correspond à la température optimale (**Figure 3. 2)**. La température optimale d'activation est propre à chaque enzyme et est, la plupart du temps, donnée par le fournisseur.

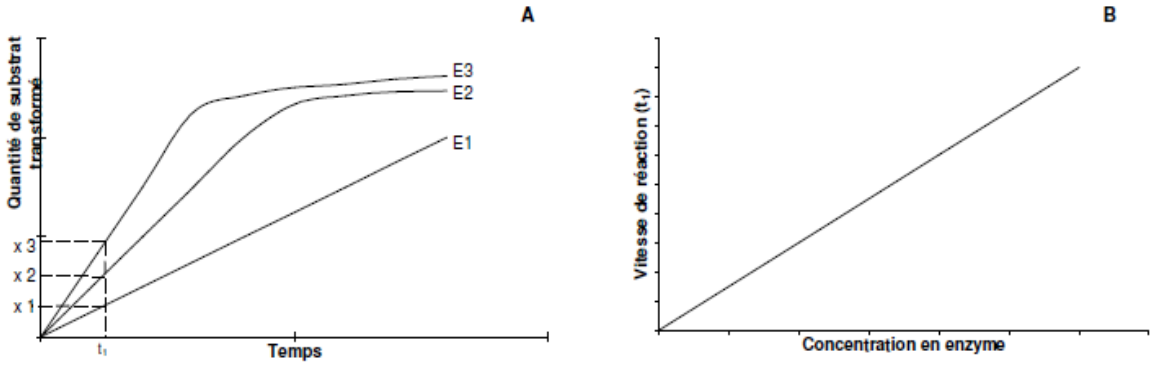
Les températures appliquées lors d'EAEs sur les algues rouges sont comprises entre 37 et 60 °C (Hardouin *et al.* 2014).

Aujourd'hui, il n'existe pas encore de procédés couplés à l'EAE qui permettent de récupérer et d'isoler les enzymes du produit pour une future utilisation. Ainsi, pour obtenir un produit stable, les enzymes doivent être dénaturées. Moins destructive envers le produit extrait

qu'une variation du pH, un traitement thermique peut être appliqué pendant une dizaine de minutes (Dumay 2006).

1.2.3.2. Influence de la quantité d'enzymes ajoutée par rapport au substrat (ratio enzyme / substrat).

Le ratio enzyme sur substrat (E/S) est un paramètre important. En effet, comme le montre la **Figure 3. 3,** ce n'est pas en ajoutant une quantité importante d'enzymes sur une quantité de substrat fixe que l'efficacité de l'EAE est meilleure. En effet, au-delà d'une certaine concentration d'enzymes, la totalité du substrat se trouve complexé et saturé (Dumay 2006).



Légende :
E1 (enzyme 1) est moins concentrée que E2, qui est moins concentrée que E3.

Figure 3. 3 Effet de la concentration de l'enzyme sur une quantité de substrat fixe, transformée au cours du temps (**A**) et sur la vitesse de réaction enzymatique (**B**) (Dumay 2006).

Les ratio E/S appliqués lors d'EAEs sur les algues rouges sont compris entre 0,05 et 5 % en matières sèches d'enzymes et de substrat (Fleurence *et al.* 1995 ; Dumay *et al.* 2013 ; Hardouin *et al.* 2013 ; Kulshreshtha *et al.* 2015).

Le coût des enzymes constitue le principal frein ainsi que la spécificité des enzymes qui est faible pour l'utilisation de l'EAE à l'échelle industrielle. Il est alors préférable de ne pas en ajouter beaucoup dans le milieu réactionnel et d'étudier le temps d'extraction pendant lequel une relation linéaire entre la quantité de substrat transformée et le temps existe (**Figure 3. 3**).

1.2.3.3. Influence de la durée de l'extraction sur la libération de produit.

La durée d'extraction est un autre paramètre important qui peut influencer l'efficacité de l'EAE. La quantité et la qualité des composés extraits dépendent du temps durant lequel l'enzyme est en contact avec la biomasse algale. Dans de nombreuses études, il a été démontré que le rendement d'extraction de composés cibles augmente au cours du temps jusqu'à ce qu'il atteigne un plateau. Puis, il tend à diminuer. Cette baisse de rendement d'extraction peut être expliquée par une dégradation des composés. C'est le cas, par exemple pour l'extraction des polysaccharides ou de la R-phycoérythrine (Dumay *et al.* 2013, Ye *et al.* 2015). D'après la revue d'Hardouin *et al.* (2014), une durée d'extraction comprise entre 3 et 48 heures est nécessaire dans l'extraction d'une quantité maximale de composés potentiellement actifs.

De nombreuses études ont mis en évidence les bénéfices qu'apportent les enzymes dans la production d'extraits ou de composés à valeur ajoutée (Wijesinghe et Jeon 2012 ; Hardouin *et al.* 2013 ; Hardouin *et al.* 2014). Néanmoins, très peu de travaux ont traité l'optimisation des conditions d'extraction sur les algues (Dumay *et al.* 2013).

1.3. *Optimisation des conditions d'extraction par la méthodologie des surfaces de réponse.*

La méthodologie des surfaces de réponse est une combinaison de plan d'expériences, de statistiques, de modélisations empiriques, qui s'appuie exclusivement sur des expériences et des observations, et des prévisions d'optimisation mathématique employée pour améliorer la performance des procédés. L'utilisation d'un plan d'expériences permet d'optimiser les données et ainsi adopter une stratégie plus économique et plus directe. En effet, le nombre des essais à effectuer est déterminé de manière rationnelle. Cela évite les redondances de données et facilite la gestion du temps et la maîtrise d'un plan d'expériences. En outre, le fait de suivre une méthodologie des surfaces de réponse afin d'optimiser des conditions d'extraction par exemple permet l'étude des interactions entre les différents facteurs de manière simultanée (Mezzi 2012).

1.3.1. Plan d'expérience : Box-Behnken

Le plan d'expériences de Box-Behken est un des plans d'expériences classiques. Il permet l'étude d'une optimisation d'une variable d'intérêt comme le rendement d'extraction des composés de l'algue de départ retrouvés dans de l'eau après EAE. De plus, il permet d'étudier l'influence de chaque paramètre extérieur comme le ratio enzyme/substrat, la température et la durée de l'extraction, de manière simultanée (Roche 2014).

Ainsi, le principe de la méthode est de trouver les conditions d'expérimentation optimales en réalisant un nombre restreint d'expériences.

Le plan de Box-Behnken répond à un critère d'optimisation particulier : l'erreur de prévision des réponses est la même pour tous les points d'une sphère centrée à l'origine du domaine expérimental. Le plus connu des plans de Box-Behnken est celui qui permet d'étudier trois facteurs qui peuvent prendre trois modalités (-1 ; 0 et 1). Les points expérimentaux sont au milieu des arêtes de chacun des côtés du cube, comme il est illustré sur la **Figure 3. 4** (Goupy 1997). Ce plan comporte douze essais auxquels il est ajouté un treizième pour le point central.

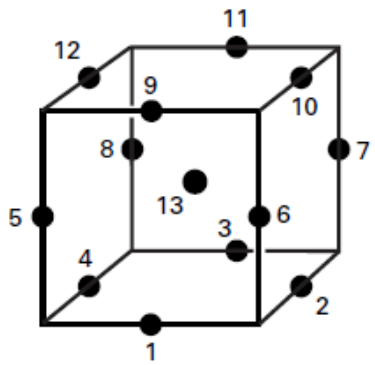


Figure 3. 4 Plan d'expérience de Box-Behnken à trois facteurs (paramètres) (Goupy 1997).

La matrice du **Tableau III. III** indique ces treize essais (Goupy 1997). L'ensemble des résultats permet ainsi d'avoir une représentation globale de l'impact de trois paramètres qui influencent le rendement d'extraction après application de l'EAE.

Tableau III. III Plan d'expérience de Box-Behnken à trois facteurs (paramètres) et essais à mener selon les différentes modalités que prend chaque facteur (-1, 0 et 1) (Goupy 1997).

N° essai	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3
1	0	– 1	– 1
2	+ 1	0	– 1
3	0	+ 1	– 1
4	– 1	0	– 1
5	– 1	– 1	0
6	+ 1	– 1	0
7	– 1	+ 1	0
8	+ 1	+ 1	0
9	0	– 1	+ 1
10	+ 1	0	+ 1
11	0	+ 1	+ 1
12	– 1	0	+ 1
13	0	0	0

1.3.2. Statistiques et mathématiques associées au plan Box-Behnken

La méthodologie des surfaces de réponse selon un plan d'expérience de Box Behnken a pour but d'explorer les relations entre une variable « réponse y » et plusieurs facteurs dépendants « x1, x2 et x3 » par ajustement d'une fonction mathématique, dans l'objectif notamment d'optimiser la « réponse y » (Roche 2014). Une fois les expériences réalisées, les valeurs de la « réponses y » sont entrées dans la matrice du **Tableau III. III** à côté des facteurs et des modalités appliqués respectivement. Une équation polynomiale quadratique est alors proposée. Elle se base sur une droite de régression en supposant les dépendances linéaires ou quadratiques entre les modalités de chaque facteur et entre les facteurs, influençant dans cette présente étude le rendement extraction (Mozzo 1990).

Ainsi, le plan de Box-Behnken permet une estimation efficace des coefficients de premier et de second ordre et il permet de mettre en évidence les paramètres les plus influents. En outre, une analyse de la variance est en général intégrée au modèle afin de déterminer la significativité du coefficient de chaque paramètre étudié (Minitab.com, 2016). Enfin, cette équation polynomiale quadratique permet la construction de graphiques en trois dimensions

facilitant ainsi l'interprétation de l'impact des différents facteurs « x1, x2 et x3 » sur la « réponse y ».

Le plan d'expérience de Box-Behnken a été choisi afin d'optimiser les conditions d'extraction et afin d'analyser l'influence de trois paramètres que sont la température, la durée de l'extraction et le ratio E/S sur le rendement d'extraction des composés hydrosolubles issus de la matière première *S. chordalis.*

1.4. Hypothèses et cibles de recherches

Ce 3ème chapitre est focalisé sur la technologie de l'Extraction Assistée par Enzymes dans l'optique de produire des extraits hydrosolubles (EHs) riches en composés potentiellement actifs, à partir de *S. chordalis*. Ainsi, le rendement d'extraction correspondant à la proportion de la matière sèche de *S. chordalis* retrouvée dans les extraits hydrosolubles après EAE est la principale « réponse » analysée.

Pour ce faire, deux cibles ont été fixées. La première consiste à sélectionner l'enzyme la plus efficace dans la production d'EHs riches en matière sèche, parmi huit enzymes d'activités différentes. Les compositions biochimiques des EHs ont été caractérisées afin d'évaluer l'impact des différentes enzymes **(Figure 3. 5).**

Cible 1 : Criblage d'enzymes d'activités différentes dans la libération d'une quantité maximale de matière sèche dans de l'eau.

Quant à la deuxième cible, après avoir sélectionné l'enzyme la plus efficace, une optimisation des conditions d'extraction a été effectuée afin d'augmenter le rendement d'extraction, en étudiant trois paramètres : la température, la durée de l'extraction et le ratio E/S.

Cible 2 : Optimisation des conditions de l'EAE selon le plan expérimental de Box-Behnken.

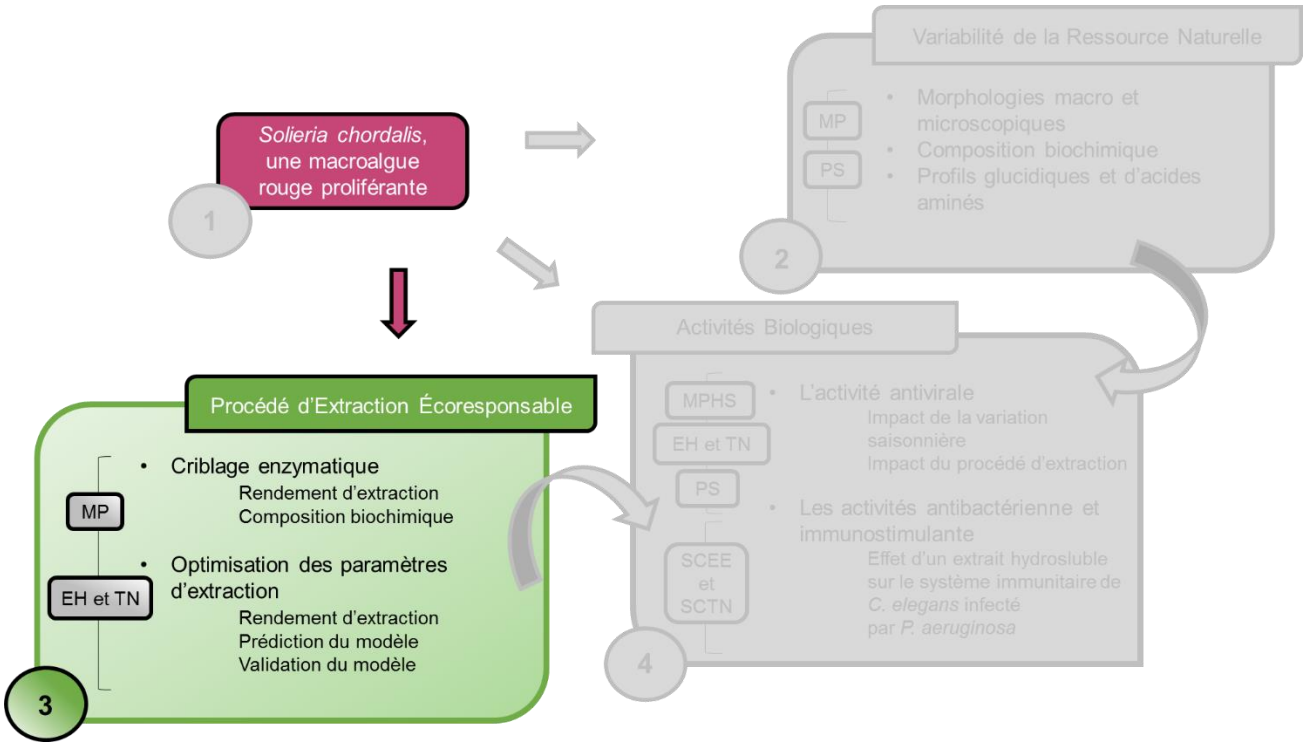


Figure 3. 5 : Organigramme du projet de doctorat mettant en évidence l'étude consistant à produire des extraits hydrosolubles (EHs) riches en composés algaux par une technologie éco-responsable, à savoir l'Extraction - Assistée par Enzymes. Les EHs sont tous obtenus à partir d'une même matière première (MP) de *S. chordalis*, collectée en octobre 2013. Des témoins négatifs (TNs) d'extraction sans enzyme ont servi de contrôles afin de mettre en évidence l'effet des enzymes dans la libération de composés algaux dans l'eau.

Des activités biologiques (antivirale, immunostimulante et antibactérienne) ainsi que l'impact de l'EAE sur l'activité antivirale ont été évaluées *in vitro* sur les extraits hydrosolubles (EHs) obtenus. Les résultats sont présentés dans le quatrième et dernier chapitre.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Matériel biologique : S. chordalis

Environ 20 kg de *S. chordalis* ont été collectés en octobre 2013, dans le rideau d'eau à marée basse descendante, lors des grands échouages sur la plage de Kerfago à Saint Gildas de Rhuys (47°29'30.5''N, 2°49'52.0''O). Les algues ont été ensuite lavées, égouttées, séchées,

broyées, lyophilisées et stockées à l'obscurité et à température ambiante (18-22°C). Les protocoles de ces étapes sont détaillés dans le Chapitre II (*Cf.* Chapitre II. 2.1. Matériel biologique *: S. chordalis*, page 114).

2.2. Matériel enzymatique

Les enzymes utilisées pour cette étude ont été fournies gracieusement par la société Novozymes AS (Danemark). Huit enzymes différentes ont été testées séparément pour l'EAE sur *S. chordalis* : trois protéases et cinq glycosidases, détaillées ci-dessous :

2.2.1. Les protéases

Alcalase 2,4L FG

Alcalase 2,4L FG est une enzyme produite par fermentation à partir d'une souche sélectionnée de la bactérie terrestre *Bacillus licheniformis*. Son principal constituant enzymatique est la subtilisine. Elle catalyse l'hydrolyse des protéines au niveau des liaisons peptidiques. C'est une endopeptidase qui possède des résidus sérine comme site catalytique. Cette enzyme possède les autorisations FAO pour être utilisée à des fins alimentaires. Les numéros enzymatiques de l'alcalase sont EC 3.4.21.62, EC 3.4.21.19 et EC 3.4.22.31.

La température optimale d'Alcalase est comprise entre 55 et 70 °C et le pH optimal est compris entre 6,5 et 8,5. L'activité déclarée d'Alcalase est de 2,4 AU[2]/g.

Alcalase peut être inactivée par chauffage à 85 °C pendant 10 min (Dumay 2006 ; Hardouin *et al.* 2014).

Flavourzyme 500 MG

Flavourzyme 500 MG est un complexe enzymatique qui hydrolyse les protéines dans des conditions neutres ou acides. Flavourzyme est produite par le champignon *Aspergillus*

[2] Unité d'Activité en unité d'Anson

oryzae et possède des activités endoprotéase et exopeptidase. Son numéro enzymatique est EC 3.4.11.1.

Les conditions optimales de travail de Flavourzyme sont des conditions regroupant une température proche des 50°C et un pH pouvant varier de 4 à 10. Flavourzyme est souvent utilisée dans le but de diminuer l'amertume des peptides. L'activité spécifique de cette enzyme est donnée cette fois-ci en unités Leucine Amino Peptidase par g (LAPU/g). Flavourzyme 500 MG possède une activité de 500 LAPU/g.

Flavourzyme est inactivée à partir de 75°C pendant 10 min (Dumay 2006 ; Hardouin *et al*. 2014).

Neutrase 0,8L

Neutrase 0,8L est une métallo-endoprotéase qui hydrolyse les liaisons internes des protéines et peptides. Elle fonctionne avec des co-facteurs que sont en général Ca^{2+} et Zn^{2+}. Elle est produite par fermentation de la bactérie *Bacillus amyloliquefaciens.* Son numéro enzymatique est EC 3.4.22.

Neutrase 0,8L a une température optimale située entre 40 et 50°C et un pH optimal de 7. L'activité déclarée est de 0,8 AU/g.

Neutrase peut être inactivée par chauffage à 90°C pendant 15 min (Hardouin *et al.* 2013 ; Tripoteau 2015 ; Novozyme.com 2016.).

2.2.2. Les glycosidases

Ultraflo L

Ultraflo L est une endo-β-glucanase qui hydrolyse les liaisons (1,3)- ou (1,4)-β-D-glucanes (xylanase et cellulase). Elle est extraite du champignon *Humicola insolens*. Ses numéros enzymatiques sont EC 3.2.1.6 et EC 3.2.1.8. L'enzyme Ultraflo L est reconnue par la FAO comme étant une enzyme GRAS non toxique envers les humains et les animaux.

La température optimale de l'activité enzymatique de l'Utraflo L est de 60°C et son pH de 7. L'activité déclarée est de 45 FBG[3]/g.

Ultraflo peut être inactivée par chauffage à 90°C pendant 15 min (Hardouin *et al.* 2013 ; Hardouin *et al.* 2014).

VinoTaste Pro

VinoTaste Pro est un complexe enzymatique contenant une exo-(1,3)-β-glucanase et une polygalacturonase. Son numéro de classification est EC 3.2.1.15. Ses activités déclarées sont de 2 500 PGNU/g (unité pectinase) et 75 BGXU/g (unité β-glucanase). Les enzymes sont extraites des champignons *Aspergilus niger* et *Trichoderma harzianum*.

VinoTaste Pro est active entre 5 et 60°C et à pH compris entre 2,9 et 4 (Novozyme.com 2016). Aujourd'hui, Novozyme propose VinoTaste Pro pour la vinification. L'enzyme permet d'accélérer les processus de fermentation, d'amplifier l'arôme et d'améliorer la clarification des vins jeunes (Novozyme.com, 2016).

Termamyl 120L, type L

Termamyl 120L, type L, est une α-amylase, plus précisément une 1,4-α-D-glucanohydrolase. Son numéro de classification est EC 3.2.1.1. L'enzyme est extraite de la bactérie *Bacillus licheniformis*. Son activité déclarée est de 120 KNU(S)/g. Cette activité signifie que 120 unités d'α-amylases sont nécessaires, dans des conditions optimales (pH 7,1 et à température 37°C), pour lyser 5,26 g d'amidon sec par heure. De plus, Termamyl est une enzyme thermostable, qui peut liquéfier une matrice biologique végétale entre 60 et 95°C à pH compris entre 6 et 6,5 (Hardouin *et al.* 2014, Novozyme.com, 2016).

[3] De l'anglais Fungal Beta-Glucanase Units, substrat, de glucanes, spécifique aux champignons

Shearzyme 500 L

Shearzyme 500 L est une endo-1,4-xylanase. Elle est produite par *Aspergillus orysae* qui porte le gène codant pour une xylanase d'*Aspergillus aculeatus*. Son numéro de classification est EC 3.2.1.8. L'activité enzymatique déclarée de Shearzyme est de 500 FXU/g (de l'anglais Farbe Xylanase Unit). Ainsi, l'activité enzymatique est exprimée en relation avec une activité enzymatique de référence de la xylanase extraite de *Humicola insolens*. Cette dernière xylanase a une activité de 3 550 FXU/g à un pH de 6 et à 50°C, mesurée sur une réaction pendant 30 min. Le substrat spécifique utilisé, pour cette réaction enzymatique, est le remazol-xylane.

Les conditions optimales pour que Shearzyme 500 L soit active sont une température comprise entre 45 et 65 °C et un pH situé entre 4 et 6. Shearzyme 500 L est principalement utilisée dans la production d'alcool et notamment pour abaisser la viscosité.

AMG 300L

AMG 300L est une exo-1,4-α-D-glucanase (glucoamylase) obtenue à partir d'*Aspergillus niger*. Son nom systématique est 1,4-α-D-glucane glucohydrolase (EC 3.2.1.3).

Les conditions optimales de l'activité enzymatique d'AMG 300L sont les suivantes : une température de 60 °C et un pH de 4,5. AMG 300L est utilisée dans la production de boissons alcoolisées. Elle sert à dégrader l'amidon et les dextrines des matrices végétales et participe alors à la formation des sucres fermentescibles en alcool par les levures (Hardouin *et al.* 2014, Novozyme.com, 2016).

En conclusion, les enzymes ont des activités qui ne s'expriment pas dans les mêmes unités. En effet, elles ne catalysent pas les mêmes réactions et les substrats sont différents. Pour pouvoir comparer l'efficacité des enzymes, dans la libération de composés hydrosolubles de *S. chordalis*, notamment par rapport à leur activité spécifique, ces complexes enzymatiques ont été traités de la même manière (avant, pendant et après expérimentations).

Le terme enzyme est utilisé pour chacun de ces complexes enzymatiques, tout au long du manuscrit, dans un but de lisibilité. Le taux de MS des enzymes a été mesuré et utilisé pour

l'EAE. En effet, certaines enzymes commerciales se présentent sous forme solide et d'autres sous forme liquide. Les taux de MS des enzymes ainsi que leur prix, quand ils étaient disponibles, sont présentés dans le **Tableau III. IV.**

*

Tableau III. IV Activités, taux de matière sèche et prix des enzymes *(par Novozyme)* utilisées pour cette étude.

Nom enzyme	Activité déclarée	Taux de matière sèche *(% du produit commercial sous forme solide ou liquide)*	Prix de référence (selon conditionnement) *(€ /kg)*
Ultraflo L	endo-1,3(4)-β-glucanase	27,2 ± 0,3	15
VinoTaste Pro	exo-(1,3)-β-glucanase, polygalacturonase	93,8 ± 0,1	120-160
Thermamyl 120 L type L	1,4-α-amylase	51,0 ± 0,2	ND
Shearzyme 500 L	endo-(1,4)-xylanase	26,3 ± 0,1	11,5
AMG 300L	exo-(1,4)-α-glucanase	36,0 ± 0,1	ND
Alcalase 2,4L	endo-subtilisine	55,6 ± 0,1	ND
Flavourzyme 500 MG	endo- et exopeptidase	99,6 ± 0,1	ND
Neutrase 0,8L	métallo-endo-protéase	57,2 ± 0,3	28,8 (achat par 25 kg)

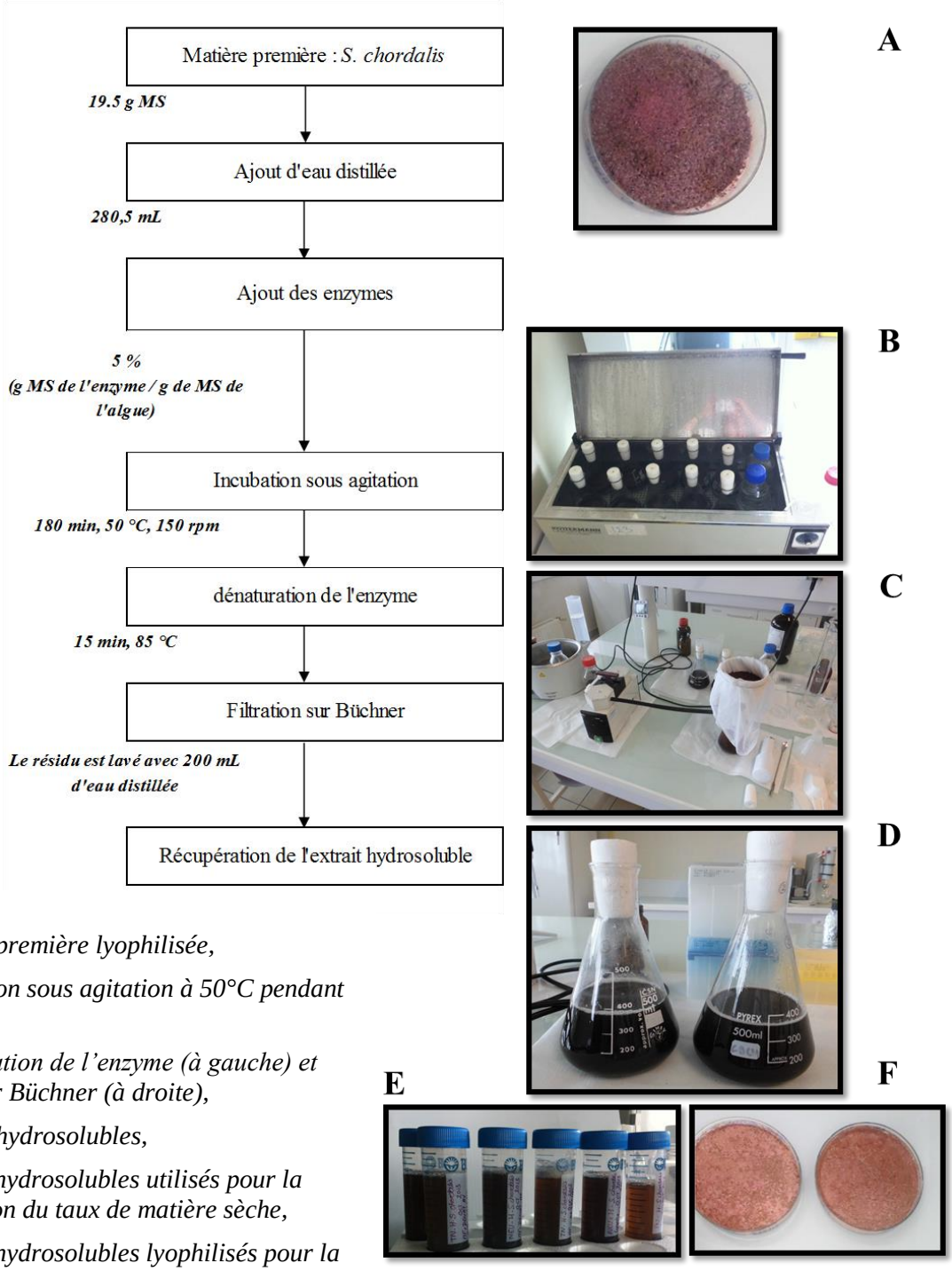
Légende :
ND : Non disponible

2.3. Extractions

Afin de caractériser la matière première de *S. chordalis* d'octobre 2013, des extractions acides et à l'eau, dont les protocoles sont décrits dans le Chapitre II (*Cf.* Chapitre II 2.3.1. Extractions acides et à l'eau pour la caractérisation de la matière première, page 117) ont été réalisées.

L'EAE a été effectuée dans un volume final de 300 mL d'eau distillée contenant 19,5 g de matière sèche de *S. chordalis* (rapport de 6,5 %). Les enzymes, à hauteur de 5 % (MS de l'enzyme / MS de l'algue) sont ensuite ajoutées. Une incubation de ce mélange sous agitation (environ 150 rpm) est effectuée à 50°C pendant 180 min. Après cette incubation, les enzymes sont dénaturées à 85°C pendant 15 min. Les extraits hydrosolubles (EHs) sont filtrés sur Büchner et séparés du résidu lavé à l'eau distillée. Les EHs sont lyophilisés et stockés à l'obscurité et à température ambiante (18-22 °C) jusqu'à utilisation. En outre, un témoin négatif a servi de contrôle. Il a été obtenu dans les mêmes conditions d'extraction (180 min à 50°C) sans apport d'enzyme. Chaque extraction a été effectuée en triplicat.

Le protocole de l'EAE est schématisé sur la **Figure 3. 6**.



Légende :
***A** : matière première lyophilisée,*

***B** : incubation sous agitation à 50°C pendant 180 min,*

***C** : dénaturation de l'enzyme (à gauche) et filtration sur Büchner (à droite),*

***D** : extraits hydrosolubles,*

***E** : extraits hydrosolubles utilisés pour la détermination du taux de matière sèche,*

***F** : extraits hydrosolubles lyophilisés pour la détermination de la composition biochimique.*

Figure 3. 6 Protocole de l'EAE.

2.4. Détermination du rendement d'extraction de l'EAE

Le rendement de l'EAE représente la proportion, en pourcentage, du poids de la matière sèche de *S. chordalis* mesuré dans les EHs. Le poids sec des EHs a été déterminé par gravimétrie après une incubation des EHs sous forme liquide (**Figure 3. 6 E**) à 100 °C jusqu'à masse constante. Dans les calculs, la masse de l'enzyme a été soustraite.

2.5. Analyses de la composition biochimique

Les compositions biochimiques de *S. chordalis* et des EHs sont définies par les proportions, en pourcentage, de chaque famille de composés dosés (protéines, sucres totaux, acides uroniques, matière minérale et groupements sulfates). Ces proportions ont été évaluées sur la matière sèche de la matière première et des EHs.

Les protocoles des dosages biochimiques sont détaillés dans le Chapitre II (*Cf.* Chapitre II 2.4 Analyse de la composition biochimique, pages 119-130).

La teneur en lipides de *S. chordalis* d'octobre 2013 a été mesurée afin de compléter la caractérisation de cette matière première. Les lipides ont été extraits dans un mélange de chloroforme/méthanol (1 :1, v/v) pendant deux jours sous agitation. L'extrait a ensuite été filtré et lavé avec de l'eau distillée. La teneur en lipides a été déterminée par gravimétrie (Kendel *et al.* 2015).

2.6. Plan d'expériences de Box Behnken pour l'optimisation des conditions de l'EAE.

Trois paramètres ont été étudiés : le temps d'extraction, la température et le ratio enzyme sur substrat (E/S). Pour chacun de ces paramètres, trois modalités ou valeurs ont été testées. Le rendement d'extraction des composés hydrosolubles a été mesuré pour chacune des conditions d'extraction. Treize essais, au total, ont été réalisés en triplicat (**Tableau III. V**).

Tableau III. V Plan d'expérience de Box Behnken avec les valeurs de chaque paramètre étudiées pour l'EAE avec l'enzyme la plus efficace

Valeurs des paramètres étudiés	**Temps de l'extraction** *(min)*	**Température** *(°C)*	**E/S** *(% MS enzyme/MS algue)*
-1	90	25	2,5
0	180	37,5	5
1	270	50	7,5

L'ordre des expériences a été fait au hasard (*Cf.* **Tableau III. III** , page 197).

Pour vérifier le modèle d'optimisation, prédit par les analyses mathématiques et statistiques à partir des résultats obtenus des treize essais du plan de Box-Behnken, des expériences sous les conditions optimisées ont été menées.

Le pH n'a pas été étudié dans cette étude. Lors de travaux préliminaires, le pH a été mesuré au cours du temps, pendant plus de 250 min, lors d'EAEs avec les différentes enzymes. Le pH évoluait peu. Le pH est compris entre 6 et 7.

2.7. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes avec leurs écarts-types. Les analyses mathématiques et statistiques ont été réalisées avec le logiciel Minitab 17. Une analyse de variance à un facteur (ANOVA) a été employée selon le test de Fisher de la plus petite différence significative (LSD, $p < 0,05$). Cette analyse statistique a été utilisée afin d'évaluer les différences entre les rendements d'extraction des EHs et entre les paramètres d'extraction étudiés.

3. Résultats et Discussions

La démarche scientifique suivie au cours de cette étude est schématisée sous forme d'organigramme, présenté sur la **Figure 3. 7**.

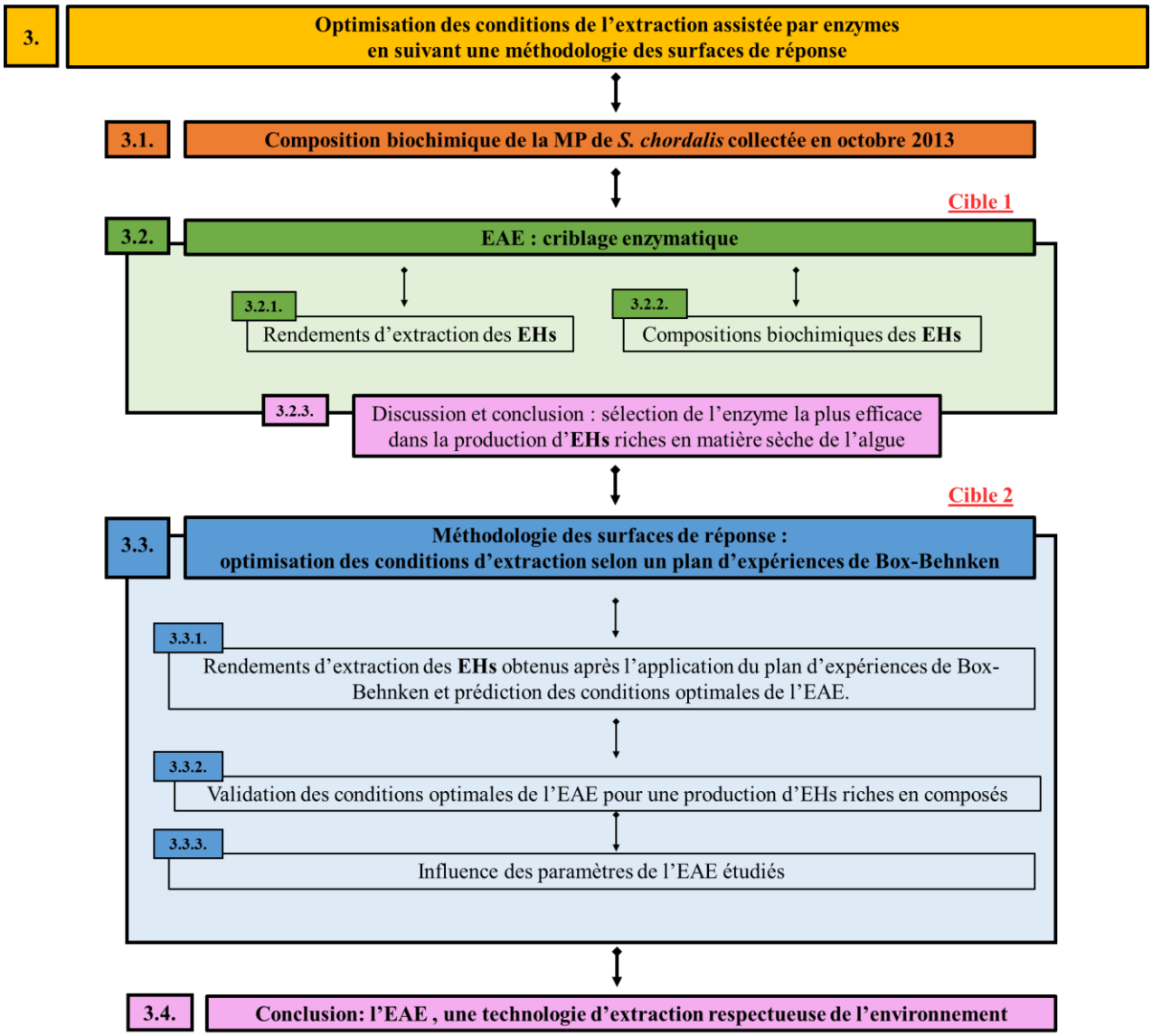


Figure 3. 7 Démarche scientifique suivie pour l'étude de l'optimisation de l'Extraction Assistée par Enzymes (EAE) suivant une méthodologie des surfaces de réponse. Les extraits hydrosolubles (**EHs**) sont tous issus de la même matière première (**MP**) de *S. chordalis* collectée en octobre 2013, lors de grands échouages. Les deux cibles mentionnées dans la partie introductive de ce chapitre sont rappelées sur cet organigramme.

Dans cette étude, la production d'EHs riches en matière sèche de *S. chordalis* a été réalisée en utilisant des enzymes. Après avoir sélectionné l'enzyme la plus efficace parmi huit enzymes de différentes activités, un plan d'expériences a été mené pour augmenter le rendement d'extraction et pour étudier l'influence des paramètres sur l'EAE par la méthodologie des surfaces de réponse.

3.1. Composition biochimique de la MP de S. chordalis collectée en octobre 2013

La composition biochimique de la macroalgue rouge *S. chordalis* sur laquelle ont été effectuées toutes les EAEs est donnée dans le Tableau **III. VI**.

Tableau III. VI Taux de matière sèche et composition biochimique de *S. chordalis.*

	Taux de matière sèche	Matière minérale	Protéines	Lipides	Acides uroniques	Groupements sulfates	Sucres totaux
	(% MF) [a]	*(% MS)* [b]	*(% MS)* [b]	*(% MS)* [b]	*(% MS)* [b]	*(% MS)* [b]	*(% MS)* [b]
S. chordalis	10,0 ± 0,6	43,3 ± 3,1	22,0 ± 2,0	3,0 ± 0,1	3,1 ± 0,1	14,7 ± 1,0	31,7 ± 0,7

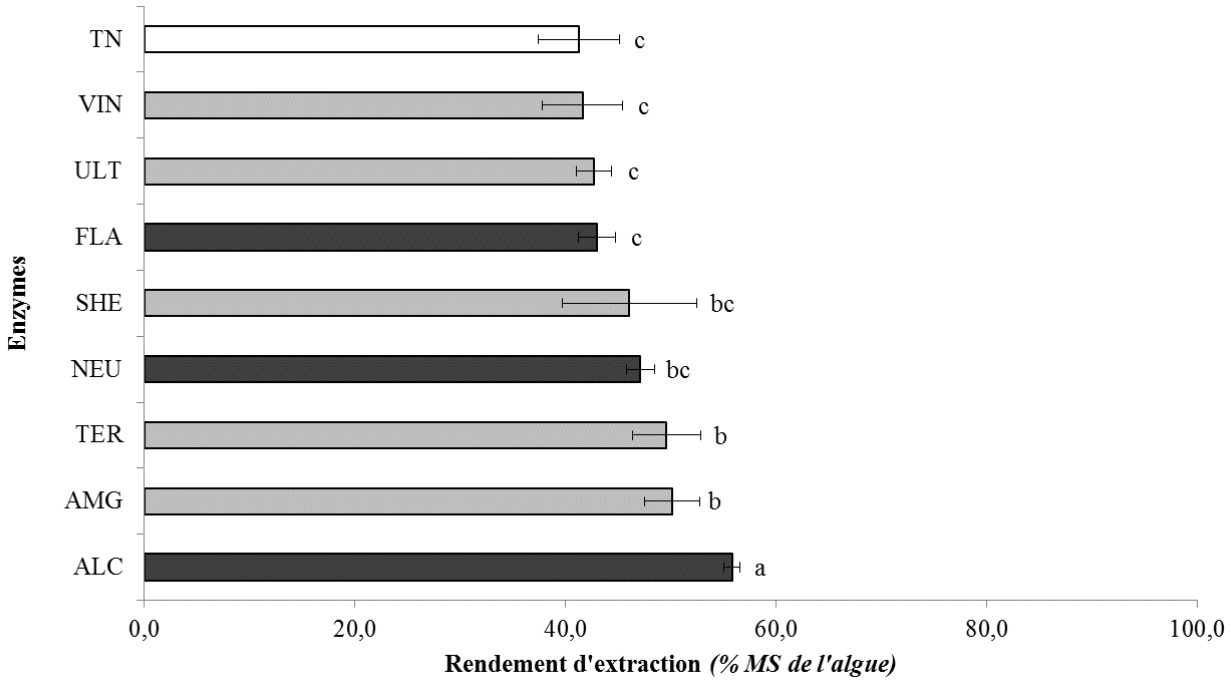
Légende :
[a] *pourcentage de la matière sèche dans la matière fraîche (MF) de l'algue.*
[b] *teneur calculée dans la matière sèche de l'algue.*
Les valeurs représentent des moyennes avec leurs écarts-types (n=9).

La composition biochimique de *S. chordalis* est en accord avec la littérature, comme il a déjà été confirmé dans le chapitre II de ce manuscrit (*Cf.* Chapitre II 3.3 Impact des saisons sur la qualité, page 157).

3.2. Extraction Assistée par Enzymes : criblage enzymatique

3.2.1. Rendements d'extraction des extraits hydrosolubles (EHs)

L'effet des huit enzymes testées, indépendamment les unes des autres, sur le rendement d'extraction est montré sur la **Figure 3. 8.**



Légende :
TN : témoin négatif ; VIN : VinoTaste Pro ; ULT : Ultraflo L ; FLA : Flavourzyme 500MG ; SHE : Shearzyme 500L ; NEU : Neutrase 0,8L ; TER :Termamyl 120L, type L ; AMG :AMG 300L ; ALC : Alcalase 2,4L FG.

Les valeurs des moyennes avec leurs écarts-types (n=9) possédant des lettres différentes sont significativement différentes (p<0,05) selon le test de Fisher LSD. L'ordre des lettres est corrélé avec l'efficacité de l'extraction.

Les EHs obtenus après l'action de protéases sont indiqués par des barres en gris foncé. Les EHs obtenus près l'action de glycosidases sont indiqués par des barres en gris clair.

Figure 3. 8 Rendements d'extraction des EHs obtenus à partir de *S. chordalis*, après EAE (180 mn, 50°C, 5% E/S).

Tous les EHs obtenus après l'action d'enzymes, quel que soit le type d'activité, ont montré un meilleur rendement d'extraction de la MS de l'algue que celui du témoin négatif. La protéase Alcalase est significativement la plus efficace dans la libération de composés hydrosolubles. En effet, près de 60 % (55,8%) de la MS de l'algue de départ sont extraits dans

l'eau. Un gain de 30 % est obtenu grâce à l'Alcalase, en comparaison avec le rendement d'extraction obtenu chez le témoin négatif (41,3 % de la MS de l'algue). Les rendements d'extraction des EHs produits après les actions des glycosidases AMG, Termamyl et Shearzyme ainsi qu'après l'action de la protéase Neutrase ne sont pas significativement différents et sont compris entre 46,1 et 50,1 % de la MS de l'algue. Cependant, seules les enzymes AMG et Termamyl permettent un rendement d'extraction supérieur à celui du témoin négatif de manière significative. Les EHs obtenus après l'action des autres enzymes (Ultraflo, VinoTaste et Flavourzyme) et l'EH du TN montrent des rendements d'extraction similaires, entre 41,3 et 43,0 % des composés totaux présents chez *S. chordalis.*

3.2.2. Compositions biochimiques des extraits hydrosolubles (EHs)

Les proportions de chaque famille de composés hydrosolubles, qui composent la matière sèche retrouvée dans les EHs, sont présentées dans le **Tableau III. VII.**

Tableau III. VII Compositions biochimiques des EHs après l'action de différentes enzymes (180 min, 50°C, 5 % E/S).

	Sucres totaux *(% MS)* *	Groupements sulfates *(% MS)*	Acides uroniques *(% MS)*	Protéines *(% MS)*	Matière minérale *(% MS)*	Autres *(% MS)*
TN	^{g} 12,8 ± 0,1	^{f} 1,6 ± 0,4	^{b} 1,0 ± 0,1	^{d} 4,5 ± 0,1	^{a} 70,9 ± 1,0	^{b} 9,2 ± 1,7
AMG	^{d} 22,8 ± 0,9	^{ab} 3,7 ± 0,2	^{c} 0,6 ± 0,1	^{abc} 8,4 ± 0,6	^{b} 64,2 ± 0,4	^{c} 0,3 ± 2,1
TER	^{cd} 24,1 ± 1,3	^{cd} 2,7 ± 0,3	^{b} 1,0 ± 0,1	^{abc} 7,8 ± 0,8	^{d} 55,0 ± 0,9	^{b} 9,4 ± 3,4
SHE	^{e} 19,9 ± 0,8	^{b} 3,4 ± 0,3	^{d} 0,2 ± 0,1	^{c} 7,1 ± 0,1	^{b} 64,0 ± 4,4	^{bc} 5,4 ± 5,7
ULT	^{h} 9,1 ± 1,5	^{de} 2,3 ± 0,3	^{b} 1,1 ± 0,1	^{d} 5,3 ± 0,2	^{b} 64,0 ± 4,6	^{a} 18,3 ± 6,7
VIN	^{a} 33,3 ± 0,8	^{b} 3,3 ± 0,1	^{d} 0,2 ± 0,1	^{ab} 8,5 ± 0,7	^{bcd} 58,9 ± 2,4	^{c} 0,1 ± 4,1
ALC	^{b} 27,5 ± 0,3	^{bc} 3,2 ± 0,1	^{d} 0,3 ± 0,2	^{a} 8,9 ± 2,0	^{cd} 56,5 ± 1,6	^{bc} 3,6 ± 4,2
NEU	^{f} 17,6 ± 0,8	^{ef} 1,9 ± 0,2	^{a} 1,3 ± 0,1	^{a} 8,8 ± 0,4	^{bc} 61,2 ± 6,6	^{b} 9,3 ± 8,1
FLA	^{c} 25,4 ± 1,2	^{a} 4,2 ± 0,5	^{c} 0,5 ± 0,1	^{bc} 7,3 ± 0,3	^{b} 63,9 ± 0,5	^{c} 0,1 ± 2,6

Légende :
TN : témoin négatif ; VIN : VinoTaste Pro ; ULT : Ultraflo L ; FLA : Flavourzyme 500MG ; SHE : Shearzyme 500L ; NEU : Neutrase 0,8L ; TER : Termamyl 120L, type L ; AMG :AMG 300L ; ALC : Alcalase 2,4L FG.

Les valeurs sont des moyennes avec leurs écarts-types (n=9).
Pour chaque colonne, les valeurs avec des lettres différentes sont significativement différentes (p<0,05) selon le test de Fisher LSD. L'ordre des lettres est corrélé avec la teneur des composés.

Les composés libres et accessibles des EHs ont été dosés. La dernière colonne du **Tableau III. VII**, intitulée « Autres », regroupe des composés non-identifiés. Leur teneur a été calculée en soustrayant la somme des teneurs des composés dosés de la MS totale de l'algue solubilisée dans l'EH (100 %). Les composés non-identifiés peuvent correspondre à des agglomérats ou à d'autres composés qui ne sont pas détectés par les analyses biochimiques utilisées.

Toutes les EAEs, quelle que soit l'enzyme, solubilisent dans l'eau une proportion importante de matière minérale, entre 55,0 et 62 %. Néanmoins, la proportion de la matière organique (protéines, sucres totaux, groupements sulfates, acides uroniques) est plus importante dans les EHs après l'action d'enzymes. En effet, moins de 20 % de matière organique ont été obtenus dans le témoin négatif, alors que plus de 45 % ont été mesurés dans les EHs après l'action des différentes enzymes. Dans les EHs, entre 9,1 et 33,3 % de sucres totaux ont été obtenus, alors que seulement 4,5 à 8,9 % de protéines accessibles dans l'eau ont été dosés. Peu de groupements sulfates (1,6 à 4,2 %) et d'acides uroniques (0,2 à 1,3 %) ont été détectés. Ces faibles teneurs ont également été remarquées dans les études d'Hardouin *et al*. 2013 chez *S. chordalis* et de Kulshreshtha *et al.* 2015 chez *C. crispus*. Les protéases Alcalase et Neutrase permettent d'accéder à de fortes proportions en protéines (8,9 et 8,8 % de la MS). La glycosidase VinoTaste a permis d'accéder à la proportion la plus élevée en sucres totaux (33,3 %) suivie par la protéase Alcalase (27,5 %) (**Tableau III. VII**).

3.2.3. Discussion et conclusion : sélection de l'enzyme la plus efficace pour la production d'EHs riches en matière sèche de l'algue.

Les enzymes produites par des microorganismes peuvent être utilisées pour digérer les algues en dégradant leurs parois cellulaires. Elles permettent ainsi d'accéder au contenu cellulaire et de solubiliser les composés algaux dans de l'eau (Wijesinghe et Jeon 2012; Hardouin *et al.* 2014). La stratégie employée dans cette étude a été de cribler différents complexes enzymatiques commerciaux avec différentes activités sur le même substrat et dans des conditions d'extraction identiques (50°C, 180 et 5% E/S). Afin de comparer l'effet de ces enzymes, le rendement d'extraction ainsi que la composition biochimique des EHs ont été déterminés.

Des conditions d'extraction similaires (50°C, 300 min, 5% E/S) ont été appliquées sur *S. chordalis* dans une étude antérieure (Hardouin *et al.* 2013). Dans cette présente étude, le rendement d'extraction du témoin négatif atteint 40 % de la MS alors qu'Hardouin *et al*. (2013) ont trouvé un rendement d'extraction proche des 15 %. Dans leur étude, ils ont testé six enzymes dont deux protéases et quatre glycosidases. Les rendements d'extraction varient de 15 à 25 % de la MS. Seuls deux paramètres changent entre l'étude d'Hardouin *et al.* (2013) et cette présente étude : le temps d'extraction et le mois de collecte de *S. chordalis.*

L'un des paramètres différents est la composition biochimique de la matière première, qui est aussi une variable à prendre en considération dans l'extraction. Hardouin *et al.* (2013) ont trouvé plus de sucres totaux (près de 10 % de plus) chez *S. chordalis* que dans cette présente étude. Les divers polysaccharides en grande quantité et leurs interactions avec d'autres constituants de la paroi cellulaire réduisent l'efficacité des extractions aqueuses en présence ou non d'enzymes (Dumay *et al.* 2013). Une quantité importante des sucres totaux contribuant à la constitution des polysaccharides pariétaux affaiblit l'efficacité des enzymes et par conséquent l'extraction des composés de l'algue dans l'eau. Quant au deuxième paramètre qui diffère, il s'agit du temps d'extraction. Shen *et al.* (2008) ont mené des études sur l'extraction des protéines du thé en utilisant aussi des enzymes. Ils ont optimisé les conditions d'extraction notamment en analysant les paramètres d'extraction. Ils ont montré que le temps d'extraction était corrélé positivement avec le rendement d'extraction des protéines. Néanmoins, après 4-8 heures, l'effet du temps de l'extraction devient moins significatif (Shen *et al*. 2008).

La nature des constituants de la paroi cellulaire des algues rouges est connue (*Cf.* Chapitre I. 4.2.1.7.2. Les polysaccharides pariétaux, page 63), contrairement à leur organisation en trois dimensions. Les protéases semblent plus efficaces dans l'obtention d'extraits riches en composés hydrosolubles de l'algue que les glycosidases. Dans cette étude, le rendement d'extraction maximum a permis d'atteindre près de 60 % de la MS de l'algue avec la protéase Alcalase.

Alcalase est une endoprotéase subtilisine. L'hydrolyse par une protéase à sérine semble être une étape essentielle dans la dégradation sélective de la paroi cellulaire de *S. chordalis*. En effet, Alcalase lyse, avec une faible spécificité, les liaisons peptidiques, des protéines ou des glycoprotéines de la paroi cellulaire. Il a été vu dans les chapitres précédents, que les algues

rouges possèdent les teneurs en protéines les plus importantes, comparées aux autres groupes d'algues (brunes et vertes). Les protéines et/ou les glycoprotéines dégradées avaient un rôle important dans la structure et dans l'organisation des constituants de la paroi cellulaire.

En outre, des rendements d'extraction de plus de 50 % de la MS de l'algue ont été obtenus dans les extraits après les actions des glycosidases Termamyl et AMG. Elles présentent toutes les deux une activité glucoamylase en α-(1,4) (*Cf.* Matériels et méthodes, pages 202-203). Parmi les constituants de *S. chordalis* listés dans le premier chapitre de ce manuscrit *(Cf.* Chapitre I : Les algues rouges dont *Solieria chordalis*, pages 17 à 88*)*, l'amidon floridéen présente des liaisons α-1,4 glucanes ainsi que quelques polysaccharides éventuels se trouvant dans le mucilage complexe des parois cellulaires comme l'hémicellulose (Craigie 1990*)*. Ainsi l'hydrolyse de l'amidon floridéen à l'intérieur des cellules, de même que l'hydrolyse de certains polysaccharides du mucilage pariétal sembleraient aussi pertinentes pour extraire des composés hydrosolubles. Les enzymes pourraient atteindre l'amidon floridéen des cellules par l'effet de l'hydrolyse sous agitation à une température de 50°C. L'amidon floridéen fragmenté pourrait entraîner l'éclatement des cellules et la libération de composés.

Des études sur la caractérisation tridimensionnelle de la paroi cellulaire des algues rouges sont nécessaires afin de comprendre et d'améliorer l'action d'enzymes appliquées.

En conclusion, l'utilisation des enzymes améliore la disponibilité et l'accessibilité des composés algaux potentiellement actifs présents dans les EHs (Dumay *et al.* 2013). Selon la nature, la sélectivité et la spécificité des enzymes, les compositions biochimiques des EHs sont différentes. En accord avec des études antérieures, l'utilisation de la liquéfaction enzymatique d'algues rouges représente une alternative utile qui hydro-solubilise les protéines, les acides uroniques, les sucres totaux et les groupements sulfates dans des conditions d'extraction douces, ce qui est un avantage pour de nombreuses applications (Wijesinghe et Jeon 2012; Hardouin *et al.* 2014; Prajapati *et al.* 2014).

La protéase Alcalase a été sélectionnée pour la suite de l'étude concernant l'optimisation des conditions de l'EAE. En effet, cette enzyme a permis d'obtenir le meilleur rendement d'extraction. De plus, les EHs produits possèdent des compositions biochimiques de qualité avec de fortes teneurs en protéines, en sucres totaux, en acides uroniques et en groupements sulfates.

3.3. Méthodologie des surfaces de réponse : optimisation des conditions d'extraction selon un plan d'expériences de Box-Behnken

3.3.1. Rendements d'extraction des EHs obtenus après l'application du plan d'expériences de Box-Behnken et prédiction des conditions optimales de l'EAE.

Les rendements d'extraction obtenus pour chaque EH produit selon le plan d'expériences de Box Behnken sont donnés dans le **Tableau III.VIII.**

Tableau III. VIII Conditions de l'extraction assistée par la protéase Alcalase et réponses obtenues correspondant au rendement d'extraction des composés hydrosolubles de *S. chordalis* après application du plan d'expériences de Box-Behnken.

Essai	Conditions d'extraction assitée par Alcalase			Réponse obtenue
N°	Temps d'extraction (min)	Température (°C)	E/S (% MS/MS)	Rendement de l'EAE (% MS de l'algue)
1	180	25	2,5	^{bc} 53,9 ± 1,9
2	270	37,5	2,5	^{cde} 51,7 ± 2,5
3	180	50	2,5	^{ab} 57,5 ± 2,1
4	90	37,5	2,5	^{f} 35,6 ± 4,0
5	90	25	5	^{e} 46,1 ± 6,8
6	270	25	5	^{cde} 49,6 ± 1,6
7	90	50	5	^{de} 48,4 ± 2,9
8	270	50	5	^{de} 48,0 ± 2,8
9	180	25	7,5	^{bc} 54,0 ± 1,4
10	270	37,5	7,5	^{ab} 56,5 ± 2,5
11	180	50	7,5	^{a} 59,4 ± 1,6
12	90	37,5	7,5	^{f} 40,4 ± 1,7
13	180	37,5	5	^{bcd} 52,4 ± 3,0

Légende :

Les valeurs sont des moyennes avec leurs écarts-types (n=9).
Les valeurs avec des lettres différentes sont significativement différentes (p<0,05) selon le test de Fisher LSD. L'ordre des lettres est corrélé avec le rendement d'extraction.

D'après le **Tableau III.VIII**, les meilleurs rendements d'extraction ont été obtenus par trois conditions d'EAE proposées par le plan d'expériences de Box-Behnken. Il s'agit des essais n°3, 10 et 11 avec un rendement maximum de 59,4 % (essai n°11). Comparé aux conditions d'extraction appliquées lors du criblage enzymatique avec Alcalase, le rendement augmente de 6,5 % si le ratio E/S est de 7,5 % au lieu de 5 %, pour une extraction à la même température (50°C) et pendant une même durée d'extraction (180 min).

Une durée d'extraction de 180 à 270 min est nécessaire afin d'atteindre un maximum de composés hydrosolubles. De plus, 90 min ne suffisent pas à dégrader la paroi cellulaire quels que soient les autres paramètres étudiés.

La température testée la plus élevée (50°C) a permis d'extraire un maximum de composés hydrosolubles pendant 180 min. Néanmoins, à 25 et à 37,5 °C, des rendements d'extraction intéressants ont été mesurés (52,4 et 56,5 % de la MS de l'algue).

Quant au ratio E/S, il est remarqué que pour deux des meilleures conditions d'extractions, ces dernières ont été assistées avec 7,5 % d'Alcalase (essais n°10 et 11).

Selon les réponses obtenues pour chaque essai du plan d'expériences (**Tableau III. VIII**), la meilleure équation de régression du modèle mathématique expliquant le rendement de l'EAE en fonction des trois paramètres étudiés avec T, la température (°C), t, le temps d'extraction (min) et E/S, le ratio enzyme sur substrat (% MS/MS), est la suivante :

$$EAE\ \% = 34{,}4 - 1{,}2 \times T + 4{,}1.10^{-1} \times t - 1{,}4 \times (E/S) + 1{,}8.10^{-2} \times T^2 - 9{,}0.10^{-4} \times t^2 + 1{,}5.10^{-1} \times (E/S)^2 - 8{,}7.10^{-4} \times T \times t + 1{,}4.10^{-2} \times T \times (E/S) + 7{,}0.10^{-5} \times t \times (E/S)$$

Les résultats des analyses des variances des paramètres d'extraction sont listés dans la **Tableau III. IX**. Tout d'abord, le fort coefficient de corrélation (R^2 = 0,69) indique que le modèle proposé explique 69 % de la variabilité du rendement de l'EAE. Comme dans l'étude de Ye *et al*. (2015), le F-test a été utilisé pour vérifier la significativité statistique de l'équation de régression du modèle (Ye *et al.* 2015). Les valeurs de p servent à vérifier la significativité de chaque coefficient et donne ainsi une information sur le profil des interactions entres les paramètres analysés.

Tableau III. IX Analyses des variances des paramètres d'extraction pour la réponse du rendement d'extraction des EHs.

Source	Valeur de F	Valeur de p
Modèle	5,50	0,000*
Linéaire	10,58	0,000*
T	1,76	0,196
t	17,87	0,000*
E / S	0,17	0,683
Carré	11,05	0,000*
T^2	2,64	0,116
t^2	16,93	0,000*
$(E/S)^2$	0,26	0,614
Interaction à 2 facteurs	0,21	0,885
T × t	0,53	0,473
T × (E / S)	0,11	0,739
t × (E / S)	0,00	0,990

R^2 = 0,69
* significatif à 1 %

De plus, le modèle généré a permis de prédire les conditions optimales afin de maximiser le rendement d'extraction de composés hydrosolubles de l'algue. Selon ce modèle mathématique, un rendement d'extraction optimal de 59,7 % serait obtenu pour une extraction réalisée avec 7,5 % d'Alcalase, à 50 °C et pendant 200 min. Ces conditions optimales permettraient de répondre avec une désirabilité de 96,6 %.

Des graphiques en trois dimensions montrant les effets du temps d'extraction, de la température et du ratio E/S, de manière simultanée, sont illustrés sur la **Figure 3. 9.** Pour chaque graphique, un des trois paramètres optimaux a été fixé.

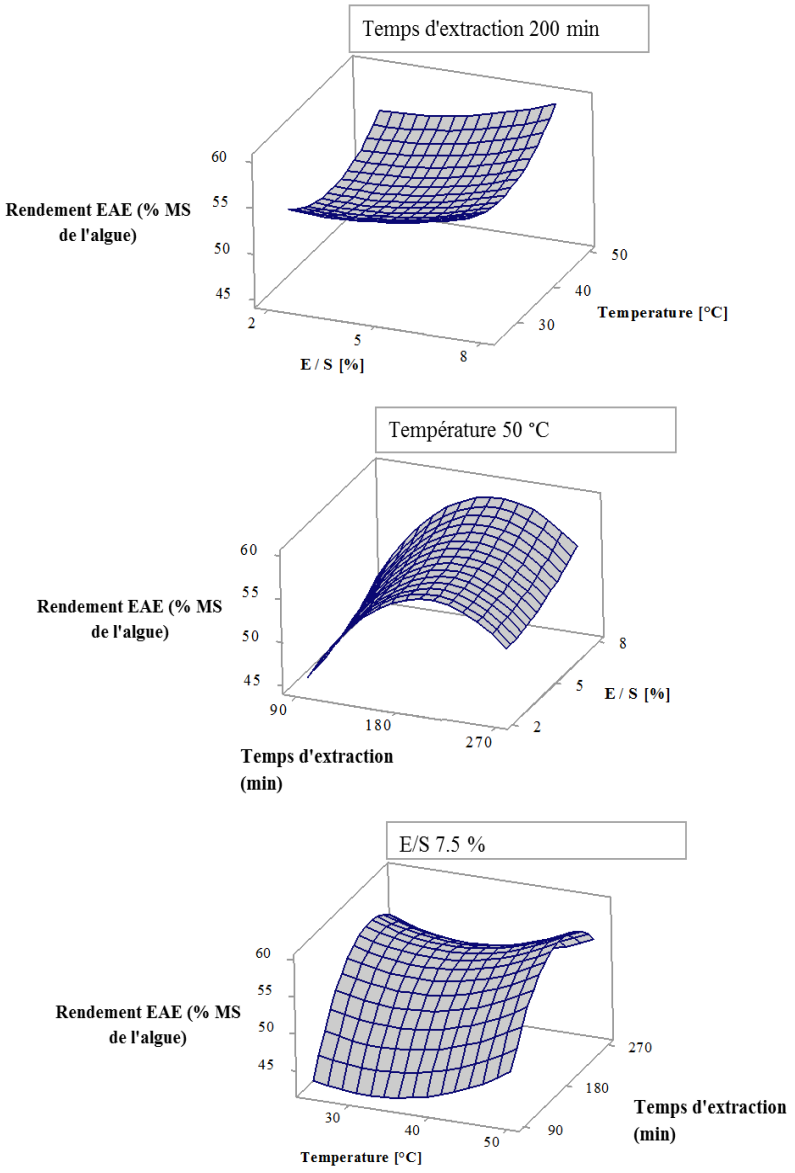


Figure 3. 9 Surfaces de réponses du rendement d'extraction assistée par Alcalase, estimées selon le temps d'extraction, la température et le ratio E/S.

Après environ 200 min d'extraction, la solubilisation des composés de l'algue n'augmente plus. Selon les résultats des **Tableaux III. VII** et **III. VIII** et de la **Figure 3. 9**, le temps d'extraction est le paramètre le plus influent sur l'extraction des composés hydrosolubles de *S. chordalis* ($p < 0,001$). Il joue un rôle dominant dans le procédé pour augmenter la solubilisation de ces derniers. Quant aux paramètres de la température et du ratio E/S, ils n'influencent pas de manière significative le rendement d'extraction, sur les intervalles des valeurs testées expérimentalement.

3.3.2. Validation des conditions optimales de l'EAE pour une production d'EHs riches en composés.

Les résultats obtenus après avoir optimisé les conditions d'extraction assistée par l'Alcalase selon le plan d'expériences du Box-Behnken sont présentés sur le **Tableau III. X.**

Tableau III. X Valeurs prédites mathématiquement selon des conditions optimales d'extraction et valeurs obtenues après expérience.

Réponse	Prédiction	Limite inférieure (95 %)	Limite supérieure (95 %)	Valeur obtenue après l'expérience
EAE yield *(% dw)*	59,2 ± 2	54,8	64,6	57,9 ± 2

Dans les conditions optimales (50°C, pendant 200 min et avec 7,5 % d'Alcalase), un rendement d'extraction de 57,9 % de la MS de l'algue a été mesuré. Cette valeur fait partie des plus élevées parmi les valeurs obtenues après l'application du plan d'expériences de Box-Behnken (**Tableau III-VIII**). De plus, ce rendement d'extraction se trouve entre les limites inférieure et supérieure, dans un intervalle de confiance de 95 % (54,8 - 64,6 %). Par conséquent, le modèle mathématique est vérifié et validé.

L'optimisation des conditions d'extraction assistée par la protéase Alcalase a permis d'obtenir un gain non significatif de 4 %.

Toutes les valeurs obtenues durant cette étude concernant les rendements d'extraction et les compositions biochimiques des EHs sont récapitulées dans le **Tableau III. XI.**

Tableau III. XI Résumé des conditions de l'EAE avec la protéase Alcalase et résultats des rendements d'extraction et des compositions biochimiques de EHs obtenus, avant et après optimisation.

		Contrôle	EAE avec Alcalase	
		Témoin négatif	Avant optimisation	Après optimisation
Température *(°C)*		50	50	50
Temps d'extraction *(min)*		180	180	200
ratio E/S *(%)*		0	5	7,5
Rendement d'extraction *(% MS de l'algue trouvée dans l'EH)*		^{b} 43,1 ± 4,5	^{a} 55,8 ± 0,8	^{a} 57,9 ± 2,0
Composition biochimique *(% MS de l'EH)*	Sucres totaux	^{b} 12,8 ± 0,1	^{a} 27,5 ± 0,3	^{b} 13,1 ± 0,8
	Acides uroniques	^{a} 1,1 ± 0,1	^{b} 0,3 ± 0,2	^{a} 1,3 ± 0,1
	Groupements sulfates	^{b} 1,6 ± 0,4	^{a} 3,2 ± 0,1	^{b} 1,7 ± 0,3
	Protéines	^{c} 4,5 ± 0,1	^{b} 8,9 ± 2,0	^{a} 14,7 ± 2,8
	Matière minérale	^{a} 70,9 ± 1,0	^{b} 56,5 ± 1,6	^{c} 51,3 ± 2,2
	Autres	^{b} 9,2 ± 1,7	^{b} 3,6 ± 4,2	^{a} 17,9 ± 6,2

Légende :

Les valeurs sont des moyennes avec leurs écarts-types (n=9).
Pour chaque ligne, les valeurs avec des lettres différentes sont significativement différentes (p<0,05) selon le test de Fisher LSD. L'ordre des lettres est corrélé avec la quantité des composés hydrosolubles.

Concernant la composition biochimique des EHs, ceux obtenus après l'action de la protéase Alcalase et après optimisation sont plus riches en matière organique et en particulier en protéines (14,7 %). En outre, ils contiennent moins de matière minérale.

3.3.3. Influence des paramètres de l'EAE étudiés

Un plan d'expériences a été utilisé afin d'étudier l'influence de différents paramètres sur l'extraction de composés hydrosolubles.

Comme il a été observé sur la **Figure 3. 9,** une augmentation de la libération des composés hydrosolubles est perceptible de 90 à 200 min. Après 200 min, le rendement d'extraction reste sensiblement le même. Néanmoins, certaines études ont montré des extractions assistées par enzymes pendant 12 à 48 h (Hardouin *et al.* 2014). Le temps d'extraction joue un rôle sur la quantité des composés libérés dans l'eau, sur le court terme et sur la qualité de ces composés sur le long terme. Les enzymes attaquent d'abord la biomasse algale pour libérer des composés et avec le temps, elles accèdent aux composés hydrosolubilisés et les transforment en des composés de plus petites tailles.

Cependant, la proportion des sucres totaux après optimisation baisse dans cette présente étude, alors que la proportion des composés non-identifiés augmente (**Tableau III. XI**). Ce résultat peut être expliqué par la solubilisation de sucres non-quantifiés des polysaccharides sulfatés. En effet, sous les conditions optimales, le temps d'extraction est plus long et le ratio E / S est plus important. À l'inverse, la teneur en protéines augmente quand les paramètres optimisés sont appliqués. Une hypothèse peut être émise : des agglomérats entre protéines et polysaccharides sulfatés ou non-sulfatés pourraient expliquer ces faibles teneurs en groupements sulfates et en sucres totaux, mesurées dans les EHs obtenus après optimisation des conditions d'extraction avec Alcalase.

De plus, une quantité plus importante de composés hydrosolubles est extraite à 50 °C. Néanmoins, une extraction effectuée à 25 °C semble aussi efficace qu'une extraction réalisée à 50°C. Cette observation a également été faite par Dumay *et al.* (2013), sur une extraction assistée par une xylanase sur *Palmaria palmata*.

Quant au ratio E / S, les résultats ont montré qu'en ajoutant plus d'enzymes sur une même quantité d'algue, le rendement d'extraction augmentait. Cependant, aucune différence significative n'est perceptible entre un ratio de 2,5 et de 7,5 % (essais n°3 et n° 11 du **Tableau III-VIII).**

Les cocktails enzymatiques possèdent un large spectre d'activités. Cependant, les enzymes ne sont pas spécifiques des polysaccharides matriciels, ce qui peut limiter l'hydrolyse et par conséquent le rendement d'extraction. Les enzymes utilisées dans cette présente étude

augmentent la liquéfaction et la solubilisation des composés hydrosolubles organiques et minéraux.

La méthodologie des surfaces de réponse requiert peu d'expériences et facilite l'interprétation des effets des paramètres d'extraction évalués. Quelques résultats inattendus sous certaines conditions d'extraction ont été obtenus. Il serait alors intéressant de les tester afin d'anticiper le passage aux échelles pilote et industrielle pour des coûts de production et d'énergie plus faibles (moins d'enzymes et à des températures basses).

3.4. Conclusion : l'EAE, une technologie d'extraction respectueuse de l'environnement

Le modèle mathématique qui a permis de prédire les conditions optimales d'extraction a été validé (**Tableau III-IX**). La quantité des composés hydrosolubles disponibles de *S. chordalis* augmente significativement de 30 % après l'action de la subtilisine Alcalase et de manière non-significative de 4 % après optimisation des conditions d'extraction (**Tableau III-X**). Cependant, les conditions d'extraction appliquées lors du criblage enzymatique sont déjà très proches de celles optimisées. Ainsi, l'optimisation confirme l'efficacité de l'EAE par la répétabilité des rendements d'extraction.

En conclusion, cette étude peut servir de base pour la production d'extraits hydrosolubles riches en composés potentiellement actifs provenant d'une macroalgue rouge proliférante.

Les résultats obtenus confirment que l'EAE peut être utilisée comme une technologie prometteuse, alternative et durable pour extraire une quantité importante de composés hydrosolubles potentiellement actifs. Comparé à une extraction à l'eau (témoin négatif) dans les mêmes conditions, toutes les enzymes commerciales ont été plus efficaces dans la libération dans l'eau de composés de *S. chordalis*. Le choix de la nature de l'enzyme est très important, de même que les conditions d'extraction et la composition biochimique de la matière première. Les surfaces de réponse sont issues d'une méthodologie utile et puissante. Elles ont permis, dans cette étude, l'analyse simultanée de l'influence de différents paramètres sur un même matériel biologique. Des paramètres qui impactent directement la quantité et la qualité des

extraits hydrosolubles produits. Ainsi, si la composition biochimique d'un extrait est différente d'un autre, alors il y a des chances que les potentielles activités de ces extraits diffèrent également. Un exemple sur l'activité antivirale évaluée sur les EHs obtenus dans cette étude est présenté dans le Chapitre IV de ce manuscrit.

D'autres recherches sur le passage à l'échelle pilote seraient intéressantes à réaliser. À quoi s'ajoutent des travaux de recherche, hautement recommandés, sur les conditions d'extraction en ciblant des composés hydrosolubles actifs.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont été publiés dans un journal scientifique international :

Burlot, A.-S., Bedoux, G., Bourgougnon, N. (2016). Response Surface Methodology for Enzyme-Assisted Extraction of Water- Soluble Antiviral Compounds from the Proliferative Macroalga *Solieria chordalis*. *Enzyme Engineering*, *5*(2). http://doi.org/10.4172/2329-6674.1000148.

Un résumé de l'ensemble des résultats et des conclusions émanant de cette étude est présenté sur la **Figure 3. 10.**

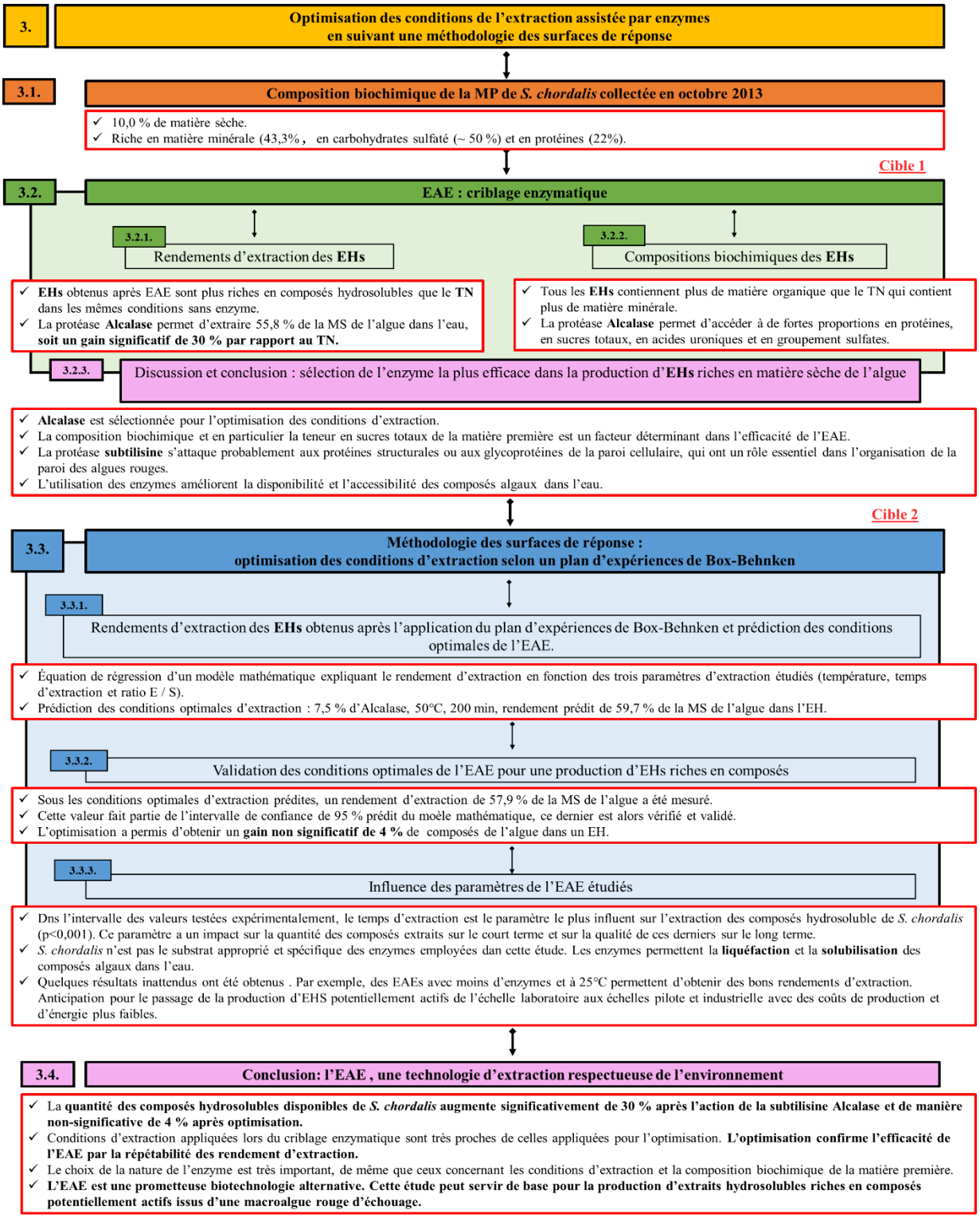


Figure 3. 10 Résumé des principaux résultats de l'étude sur l'optimisation des conditions de l'extraction assistée par enzymes en suivant une méthodologie des surfaces de réponse pour la production d'extraits hydrosolubles riches en composés potentiellement actifs, issus de la macroalgue rouge proliférante *S. chordalis.*

CHAPITRE IV

Saint Gildas de Rhuys, Morbihan, Octobre 2013

Perspectives d'applications

CHAPITRE IV

C. elegans *observé à la loupe binoculaire*

Perspectives d'applications.

1. Introduction
- 1.1. Focus sur l'activité antivirale
- 1.2. Focus sur les activités antibactérienne et immunostimulante des algues rouges chez le nématode *Caenorhabditis elegans* infecté par la bactérie pathogène *Pseudomonas aeruginosa*.
- 1.3. Production d'extraits et de composés antiviraux, antibactériens et immunostimulants issus de Gigartinales.
- 1.4. Hypothèses et cibles de recherche

2. Matériels et Méthodes
- 2.1. Cytotoxicité et activité antivirale
- 2.2. Activités antibactérienne et immunostimulante : modèle de pathogénicité *C. elegans – P. aeruginosa*
- 2.3. Analyses statistiques

3. Résultats et Discussion
- 3.1. Impact de la saisonnalité sur l'activité anti-VHS-1, évaluée sur la matière première hydrosolubilisée et sur les polysaccharides de *S. chordalis*.
- 3.2. Impact de l'Extraction Assistée par Enzymes sur l'activité anti-VHS-1 évaluée sur les extraits hydrosolubles obtenus de *S. chordalis*.
- 3.3. Impact d'un extrait hydrosoluble de *S. chordalis* sur le système immunitaire de *C. elegans* et sur les facteurs de virulence de *P. aeruginosa*.

Perspectives d'applications

1. Introduction

Au quotidien et tout au long de leur vie, les algues sont confrontées à de nombreuses menaces de nature biotique et/ou abiotique provenant du milieu marin. Les facteurs biotiques comme les bactéries, les champignons, les herbivores marins ou encore les virus constituent des prédateurs non négligeables. Afin de survivre face à ces facteurs, une paroi complexe entoure chaque cellule algale élaborant ainsi une barrière physique difficilement franchissable. De plus, les algues peuvent développer des mécanismes de défenses chimiques et biologiques notamment par la production de leurs métabolites primaires et secondaires. (*Cf.* Chapitre I Les algues rouges, dont *Solieria chordalis*, pages 17 à 88). D'après Kubanek *et al.* (2003), un millilitre d'eau de mer contient 10^3 cellules fongiques, 10^6 bactéries et 10^7 virus, incluant des pathogènes. Ainsi, les algues sont continuellement exposées à de fortes concentrations de microbes potentiellement nuisibles à leur encontre (Kubanek *et al.* 2003). Pourtant, elles ont réussi à parcourir l'échelle du temps grâce notamment à des composés actifs, comme par exemple des molécules antivirales ou encore antibactériennes qu'elles renferment. Ainsi, de nombreuses recherches scientifiques se sont orientées vers l'isolement de ces composés (Bourgougnon *et al.* 1993; Bouhlal *et al.* 2011; Hardouin *et al.* 2013; García-Bueno *et al.* 2014; Kulshreshtha *et al.* 2015; Kasanah *et al.* 2015).

Un des objectifs de ces trois années de recherche a été de déterminer si des extraits obtenus à partir de *S. chordalis* montraient des propriétés et ou des activités biologiques intéressantes. Ce travail rentrait dans le cadre du projet industriel VB2 (*Cf.* Avant-propos : Le contexte de l'étude et les projets de recherche, page 8). Une recherche d'activités biologiques a alors été effectuée (antioxydant, photoprotection, blanchiment), mais seules deux ont été approfondies dans le cadre de la thèse. Il s'agit des évaluations qui mettent en évidence d'une part, l'activité vis-à-vis du virus de *l'Herpes simplex* de type 1 (VHS-1) et d'autre part, l'activité

immunostimulante utilisant le modèle de pathogénicité du nématode *Caenorhabditis elegans* infecté par une bactérie pathogène *Pseudomonas aeruginosa.*

1.1. Focus sur l'activité antivirale.

Des activités antivirales ont été reportées chez les Rhodophyta notamment chez les Gigartinales. De manière générale, les travaux mentionnent principalement une corrélation perceptible entre ces activités et les polysaccharides sulfatés (**Tableau IV.I**). La production des extraits ou des produits issus des algues mentionnées dans le **Tableau IV. I** ainsi que leur concentration efficace pour lutter contre les virus seront détaillées plus loin dans ce manuscrit (*Cf.* 1.3 Production d'extraits antiviraux). Ce **Tableau IV. I** récapitule les travaux de 15 études menées à partir des années 90 jusqu'à aujourd'hui. Au total, les activités antivirales ont été évaluées sur 14 espèces de Gigartinales, notamment sur *S. chordalis*. Des extraits hydrosolubles de *S. chordalis* ont montré des concentrations protégeant 50 % de cellules infectées par le VHS-1 allant de 23 à 101,1 µg/mL (Hardouin *et al.* 2013).

Les virus sur lesquels sont effectuées les recherches infectent les plantes (virus de la mosaïque du tabac ; TMV), les porcins (virus de l'*Herpes* porcin ; SuHV-1), les bovins (virus de l'*Herpes* bovin ; BoHV-1), les moustiques (virus de la dengue ; DENV-2), les crustacés (WSSV) et bien évidemment les humains (virus de *l'Herpes simplex* ; VHS, virus de l'immunodéficience humaine ; VIH, virus de la dengue ; DENV-2, cytomégalovirus ; HCMV, poliovirus et virus de la stomatite vésiculaire ; VSV).

Tableau IV. I Activité antivirale reportée chez les algues rouges de l'ordre des Gigartinales (1/3).

Algues (Lieu de collecte)	**Lignée cellulaire**	**Virus**	**Produit, fraction ou composé testé issu(e) d'algues**	**Références**
Gigartina skottsbergii (Patagonie, Argentine)	Cellules MDBK (Madin-Darby Cellule de rein de bovin)	BoHV-1 (virus *Herpes* type bovin 1) SuHV-1 (virus *Herpes* porcin type 1)	Lambda-carraghénanes	Diogo *et al.* 2015
Chondrus crispus (Acadian Seaplants Limited, Nova Scotia, Canada)	Cellules de rein de singe vert d'Afrique (Vero, ATCC CCL-81)	VHS-1 (*Herpes simplex* type 1)	Extraits hydrosolubles	Kulshreshtha *et al.* 2015
Hypnea spinella (Rameshwaram, Tamil Nadu, Inde)	Homolymphe obtenue à partir de crevettes *P. monodon* infectées par WSSV	WSSV (*White Spot Syndrome Virus*)	Extrait méthanolique	Sudhakaran *et al.* 2014
Solieria chordalis (Brittany, France)	Cellules de rein de singe vert d'Afrique (Vero, ATCC CCL-81)	VHS-1 (*Herpes Simplex* type 1)	Extraits hydrosolubles	Hardouin *et al.* 2013
Hypnea musciformis (côtes syriennes)	*N. tabacum L. cv. Samsun NN*	TMV (*Virus de la mosaïque de tabac*)	Kappa-carraghénanes	Ghannam *et al.* 2013
Sphaerococcus coronopifolius (Détroit de Gibraltar, Maroc)	Cellules de rein de singe vert d'Afrique (Vero, ATCC CCL-81)	VHS-1 (*Herpes simplex* type 1) VIH (*Virus de l'Immunodéficience Humaine*)	Polysaccharides sulfatés hydrosolubles	Bouhlal *et al.* 2011
Hypnea musciformis *Plocamium cartilagineum* *Sphaerococcus coronopifolius* (côtes de l'Atlantique, du Maroc et de la Méditerranée)	Cellules de rein de singe vert d'Afrique (Vero, ATCC CCL-81)	VHS-1 (*Herpes Simplex virus* type 1)	Extraits organiques et aqueux	Bouhlal *et al.* 2010

Tableau IV. I Activité antivirale reportée chez les algues rouges de l'ordre des Gigartinales (2/3).

Algues (Lieu de collecte)	**Lignée cellulaire**	**Virus**	**Produit, fraction ou composé testé issu(e) d'algues**	**Références**
Gigartina atropurpurea (Marlborough Sounds, Nouvelle Zélande)	HFF (Human Foreskin Fibroblast)	VHS-1 souche E-377 (*Herpes simplex* type 1) VHS-2 souche MS (*Herpes simplex* type 2)	Carraghénanes	Harden *et al.* 2009
Meristiella gelidium (côte nord-est du Brésil)	Cellules de rein de singe (Vero cells)	VHS-2 souche MS (*Herpes simplex* virus type 2) DENV-2 strain NGC (dengue virus)	Iota/kappa/nu-hybrides carraghénanes	de S.F-Tischer *et al*. 2006
Schizymenia binderi (Navidad Bay, Chili)	Cellules de rein de singe vert d'Afrique (Vero)	VHS-1 (*Herpes simplex* type 1) VHS-2 souche MS (*Herpes simplex* type 2)	Galactanes natifs	Matsuhiro *et al.* 2005
Callophyllis variegata (Santa Cruz, Argentine)	Cellules de rein de singe vert d'Afrique (Vero)	VHS-1 (*Herpes simplex* type 1), VHS-2 souche G (*Herpes simplex* Virus type 2), DENV-2 souche NGC (virus de la dengue), HCMV souche Davis (cytomégalovirus)	Polysaccharides sulfatés	Rodríguez *et al*. 2005

Tableau IV. I Activité antivirale reportée chez les algues rouges de l'ordre des Gigartinales (3/3).

Algues (Lieu de collecte)	**Lignée cellulaire**	**Virus**	**Produit, fraction ou composé testé issu(e) d'algues**	**Références**
Gymnogongrus griffithsiae (Brésil)	Cellules de rein de singe vert d'Afrique (Vero)	VHS-1 souche F (*Herpes simplex* type 1) VHS-1 B 2006 (*Herpes simplex* type 1 Acyclovir-resistant) VHS-1 1C3-syn 13-8 (*Herpes simplex* type 1 syncytial variant) VHS-1 1C3-syn 14-1 (*Herpes simplex vs* type 1 syncytial variant) VHS-2 souche G (*Herpes simplex* type 2) VHS-2 strain MS	Galactanes sulfatés et fractions de galactanes sulfatés	Talarico *et al.* 2004
Chondrus ocellata (Corée du Sud)	Cellules de rein de singe vert (Vero ATCC)	VHS-1 (*Herpes simplex* type 1) Poliovirus type 1 SINV (virus Sindbis)	Extrait méthanolique	Hudson *et al.* 1998
Gigartina skottsbergii (Province de Chubu, Argentine)	Cellules de rein de singe vert d'Afrique (Vero)	Six souches d'VHS-1 (F, B2006, Field, 1213 LCR/94, 374 LCR/94 et 1180 BE/94) et 2 d'VHS-2 (G and 244 BE/94)	Carraghénanes	Carlucci *et al.* 1997
Schizymenia dubyi (Sicile, Italie)	Cellules de rein de singe vert d'Afrique (Vero)	VHS-1 (*Herpes simplex virus* type 1), VHS-2 Poliovirus de type 2, VSV (Virus de la Stomatique Vésiculaire)	Polysaccharides sulfatés hydrosolubles et galactanes sulfatés	Bourgougnon *et al.* 1993

Il existe différentes souches du VHS-1. La souche F est une souche de référence (Carlucci *et al.* 1997; Talarico *et al.* 2004). Les souches B 2006 et Field sont des versions du virus, résistantes à l'acyclovir, le médicament anti-herpétique de référence. Les souches 1 213 LCR/94, 374 LCR/94 et 1 180 BE/94 ont été isolées de patients infectés puis elles ont été multipliées deux fois sur des fibroblastes humains (Carlucci *et al.* 1997). Les souches 1C3-syn 13-8 et 1C3 syn 14-1 sont des variantes du VHS-1 issues de syncytiums[1] et obtenues après une série de passages sur des cellules Vero en présence de μ- et de ν-carraghénanes, qui avaient déjà montré une activité antivirale. Ces souches sont alors résistantes à ces types de carraghénanes, mais l'étude de Talarico *et al.* (2004) a montré que ces mêmes souches restent sensibles à d'autres types de carraghénanes et à d'autres fractions de polysaccharides sulfatés.

En général, les lignées cellulaires sont choisies en fonction de l'organisme hôte qu'infecte le virus étudié. Cependant, la grande majorité des études menées sur des virus touchant les êtres humains sont basées sur des lignées cellulaires de fibroblastes mammaliennes et en particulier sur des cellules de rein de singe vert (Cellule Vero) **(Tableau IV. I)**. En effet, c'est une lignée cellulaire en culture continue, adhérente, garantie en conditions stériles, contrairement aux lignées cellulaires humaines qui sont plus difficiles à maintenir *in vitro*. Les cellules Vero présentent un haut potentiel multiplicatif et elles peuvent être subcultivées un grand nombre de fois. Elle est alors recommandée lors d'évaluations de l'activité antivirale et de cytotoxicité (Olicard 2002).

Ainsi, il est intéressant d'évaluer une activité sur plusieurs souches d'un même virus, car les mutations sont nombreuses et apparaissent au cours du temps ainsi que sur différentes lignées cellulaires. Cela permet d'étudier le virus, le mode d'action des molécules sur le virus ainsi que la résistance de ce dernier. D'après le **Tableau IV. I**, le virus qui est le plus étudié est celui de *l'Herpes simplex* et particulièrement celui de type-1.

1.1.1. Virus de l'Herpes simplex.

Un virus est une entité vivante capable de passer d'un organisme à un autre et qui pour vivre est obligé de parasiter l'intérieur des cellules d'un organisme hôte afin de se multiplier. Il

[1] Un syncytium correspond à une masse de cytoplasme limitée par une membrane, comportant plusieurs noyaux, et obtenue par fusion de plusieurs cellules, comme les cellules des muscles striés *(Larousse.com, 2016).*

reprogramme la cellule infectée pour assurer la production de ses constituants. Le virus de *l'Herpes simplex*, dont la structure d'une particule virale est représentée sur la **Figure 4. 1**, fait partie de la famille des *Herpesviridae* qui comporte près de 120 herpès virus (Pasquier *et al.* 2013).

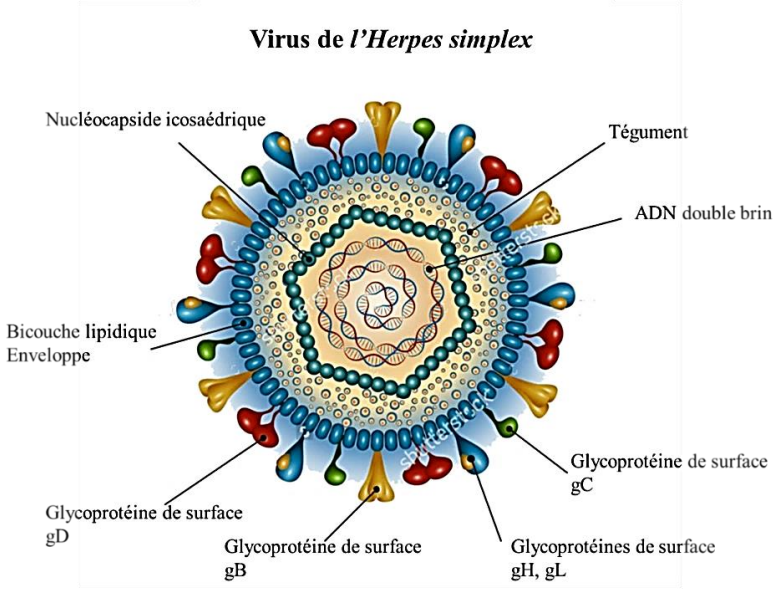


Figure 4. 1 : Structure d'une particule virale de *l'Herpes simplex* (Shutterstock en ligne 2016 modifié par Burlot AS).

Ces derniers partagent des caractères communs. Ils possèdent des ADN de poids moléculaire élevé (150 à 230 mille paires de bases), une capside icosaédrique et une enveloppe dérivée de la membrane nucléaire.

Il existe deux types de virus *Herpes simplex*, le type 1 (VHS-1) et le type 2 (VHS-2). Le VHS-1 est transmis par contact avec les muqueuses buccales et cause en général des infections à l'intérieur ou autour de la bouche, notamment sur les lèvres (**Figure 4. 2**). Alors que le VHS-2 se transmet par voie sexuelle et est souvent à l'origine de l'herpès génital ou anal (OMS en ligne 2016).

Figure 4. 2 : Boutons d'herpès après infection du virus *Herpes simplex* de type 1.

Les infections herpétiques sont la plupart du temps asymptomatiques, mais il arrive qu'elles provoquent des poussées de lésions et/ou de boutons douloureux. La différence entre ces deux types de virus réside principalement par le lieu de leur primo-infection soit l'endroit du premier contact entre le virus et l'organisme hôte, mentionné précédemment puis par le lieu où ils vont rester en infection latente, c'est-à-dire sous une forme « dormante ». Les sièges de l'infection latente sont dermoneurotropes. En effet, il s'agit du ganglion de Gasser (derrière la tête, proche du nerf trijumeau) pour le VHS-1 et du ganglion sacré (au niveau des vertèbres sacrées, en bas de la moelle épinière) pour le VHS-2. De plus, d'après Trybala *et al.* (2000), ces deux types du virus montrent des différences spécifiques dans leurs interactions avec l'héparane sulfate (HS), un récepteur de la surface des cellules hôtes lors de l'attachement du virus. Les glycoprotéines B et C (gB et gC respectivement) illustrés sur le **Figure 4. 1** sont les deux constituants du virus qui vont se lier à l'HS. Chez le VHS-1, ce sont les gC qui ont un rôle majeur dans l'attachement du virus alors que ce sont les gB chez le VHS-2. En outre, dans cette même étude, il est écrit que l'infection au VHS-2 était plus efficacement inhibée par la présence de substances polyanioniques (héparine, dextrane sulfaté, agar) alors que des substances polycationiques (néomycine, poly-L-lysine) étaient plus efficaces dans l'inhibition de l'infection par le VHS-1 (Trybala *et al.* 2000). Cette affirmation est confirmée par les études de Carlucci *et al.* 1997, Talarico *et al.* 2004, Matsuhiro *et al.* 2005 et Harden *et al*. 2009.

1.1.2. Mode d'action des polysaccharides sulfatés sur VHS-1.

Les premières observations d'activités antivirales de polysaccharides d'algues datent de plus de 50 ans notamment avec une étude montrant la protection d'extraits algaux sur des

embryons de poulets contre l'infection au virus Influenza B. Peu de temps après, il a été découvert par sérendipité que l'héparine inhibait le VHS (Jiao *et al.* 2011). L'héparine est un polysaccharide constitué d'unités disaccharidiques trisulfatées qui est trouvé sur la muqueuse intestinale de porc (**Figure 4. 2b**). L'hypothèse émise propose une inhibition de l'attachement des particules virales à la surface des cellules hôtes due à une interférence électrostatique causée par le polysaccharide trisulfaté.

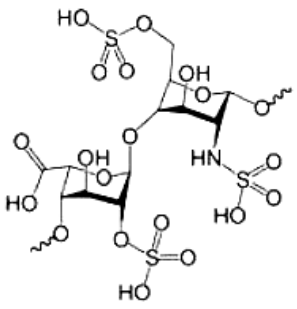


Figure 4. 2b : Structure chimique de l'héparine (Sigma-aldrich en ligne 2016).

D'après Jiao *et al*. (2011) et Wijesekara *et al.* (2011), les polysaccharides sulfatés des algues, proches dans leur structure à l'héparine, ont également la capacité de bloquer les premières étapes du cycle de réplication des virus. Ils interviennent lors de l'adsorption entre le virus et la cellule hôte (Carlucci *et al.* 1997; Carlucci *et al.* 1999; Jiao *et al.* 2011; Wijesekara *et al.* 2011).

À la surface de la plupart des cellules hôtes (animale, humaine) sont exprimées en grande quantité des héparanes sulfates (HS), des polysaccharides complexes appartenant à la famille des glycosaminoglycanes. Une de leurs fonctions majeures est de fixer de nombreuses protéines, dont ils modulent l'activité biologique. Certains virus utilisent ces propriétés interactives pour s'attacher à la surface de leur cible cellulaire. Les héparanes sulfates représentent un site d'attachement primaire pour les virus (Lortat-Jacob *et al.* 2005).

D'après Damonte *et al.* (2004) cinq glycoprotéines de l'enveloppe du virus de *l'Herpes simplex*, gB, gC, gD, gH et gL, sont impliquées dans l'attachement et dans l'entrée du virus dans la cellule hôte. Lors de l'étape initiale de l'attachement du virus, gC et dans certains cas

gB se lie avec HS. Cette première étape permet ainsi de concentrer les virus sur la surface cellulaire et par conséquent facilite l'étape suivante, à savoir la pénétration du virus dans la cellule hôte. Pour cela, la glycoprotéine gD interagit avec d'autres récepteurs cellulaires que sont des médiateurs. Ces derniers incluent des protéines membres de la famille des récepteurs de facteurs de nécrose tumorale et de la famille des immunoglobines. Cette interaction gD-médiateurs permet la fusion de l'enveloppe du virion avec la membrane cellulaire ce qui assure la pénétration du virus dans le cytoplasme cellulaire. gB, gH et gL sont indispensables lors de cette deuxième étape. Néanmoins, le rôle précis de chacune de ces glycoprotéines n'a pas encore été défini (Damonte *et al.* 2004).

Les glycoprotéines gC du virus de l'herpès présente un cluster d'acides aminés basiques. Ainsi les polysaccharides anioniques des algues interagissent avec ces sites chargés positivement à la surface de l'enveloppe virale. Ce sont, entre autres, ces mêmes clusters à la surface de l'enveloppe de l'herpès qui sont nécessaires lors de l'attachement avec les héparanes sulfates des cellules hôtes, d'où l'effet inhibiteur « anti-adsorption » des polysaccharides sulfatés des algues (Carlucci *et al.* 1999). À quoi s'ajoute un potentiel négatif causé par l'apport des polysaccharides anioniques des algues, ce qui gêne également le contact entre le virus et la cellule-hôte (Damonte *et al.* 2004).

De plus, certaines études ont montré que le mécanisme d'action déclenché par des substances polyanioniques repose également sur la qualité structurale spécifique des polysaccharides et pas seulement sur des interactions non-spécifiques. Les caractéristiques structurales des polysaccharides incluent le degré de sulfatation, la distribution des groupements sulfates, leur poids moléculaire, leur composition en sucres et leur stéréochimie et peuvent donc être responsables d'interactions complexes avec les cellules avec qui ils entrent en contact. Il a été démontré que l'activité antivirale était plus importante quand le poids moléculaire des polysaccharides était élevé (Witvrouw et de Clercq, 1997). Ghosh *et al.* (2009) ont extrait des xylomannanes de l'algue rouge *Sebdenia polydactyla* (*Florideophyceae*, Sebdeniales*)*. Ces polysaccharides inhibent la propagation du VHS-1 dans des cellules de rein de mammifères (cellule Vero). Ils ont montré que l'activité disparaissait quand ils enlevaient les groupements sulfates alors que le contraire se produisait pour des dérivés purifiés de xylomannanes enrichis en groupements sulfates (Ghosh *et al*. 2009). De même que Carlucci *et al*. en 1997 ont détaillé les relations entre les spécificités structurales des différents types de

carraghénanes extraits de la Gigartinale *Gigartina skottsbergii* et le degré de l'activité anti-herpétique. D'après leur étude, les λ et les μ/ν-carraghénanes possédant 2 à 3 groupements sulfates par unité disaccharidique ont été les plus efficaces dans la protection des cellules animales et humaines infectées par le virus de *l'Herpes simplex* comparé à des carraghénanes de type κ et ι à 1 ou 2 groupements sulfates (Carlucci *et al.* 1997). De plus, il a été observé par Bourgougnon (1994) qu'en présence de polysaccharides de *Schizymena dubi* (Rhodophyta, Gigartinales) à hauteur de 35 à 150 μg/mL, l'enveloppe virale du VHS se détachait du tégument et de la capside après un traitement de 2h à 37°C suivi d'un passage à 4°C en vue de réaliser un cliché photographique au microscope électronique (**Figure 4. 3**) (Bourgougnon 1994).

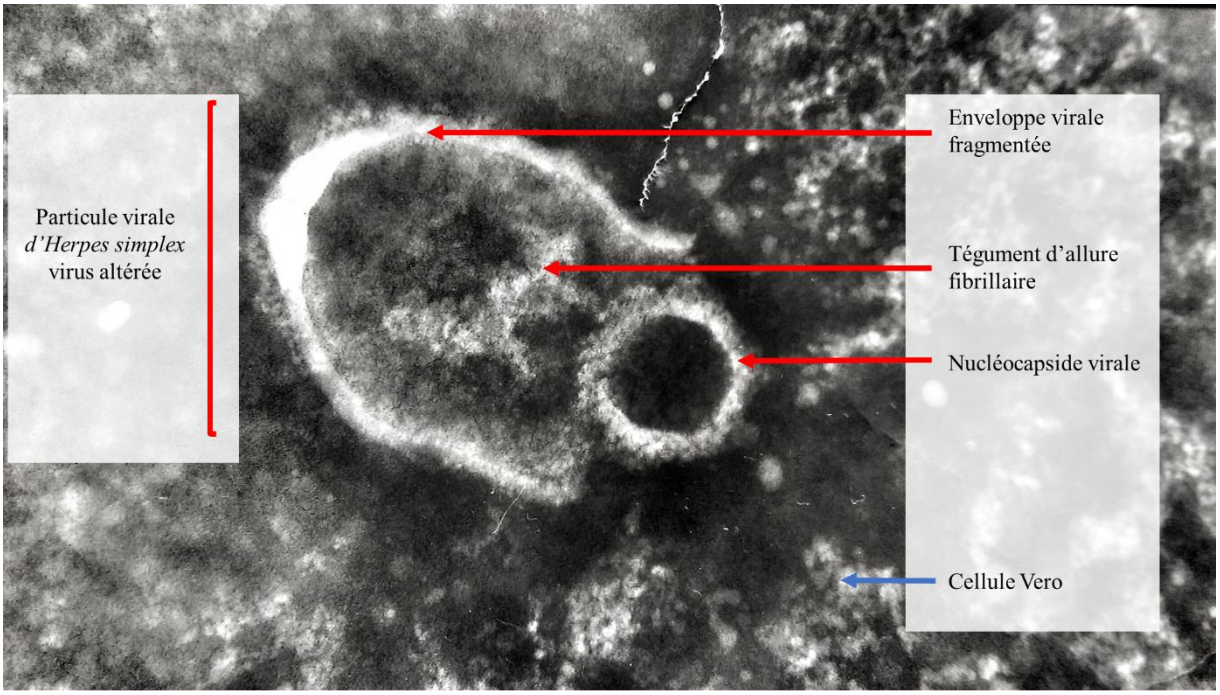


Figure 4. 3 Photographie prise au microscope électronique d'une particule virale *d'Herpes simplex* virus altérée x 80 000 *(Bourgougnon 1994 et modifié par Burlot 2016)*.

Aujourd'hui, des molécules de synthèse comme l'acyclovir sont couramment prescrites dans les cas d'infection du VHS. L'acyclovir ou la valacyclovir, qui est convertie en acyclovir lors du passage dans l'intestin et/ou dans le foie, sont transformées en forme monophosphatée par la thymidine kinase virale puis phosphorylée en une forme triphosphatée active par des kinases cellulaires. Cette dernière forme est un puissant inhibiteur de l'ADN polymérase virale bloquant ainsi la réplication de l'ADN viral. Ainsi, dès les années 90, des scientifiques proposent de réaliser des essais cliniques contre l'infection du virus de l'*Herpes Simplex* en

combinant les polysaccharides sulfatés provenant des Gigartinales avec des molécules de référence comme l'acyclovir afin d'amplifier l'activité antivirale voire d'éradiquer les virus (Carlucci *et al.* 1997). Cependant, aucune étude clinique n'a été réalisée jusqu'à aujourd'hui contre l'infection du VHS, alors que de nombreuses études ont été menées en phase clinique contre les infections du VIH sur 6 202 femmes (Skoler-Karpoff *et al*. 2008), du papillomavirus (PVH) sur 1 723 femmes (Marais *et al.* 2011) et du rhinovirus humain (RVH) sur 153 enfants (Fazekas *et al*. 2012) et 35 adultes (Eccles et al. 2010) et une autre sur 221 adultes (Ludwig *et al.* 2013). Ces dernières ont évalué les activités antivirales d'un gel lubrifiant vaginal contenant entre 1 à 3 % d'un mélange de ι-, κ- et λ-carraghénanes, le Carraguard (contre le VIH et le PVH) (Skoler-Karpoff *et al.* 2008; Marais *et al.* 2011) , et d'un spray nasal, contre le RHV contenant 0,12 % de ι-carraghénanes provenant certainement d'*Eucheuma spinosum* (Rhodophyta, Gigartinales, Solieriaceae) (Eccles *et al*. 2010; Fazekas *et al.* 2012; Ludwig *et al.* 2013; Hebar *et al.* 2015).

1.1.3. Intérêts d'évaluer l'activité antiherpétique.

Le virus de l'herpès est beaucoup étudié pour plusieurs raisons (**Tableau IV. I**) :

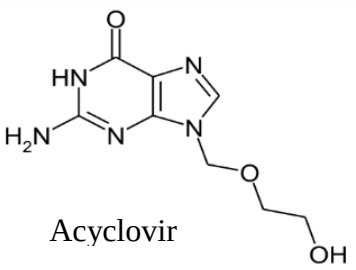
- Premièrement, c'est un virus très contagieux. Plus de la moitié de la population mondiale est infectée par ce virus même s'il est, la plupart du temps, dans une phase de latence pendant laquelle il ne s'exprime pas de manière symptomatique (**Figure 4. 2**). En 2012, l'Organisation Mondiale de la Santé chiffrait à 3,7 milliards le nombre de personnes de moins de 50 ans infectées par le VHS-1 dans le monde avec une forte proportion d'infection en Afrique (87 % de la population) (OMS en ligne 2016).

- De plus, des recherches ont mis en évidence que le VHS-1 était capable d'entrer en latence dans le système nerveux après une primo-infection. Cette latence se caractérise par une extinction totale de la production de protéines virales, et par l'accumulation de transcrits associés à la latence, appelés LAT (Latency Associated Transcripts). De façon spontanée ou sous l'influence de facteurs déclenchants, le virus peut se réactiver, reprendre un cycle[2] viral et occasionner des symptômes beaucoup plus graves comme

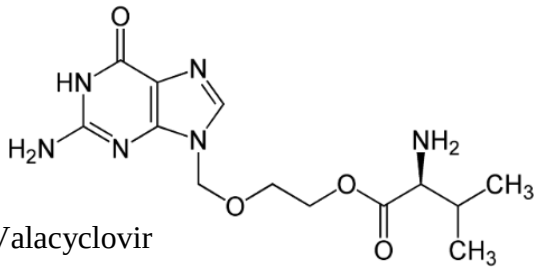
[2] Un cycle de multiplication virale comporte 6 étapes : l'attachement du virus à la membrane cellulaire de l'hôte ; la pénétration, la décapsidation, la réplication de l'ADN ou de l'ARN ; l'assemblage et maturation et pour finir la libération des virus.

des inflammations cérébrales (cécité et encéphalite herpétique) (Kennedy 2002; Cavallero *et al.* 2014).

- A l'heure actuelle, l'infection au VHS est incurable et dure toute la vie. Il existe des traitements antiviraux, comme l'acyclovir ou encore le valacyclovir (**Figure 4. 4).** Cependant, ces derniers aident à réduire les symptômes mais ils n'éradiquent pas les virus. À quoi s'ajoute le fait que certaines entités pathogènes deviennent résistantes aux médicaments comme les virus qui résistent aux médicaments antiviraux (Ellis *et al.* 1986). D'où la nécessité de rechercher de nouvelles molécules, qui peuvent, en plus de remplacer les médicaments antiviraux actuels, devenir plus efficaces en ayant un mode d'action plus radical. Les polysaccharides d'algues rouges et notamment de l'ordre des Gigartinales semblent être de bons candidats pour substituer ou concurrencer les agents antiviraux d'aujourd'hui (**Tableau IV. I**). Avec les infections virales, les maladies rencontrées chez les hommes et chez les animaux domestiques et causées par les membres du groupe des virus de l'herpès représentent un challenge en chimiothérapie depuis déjà quelques années (Werner 1977).



Acyclovir



Valacyclovir

Figure 4. 4 Structures chimiques des molécules synthétiques utilisées dans les traitements antiherpétiques.

- L'herpès est un cofacteur important du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine). En réduisant la séropositivité au VHS, celle au VIH le serait également (Mayaud et Bellec 2000).

- D'un point de vue industriel et économique, il est très intéressant de se tourner vers de nouvelles molécules car les brevets des composés antiviraux utilisés aujourd'hui tombent dans le domaine public.

- Enfin, le VHS-1 est un virus qui est entretenu en routine au LBCM. Il est assez aisé de le manipuler une fois que son maintien est lancé.

1.2. Focus sur les activités antibactérienne et immunostimulante des algues rouges chez le nématode **Caenorhabditis elegans** *infecté par la bactérie pathogène* **Pseudomonas aeruginosa.**

Dans le cadre de ces trois années de recherche, l'activité antibactérienne ainsi que l'activité immunostimulante d'un extrait de *S. chordalis* ont été évaluées. Un article scientifique publié en 2013 par le laboratoire canadien avec lequel le LBCM collabore a servi de base pour l'étude réalisée sur *S. chordalis.* Les résultats mentionnés dans cet article mettent en évidence la stimulation du système immunitaire de *Caenorhabditis elegans* infecté par la bactérie pathogène *Pseudomonas aeruginosa*, après application d'un extrait aqueux de l'algue rouge cultivée *Chondrus crispus* (Rhodophyta, Gigartinales) (Liu *et al.* 2013). Dans cette sous partie d'introduction bibliographique, les activités antibactériennes et immunologiques reportées chez les Gigartinales sont présentées ainsi que le nématode *C. elegans*, la bactérie pathogène *P. aeruginosa* et le système de pathogénicité entre *C. elegans* et *P. aeruginosa* utilisé dans le cadre dans cette étude.

1.2.1. *Activités antibactérienne et immunostimulante des Gigartinales.*

1.2.1.1 Activités antibactériennes reportées chez les Gigartinales

Beaucoup de microorganismes sont devenus résistants aux médicaments antibiotiques actuellement utilisés dans le traitement des maladies infectieuses. En effet, à force de subir les mêmes traitements thérapeutiques, les bactéries pathogènes ont su développer des mécanismes de résistance au cours du temps. C'est pourquoi, la recherche de nouveaux composés antibactériens est primordiale afin de trouver une alternative à ces médicaments de moins en moins efficaces (Pierre *et al.* 2015). En agriculture comme en aquaculture, des améliorations

des méthodes d'élevage d'animaux terrestres et aquatiques et des méthodes de cultures de plantes et d'algues d'intérêt économique ont été réalisées. En effet, pour pallier au caractère aléatoire de la biomasse naturelle, des aménagements sur terre, comme les bassins offshores par exemple, et en mer ont conduit à une augmentation significative des productions animale et végétale. Néanmoins, le confinement des espèces, leur échange et leur transfert sont fréquents et peuvent engendrer des risques accrus d'infections microbiennes (Olicard 2002). De plus, pour le domaine des peintures antifouling, la recherche de nouvelles molécules biologiques s'est développée. En effet, pour contrôler l'apparition de biofilms puis la croissance d'organismes biologiques (fouling) sur la coque des bateaux de plaisance et de commerce, des peintures antifouling sont utilisées. Cependant, nombre d'entre elles contiennent des composés chimiques toxiques comme la tributyltine (TBT) qui impactent négativement sur l'environnement et l'écosystème marins (Hellio *et al.* 2001). Des scientifiques se sont alors tournés vers les algues rouges (Pierre *et al*. 2015).

En ce qui concernent les études menées à visée nutrition et santé, des extraits méthanoliques *d'Hypnea musciformis* et d'H*ypnea valentiae* (Rhodophyta, Gigartinales) inhibent la croissance *in vitro* de bactéries pathogènes à Gram positif (*Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis et Micrococcus luteus*) et à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* et *Aeromonas hydrophil*) (Rhimou *et al.* 2010; Pramitha et Lipton 2013). D'après Pierre *et al.* (2015), les galactanes sulfatés des algues rouges pourraient interagir avec des sites spécifiques de la paroi des bactéries en se liant sur des sites chargés positivement (comme avec l'enveloppe des virus). De plus, les bactéries pourraient aussi avoir la capacité de modifier la structure des galactanes sulfatés en mettant en jeu des enzymes. A l'heure actuelle, seules ces hypothèses sont émises, les mécanismes d'action n'ont pas encore été vérifiés (Pierre *et al.* 2015). Certains scientifiques émettent également l'hypothèse que l'activité antibactérienne des extraits d'algues rouges serait plus importante sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. Cela serait dû à la barrière perméable de la paroi et à l'accumulation des membranes chez les bactéries à Gram négatif (Manilal *et al.* 2009). Cependant, cela n'a pas été prouvé (Pramitha et Lipton 2013).

En 2013, Liu *et al.* ont mis en évidence biochimiquement et par des analyses d'expressions géniques qu'un extrait aqueux de *Chondrus crispus* (Gigartinales) inhibait les facteurs de virulence de *P. aeruginosa*. Cette inhibition s'accentuait quand des carraghénanes

commerciaux, majoritairement de type kappa étaient appliqués (Liu *et al.* 2013). Manilal *et al.* (2009) ont évalué l'activité antibactérienne de 15 algues rouges appartenant à 13 familles et à 6 ordres. Trois espèces appartenaient à l'ordre des Gigartinales. Il s'agissait *d'Hypnea musciformis*, d'*Hypnea valentiae* et de *Chondracanthus acicularis* collectées sur la côte du Sud-Ouest de l'Inde. Ils ont appliqué des extraits au méthanol de ces algues sur 6 souches bactériennes pathogènes de *Vibrio* et sur 10 bactéries pathogènes cliniques résistantes aux antibiotiques. Certains de ces extraits ont montré des résultats intéressants notamment contre la bactérie à Gram positif *Staphylococcus aureus* mais aussi contre la bactérie à Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa* (Manilal *et al.* 2009). Dernièrement, une étude a montré l'inhibition de la virulence de la bactérie à Gram négatif *Salmonella enteritidis,* qui infecte l'homme par l'intermédiaire des volailles, après l'application d'un extrait de *Chondrus crispus* (Kulshreshtha *et al.* 2016a).

En plus des galactanes sulfatés s'ajouteraient d'autre composés responsables de l'inhibition de la croissance de certaines bactéries, à savoir des petits métabolites secondaires synthétisés par les algues rouges, que sont des terpènes halogénés volatils bromés, chlorés et/ou iodés (Manilal *et al*. 2009; Rhimou *et al.* 2010; Pramitha et Lipton 2013) *(Cf.* Chapitre I : Les algues rouges dont *Solieria chordalis*, page 70*).*

Enfin, Hellio *et al.* (2001) ont évalué l'activité de 30 algues marines de Bretagne sur 35 bactéries marines représentatives des communautés microfouling, les premiers colonisateurs, afin de trouver un ingrédient actif pour des préparations de peintures antifouling. Ils ont choisi des algues vivant en milieu benthique qui ne montrent pas d'épiphytes. En effet, cela peut indiquer une présence potentielle de mécanismes antifouling de ces algues. Des extraits éthanoliques de *Chondrus crispus* et de *Mastocarpus stellatus* dont leur concentration minimale inhibitrice (CMI) est de 24 µg/mL inhibent la croissance de bactéries marines à Gram positif. L'étude a montré une corrélation entre l'activité antifouling et l'activité contre les bactéries à Gram positif. Ces dernières semblent alors nécessaires à l'établissement du fouling (Hellio *et al*. 2001).

1.2.1.2. Activité immunologique reportée chez les Gigartinales.

Les fonctions principales du système immunitaire, de ses cellules (macrophages, lymphocytes, cellules tueuses) et de ses molécules (système complément[3] et anticorps) sont de « patrouiller » le corps et de détruire tous les éléments intrus étrangers. Ces cellules et ces molécules expriment leur activité à travers différents mécanismes comme la phagocytose, la cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC[4]) et la cytotoxicité directe en présence de cellules tueuses ou encore cellules NK (Natural Killer). Cet ensemble de mécanismes du système immunitaire dit inné correspond à la première ligne de défense contre une invasion d'éléments étrangers, une brûlure (inflammation) ou contre une prolifération anormale de cellules (cellules tumorales) (Bondu *et al.* 2010).

Toujours à la recherche de molécules naturelles biologiquement actives, des scientifiques ont étudié l'effet des polysaccharides issus d'algues rouges de l'ordre des Gigartinales sur le système immunitaire (Courtois *et al.* 2008; Bondu *et al.* 2010; de Araújo *et al.* 2011; Liu *et al.* 2013; Kulshreshtha *et al.* 2016b). Des résultats positifs ont été démontrés chez 140 espèces d'algues mais les molécules de seulement trois algues rouges ont été retenues et sont actuellement en étude préclinique, c'est-à-dire évaluées sur des animaux (Courtois *et al.* 2008). Courtois *et al.* (2008) ont extrait des floridosides de *Mastocarpus stellatus* et ont montré que ces derniers avaient une structure similaire à l'antigène dénommé Gal alpha 1-3 Gal absent chez l'être humain mais présent sur de nombreuses cellules animales (singe). La présence de cet antigène induit une forte réponse du système immunitaire par la présence d'anticorps anti-Gal alpha 1-3 Gal qui active le système complément et est alors responsable des rejets de xénogreffes chez l'humain. En présence de floridoside dans du sérum normal et ombilical d'humain, le système complément est activé et dirige des immunoglobines de type M (anticorps) contre le polysaccharide. Cette molécule naturelle semble alors être un nouvel et prometteur agent thérapeutique pour favoriser par exemple l'intégration de greffe, mais aussi pour le traitement de cancers (Courtois *et al.* 2008).

[3] Le système complément regroupe 35 protéines présentes dans le sérum faisant partie du système immunitaire inné. 12 de ces protéines sont directement impliquées dans les mécanismes d'élimination des éléments étrangers, les autres protéines régulent finement l'activité des 12 protéines actrices afin d'éviter les réactions auto-immunes.
[4] ADCC : acronyme anglais pour Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity. Un anticorps reconnaît son antigène présent à la surface d'une cellule cible. Une cellule tueuse de type K (macrophage, polynucléaire, NK) se lie alors à l'anticorps et l'interaction entre l'antigène de la cellule cible lié à l'anticorps de la cellule K déclenche le processus lytique et élimine ainsi l'élément intrus.

Les carraghénanes sont également des molécules pouvant intervenir puisqu'elles interagissent avec des ligands comme des protéines par exemple et peuvent alors jouer deux rôles : être des inhibiteurs ou être des promoteurs du système immunitaire. Des études sur des animaux ont montré le potentiel pro-inflammatoire des carraghénanes. Néanmoins, d'autres études ont mis en avant : le blocage de la transmission du signal inflammatoire induit par les cytokines, l'inhibition de l'adhésion des leucocytes et de leur passage à travers l'endothélium vasculaire et la suppression de l'activation du système complément provoqués par ces polysaccharides sulfatés des algues La structure ainsi que le poids moléculaire des poly- ou oligosaccharides seraient deux éléments qui expliqueraient la différence de ces rôles d'inhibiteurs ou de promoteurs (Bondu *et al.* 2010). Ainsi, les ι- et κ-carraghénanes semblent stimuler le système immunitaire contrairement aux λ-carraghénanes (Bondu *et al.* 2010; de Araújo *et al.* 2011; Liu *et al.* 2013).

S. chordalis a déjà fait l'objet d'une étude concernant l'activité immunologique. Dans l'étude de Bondu *et al.* (2010), des fractions de faibles poids moléculaires de 20 kDa issues de la dépolymérisation de ι-carraghénanes n'ont montré aucune toxicité vis-à-vis de lignées cellulaires humaines lymphoblastoïdes (Daudi, Jurka et vis-à-vis de cellules K562 isolées de patients atteints de leucémie). Ces fractions saccharidiques ont aussi stimulé l'activation de la phagocytose, la prolifération de lymphocytes et la cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC) (Bondu *et al.* 2010). Ces travaux dont les résultats sont très encourageants ont confirmé le potentiel immunothérapeutique de *S. chordalis* avancé par le Professeur Eric Deslandes dans les années 2000 (leucémie-espoir.org, 2016). De ces travaux et de la collaboration entre la Fédération Leucémie Espoir, le Centre Régional Universitaire de Brest, le CNRS et l'UBO, l'Institut de Recherche Translationnelle en Maladies du Sang (IRTMS) a été créé en 2014 et devient, en s'alliant au groupe Quéguiner, une start-up puis une société « Kercells Biosciences ». Le brevet d'une molécule de synthèse nommée SC2310 a été déposé par l'institut Leucémie Espoir et l'ancien IRTMS en 2015 (numéro du brevet WO2015197652). SC2310 est le produit d'une synthèse chimique inspirée d'une molécule naturelle de *S. chordalis* dont les propriétés immunostimulantes ont été exploitées pour le traitement de la leucémie lymphoïde chronique et aussi dans le cas d'infections résistantes. SC2310 améliore la défense des cellules du système immunitaire contre la leucémie chez les murins en diminuant la formation de tumeurs et en augmentant fortement la survie des groupes de murins traités (Berdeaux *et al.* 2016 ; leucémie-espoir.org, 2016*).* Aujourd'hui, une collecte de fonds est en

cours pour confirmer que la molécule de synthèse SC2310 possède les mêmes propriétés pharmacologiques que la molécule naturelle par des tests de bioéquivalence avant d'envisager des tests précliniques puis cliniques. En parallèle, les résultats prometteurs encouragent les chercheurs à se préoccuper de l'approvisionnement en algues pour garantir des quantités et des qualités compatibles avec une utilisation médicale (*Cf.* Chapitre II. Effets de la saisonnalité sur les caractéristiques biochimiques et biologiques de *Solieria chordalis*) *(*Berdeaux *et al.* 2016*).*

1.2.2. Caenorhabditis elegans *comme modèle d'étude*

C. elegans est un modèle animal de laboratoire utilisé notamment à l'Université canadienne de Dalhousie au Marine Bio-Products Research Laboratory (*Cf.* Avant-propos : Le contexte de l'étude et les projets de recherche, page 14). *C. elegans* est un invertébré bactériophage, ubiquiste, cosmopolite et fait partie des espèces les plus abondantes sur terre. Il est retrouvé dans la terre et représente l'un des plus grands contributeurs de la chaîne des décomposeurs du sol. Sa classification phylogénétique est indiquée dans le **Tableau IV. II.**

Tableau IV. II Classification phylogénétique de *Caenorhabditis elegans*(Goussen 2013).

Règne	**Metazoa/ Animal**
Embranchement	Nematoda
Classe	Secernentea
Ordre	Rhabditida
Famille	Rhabditiae
Genre	*Caernorhabditis*

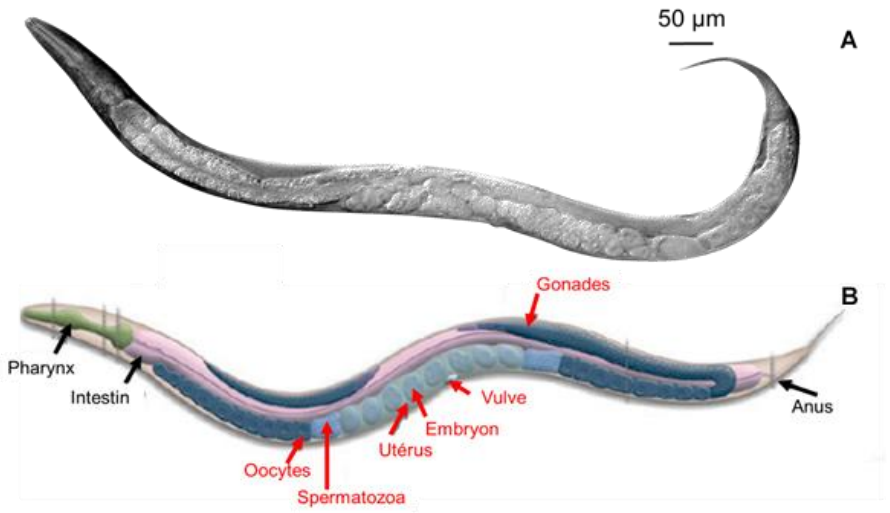
Les premières publications scientifiques le mentionnant datent de la fin du 19ème siècle. Il a été isolé pour la première fois par un français, Émile Maupas en 1900 qui a étudié le mode de reproduction des vers provenant d'humus d'Algérie. Puis en 1960, ce nématode devient un modèle de laboratoire grâce à l'intervention d'un biologiste sud-africain Sydney Brenner (Corsi *et al.* 2015). Ce dernier reçut avec Robert Horvitz et John E. Sulston le prix Nobel de physiologie ou médecine en 2002 pour leurs travaux et découvertes concernant la régulation génétique du développement des organes et de la mort cellulaire programmée en utilisant comme modèle *C. elegans.* Leurs travaux ont été importants pour la recherche médicale. En

effet, ils ont participé aux avancées sur la nature du code génétique et ont permis de lever des zones d'ombre sur les mécanismes de pathogénicité de certaines maladies touchant l'être humain (Nobelprize.org 2016). Ainsi, depuis plus de 55 ans, de nombreux scientifiques travaillent avec ce nématode et la recherche sur et avec ce dernier reste très active. D'après Corsi *et al.* (2015), sur ces cinq dernières années, 1 200 articles mentionnant le nématode sont publiés par an dans le monde. Plus d'un millier de laboratoires ont choisi de travailler, entre autres, avec *C. elegans* (Corsi *et al.* 2015).

Son anatomie et son cycle de vie remarquables ainsi que les avantages de cet « outil » vivant de laboratoire sont décrits dans la suite de ce manuscrit afin de mettre en avant l'intérêt de faire de la recherche avec *C. elegans.*

1.2.2.1. Anatomie et cycle de vie

C. elegans est un organisme multicellulaire invertébré d'environ 1 mm sous sa forme adulte et d'environ 0,25 mm pour de jeunes larves. (**Figure 4 5**). *C. elegans* est hermaphrodite autofécondant. Il existe aussi des mâles, mais leur fréquence dans une population reste faible (entre 0,1 et 0,2 %). Il possède un cycle de vie (d'œuf à adulte) de 2,5 jours à 25 °C, de 3,5 jours à 20°C et de 5,5 jours à 15°C (Kulshreshtha 2016a).



***A** : Photographie prise au microscope optique (par Burlot en 2015).*
***B** : Schéma de l'anatomie de C. elegans (systèmes digestif et de reproduction).*

Figure 4. 5 Anatomie de *C. elegans* adulte hermaphrodite *(modifié de Wormatlas.org par Burlot 2016).*

Au cours de sa vie, un hermaphrodite, d'espérance de vie de deux semaines en moyenne, peut pondre jusqu'à environ 300 œufs tous les 5 jours. L'œuf se forme pendant 150 min *in utero* après auto-fécondation. Une fois expulsée dans le milieu extérieur, la cellule-œuf continue de se diviser pendant 9 heures puis éclot pour former une larve de type L1. (**Figure 4. 6**). Cette dernière grandit pendant 12h et devient une larve L2. Si toutes les conditions extérieures sont satisfaisantes, alors la L2 mue et devient une larve L3 en 8h, puis une larve L4 après 8h de plus et enfin un nématode adulte après 18h. Néanmoins, si après la phase L1, les vers se trouvent en sur-population, ou sont en manque de nourriture ou à une température de développement non-optimale (soit inférieure à 15°C ou supérieure à 25°C), ils peuvent alors adopter une forme alternative dite de « dauer ». Les larves dauer sont viables pendant environ trois-quatre mois. Si elles sont tranférées à nouveau dans de bonnes conditions extérieures notamment en présence de nourriture, alors elles évoluent en larves L4 directement puis en adultes capables de se reproduire (**Figure 4. 6**).

Le nématode grandit en cinq étapes (de L1 à adulte). Il est difficile de différencier les deux sexes, hermaphrodite ou mâle (**Figure 4. 6**). Seule la vulve de l'hermaphrodite (flèche blanche) est perceptible. La partie postérieure du mâle L4 est plus large (flèche noire). Au stade

adulte, le mâle possède des excroissances dans la partie postérieure formant comme un évantail criblé de terminaisons nerveuses qui facilite la reproduction avec l'hermaphrodite (wormbook.org, Couillault et Kurz 2010).

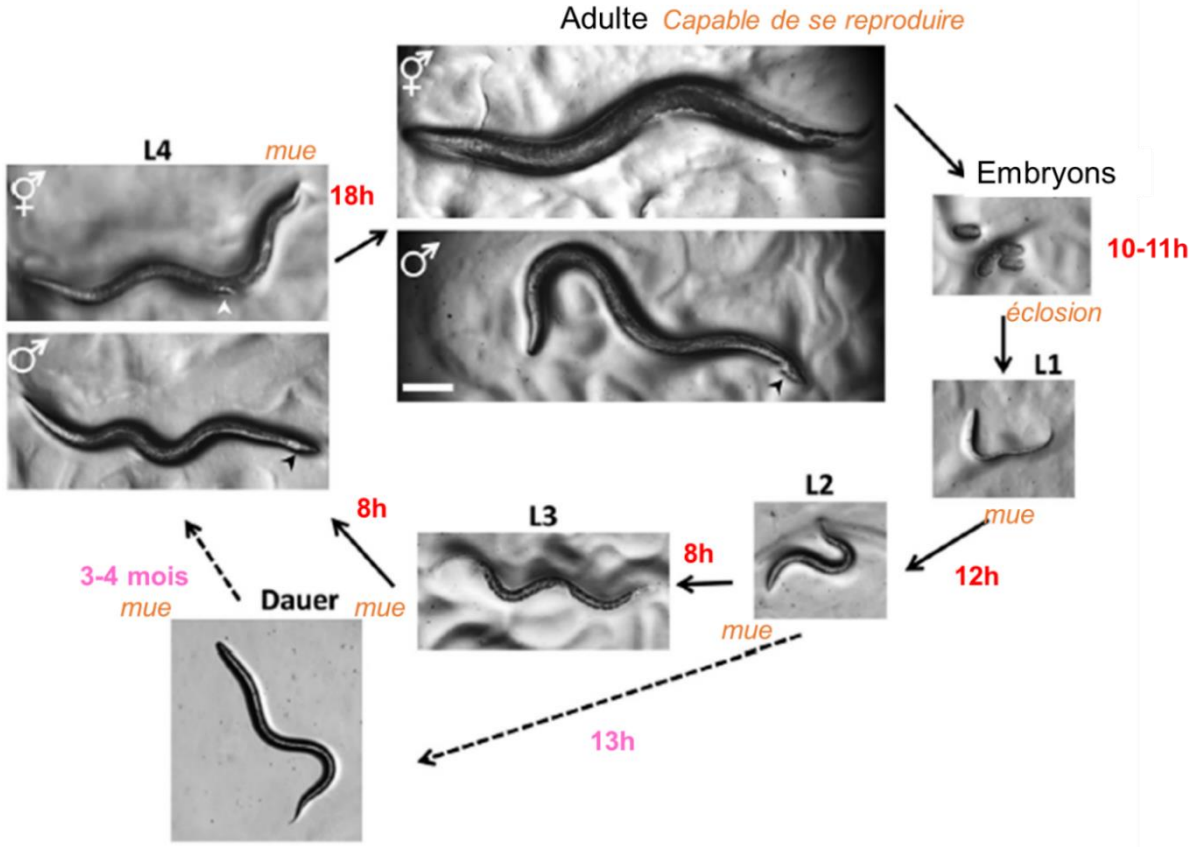


Figure 4. 6 Cycle de vie de *C. elegans* (wormbook.org, modifié par Burlot 2016).

1.2.2.2. Un outil de laboratoire pour découvrir de nouveaux composés biologiquement actifs.

C. elegans peut servir de modèle de laboratoire car il possède des caractéristiques biologiques et génétiques particulières et apporte de nombreux avantages et intérêts.

En effet, l'hermaphrodite possède exactement 959 noyaux de cellules somatiques dont 302 qui sont des neurones (Couillault et Kurz 2010). Le nombre et le type de cellules ont été déterminés et identifiés et ils ne changent pas d'un ver à l'autre. A quoi s'ajoutent l'anatomie, la morphologie transparente et le cycle de vie qui sont réguliers et identiques chez tous ces vers. Ainsi ces nombreuses constantes servent de repères et permettent de faciliter l'étude de chaque cellule et de comprendre divers mécanismes (métaboliques, locomoteurs, sensitifs).

De plus, *C. elegans* est le premier organisme multicellulaire dont le génome entier a été séquencé (**Figure 4. 7**). Cela a permis, dans un premier temps, l'identification de gènes primordiaux dans le développement et dans les procédés biologiques cellulaires (Corsi *et al.* 2015). Puis, quand les génomes d'autres animaux ainsi que des fragments de celui de l'être humain ont été séquencés, des similarités d'un point de vue moléculaire et cellulaire ont été trouvées avec celui de *C. elegans* (métabolisme, structure et fonction des organes, régulation génique).

Figure 4. 7 Couverture du journal international Science publié en 1998.

Les travaux de Kaletta et Hengartner (2006) ont montré qu'entre 60 et 80 % des gènes humains ont des gènes orthologues[5] chez *C. elegans* (Kaletta et Hengartner 2006), dont 38 % sont des gènes codant pour des protéines (Shaye et Greenwald 2011). Enfin 40 % des gènes connus comme étant associés avec des maladies humaines ont des gènes orthologues dans le génome de *C. elegans* (Culetto et Sattelle 2000; Corsi *et al.* 2015).

Son génome étant séquencé, il offre des avantages pour les études génétiques et par conséquent pour des études du système immunitaire. Il est devenu ainsi un modèle en génétique pour comprendre la biologie du développement, la neurobiologie, les fonctions et les

[5] Deux gènes sont dits orthologues s'ils remplissent deux conditions. Premièrement, ils doivent être issus d'un même gène ancestral, leurs séquences sont généralement proches (homologues). Deuxièmement, des gènes orthologues ont la même fonction.

interactions des cellules eucaryotes, les interactions entre hôtes et parasites, l'évolution du monde vivant et les mécanismes en jeu dans les maladies humaines (Couillault et Kurz 2010, Corsi *et al.* 2015). Les découvertes de composés testés sur *C. elegans* peuvent êtres utilisées comme étant des premières étapes pour des études sur la santé et les maladies touchant l'être humain.

Pour finir, *C. elegans* est « facile à manipuler » en laboratoire, dans le sens où il est maintenu en vie sur des boîtes de Pétri gélosées et nourri avec la bactérie *Escherichia coli.* Il est de petite taille, transparent, son cycle de vie est rapide, son génome est séquencé et bien annoté, et il existe une communauté scientifique assez imposante qui partage les connaissances et les dernières avancées sur des sites internet comme wormatlas.org et wormbook.org. Des photographies de *C. elegans* prises, entre autres, au microscope électronique à balayage sont disponibles sur ces sites internet et montrent l'originalité et l'anatomie détaillée de *C. elegans*.

1.2.3. Pseudomonas aeruginosa *et ses facteurs de virulence.*

1.2.3.1. Caractéristiques générales

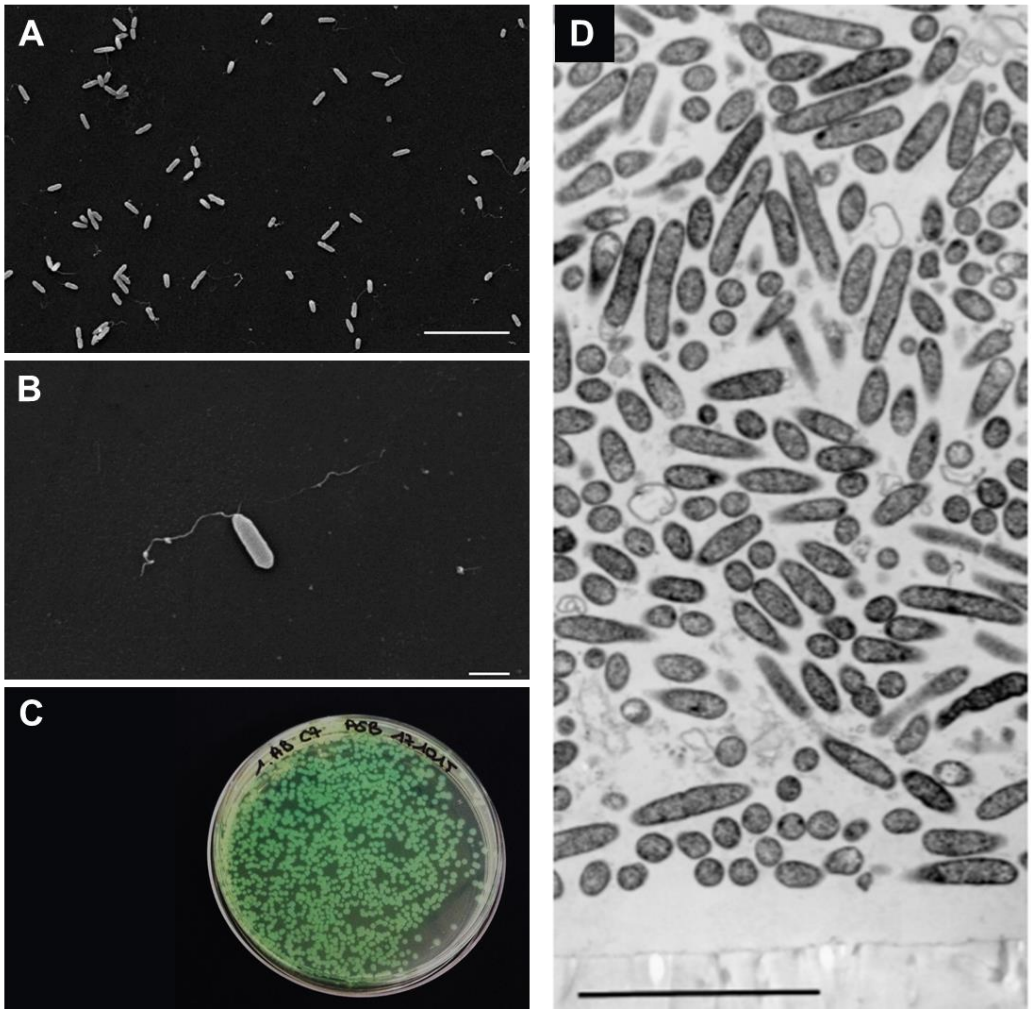
Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram négatif de l'Ordre des Pseudomonales. La systématique est donnée dans le **Tableau IV. III.**

Tableau IV. III Classification phylogénétique de *Pseudomonas aeruginosa* (Frank 2012).

Règne	**Bacteria**
Division	Proteobacteria
Classe	Gammaproteobacteria
Ordre	Pseudomonadales
Famille	Pseudomonadaceae
Genre	*Pseudomonas*

La bactérie se présente sous forme de bacille mobile grâce à un flagelle et est entourée d'appendices filamenteux que sont les pili, qui lui permettent de s'ancrer sur des surfaces ou

sur des récepteurs cellulaires (de Bentzmann et Plésiat 2011). De plus, une des caractéristiques qui distingue *P. aeruginosa* des autres Pseudomonales est la production de pyocyanine, un pigment bleu comme illustré sur la **Figure 4. 8**.



***A** : Des bacilles de* P. aeruginosa *sur une surface couverte de collagène. Échelle : 10 µm* (Tsang *et al.* 2003).
***B** : Grossissement sur un bacille de* P. aeruginosa *sur une surface couverte de collagène. Échelle : 1 µm (Tsang et al. 2003).*
***C** : Colonies de* P. aeruginosa *colorées par son pigment naturel, la pyocyanine. Échelle : le diamètre de la boîte de Pétri est de 90 mm (Burlot 2015).*
***D** : Biofilm de* P. aeruginosa *sur une surface solide. Échelle :5* µm (Stewart et William Costerton 2001).

Figure 4. 8 *Pseudomonas aeruginosa* observée au microscope électronique à balayage (**A**, **B et D**) et à l'œil nu (**C**) (Stewart et William Costerton 2001; Tsang *et al.* 2003; Burlot 2015).

P. aeruginosa est une bactérie ubiquitaire et versatile, c'est-à-dire qu'elle a la capacité de se développer dans de nombreuses conditions comme par exemple à la température du corps humain et au-delà (45°C), dans l'eau distillée, dans des désinfectants, en aérobie mais également en anaérobie à condition qu'elle trouve des nutriments dans son milieu. Ainsi, cette bactérie est retrouvée dans de nombreux environnements, terrestres comme aquatiques. De plus, il s'agit d'un pathogène opportuniste qui infecte différents hôtes allant des plantes à l'être humain (Elrod et Braun 1942). Chez ce dernier, *P. aeruginosa* est associée à des maladies comme des brûlures sévères, le sida et le cancer (Rastegar Lari *et al.* 1998). Elle est rarement pathogène chez un individu sain, mais elle est responsable d'infections, qui peuvent s'avérer très sévères, voire mortelles, des voies respiratoires, de pneumonies nosocomiales chez des patients immunodéprimés, atteints de mucoviscidose, et d'infections respiratoires chroniques. Elle est responsable ainsi de 10 % des infections nosocomiales (Vasil 1986; Tsang *et al.* 2003; Kipnis *et al.* 2006; de Bentzmann et Plésiat 2011; Frank 2012; Liu *et al.* 2013; Bazire et Dufour 2014).

1.2.3.2. Pathogénicité

La capacité de *P. aeruginosa* à interagir avec son environnement constitue un élément-clé de sa virulence. De l'anodine colonisation à l'infection invasive, *P. aeruginosa* doit franchir plusieurs étapes afin d'exprimer son pouvoir pathogène. Ce cheminement dépend surtout de l'état immunitaire de l'hôte et de l'intégrité de ses barrières cutanéo-muqueuses (de Bentzmann et Plésiat 2011). La bactérie peut provoquer des infections en interagissant directement et souvent spécifiquement avec des récepteurs cellulaires présents chez l'hôte, par le biais de structures superficielles. La pathogénicité est ensuite promue par la sécrétion de facteurs de virulence tels que la pyocyanine, le cyanure d'hydrogène, l'élastase et d'autres protéases. De plus, *P. aeruginosa* est capable de former un biofilm avec d'autres bactéries qui augmente sa résistance et accentue le processus physiopathologique.

1.2.3.2.1. Facteurs de virulence.

Les facteurs de virulence chez *P. aeruginosa* sont nombreux et variés. Beaucoup de publications scientifiques les décrivent en détail (Vasil 1986; Rastegar Lari *et al.* 1998; de Bentzmann et Plésiat 2011; Franklin *et al.* 2011; Fito-Boncompte *et al.* 2011; Frank 2012; Bazire et Dufour 2014). La revue de de Bentzmann et Plésiat présente un catalogue complet bien qu'il soit non-exhaustif de tous ces éléments participant au pouvoir pathogène. Ils sont mentionnés sur la **Figure 4. 9**, extraite de cette revue (de Bentzmann et Plésiat 2011).

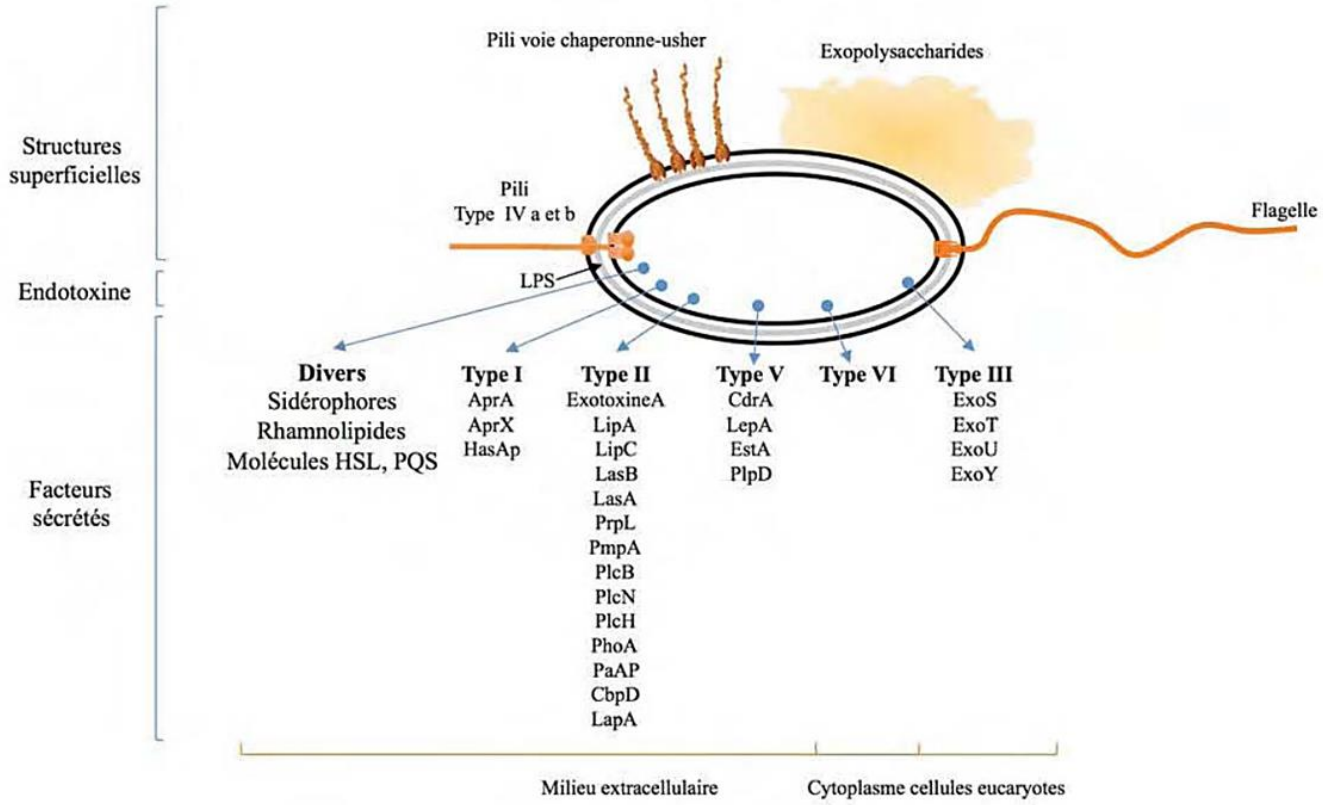


Figure 4. 9 Facteurs de virulence chez *P. aeruginosa* (de Bentzmann et Plésiat 2011).

Comme le montre la **Figure 4. 9**, à la surface de la bactérie se trouvent des structures propres aux bactéries à Gram négatif comme le flagelle et les pili. Ces derniers sont des appendices qui permettent la mobilité. Les pili voie chaperonne-usher permettent à la bactérie de s'ancrer à des récepteurs cellulaires pendant l'étape de la colonisation, et pendant celle du développement de la communauté multicellulaire (biofilm), au sein d'une matrice visqueuse d'exopolysaccharides comme les alginates. Parmi ces effecteurs virulents de surface, des

lipopolysaccharides sont présents à la surface de *P. aeruginosa* sous forme de monocouche compacte accentuant l'adhésion de la bactérie. Elle se comporte comme un élément immunogène qui est responsable de l'inflammation.

Le transport des facteurs de virulence à travers les deux membranes et la couche de peptidoglycanes constituant l'enveloppe des bactéries à Gram négatif, est assuré par différents types de mécanismes de sécrétion. Ils se différencient par la manière utilisée pour traverser l'enveloppe bactérienne et par la nature des composés sécrétés (de Bentzmann et Plésiat 2011). Ces composés sont par exemple la pyocyanine, la pyoversine qui est une sidérophore, une protéase alcaline, une élastase ou lasB, la phospholipase C, l'exotoxine A (ExoA), les toxines ExoS et ExoT, ExoY et ExoU (Kipnis *et al.* 2006; de Bentzmann et Plésiat 2011). Tous ces éléments sont néfastes une fois que la bactérie a infecté un hôte immunodéprimé. En effet, ils peuvent induire une inflammation, l'apoptose des neutrophiles, détruire la chaîne de transport des électrons et l'ATPase vacuolaire des cellules hôtes et ainsi causer des dommages liés à un stress oxydatif (Kipnis *et al*. 2006). *P. aeruginosa* est aussi capable de produire un surfactant glycolipidique constitué de rhamnolipides ayant une action lytique vis-à-vis des érythrocytes et des leucocytes de l'organisme hôte (de Bentzmann et Plésiat 2011; Bazire et Dufour 2014). Enfin, en plus de cet arsenal de composés, *P. aeruginosa* possède un système de régulation de sa virulence lui permettant de s'adapter à son environnement et de contourner la défense de l'organisme hôte. Ce système de régulation est connu sous le nom de quorum-sensing (QS).

1.2.3.2.2. Mécanisme du Quorum Sensing (QS) : l'union fait la force.

Les systèmes de QS mis en place chez *P. aeruginosa* sont exposés sur la **Figure 4. 10**. Ce sont des mécanismes sophistiqués de régulation génique et de signalisation qui permettent à la bactérie de communiquer et de se regrouper avec d'autres bactéries de la même espèce. Les bactéries communiquent en produisant des petites molécules que sont les acyl-homosérine lactones (AHL). Plus il y a de bactéries qui se rassemblent, plus il y a d'AHL produites. Quand la concentration de ces dernières atteint un certain seuil, alors les bactéries se coordonnent pour exprimer certains de leurs gènes (*lasR, rhlR, lasI et rhlI*) pour le bien de la communauté. Cette

expression génique coordonnée concerne les gènes de survie, mais surtout les gènes codant pour les facteurs de virulence et ceux pour la formation de biofilms (Kipnis *et al.* 2006).

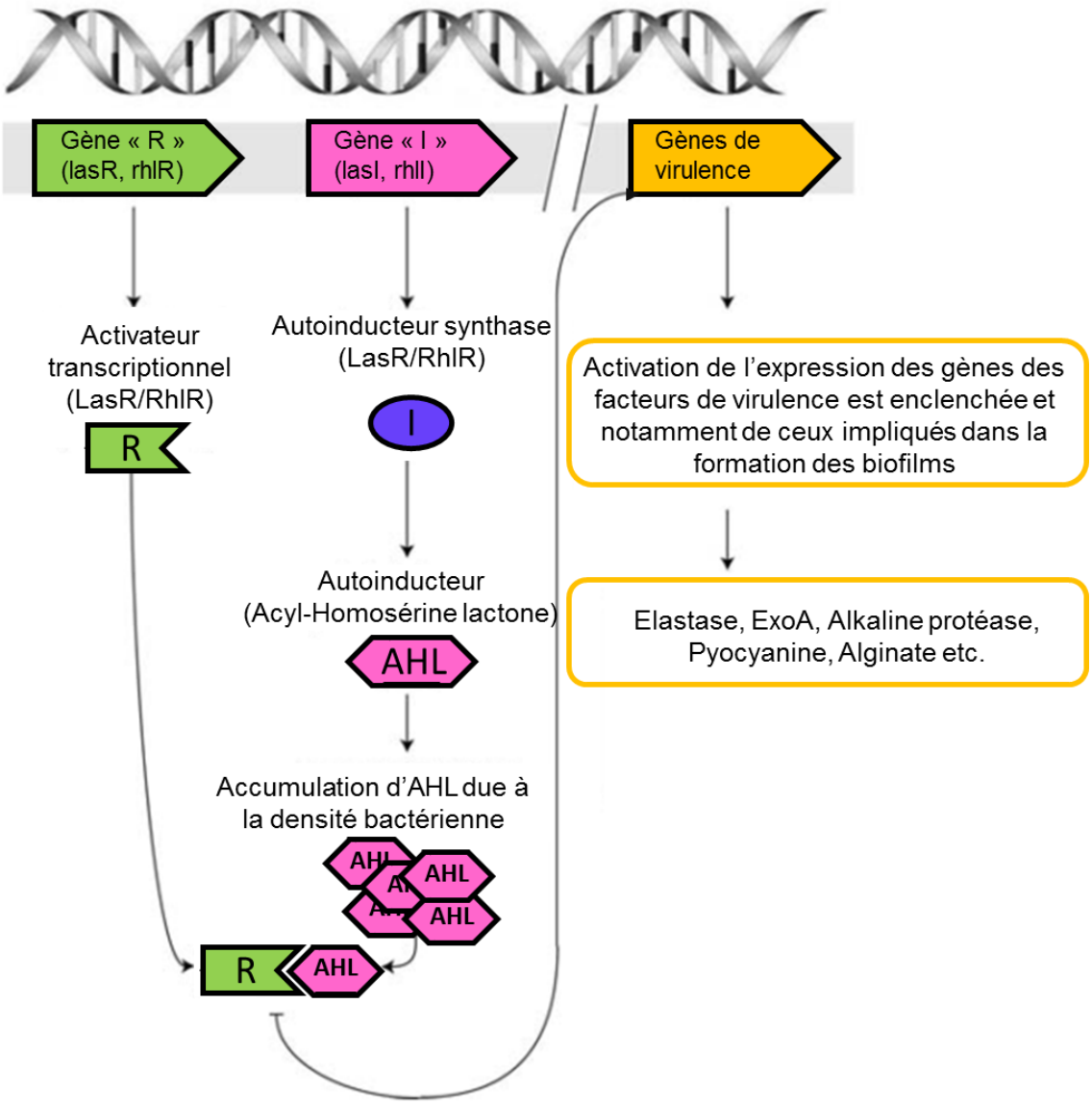


Figure 4. 10 Schéma du QS de *P. aeruginosa* (Kipnis *et al.* 2006 *modifié par Burlot 2016).*

1.2.3.3. Antibiotiques et résistance

Le séquençage du génome de la souche modèle PAO1 de *P. aeruginosa* a été achevé en 2000. *P. aeruginosa* possède le plus grand génome bactérien connu jusqu'à aujourd'hui avec 6,3 millions de paires de bases nucléotidiques et 5 570 gènes. Parmi ces derniers, 8,4 % correspondent à des gènes de régulation, qui dirigent la biologie de cet organisme, la plus large

proportion jamais retrouvée chez les bactéries (Hancock et Speert 2000; Kipnis *et al*. 2006). Le génome est assez bien conservé chez toutes les autres souches de *P. aeruginosa* isolées cliniquement comme la deuxième souche de référence PA14. 10 % du génome est variable d'une souche à l'autre (Kipnis *et al.* 2006; Gómez-Zorrilla *et al.* 2016). L'ensemble des gènes de régulation couplé aux mécanismes de transfert de gènes comme la conjugaison, la transformation ou encore la transduction[6] permettent à cette bactérie de s'adapter à son milieu.

Plusieurs classes d'antibiotiques sont communément utilisées dans le traitement des infections de *P. aeruginosa*. Il s'agit des pénicillines, des céphalosporines, des aminoglycosides, des quinolones, des polymyxines et des carbapénèmes (**Figure 4. 11**). Ces antibiotiques agissent principalement en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne (pénicillines, céphalosporines et carbapénèmes), la synthèse protéique (aminoglycosides), la synthèse ou le fonctionnement des acides nucléiques (quinolones) ou en agissant directement sur la membrane plasmique (polymyxines) (Hancock et Speert 2000).

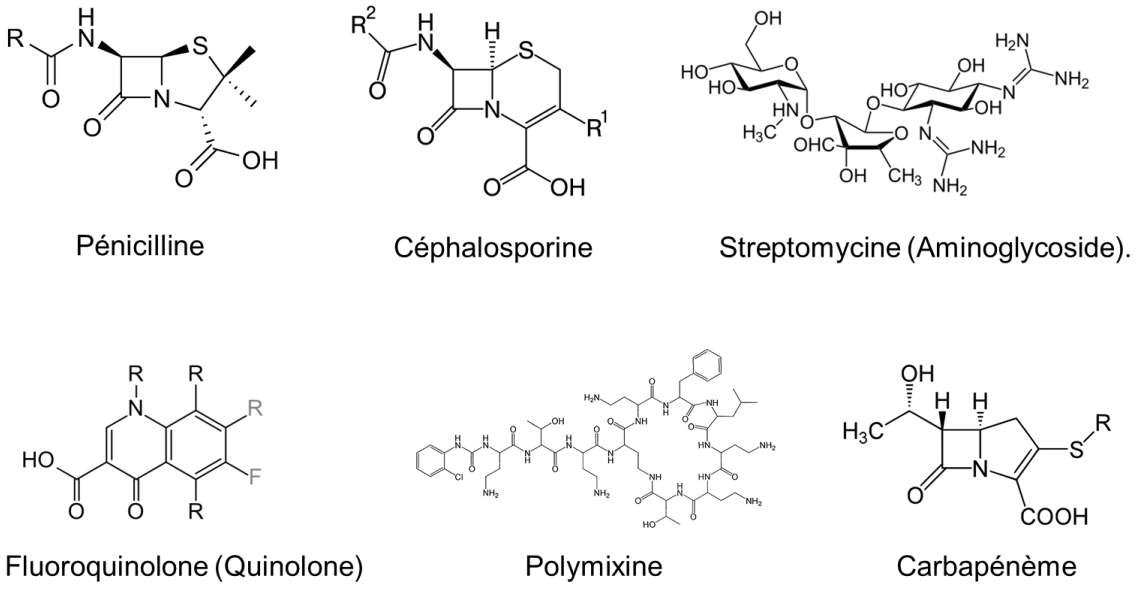


Figure 4. 11 Structures chimiques des antibiotiques utilisés contre les infections de *P. aeruginosa*.

[6] Processus qui consiste en un transfert de matériel génétique entre deux bactéries par l'intermédiaire d'un vecteur viral.

Néanmoins, au cours du temps, *P. aeruginosa* a élaboré des stratégies de résistance aux antibiotiques qui consistent en une collaboration de plusieurs éléments.

Premièrement, la perméabilité de la membrane extérieure de *P. aeruginosa* est 10 à 100 fois plus faible que d'autres bactéries à Gram négatif comme *Escherichia coli.* L'absorption des antibiotiques est ainsi restreinte, bien qu'il existe des protéines qui forment des canaux au travers des membranes et de la paroi bactérienne. Ces protéines appelées porines (OprF, OprB, OprD, OmpF) permettent alors la diffusion de petites et grosses molécules de manière plus ou moins sélective. Deuxièmement, *P. aeruginosa* a à sa disposition des systèmes d'efflux qui éliminent tous les composés à excréter. Ils sont composés de protéines cytoplasmiques qui servent de pompes comme par exemple MexB, de protéines liantes périplasmiques comme MexA et d'une porine (par exemple OpmF). En outre, la bactérie synthétise une enzyme, qu'elle sécrète à la surface de sa paroi, qui a pour but d'hydrolyser les molécules antibiotiques bêta-lactamines telles que les pénicillines et les céphalosporines. Enfin, la formation de biofilms accentue cette résistance par la cohésion des bactéries entre elles qui se protègent mutuellement (Hancock et Speert 2000; Stewart et William Costerton 2001; Taylor *et al.* 2014).

Aujourd'hui, les thérapies les plus efficaces contre les infections de *P. aeruginosa* sont l'utilisation d'antibiotiques de manière raisonnée (thérapie combinatoire) et restreinte, la combinaison entre un agent actif comme une bêta-lactamine et un agent anti-résistant (inhibiteur de la bêta-lactamase), l'inhalation et la prévention de l'infection (Hancock et Speert 2000).

Depuis que le génome a été séquencé, il existe quand même un espoir sur le long terme en identifiant la base de la résistance et en découvrant de nouvelles cibles thérapeutiques. Par exemple, les mutations des gènes codant pour les porines, pour les systèmes d'efflux, pour la bêta-lactamase ont déjà montré des hyper-sensibilités aux antibiotiques. Une stratégie contre la résistance adaptative a été formulée par Taylor *et al.* (2014) en considérant la spécificité des biofilms. En effet, plusieurs aspects peuvent être exploités comme l'inhibition de l'adhérence du biofilm sur une surface, l'inhibition du QS et l'inhibition de la signalisation intervenant dans les différentes étapes de la formation du biofilm (adhérence, colonisation, maturation, et dispersion). Enfin, des recherches d'immunisation contre *P. aeruginosa* ont été lancées et des

stratégies d'élaboration de vaccins ont été testées, mais aucune n'a fonctionné jusqu'à nos jours (Taylor *et al.* 2014).

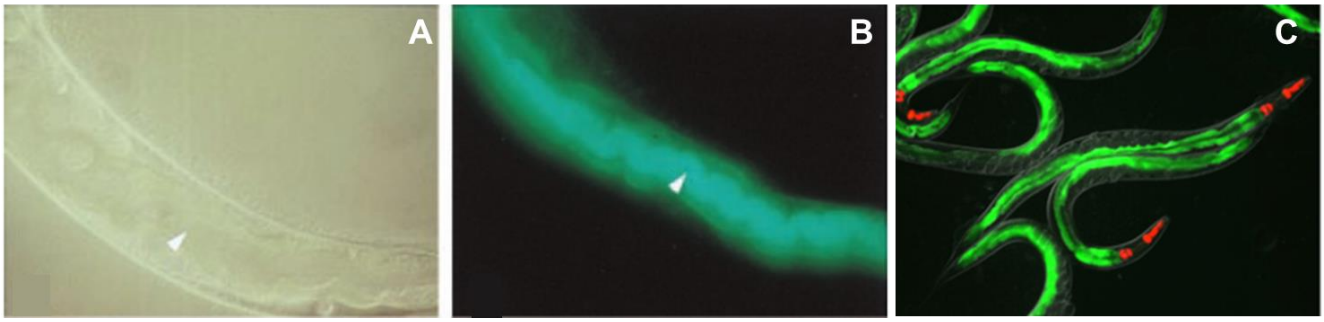
1.2.4. *Modèle de pathogénicité* P. aeruginosa-C. elegans

Ces dernières années, les études notamment sur les maladies infectieuses ont bénéficié du développement de modèles *in vivo* de pathogénicité associant les bactéries et leurs hôtes. Un des modèles les mieux caractérisés est celui constitué de *C. elegans* et *P. aeruginosa* (Chauvet et Ewbank 2000). Les modèles de pathogénicité permettent de mieux comprendre l'interaction qui a lieu entre deux organismes vivants d'un point de vue physiologique, biologique et génétique. Ainsi, de nouvelles cibles thérapeutiques peuvent être envisagées ainsi que la prévention d'infections microbiennes.

1.2.4.1. Infection de C. elegans *par* Pseudomonas aeruginosa.

La connaissance des génomes séquencés des deux organismes a ouvert de nouvelles perspectives pour la compréhension des interactions entre l'invertébré *C. elegans* et la bactérie *P. aeruginosa*. De plus, *P. aeruginosa* est une bactérie létale à l'encontre de *C. elegans*, qu'elle tue en quelques jours seulement, et est aussi pathogène à l'encontre de l'être humain, des plantes et des animaux, en particulier la souche clinique isolée PA14. Chacune des espèces en interaction cherche à reconnaître puis à éliminer l'autre. Pour cela, l'hôte possède un système de surveillance et un arsenal de molécules de défense. Quant à l'agent pathogène, il a la capacité de reconnaître son hôte, dispose de divers mécanismes d'attaque et développe des stratégies lui permettant d'échapper ou de contrecarrer les défenses de son hôte (Tan *et al.* 1999; Chauvet et Ewbank 2000).

P. aeruginosa a montré deux modes distincts pour tuer *C. elegans.* Premièrement, si *C. elegans* vit dans un milieu pauvre en nutriment et qu'il est infecté par la bactérie, alors il vivra pendant quelques jours avant de mourir (« Slow killing »). Des bactéries pathogènes seront retrouvées dans son système digestif, en particulier dans son intestin où elles ont pour habitude de s'accumuler avant de détruire les tissus cellulaires du ver (**Figure 4. 12**). Tan *et al.* (1999) ont mesuré le TL_{50} (Temps Létal) de 39,6 ± 2,8 heures, qui correspond au temps nécessaire pour que l'agent pathogène tue 50 % de la population hôte.



*La lumière du tractus digestif, indiquée par la tête de flèche (**A** et **B**), de C. elegans infecté par PA14, apparaît verte montrant la présence et l'abondance de ces bactéries marquées à la GFP (**A, B** et **C**)*

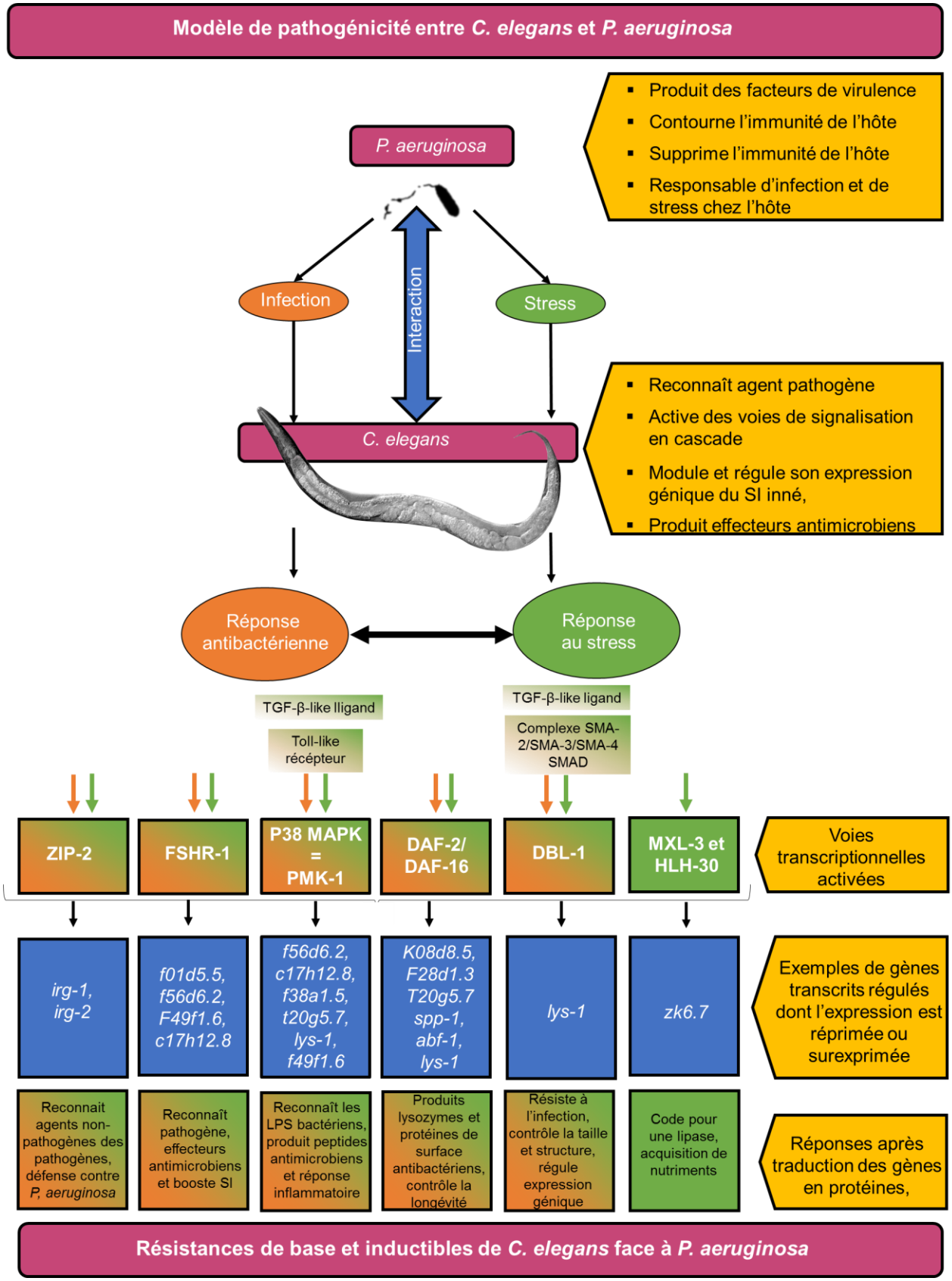
Figure 4. 12 Photographies d'une partie de l'intestin de *C. elegans* infecté par PA14 marquée à la GFP[7] prises au microscope à contraste interférentiel de Nomarski (**A**) et à fluorescence (**B et C**). Échelle : un ver est long d'environ 1 mm et son diamètre est d'environ 80 µm (Tan *et al.* 1999; Estes *et al*. 2010).

Deuxièmement, le ver peut mourir en quelques heures à cause de toxines diffusibles de faibles poids moléculaires secrétées par la bactérie quand cette dernière est en condition de stress osmotique par exemple (« Fast killing »). D'après Feinbaum *et al*. (2012), 170 gènes de *P. aeruginoa* sont impliqués dans la virulence à l'encontre de *C. elegans*. Son étude a montré que chaque gène a un impact sur la virulence expliquant l'ubiquité de la bactérie (Feinbaum *et al*. 2012).

1.2.4.2. Voie de signalisation de l'immunité chez C. elegans *en réponse à l'infection de* Pseudomonas aeruginosa.

L'immunité adaptative est spécifique des vertébrés. En utilisant le modèle de pathogénicité *C. elegans* et *P. aeruginosa,* seule l'immunité innée du nématode est étudiée (Chauvet et Ewbank 2000*)*. L'analyse phylogénétique des mécanismes responsables des défenses innées antimicrobiennes suggère leur ancienneté et leur forte conservation au cours de l'évolution (Hoffmann *et al.* 1999). Les interactions entre *C. elegans* et *P. aeruginosa* ainsi que les principaux mécanismes de réponse du système immunitaire inné (SII) du nématode sont schématisés sur la **Figure 4. 13**.

[7] GFP est l'acronyme de l'anglais Green Fluorescente Protein. C'est une protéine issue d'une méduse ayant la propriété d'émettre une fluorescence de couleur verte.



Légende
SI : système immunitaire

Figure 4. 13 Modèle de pathogénicité entre *C. elegans* et *P. aeruginosa* et réponses du système immunitaire du nématode infecté.

Cette figure a été obtenue en récapitulant tous les mécanismes génétiques transcriptionnels décrits dans la littérature. Des gènes ayant un rôle dans le SII du nématode sont donnés en exemple (Ewbank 2006; Powell *et al.* 2009; Estes *et al.* 2010; Kandasamy *et al.* 2012; O'Rourke et Ruvkun 2013; Liu *et al*. 2013; Ermolaeva et Schumacher 2014; Kulshreshtha *et al*. 2016a; Kulshreshtha 2016b).

L'infection de *C. elegans* par *P. aeruginosa* engendre un stress pour le nématode. Pour y faire face, des réactions d'adaptation correspondant à des réponses au stress et de défense antibactérienne se développent chez *C. elegans*. L'immunité innée du nématode inclue des mécanismes de défense constitutive et inductible (Powell *et al.* 2009). En effet, *C. elegans* présente des récepteurs à la surface de certaines de ses cellules (TGF-like ligands et Toll-like récepteurs) qui vont reconnaître le pathogène, notamment les LPS de la paroi des bactéries à Gram négatif (Ewbank 2006). Les informations concernant l'infection du pathogène sont alors transmises par l'activation de différentes voies de signalisation, qui induisent des cascades de régulations géniques. Des gènes d'adaptation au stress engendré par le pathogène ainsi que des gènes codant pour des effecteurs antibactériens vont alors être soit réprimés, soit surexprimés afin de répondre et de résister au mieux à l'infection bactérienne. En 2006, 3 voies de signalisation de l'infection de bactéries à Gram négatif étaient connues. Il s'agissait des voies de DBL-1, du DAF-2/DAF-16 et des MAP kinases[8] soit la p38 MAPK ou la PMK-1 (Ewbank 2006). Des années plus tard, d'autres voies de signalisation ont été découvertes grâce, entre autres, à l'étude de mutants de *C. elegans*. En 2009, Powell *et al*. montrent une nouvelle voie de signalisation qui est conservée chez les vertébrés, la voie FSHR-1. Cette dernière permet de détecter la présence de pathogène en utilisant le récepteur FSHR-1 de *C. elegans* couplé à une protéine G, qui transfère l'information à l'intérieur des cellules. Cette voie converge avec celle de la p38 MAPK et avec l'induction transcriptionnelle d'un ensemble de gènes codant notamment pour des effecteurs antimicrobiens (Powell *et al.* 2009). En 2010, Estes *et al.* mettent en évidence l'importance de la voie ZIP-2 qui permet au nématode de différencier les bactéries pathogènes des bactéries qui ne le sont pas. Cette voie permet ainsi de renforcer les défenses immunitaires envers les pathogènes (Estes *et al.* 2010). Toutes ces voies de signalisation, bien qu'indépendantes, interagissent bien souvent entre elles et forme un mécanisme complexe du SII de *C. elegans.* De plus, dans des études concernant le modèle de

[8] MAPK, acronyme anglais pour Mitogen-Activated Protein Kinases correspond à un ensemble de protéines kinases nécessaires à la survie cellulaire.

pathogénicité *C. elegans-P. aeruginosa*, le gène *zk6.7* est analysé (Kandasamy *et al.* 2012; Liu *et al.* 2013). Il est transcrit quand les voies MXL-3 et HLH-30 sont activées. Il code pour une lipase de lysozyme, impliquée dans l'acquisition de nutriments en condition de stress. Ainsi, après activation de ces voies d'inductions transcriptionnelles, les gènes mentionnés sur la **Figure 4. 13** sont régulés et leurs expressions vont permettre de reconnaitre la pathogénicité de *P. aeruginosa*, de produire des peptides et protéines antimicrobiens, de stimuler son SII, de réguler d'autres gènes ou encore d'acquérir des nutriments pour sa survie.

1.3. Production d'extraits et de composés antiviraux, antibactériens et immunostimulants issus de Gigartinales.

Les propriétés physico-chimiques et les activités biologiques conférées aux extraits d'algues sont liées à leur composition. Différentes méthodes d'extraction puis de purification peuvent être employées pour les produire. Elles doivent être choisies en fonction du composé d'intérêt, mais aussi en fonction de l'application envisagée. Dans beaucoup d'études, des extraits sont produits en ciblant un composé en particulier et des évaluations d'activités biologiques sont ensuite réalisées. Un fractionnement chimio- et bio-guidé est, dans de nombreux cas, réalisé afin d'isoler le composé actif en fonction de sa polarité, de sa taille, de sa structure ou encore de sa réactivité. À chaque étape d'extraction et de purification, l'activité biologique est évaluée. Celle-ci est renforcée au fur et à mesure des étapes de concentration du composé actif. Des exemples de productions d'extraits et de composés antiviraux, antibactériens et immunostimulants issus de Gigartinales sont rassemblés de manière non exhaustive dans le **Tableau IV. IV.** Les différentes voies de production ainsi que les domaines d'application visés sont détaillés à la suite de ce tableau.

Tableau IV. IV Productions d'extraits antiviraux, antibactériens et immunostimulants reportées chez les Gigartinales. (1/5)

Activité	**Algues (Lieu de collecte)**	**Domaine d'application *(hôte spécifique)***	**Extraction (*produit, fraction ou composé extrait (e)*)**	**Concentrations ou quantités mentionnées**	**Références**
Antivirale	*Gigartina skottsbergii* (Patagonie, Argentine)	Agriculture élevages (*bovins et porcins*)	Hydrolyse à température ambiante et fractionnement au KCl *(Lambda-carraghénanes)*	*Anti BoHV-1:* CI_{50} *= 0,52 ± 0,01 µg/mL VC_{50} **= 0,96 ± 0,08µg/mL YC_{50} ***= 1,37 ± 0,13 *Anti-SuHV-1 :* CI_{50} = 10.42 ± 0,88 VC_{50} = 31,10 ± 2,28 YC_{50} = 73,54 ± 2,07	Diogo *et al.* 2015
	Chondrus crispus (Acadian Seaplants Limited, Nova Scotia, Canada)	Nutrition et santé humaine voire animale	EAE, sous agitation pendant 3h à 50°C *(Extrait hydrosoluble)*	*Anti VHS-1 :* CE_{50} ****= 161,1 ± 4,3	Kulshreshtha *et al.* 2015
	Hypnea spinella (Rameshwaram, Tamil Nadu, Inde)	Aquaculture (*crabe d'eau douce*)	*(Extrait méthanolique)*	*Anti-WSSV :* activité antivirale non négligeable	Dinesh *et al.* 2014
	Solieria chordalis (Brittany, France)	Nutrition et santé humaine voire animale	EAE sous agitation pendant 5h à 50°C et hydrolyse *(Extraits hydrosolubles)*	*Anti VHS-1 :* CE_{50} = 23,0 ± 1,7 - 101,1 ± 11,0	Hardouin *et al.* 2013
	Hypnea musciformis (côtes syriennes)	Agriculture (*plants de tabac*)	Hydrolyse à température élevée et précipitation à l'éthanol *(Kappa-carraghénanes)*	*Anti- TMV :* Baisse de l'accumulation et de l'infectiosité du virus et hausse de l'immunité chez l'hôte à partir de 20 µM jusqu'à 800 µM	Ghannam *et al.* 2013
	Sphaerococcus coronopifolius (Détroit de Gibraltar, Maroc)	Nutrition et santé humaine voire animale	Hydrolyse et précipitation à l'éthanol *(Polysaccharides sulfatés hydrosolubles)*	*Anti VHS-1:* CE_{50} = 4,1 Anti VIH: CE_{50} = 12,5	Bouhlal *et al.* 2011

Tableau IV. IV Productions d'extraits antiviraux, antibactériens et immunostimulants reportées chez les Gigartinales (2/5).

Activité	**Algues (Lieu de collecte)**	**Domaine d'application *(hôte spécifique)***	**Extraction (*produit, fraction ou composé extrait (e)*)**	**Concentrations ou quantités mentionnées**	**Références**
Antivirale	*Hypnea musciformis* *Plocamium cartilagineum* *Sphaerococcus coronopifolius* (côtes de l'Atlantique, du Maroc et de la Méditerranée)	Nutrition et santé humaine voire animale	Extractions organiques avec du chloroforme - méthanol (3: 2), dichlorométhane (100%), méthanol (100%) et *(Extraits organiques)* Hydrolyse *(extrait aqueux)*	*Anti VHS-1 :* CE_{50} = 6,5 – 51,4, CE_{50} = 6,4 – 27,4, CE_{50} = 4,4 – 25,4, CE_{50} = 2,5 -75,9	Bouhlal *et al.* 2010
	Gigartina atropurpurea (Marlborough Sounds, Nouvelle Zélande)	Nutrition et santé humaine voire animale	Hydrolyse à température élevée avec du $NaHCO_3$ et précipitation à l'éthanol (*Carraghénanes)*	*Anti VHS-1:* CE_{50} = 2,5 – 3,6 *Anti VHS-2:* CE_{50} = 0,7 – 6,6	Harden *et al.* 2009
	Meristiella gelidium (côte nord-est du Brésil)	Nutrition et santé humaine voire animale	Hydrolyse, fractionnement au KCl et traitement alcalin *(Iota/kappa/nu-hybrides carraghénanes)*	*Anti VHS-2:* IC_{50} = 0,04 ± 0,01 – 0,06 ± 0,01 *Anti-DENV-2:* IC_{50} = 0,14 ± 0,01 – 0,79 ± 0,04	de S.F-Tischer *et al.* 2006
	Schizymenia binderi (Navidad Bay, Chili)	Nutrition et santé humaine voire animale	Hydrolyse, précipitation à l'éthanol, traitement alcalin et purification par chromatographie *(Galactanes natifs et galactanes non-natifs)*	*Anti VHS-1:* CE_{50} = 0,76 ± 0,01 *Anti VHS-2:* CE_{50}= 0,63 ± 0,02	Matsuhiro *et al.* 2005
	Callophyllis variegata (Santa Cruz, Argentine)	Nutrition et santé humaine voire animale	Hydrolyse, fractionnement avec du KCl et traitement alcalin *(Polysaccharides sulfatés)*	*Anti VHS-1:* IC_{50} = 0,16 ± 0,02 - 1,55 ± 0,37 *Anti VHS-2 :* IC_{50} = 0,21 ± 0,08 - 2,19 ± 0,70 *Anti_DENV-2:* IC_{50} = 0,10 ± 0,01 - 0,41 ± 0,12 Anti VCMH: IC_{50} = 0,79 ± 0,2	Rodríguez *et al.* 2005

Tableau IV. IV Productions d'extraits antiviraux, antibactériens et immunostimulants reportées chez les Gigartinales (3/5).

Activité	**Algues (Lieu de collecte)**	**Domaine d'application *(hôte spécifique)***	**Extraction (*produit, fraction ou composé extrait (e)*)**	**Concentrations ou quantités mentionnées**	**Références**
Antivirale	*Gymnogongrus griffithsiae* (Brésil)	Nutrition et santé humaine voire animale	Hydrolyse et précipitation à l'éthanol *(Galactanes sulfatés et fractions de galactanes sulfatés)*	*Anti-VHS-1:* IC_{50} = 1 - 5,6 µg/mL VC_{50} = 8,5 µg/mL *Anti-VHS-1 B 2006:* IC50 = 0,4 - 2,8 µg/mL *Anti-VHS-1 1C3-syn 13-8:* IC_{50} = 0,3 - 3,4 µg/mL *Anti-VHS-1 1C3-syn 14-1:* IC_{50} = 2,7 - 16,7 µg/mL Anti-VHS-2 G: IC_{50} = 1,0 - 3,3 µg/mL Anti-VHS-2 MS: IC_{50} = 0,1 - 0,4 µg/mL	Talarico *et al.* 2004
	Chondrus ocellata (Corée du Sud)	Nutrition et santé humaine et animale	Extraction au méthanol pendant 24h *(Extrait méthanolique)*	*Anti VHS-1 :* Pas d'activité *Anti-virus de la polio type 1 :* 200 µg/mL *Anti SINV :* Pas d'activité	Hudson *et al.* 1998
	Gigartina skottsbergii (Province de Chubu, Argentine)	Nutrition et santé humaine voire animale	Hydrolyse à température ambiante. La fraction liquide a été mélangée à 3 volumes d'isopropanol. Un traitement alcalin a ensuite été réalisé *(Carraghénanes)*	*Anti-VHS-1 :* IC_{50} allant de 0,3 à 67,6 µg/mL *Anti VHS-2 :* IC_{50} allant de 0,3 à 60,2 µg/mL	Carlucci *et al.* 1997
	Schizymenia dubyi (Sicile, Italie)	Nutrition et santé humaine et animale	Hydrolyse *(Polysaccharides sulfatés hydrosolubles et galactanes sulfatés)*	*Anti-VHS-1:* ED_{50}**** = 1,5 - 5 *Anti-VHS-2 :* ED_{50} = 6 – 25 *Anti-virus de la polio type 2 :* ED_{50} = 30 – 44 *Anti-VVS :* ED_{50} = 10 – 15	Bourgougnon *et al.* 1993

Tableau IV. IV Productions d'extraits antiviraux, antibactériens et immunostimulants reportées chez les Gigartinales (4/5).

Activité	**Algues (Lieu de collecte)**	**Domaine d'application *(hôte spécifique)***	**Extraction (*produit, fraction ou composé extrait (e)*)**	**Concentrations ou quantités mentionnées**	**Références**
Antibactérienne	*Chondrus crispus* *Sarcodiotheca gaudichaudii* (Cultivées en Nouvelle Ecosse, Canada)	Pharmaceutique Agriculture Anti-*Salmonella enteritis*	Hydrolyse pendant 3h à 50°C sous agitation et centrifugation pendant 20 min *(Extrait aqueux)*	0,2-2 mg/ml (IC50, anti-mobilité et antibiofilm)	Kulshrehtha *et al.* 2016
	Hypnea musciformis *Hypnea valentiae* (Côtes sud et sud-est de l'Inde)	Pharmaceutique	Extraction au méthanol et séchage à l'évaporateur rotatif *(Extrait au méthanol)*	30 µl d'extrait *Concentration non mentionnée*	Pramitha et Lipton 2013
	Chondrus crispus (Cultivée en Nouvelle-Ecosse, Canada)	Pharmaceutique Anti-*Pseudomonas aeruginosa*	Hydrolyse sous sonication pendant 1h à température ambiante *(Extraits aqueux)*	Extrait aqueux : 500 µg/mL	Liu *et al.* 2013
			Standard commercial *(kappa-carraghénanes)*	κ-carraghénane : 200 µg/mL	
	9 Gigartinales (Maroc)	Pharmaceutique	Extraction selon Soxhlet pendant 8h avec du méthanol *(Extraits au méthanol)*	25 µl d'extrait *Concentration non mentionnée*	Rhimou *et al.* 2010
	Hypnea valentiae (Côte sud-ouest de l'Inde)	Aquaculture Pharmaceutique Agriculture	Extraction sous agitation avec du méthanol pendant 2 semaines à 35°C, centrifugation pendant 5 min à 20°C et séchage à l'évaporateur rotatif *(Extraits au méthanol)*	100 µl d'extrait *Concentration non mentionnée*	Manilal *et al.* 2009
	Chondrus crispus *Mastocarpus stellatus* (Bretagne, France)	Aquaculture *(Antifouling)*	Extraction sous agitation avec de l'éthanol 95 %, 5 centrifugations pendant 30 min à 4°C et séchage à l'évaporateur rotatif *(Extraits à l'éthanol)*	Concentrations minimales inhibitrices de 24 à 48 µg/mL	Hellio *et al.* 2001

Tableau IV. IV Productions d'extraits antiviraux, antibactériens et immunostimulants reportées chez les Gigartinales (5/5).

Activité	**Algues (Lieu de collecte)**	**Domaine d'application *(hôte spécifique)***	**Extraction (*produit, fraction ou composé extrait (e))***	**Concentrations ou quantités mentionnées**	**Références**
Immuno-stimulante	*Chondrus crispus* *Sarcodiotheca gaudichaudii* (Cultivées en Nouvelle Ecosse, Canada)	Pharmaceutique Agriculture Immunostimulant	Hydrolyse pendant 3h à 50°C sous agitation et centrifugation pendant 20 min *(Extrait aqueux)*	400 µg/mL	Kulshrehtha *et al*. 2016
	Solieria chordalis (Bretagne)	Pharmaceutique pour lutter contre la leucémie	Molécule purifiée SC2310	Pas de donnée	Leucémie-espoir.org 2016
	Chondrus crispus (Cultivée en Nouvelle-Ecosse, Canada)	Pharmaceutique Immunostimulant	Hydrolyse sous sonication pendant 1h à température ambiante *(Extraits aqueux)*	Extrait aqueux : 500 µg/mL	Liu *et al.*2013
	Solieria filiformis (Brésil)	Pharmaceutique Anti-inflammatoire Analgésique	EAE avec de la papaïne pendant 6h à 60°C, Fractionnement par passage sur colonne. *(Polysaccharides sulfatés, essentiellement des ι-carraghénanes)*	Polysaccharides sulfatés : 1 à 9 mg par kg de souris ou rat Carraghénanes 500 µg par patte de souris ou rat	de Araújo *et al.* 2011
	Solieria chordalis (Bretagne, baie de Brest)	Pharmaceutique Immunostimulant du système immunitaire inné	Hydrolyse pendant 4h à 85°C et traitement alcalin. Fractionnement réalisée par chromatographie exclusion stérique *(Fractions de 20 kDa issues de la dépolymérisation de ι-carraghénanes*)	10 mM de fraction de faible poids moléculaire	Bondu *et al*. 2010
	Mastocarpus stellatus (Bretagne, Plouzané)	Pharmaceutique Immunostimulant (du système complément)	Extraction avec une solution de MeOH-$CHCl_3$-H2O pendant 1h à température ambiante, séchage à l'évaporateur rotatif et purifications sur colonnes *(cristaux de floridoside)*	5-50 µg de cristaux de floridoside purifié	Courtois *et al.* 2008

Légende du tableau :
*****CI$_{50}$** *: Concentration Inhibitrice 50 : concentration de l'échantillon (extrait ou composé) qui réduit de 50 % l'effet cytopathique de virus.*
******VC$_{50}$** *: Virucidal Concentration 50 : concentration de l'échantillon qui inactive 50 % des virions.*
*******YC$_{50}$** *: Yield Concentration 50 : concentration de l'échantillon qui réduit de 50 % la descendance du virus. Cette donnée mesure la capacité d'un échantillon à inhiber la production de virus.*
********CE$_{50}$ = ED$_{50}$** *: Concentration Efficace ou en anglais Effective Dose 50 : concentration de l'échantillon qui protège 50 % des cellules infectées par le virus.*

L'ensemble de ces études ont montré des activités antivirales efficaces avec des CE$_{50}$ et des CI$_{50}$ faibles, comprises entre 0,04 et 161,1 µg/mL pour des multiplicités d'infection le plus souvent fixées entre 0,01 et 0,001 DI$_{50}$/mL avec DI$_{50}$ (Dose Infectieuse) correspondant à la concentration de l'agent pathogène (virus) nécessaire pour infecter 50 % des cellules hôtes (Bourgougnon *et al.* 1993; Bouhlal *et al.* 2010; Bouhlal *et al.* 2011; Hardouin *et al.* 2013; Kulshreshtha *et al.* 2015). L'activité antivirale est évaluée soit par la CE$_{50}$, c'est-à-dire la concentration de l'échantillon qui protège 50 % des cellules infectées par le virus, soit par la CI$_{50}$, qui représente la concentration de l'échantillon nécessaire pour réduire de 50 % l'effet cytopathique de virus. Des extraits ont été obtenus et ont montré des activités contre le VHS-1 avec des concentrations efficaces allant de 4,4 à 161,1 µg/mL (Bouhlal *et al.* 2010; Hardouin *et al.* 2013; Kulshreshtha *et al.* 2015).

Quant à l'activité antibactérienne des Gigartinales envers des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, dont *P. aeruginosa*, il est difficile de déterminer les concentrations efficaces des extraits ou des composés. En effet, les résultats des études du **Tableau IV. IV** sont souvent issus de données qualitatives. De plus, les extraits sont, en majorité, produits en présence de solvants organiques et la grande majorité des auteurs ne mentionnent pas de concentration, mais des volumes d'extraits concentrés mis en contact avec les bactéries. Hellio *et al.* (2001) ont déterminé des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de 24 à 48 µg/mL d'extraits éthanoliques de *Chondrus crispus* et de *Mastocarpus stellatus.* Ces extraits inhibaient la croissance de bactéries marines exclusivement à Gram positif (Hellio *et al.* 2001). Des résultats publiés par le laboratoire canadien partenaire du LBCM ont mis en évidence une activité anti-*P. aeruginosa* et anti- *Salmonella enteritidis* (bactéries à Gram négatif) après application d'extraits aqueux de *Chondrus crispus* et de *Sarcodiotheca gaudichaudii*, mais aussi de κ-

carraghénanes standards de concentrations comprises entre 200 et 2 000 µg/mL (Liu *et al.* 2013; Kulshreshtha *et al.* 2016b).

Enfin, des concentrations de 400 µg/mL et de 500 µg/mL d'extraits aqueux issus des algues citées précédemment ainsi que des fractions de 20 kDa de ι-carraghénanes de *S. chordalis* à 10 mM ont montré un effet positif sur le système immunitaire (Bondu *et al.* 2010; Liu *et al.* 2013; Kulshreshtha *et al*. 2016b). En outre, 5 à 50 µg de floridoside purifié de *Mastocarpus stellatus* activent le système complément *in vitro* (Courtois *et al.* 2008). Des polysaccharides sulfatés et en particulier des ι-carraghénanes, purifiés de *Solieria filiformis*, ont montré des propriétés anti-inflammatoire et analgésique à hauteur d'1 à 9 mg par kg de souris et de rat et à hauteur de 500 µg dans une patte de souris ou de rat (de Araújo *et al.* 2011*)*.

Ces activités antivirales, antibactériennes et immunostimulantes ont été obtenues à partir d'extraits ou de composés particuliers d'algues.

D'après le **Tableau IV. IV**, pour obtenir des extraits ou des composés antibactériens, deux voies d'extraction sont couramment utilisées à quoi s'ajoute une troisième voie utilisée pour extraire des composés immunostimulants et antiviraux issus d'algues rouges. Il s'agit de l'hydrolyse, de l'extraction organique et de l'extraction assistée par enzymes (EAE).

1.3.1. *Par hydrolyse*

Les meilleures activités antivirales ont été démontrées après des hydrolyses. Le plus souvent, les hydrolyses sont effectuées avec de l'eau distillée soit à température ambiante soit à forte température (50-85 °C). Elles durent en général plusieurs heures, de 1 à 4 h sous agitation ou dans un bain à ultrasons. Des extraits aqueux sont ainsi obtenus et sont actifs contre des virus (Bouhlal *et al.* 2010; Hardouin *et al.* 2013), des bactéries ou envers le SII d'invertébrés (Liu *et al.* 2013; Kulshreshtha *et al.* 2016b*)*. Pour augmenter les activités biologiques ou encore pour améliorer les propriétés physico-chimiques, l'hydrolyse est souvent accompagnée d'un traitement alcalin puis est suivie d'une précipitation à l'alcool. Enfin, un fractionnement ou une dépolymérisation est facultativement réalisé(e) pour accéder à des fractions de faible poids moléculaire. Les polysaccharides ou oligosaccharides sulfatés et en l'occurrence les carraghénanes sont ainsi purifiés.

1.3.1.1. Traitement alcalin

En industrie, le traitement alcalin accompagne ou suit l'hydrolyse. Dans l'eau sont ajoutés des agents alcalins, tels que l'hydroxyde de sodium, de calcium, de potassium (NaOH, CaOH ou KOH) et le carbonate de sodium ($NaHCO_3$). Ce traitement permet d'éviter l'auto-hydrolyse acide de l'algue qui dégrade les polysaccharides sulfatés et donc leurs propriétés et activités biologiques (Jouanneau 2010; Moreira *et al.* 2016). Il induit également la formation de ponts 3,6 anhydro-galactose, ce qui augmente la propriété gélifiante des carraghénanes. Il peut influencer la conversion des précurseurs biosynthétiques de carraghénanes comme les unités μ- et ν-carrabiose en κ- et ι-carrabiose (Guibet 2007; Jouanneau 2010). Des carraghénanes montrant des activités anti-VHS (Matsuhiro *et al.* 2005; Rodríguez *et al.* 2005; de S.F-Tischer *et al*. 2006; Harden *et al*. 2009) et anti-DENV-2 (Rodríguez *et al.* 2005; de S.F-Tischer *et al.* 2006) ont été produits, entre autre, par une hydrolyse alcaline.

1.3.1.2. Précipitation

Les carraghénanes des Gigartinales après hydrolyse neutre ou alcaline sont obtenus par précipitation dans l'alcool. À l'échelle industrielle, de l'isopropanol est couramment appliqué tandis que l'éthanol est préféré en laboratoire. De plus, des sels minéraux comme le chlorure de potassium (KCl) sont souvent nécessaires et sont ajoutés pendant l'étape de précipitation afin d'améliorer la déshydratation des fibres glucidiques (Verhaeghe 2007). Ces moyens de précipitation auraient peu d'influence sur la structure des carraghénanes. Cela a été montré par Guibet (2007) sur des carraghénanes extraits de l'algue *Kappaphycus alvarezii* (Guibet 2007). La précipitation est une étape clé pour concentrer les galactanes sulfatés et améliorer leur(s) activité(s) (Carlucci *et al.* 1997; Talarico et al. 2004; Matsuhiro *et al.* 2005; Bouhlal *et al.* 2011; Ghannam *et al.* 2013)

1.3.1.3. Fractionnement

Dans beaucoup de cas, les applications à base de polysaccharides sur des tissus d'animaux induisent de faibles activités biologiques à cause du haut poids moléculaire de ces composés. En effet, la grande taille est un obstacle à la diffusion. C'est pourquoi des fractions de faibles poids moléculaires comme les oligosaccharides peuvent interagir plus efficacement et de manière spécifique par exemple avec des récepteurs protéiques membranaires. Par conséquent, les oligosaccharides provenant du fractionnement ou de la dépolymérisation de galactanes sulfatés sont utilisés pour leur plus forte activité biologique sur les cellules (Bondu

et al. 2010; Delattre *et al*. 2011). Le fractionnement peut se faire par l'ajout de KCl, par dépolymérisation des radicaux libres, par hydrolyse avec des acides faibles et éventuellement par chromatographie (ionique ou d'exclusion stérique) (Mollion 1977; Therkelsen 2002; Jouanneau 2010; Bondu *et al.* 2010).

Le KCl permet aussi la séparation d'une fraction soluble et d'une fraction insoluble récupérables après centrifugation (Mollion 1977). Dans chacune des fractions se trouvent des types de carraghénanes particuliers. Un brevet a été déposé sur ce sujet, le fractionnement au KCl s'avère être intéressant surtout pour les Gigartinales possédant plusieurs types de carraghénanes. Alors que les λ- et les θ- carraghénanes sont solubles dans l'eau quelles que soient les conditions de température et de concentrations de sels, les ι- et les κ-carraghénanes sont insolubles en présence de sels de potassium ou de calcium dans l'eau froide (Therkelsen 2002). Les λ- et les θ- carraghénanes ne forment d'ailleurs pas de gels. Diogo *et al.* (2015) ont utilisé le KCl pour isoler les λ-carraghénanes qui ont montré des activités antivirales contre le virus de l'herpès bovin et porcin (Diogo *et al*. 2015). De même que des ι-, κ-, ν- carraghénanes hybrides de *Meristiella gelidium* ont été purifiés et ont montré des CI_{50} très faibles à hauteur de 0,04 à 0,79 µg/mL contre l'herpès humain (de S.F-Tischer *et al.* 2006).

Dans l'étude de Bondu *et al.* (2010), des fractions de faibles poids moléculaires de carraghénanes de *S. chordalis* ont été obtenues par une dépolymérisation des radicaux libres, par hydrolyse acide (0,1 N HCl) puis par passage sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique. La dépolymérisation se fait à partir des groupements libres d'hydroxyle (–OH) des polysaccharides. Ce type de fractionnement dégrade de manière non-sélective contrairement à l'hydrolyse acide dirigée vers les ponts 3,6-AG. La dépolymérisation génère des composés de structure chimique identique, mais de poids moléculaires différents, comme l'hydrolyse acide qui produit en plus des composés hétérogènes d'un point de vue structural. Ensuite, les produits sont encore fractionnés selon leur taille par chromatographie d'exclusion stérique. Les plus fortes activités immunostimulantes ont été enregistrées sur les fractions de faibles poids moléculaires issues notamment de la dépolymérisation. Ainsi la structure chimique et le poids moléculaire des fractions des ι-carraghénanes de *S. chordalis* ont un impact sur le système immunitaire (Bondu *et al.* 2010).

1.3.2. *Par extraction organique*

D'après le **Tableau IV. IV**, 13 % et 17 % des études concernant, respectivement, des extraits ou des composés antiviraux et immunostimulants sont basées sur des extractions organiques. Alors que des extraits organiques de Gigartinales ont montré des activités antibactériennes dans 67 % des études. Plusieurs solvants organiques qui se différencient, entre autres, par leur polarité, peuvent être utilisés.

Le méthanol 100 % est beaucoup employé (Hudson *et al.* 1998; Manilal *et al.* 2009; Rhimou *et al.* 2010; Bouhlal *et al.* 2010; Pramitha et Lipton 2013), puis l'éthanol (Hellio *et al.* 2001) et enfin des mélanges avec du chloroforme, du dichlorométhane, de l'eau et du méthanol (Courtois *et al.* 2008; Bouhlal *et al*. 2010).

Les extractions organiques se déroulent sous agitation et/ou à reflux avec un appareil de Soxhlet pendant plusieurs heures voire plusieurs semaines et à une température n'excédant pas 35 °C. Les extraits liquides sont par la suite séchés généralement avec un évaporateur rotatif. Afin d'évaluer leurs potentielles activités biologiques, les extraits secs sont re-dissouts soit dans leur solvant d'extraction (Hudson *et al.* 1998) ; soit dans des solvants de polarité proche de celle du milieu dans lequel est effectuée l'évaluation biologique et dans lesquelles ils se dissolvent ; soit dans des émulsifiants ou dans des solvants organiques polaires comme le diméthysulfoxide (DMSO) (Bouhlal *et al*. 2010).

Parmi toutes les études menées sur la production d'extraits organiques et exposées dans le **Tableau IV. IV,** seule l'étude de Courtois *et al.* est poussée jusqu'à l'étape de purification de molécules actives. Les scientifiques ont isolé, après des passages sur plusieurs colonnes échangeuses d'ions, des cristaux de floridosides issus de *Mastocarpus stellatus.* L'activité immunostimulante mesurée après l'application de ces cristaux de floridoside est de 10 à 100 fois plus importante que celles mesurées après l'application d'extraits organiques de Gigartinales (Courtois *et al.* 2008).

1.3.3. *Par EAE*

Peu d'études ont été menées sur des extraits antiviraux, antibactériens ou encore immunostimulants obtenus après EAE. Les extraits hydrosolubles de *Chondrus crispus* avec

des CE_{50} comprises entre 77,6 et 129,7 µg/mL (Kulshreshtha *et al.* 2015) et de *S. chordalis* avec des CE_{50} comprises entre 23,0 à 101,1 µg/mL (Hardouin *et al.* 2013*)* produits après l'action d'enzymes ont montré des activités anti–VHS un peu plus faibles que celles des extraits aqueux *d'Hypnea musciformis*, de *Plocamium cartilagineaum* et de *Sphaerococcis coronopifolius* (CE_{50} comprises entre 2,5 et 75,9 µg/mL*)* (Bouhlal *et al*. 2010). Dans le cas de ces études , les EAE se sont déroulées pendant 3 à 6 h et à des températures se situant entre 30 et 60 °C (de Araújo *et al.* 2011; Hardouin *et al.* 2013; Kulshreshtha *et al*. 2015). De Araújo *et al*. (2011) ont utilisé une enzyme, la papaïne, pour produire un extrait de *Solieria filiformis* qu'ils ont ensuite fractionné sur colonne ionique. Des polysaccharides sulfatés et essentiellement des ι-carraghénanes aux propriétés analgésiques et anti-inflammatoires sous forme solide ont alors été purifiés *(*de Araújo *et al. 2011).*

Comme la dépolymérisation, l'action d'enzymes pourrait générer des fractions contenant des composés de structures chimiques similaires, voire de même poids moléculaire, à condition que l'action enzymatique soit spécifique et sélective. Le fractionnement par enzymes permettrait ainsi d'augmenter l'activité souhaitée.

Le développement des procédés d'extraction et de purification spécifiques des galactanes raffinés et semi-raffinés avec des caractéristiques bien définies est essentiel pour le développement futur de ces composés sur le marché avec de plus fortes valeurs ajoutées que celles aujourd'hui exploitées (Delattre *et al.* 2011). D'après un rapport publié en novembre 2015 par une entreprise hollandaise travaillant sur les marchés économiques, les prix des carraghénanes semi-raffinés sur le marché européen se situent entre 4 et 6 € le kilo en fonction du type de carraghénane et entre 8 et 14 € le kilo pour les raffinés. Ces galactanes sulfatés sont extraits et purifiés de 5 Gigartinales : *Chondrus crispus*, *Kappaphyccus alvarezii*, *Eucheuma denticulatum (spinosum*), *Gigartina skottsbergii* et *Sarcothalia crispata* essentiellement pour leurs propriétés gélifiantes et texturantes (CBI Market Intelligence 2015).

1.4. Hypothèses et cibles de recherche

Ce 4ème et dernier chapitre se divise en 2 parties. La 1ère concerne l'évaluation de l'activité antivirale d'extraits de *S. chordalis*. Les impacts de la variation saisonnière de la composition biochimique de *S. chordalis* et de l'extraction assistée par enzyme sur l'activité antivirale ont été étudiés. La 2ème partie porte sur l'effet d'un extrait hydrosoluble obtenu après EAE sur le système immunitaire de *C. elegans* infecté par *P. aeruginosa* et sur les facteurs de virulence de cette bactérie pathogène (**Figure 4. 14**).

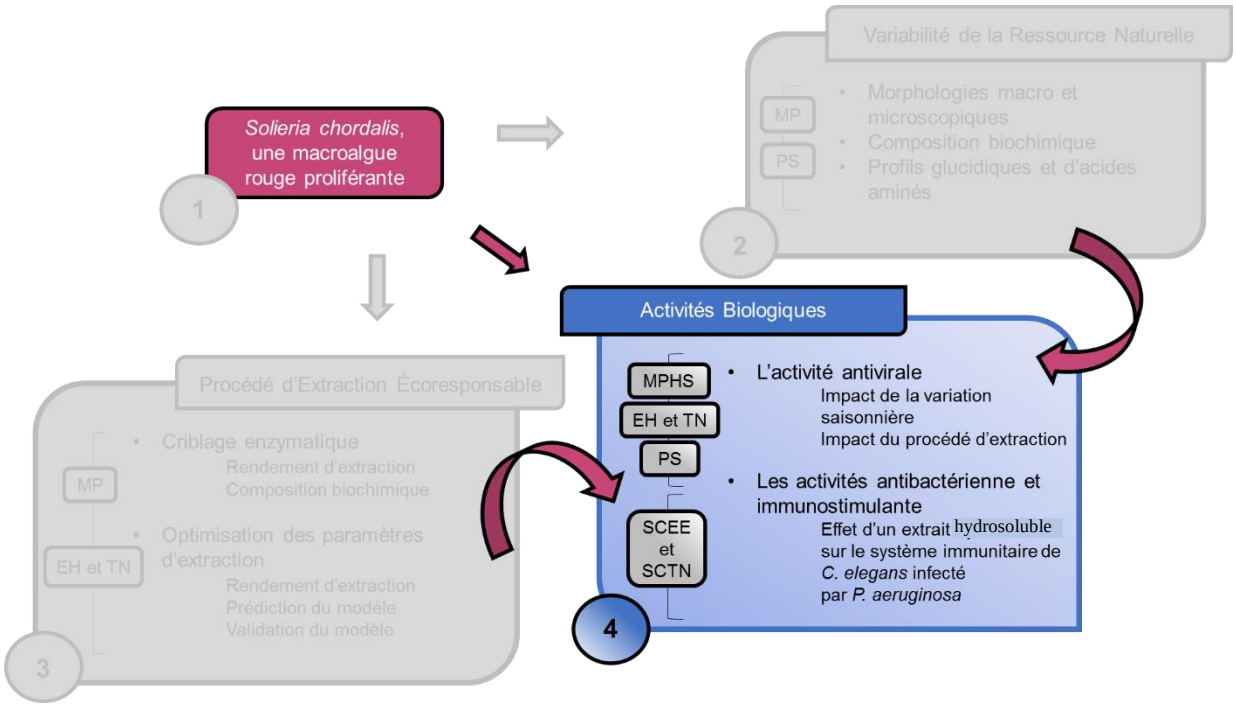


Figure 4. 14: Organigramme du projet de doctorat mettant en évidence les dernières études traitant les activités biologiques évaluées sur la matière-première hydrosolubilisée (**MPHS**), sur des extraits hydrosolubles (**EH**) et sur des polysaccharides (**PS**) de *S. chordalis*, collectés et produits d'après les chapitres II et III pour des perspectives d'applications.

1.4.1. *Première partie*

Il a été démontré dans le chapitre II de ce manuscrit que la composition biochimique de *S. chordalis* varie au cours des saisons et au cours des années (*Cf.* Chapitre II. Effets de la saisonnalité sur les caractéristiques biochimiques et biologiques de *Solieria chordalis*, pages 89 à 177*)*. Or, les activités biologiques conférées aux extraits d'algues dépendent de la composition biochimique. Ainsi, en ciblant les polysaccharides, si leur quantité et leur qualité dans l'algue changent au cours du temps, alors il est fort probable que leur potentielle activité anti-VHS -1 fluctue également.

Cible 1 : Évaluation de l'impact des saisons sur l'activité anti-VHS-1 de la matière première hydrosolubilisée (MPHS) et des polysaccharides (PS).

Les procédés d'extraction font intervenir des paramètres physico-chimiques, biologiques et mécaniques tels que la température, l'apport d'enzymes, l'agitation, les solvants ou encore le temps d'extraction. En fonction de ces paramètres, les composés extraits ne sont pas forcément les mêmes. Des extraits hydrosolubles ont été obtenus après l'action de différentes enzymes et après une optimisation des paramètres d'extraction en vue d'augmenter le rendement d'extraction (*Cf.* Chapitre III. Optimisation de l'extraction assistée par enzymes de *S. chordalis*, page 179-224). Il est alors intéressant de déterminer si certaines enzymes et certains paramètres d'extraction peuvent influencer et favoriser l'isolement de composés anti-VHS-1.

Cible 2 : Évaluation de l'impact du procédé d'extraction assistée par des enzymes de différentes activités lytiques sur l'activité anti-VHS-1 des extraits hydrosolubles et de leurs polysaccharides.

Cible 3 : Prédiction des conditions optimales de l'EAE afin d'isoler des extraits hydrosolubles anti-VHS-1.

1.4.2. *Deuxième partie*

Des extraits hydrosolubles de *S. chordalis* ont été produits à l'aide d'une biotechnologie écoresponsable (*Cf.* Chapitre III. Optimisation de l'extraction assistée par enzymes de *S. chordalis*, pages 179-224). Afin de conforter les résultats déjà prometteurs de l'activité immunostimulante de *S. chordalis*, un modèle de pathogénicité entre *C. elegans* et la bactérie commune pathogène *P. aeruginosa* a été utilisé. L'hypothèse étant de déterminer si l'action stimulant des composés de l'algue est due à l'effet antibactérien ou à l'effet immunostimulant ou aux deux effets en même temps. Quatre cibles ont alors été fixées.

Cible 4 : Évaluation de l'activité anti-*P.aeruginosa* des extraits hydrosolubles.

Cible 5 : Analyse des gènes de virulence de *P. aeruginosa* après l'application d'extraits hydrosolubles.

Cible 6 : Étude du comportement de *C. elegans* sain et infecté par *P. aeruginosa* après application des extraits hydrosolubles.

Cible 7 : Analyse des gènes du système immunitaire de *C. elegans* infecté par *P. aeruginosa* après application d'extraits hydrosolubles.

2. Matériels et Méthodes : Applications potentielles d'extraits de *S. chordalis* dans les domaines de la santé et de la nutrition.

2.1. Cytotoxicité et activité antivirale

L'activité antivirale d'un échantillon est évaluée en même temps que la cytotoxicité. En effet, s'il s'avère qu'un échantillon soit antiviral, il faut s'assurer qu'il vise bien le virus et pas les cellules, c'est pourquoi il est très important d'analyser la toxicité de ce même échantillon envers des cellules saines.

2.1.1. Extraits et composés d'algues analysés

2.1.1.1. Matière Première Hydrosolubilisée (MPHS) et polysaccharides (PS) pour l'étude de l'impact de la variation saisonnière

La cytotoxicité et l'activité antivirale ont été évaluées sur la matière première hydrosolubilisée (MPHS) et sur les polysaccharides (PS) extraits de *S. chordalis* collectée à la fin de chaque mois durant l'année 2015, sur la même plage de Kerfago à Saint Gildas de Rhuys dans le Morbihan (47°30′0″N, 2°49′60″W).

Les algues collectées sont lyophilisées selon la méthode décrite dans la **Figure 2. 5** du Chapitre II (Cf. Chapitre II, Matériels et méthodes, 2.1 Matériel végétal : *S. chordalis*, page 113-114). Le protocole de solubilisation de la matière première de *S. chordalis* sera détaillé par la suite, dans la partie traitant la préparation des échantillons pour l'évaluation de l'activité antivirale.

Les polysaccharides (PS) sont extraits et ont été caractérisés biochimiquement selon les protocoles détaillés dans le chapitre II (*Cf.* Chapitre II. 2. Matériels et méthodes 2.3 et 2.4, pages 117-118, Figure 2. 8 et pages 119-130).

L'activité antivirale a été évaluée sur 11 échantillons de MPHS et 12 échantillons de PS isolés de *S. chordalis* collectée mensuellement en 2015 (pas assez de MPHS en juin 2015). Chaque échantillon de MPHS et de PS a été testé en 1 réplicat biologique (RB) et 4 réplicats techniques (RT) (soit n=4).

2.1.1.2. Extraits hydrosolubles (EHs) et leurs polysaccharides pour l'étude de l'impact du procédé d'extraction

Criblage d'enzymes

Lors du criblage d'enzymes, la cytotoxicité et l'activité antivirale ont été évaluées sur la MPHS collectée en Octobre 2013, sur les extraits hydrosolubles (EH) obtenus après EAE, après une hydrolyse sans enzyme (TN) et sur les polysaccharides (PS) extraits à l'appareil de Soxhlet issus directement de l'algue et de tous les EHs et du TN (**Figure 4. 15**). Le détail de l'obtention de ces extraits et de ces composés est donné dans les chapitres précédents (*Cf.* Chapitre II, pages 113-117 et Chapitre III ; pages 204-205).

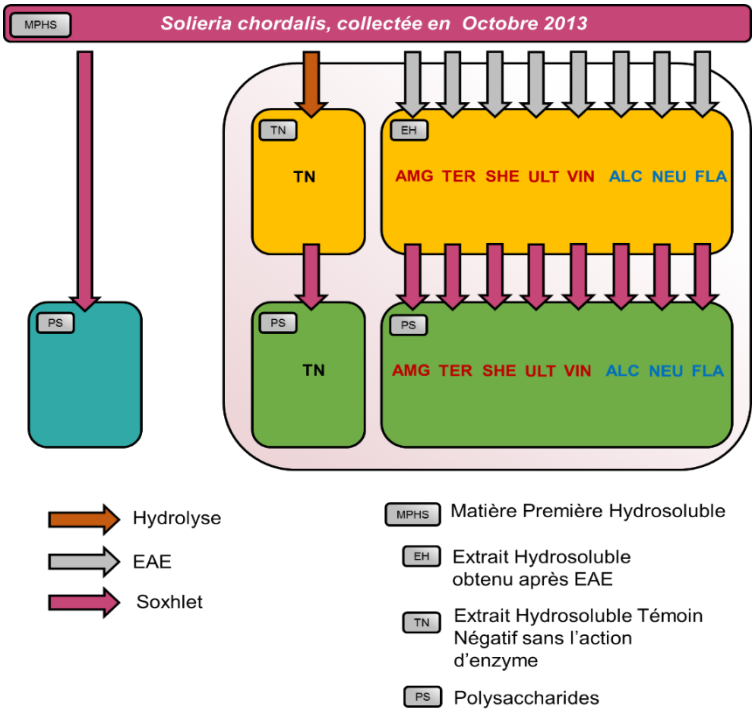


Figure 4. 15 Organigramme des différents échantillons analysés pour leur activité antivirale et pour leur cytotoxicité. Au total, il existe 20 échantillons. Chaque encadré coloré correspond à un ou plusieurs échantillons. Chaque échantillon a été testé en 2 RB et 4 RT (soit n=8).

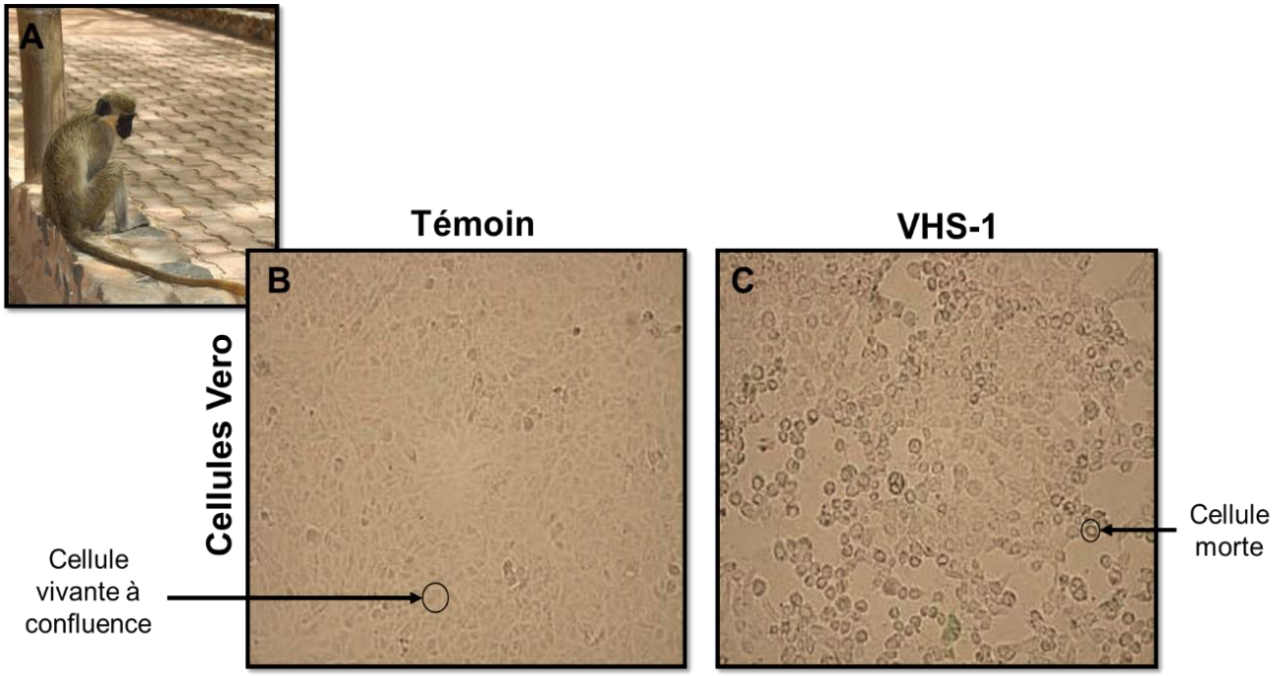
Optimisation de l'EAE

Des extraits hydrosolubles du même lot d'algues collectées en octobre 2013 ont été obtenus après des extractions assistées avec la protéase Alcalase, sous différentes conditions d'extraction selon le plan d'expérience de Box-Behnken du Chapitre III (*Cf.* Chapitre III. 2.6 Plan d'expériences de Box Behnken pour l'optimisation des conditions de l'EAE, page 206). Pour rappel, 3 paramètres ont été étudiés selon 3 modalités : la température (25 ; 37,5 et 50 °C), la durée d'extraction (90 ; 180 et 270 min) et le ratio E / S (2,5 ; 5 et 7,5 %). De plus, des extractions dans les mêmes conditions sans enzymes ont aussi été réalisées afin de servir de témoins. Au total, 22 extraits solubles ont été analysés en 2 RB et 4 RT (n=8).

2.1.2. Cellules Vero (ATCC : CCL 81)

Les évaluations de cytotoxicité et d'activité antivirale ont été réalisées *in vitro* en utilisant les cellules Vero. Cette lignée cellulaire de fibroblastes de rein de singe vert a un taux de croissance passant de 1 à 20 en 7 jours lorsque les cellules sont ensemencées à raison de 3.10^5 cellules / mL et sont sensibles à de nombreux virus, dont le VHS-1 (Thouvenot *et al.* 2004). Sous un microscope inversé, elles apparaissent adhérentes et un peu allongées quand elles sont vivantes à confluence[9]. Elles sont rondes et elles flottent dans le milieu de culture, quand elles sont mortes, comme par exemple quand elles sont infectées par le VHS-1 (**Figure 4. 16**).

[9] La confluence des cellules correspond à l'état des cellules, en contact les unes avec les autres, adhérentes et cultivées en monocouche sur un support adéquat. Un tapis cellulaire est produit à 100 % de confluence, aucun espace libre n'est perceptible entre les cellules.



***A** : Photographie prise à la réserve naturelle de Bandia au Sénégal, d'un singe vert du genre Chlorocebus (Burlot, 2016)*
***B** et **C** : Photographies prises au microscope inversé (échelle non indiquée dans l'article)* (Thouvenot *et al.* 2004, *modifié par Burlot 2016*).

Figure 4. 16 Photographies d'un singe vert (**A**) et de cellules Vero, *in vitro*, saines (**B**) et infectées par le VHS-1 (**C***)* (Thouvenot *et al.* 2004, modifié par Burlot 2016).

2.1.2.1.Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour la croissance, l'entretien et les tests d'activités biologiques est un milieu commercialisé, filtré stérilement et tamponné avec du bicarbonate de sodium à 7,5 %. Il s'agit du Minimal Essential Medium (MEM) de Eagle avec des sels de Earle (Eurobio). Il doit être stocké à 4°C avant toute utilisation.

Au moment de l'utilisation, le milieu est enrichi à hauteur de 8 % avec du Sérum de Veau Fœtal stérile (SVF, Eurobio), qui a été au préalable inactivé pendant 40 min dans un bain-marie à 56°C puis filtré sur membrane 0,22 µm. Quand les cellules sont mises en culture en présence du milieu, la quantité en facteurs mitogènes apportés par le SVF rend possible le déclenchement de la division cellulaire (Bourgougnon 1994). À ce milieu s'ajoutent 0,8 % de L-glutamine à 200 mM (Eurobio) et 0,8 % de solution d'antibiotiques et d'antifongiques afin

d'éviter toute contamination par les bactéries et les champignons. Ce milieu de culture final est appelé milieu « MEM enrichi » dans la suite de ce manuscrit.

La solution d'antibiotiques et d'antifongiques a été, au préalable, préparée dans 200 mL de solution phosphate en mélangeant 1,2 g de pénicilline (Sigma - Aldrich), 1 g de streptomycine (Sigma-Aldrich) et 0,378 g de colimycine (Sigma-Aldrich). Cette solution a ensuite été répartie en aliquotes de 4 mL et stockée à -25°C jusqu'à utilisation.

La solution phosphate, mentionnée dans le paragraphe précédent, est préparée pour 5 L, à partir de chlorure de sodium (NaCl, 40 g ; Fisher Scientific), de chlorure de potassium (KCl, 1 g ; Fisher Scientific), d'hydrogénophosphate de di-sodium (Na_2HPO_4, 14,5 g ; Fisher Scientific), de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4, 1 g ; Fisher Scientific) et d'eau ultrapure (qsp 5 L, Purelab Ultra, Elga). La solution phosphate est mise à l'autoclave pendant 20 min à 120°C. Elle est conservée à 4°C avant utilisation.

2.1.2.2.Entretien des cellules

Les cellules Vero sont cultivées dans 30 mL de milieu MEM enrichi, dans des flacons de culture cellulaire de 250 mL et de 75 cm^2 (Falcon, Corning). Elles sont incubées à 37 °C dans une étuve contenant 5 % de CO_2 et saturée en vapeur d'eau. Le bouchon du flacon contenant les cellules est ouvert au quart de tour afin de permettre les échanges avec le CO_2. En effet, le pH est maintenu entre 7,2 et 7,4 (indicateur rouge de pH dans le milieu MEM commercial) grâce au système tampon bicarbonate de sodium et CO_2 (CO_2/HCO_3^-) et est renforcé par l'atmosphère de l'étuve. Le CO_2 intervient aussi sur la prolifération cellulaire au niveau de la biosynthèse des acides puriques et pyrimidiques (Tripoteau 2015). La saturation en vapeur d'eau permet de prévenir l'évaporation et donc l'augmentation de l'osmolarité du milieu.

Les cellules sont maintenues en les multipliant quand le tapis cellulaire est confluent, soit 2 fois par semaine. En faisant bien attention à refermer le bouchon du flacon, la viabilité des cellules est vérifiée au microscope inversé (G x 100, Olympus CK2). Si les cellules paraissent saines comme sur la **Figure 4. 16 B**, alors le flacon est déposé sous un PSM à flux

laminaire de classe II[10] (MSC 12, Jouan). À partir de cette étape, toutes les manipulations ont lieu sous le PSM-II. Les 30 mL de milieu de culture MEM du flacon récupéré est éliminé dans de l'eau de javel. 20 mL d'une solution phosphate sont introduits pour rincer le tapis cellulaire du flacon. La solution phosphate est éliminée et un 2ème rinçage est effectué. Après avoir jeté la solution de phosphate, 2 mL de trypsine (Eurobio, Trypsine/EDTA 0,05/0,02%) sont ajoutés et mis en contact avec le tapis cellulaire pendant environ 1 min à 20-25 °C (étape de trypsination). L'excès de trypsine est éliminé et le flacon est placé de nouveau dans l'étuve à 37 °C pendant 2 min. En tapotant sur le côté du flacon, une dissociation du tapis cellulaire doit être perceptible. Si ce n'est pas le cas, alors le flacon est laissé un peu plus longtemps dans l'étuve. De nouveau sous le PSM-II, 6 mL de milieu MEM enrichi sont insérés et les cellules séparées des unes des autres sont homogénéisées par plusieurs aspirations et rejets à l'aide d'une pipette movette. Une fois les cellules bien décollées et homogénéisées dans le MEM enrichi, elles sont ensemencées à raison de 2 mL de suspension cellulaire dans 3 nouveaux flacons de culture cellulaire de 250 mL, dans lesquelles étaient déposés, au préalable, 30 mL de MEM enrichi. Ces 3 flacons de cultures cellulaires sont mis dans l'étuve à 37 °C, sous 5 % de CO_2 et saturée en vapeur d'eau, pendant 2-3 jours.

Quand les cellules sont à confluence, il y a, dans 1 mL de milieu, environ 350 000 cellules Vero (Bourgougnon 1994). Les cellules à confluence sont repiquées et maintenues ainsi de suite. Environ 25 repiquages peuvent être effectués avant de débuter une nouvelle culture cellulaire à partir de cellules stock.

2.1.2.3. Conservation des cellules

Pour conserver les cellules Vero, des cellules repiquées moins d'une dizaine de fois et en phase exponentielle de croissance (environ 25-30 h) sont utilisées. Les cellules sont dissociées par ajout de trypsine et reprises dans 4 mL de SVF pur. À partir de cette étape, toutes les prochaines manipulations s'effectuent à froid, dans un bac de glace. La suspension cellulaire est ensuite distribuée dans des cryotubes dans lesquels 1 mL y est inséré. En parallèle, une solution cryoprotective de DMSO à 20 % est préparée à froid, dans du MEM avec 8 % de SVF. 1 mL de cette solution est ajouté, goutte à goutte, dans un cryotube contenant la suspension

[10] Poste de Sécurité Microbiologique dont le risque de contamination pour l'expérience et pour l'opérateur est faible. L'air rejeté dans l'atmosphère est filtré et la fuite des contaminants aéroportés générés à l'intérieur du poste est contrôlée.

cellulaire. Le cryotube est incubé à -25 °C pendant 1 h puis à -70 °C pendant 24 h et il est conservé dans de l'azote liquide (-196 °C) jusqu'à utilisation. Selon ce protocole et d'après Bourgougnon (1994), les cellules Vero sont conservées à hauteur de 6.10^6 cellules dans les 2 mL à -70°C (Bourgougnon 1994).

2.1.2.4. Lancement d'une nouvelle culture cellulaire

À partir d'un cryotube placé dans l'azote liquide et contenant la suspension des cellules Vero dans la solution cryoprotective, les cellules sont mises à décongeler. La décongélation doit être rapide à 37 °C et partielle. En effet, une décongélation totale à 20 °C provoquerait un contact trop long avec le DMSO, qui est toxique envers les membranes cellulaires (Tripoteau 2015). Les 2 mL décongelés partiellement sont versés dans 30 mL de milieu MEM enrichi et centrifugés à 500 g pendant 10 min à 4°C (Spectrafuge 6C, Labnet). Le culot cellulaire est ensuite récupéré et re-suspendu dans 6 mL de milieu MEM enrichi. Cette nouvelle suspension cellulaire est insérée dans un petit flacon de culture cellulaire de 50 mL, 25 cm^2 (Cellstar, Greiner Bio-one) puis elle est placée pendant 24 h dans une étuve à 37 °C sous 5 % de CO_2 et saturée en vapeur d'eau. Après ce temps, le milieu de culture est renouvelé dans un autre flacon de culture cellulaire de 50 mL. Les cellules sont laissées de nouveau dans l'étuve à 37 °C. Quand elles sont à confluence après 3-4 jours, une trypsination est réalisée afin de les transférer dans un flacon de culture cellulaire de 250 mL dans lequel ont été ajoutés, au préalable, 30 mL de milieu MEM enrichi. L'entretien des cellules peut débuter à cette étape.

2.1.2.5. Dénombrement cellulaire

Pour évaluer une activité biologique sur des cellules, il est important d'avoir le même nombre de cellules quel que soit l'échantillon analysé. Pour cela, il faut déterminer et fixer le nombre de cellules contenues dans un volume précis de milieu liquide. Pour la cytotoxicité et l'activité antivirale évaluées dans le cadre de cette étude, la concentration de cellules Vero est fixé à 350 000 cellules/mL. Le dénombrement cellulaire est réalisé par comptage au microscope inversé à l'aide d'une cellule de Malassez. 1 µL de suspension cellulaire après une trypsination est déposée entre une lame et une lamelle constituant la cellule de Malassez. Sur la lame sont gravés 100 rectangles subdivisés en 20 petits carrées. Le volume de la cellule de Malassez correspondant au quadrillage total est égal à 1 mm^3, soit 1 µL. Sous le microscope inversé, la

quantité de cellules est comptée sur 5 rectangles. Le facteur de dilution (FD) pour obtenir 350 000 cellules / mL (dans du MEM enrichi) est déterminé par la formule (**Eq. E**) simplifiée ci-dessous :

Eq. E

$$FD = \mathbf{X} \times 2 / 35$$

*Avec **X**, le nombre de cellules calculé sur 5 rectangles.*

Par exemple, si 143 cellules sont dénombrées dans 5 rectangles, le facteur de dilution est égal à 8,17. La solution cellulaire doit alors être diluée 8,17 pour obtenir une suspension cellulaire à 350 000 cellules par mL.

2.1.3. Virus (VHS-1)

La souche sauvage 17 du VHS-1 a été donné par le Professeur Agut (Laboratoire de Dynamique, épidémiologie et traitement des infections virales de la Pitié Salpêtrière, Paris). Depuis, il a été entretenu régulièrement au LBCM.

2.1.3.1. Maintien du virus

Les virus sont maintenus dans des cellules Vero. Pour cela, les cellules à confluence dans un flacon de culture cellulaire de 250 mL, 75 cm^2, sont inoculées par 500 µL d'une suspension virale stock après avoir éliminé le vieux milieu de culture du flacon des cellules à confluence. 5 mL de nouveau milieu MEM enrichi sont insérés dans le flacon, qui est ensuite laissé incubé pendant 2h dans l'étuve à 37 °C sous 5 % de CO_2. Cette étape permet au virus de s'adsorber sur la membrane cellulaire avant de pénétrer dans la cellule et de s'y multiplier. Après ce temps d'incubation, le milieu est enlevé afin d'éliminer le surplus de suspension virale et 30 mL de MEM enrichi sont ajoutés. Le tapis cellulaire se détruit petit à petit chaque jour et après 3 à 4 cycles de multiplication virale (3 jours), le surnageant contenant les virions extracellulaires est prélevé et conservé au froid (4°C). Ensuite, le flacon subit 2 cycles successifs de congélation et de décongélation pour compléter l'éclatement des cellules et ainsi libérer les virions intracellulaires. Le surnageant récupéré est mélangé au 1er surnageant. Pour

finir, la suspension virale finale est répartie en aliquotes, qui sont congelées à -70 °C jusqu'à utilisation.

2.1.3.2. Détermination du titre infectieux de la suspension virale et de sa multiplicité d'infection (MOI)

De même que pour une concentration de cellules fixe, la virulence du virus et plus précisément sa multiplicité d'infection (MOI, de l'anglais Multiplicity Of Infection) doit être identique pour évaluer l'activité antivirale des extraits et des composés de *S. chordalis* de manière à pouvoir les comparer.

Tout d'abord, le titre infectieux du virus doit être déterminé. Les particules virales, capables d'infecter des cellules permissives, doivent être dénombrées par unité de volume. Pour cela, un titrage viral est alors réalisé.

Titration du virus

Pour le titrage viral, la méthode des dilutions limites avec le calcul du point d'infection 50 % selon Reed et Muench (1938) a été suivie (Reed et Muench 1938).

Une série de dilution en cascade au 10ième d'une solution virale stock, dont le titre infectieux est à déterminer, est réalisée. Pour cela, 100 µL d'une suspension virale stock, décongelée entre 20 et 25 °C, sont insérés dans 900 µL de MEM. 100 µL de cette suspension virale diluée à 10^{-1} sont ajoutés à 900 µL de MEM (10^{-2}) et ainsi de suite jusqu'à une dilution à 10^{-8}.

Le titrage du virus est réalisé sur une microplaque de 96 puits (Corning® 96 well plate, PVC Flat Bottom) (**Figure 4. 17**). 100 µL de suspension de cellules Vero à 350 000 cellules / mL ainsi que 50 µL de milieu MEM enrichi sont insérés dans tous les puits de la microplaque. Les 2 dernières colonnes (n°11 et 12) servent de témoins cellules (CC). 50 µL de milieu MEM enrichi sont ajoutés, en plus, dans tous les puits de ces 2 dernières colonnes. Dans les autres puits de la microplaque 96 puits, 50 µL de suspension virale à une dilution définie (de 10^{-1} à 10^{-8}) sont distribués sur une ligne de la plaque à raison de 10 réplicats par dilution (par exemple du puits A1 au puits A10 pour la suspension virale diluée à 10^{-1}).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10^{-1}								→	10^{-1}	CC	CC
B	10^{-2}								→	10^{-2}	CC	CC
C	10^{-3}								→	10^{-3}	CC	CC
D	10^{-4}								→	10^{-4}	CC	CC
E	10^{-5}								→	10^{-5}	CC	CC
F	10^{-6}								→	10^{-6}	CC	CC
G	10^{-7}								→	10^{-7}	CC	CC
H	10^{-8}								→	10^{-8}	CC	CC

<u>Une ligne par dilution de suspension virale</u> :
100 µL de suspension cellulaire à 350 000 cellules / mL
50 µL de milieu MEM enrichi
50 µL de suspension virale stock diluée de 10^{-1} à 10^{-8}

<u>Les 2 dernières colonnes (n°11 et n°12) sont des témoins cellules</u> :
100 µL de suspension cellulaire à 350 000 cellules / mL
100 µL de milieu MEM enrichi

Figure 4. 17 : Organisation de la microplaque 96 puits pour la titration du virus. **CC** : Contrôle Cellules ; **10^{-1}** à **10^{-8}** : Facteur de dilution de la suspension virale stock.

Après l'inoculation du virus, la microplaque 96 puits est laissée 72 h dans l'étuve à 37°C sous 5 % de CO_2 et saturée en vapeur d'eau, permettant 3 à 4 cycles de multiplication du VHS-1. L'effet cytopathique du VHS-1 s'exprime par un gonflement et un arrondissement des cellules qui prennent un aspect globuleux ainsi qu'une organisation en chapelet (**Figure 4. 16**

C). La dose infectieuse 50 % (DI_{50}) correspond à la dilution produisant un effet cytopathique total dans 50 % des réplicats d'une même dilution (Bourgougnon 1994).

Afin de calculer le titre infectieux du virus, la méthode de Reed et Muench (1938) utilise le procédé des totaux cumulatifs afin de limiter le nombre de réplicats et ainsi elle limite l'emploi du virus. Ce procédé repose sur le fait que si les cellules sont mortes à une dilution donnée de la suspension virale (Exemple : 10^{-3}), alors les cellules seront également mortes aux dilutions inférieures (Exemple : 10^{-2}, 10^{-1}). Inversement, si les cellules sont vivantes à une dilution donnée, alors les cellules seront aussi vivantes aux dilutions supérieures (Exemple :10^{-4}, 10^{-5}).

Au microscope inversé, chaque puits est observé et le nombre de réponses « cellules mortes » ou « cellules vivantes » est compté comme une lecture « tout ou rien ». Les pourcentages de mortalité des cellules sont calculés pour chaque dilution, comme présenté dans l'exemple du **Tableau IV. V**.

Tableau IV. V Exemple de calcul du facteur **e**, utilisé pour la détermination du titre infectieux de la solution virale stock (inspiré par Reed et Muench 1938 ; Bourgougnon 1994).

	Nombre de puits contenant des cellules en présence du VHS-1 « tout ou rien »		Somme des puits contenant des cellules en présence du VHS-1		Mortalité		Distance proportionnelle
Dilution	Mortes	Vivantes	Mortes	Vivantes	Taux	%	**e** = (A – 50) / (A-B)
10^{-1}	10	0	47	0	47/47	100	
10^{-2}	10	0	37	0	37/37	100	
10^{-3}	10	0	27	0	27/27	100	
10^{-4}	9	1	17	1	17/18	94,4	(66,7 – 50) / (66,7– 7,4)
10^{-5}	7	3	8	4	8/12	66,7	**e** = 0,29
10^{-6}	1	9	1	13	1/14	7,4	
10^{-7}	0	10	0	23	0/23	0	
10^{-8}	0	10	0	33	0/33	0	

Si les 50 % de mortalité ne correspondent pas à un des pourcentages trouvés pour les différentes dilutions testées alors, toujours d'après ces auteurs, il existe une formule (**Eq. F**) qui permet de calculer la distance proportionnelle notée « **e** » à la dilution immédiatement inférieure (Reed et Muench 1938).

Eq. F :

$$\mathbf{e} = (\mathbf{A} - 50) / \mathbf{A} - \mathbf{B}$$

*Avec **A** le pourcentage de mortalité > 50 % à la dilution directement supérieure et **B** le pourcentage de mortalité < 50 % à la dilution directement inférieure.*

Ce facteur « **e** » est utilisé pour déterminer le titre infectieux. En effet, il peut alors être calculé le facteur multiplicatif de la DI_{50}, qui est donc la dose infectieuse de 50 % des réplicats multipliée par un facteur à la puissance 10 correspondant à la dilution qui donne un pourcentage de cellules mortes immédiatement supérieur à 50 %, additionnée à la distance proportionnelle « **e** » calculée précédemment, soit dans l'exemple du **Tableau IV. V :**

$$10^{(5+0,29)} = 10^{5,29}\ DI_{50}$$

En effet, c'est en diluant 10^5 fois la suspension virale stock qu'un pourcentage de mortalité cellulaire est immédiatement supérieur à 50 % (66,7 % de mortalité mesurée).

D'après l'exemple du **Tableau IV. V**, le titre infectieux des 50 µL de suspension virale stock ajoutés dans les puits de la microplaque 96 puis (**Figure 4. 17**) équivaut à $10^{5,29}$ DI_{50}, soit pour 1 mL et par conversion d'unités volumétriques, le titre infectieux est de $2.10^{6,29}$ DI_{50}.

MOI, la multiplicité d'infection

À partir du titre infectieux de la suspension virale stock, il est désormais possible de calculer sa MOI puis de fixer la virulence du virus afin d'être dans les mêmes conditions d'expérience *in vitro* pour évaluer les échantillons d'algues de manière équitable et comparable. La MOI correspond au titre infectieux divisé par le nombre de cellules par mL (**Eq. G**) et intervient donc dans l'évaluation de l'activité antivirale.

Eq. G

$$MOI = DI_{50} / [\text{nombre de cellule / mL}]$$

Dans l'exemple du **Tableau IV. V**, la MOI est égale à 2.10 ^{6,29} DI_{50} / 350 000, soit 11,1 DI_{50} / cellule.

Pour tous les travaux, concernant l'activité antivirale, menés au cours de ce doctorat, la MOI a été fixée à 0,001 DI_{50} / cellule. Par conséquent, dans l'exemple illustré ci-dessus, 1 µL de la suspension virale stock est mélangé à 11, 1 mL de milieu MEM enrichi afin d'obtenir la MOI souhaitée.

2.1.4. Évaluations de la cytotoxicité et de l'activité antivirale par la méthode du rouge neutre

La méthode du rouge neutre permet de déterminer la viabilité cellulaire. Le principe repose sur la coloration des cellules par un colorant vital, le rouge neutre (composé chimique), qui entre seulement dans les cellules vivantes en intégrant notamment les lysosomes (Langlois *et al*. 1986 ; Bourgougnon 1994). Ainsi, la viabilité cellulaire est quantifiable au spectrophotomètre en lisant une densité optique à une longueur d'onde fixe à $\lambda = 540$ nm.

Pour évaluer la cytotoxicité et l'activité antivirale, il faut tout d'abord mettre en contact pendant un certain temps les cellules Vero avec les échantillons algaux en présence ou non du VHS-1. La viabilité des cellules Vero est ensuite mesurée. La préparation des échantillons, la mise en place de l'expérience *in vitro*, la révélation de la viabilité cellulaire au rouge neutre et les déterminations des CC_{50} et des CE_{50} des échantillons d'algues sont décrits ci-dessous.

2.2.3.1. Préparation des échantillons et de la molécule de référence

Pour les analyses des matières premières de *S. chordalis* lyophilisées, les poudres ont été broyées plus finement dans un mortier à l'aide d'un pilon. Ensuite, les poudres ont été homogénéisées dans du milieu MEM enrichi avec 10 % de DMSO, en atteignant une concentration finale de 500 µg/mL. Les mélanges sont passés dans un bac à ultrasons pendant 40 min à 50 °C puis filtrés sur toile afin d'obtenir un échantillon solubilisé dans le MEM enrichi.

C'est ainsi que sont obtenus les échantillons de Matières Premières HydroSolubilisées, MPHS. Pour déterminer la concentration de la MPHS qui est potentiellement cytotoxique et/ou potentiellement antivirale, 5 concentrations d'une même MPHS ont été évaluées (500 µg / mL, 200 µg / mL ; 100 µg / mL, 50 µg / mL et 10 µg / mL). Les dilutions sont faites en cascade dans du MEM enrichi.

Les EHs et le TN lyophilisés sont broyés plus finement au mortier avec un pilon. Les poudres sont directement diluées dans du MEM enrichi et 5 concentrations sont testées (500 µg / mL ; 200 µg / mL ; 100 µg / mL ; 50 µg / mL et 10 µg / mL).

Quant aux PS séchés, ils sont broyés finement dans un mortier à l'aide d'un pilon et solubilisés dans du milieu MEM enrichi. Ils sont dilués en cascade pour atteindre 5 concentrations, à savoir 200 µg / mL ; 50 µg / mL ; 10 µg / mL ; 5 µg / mL et 1 µg / mL.

Du Zovirax, nom commercial de l'acyclovir, sert de molécule de référence. 5 concentrations d'acyclovir dilué dans du MEM enrichi sont évaluées : 5 µg / mL ; 1 µg / mL ; 0,5 µg / mL ; 0,1 µg / mL et 0,05 µg / mL.

2.2.3.2. Mise en place de l'expérience in vitro *sur microplaque 96 puits.*

Sur une même microplaque 96 puits, la cytotoxicité et l'activité antivirale de deux échantillons algaux peuvent être évaluées, comme illustré sur la **Figure 4. 18.**

Sur la microplaque 96 puits, 100 µL de suspension cellulaire à 350 000 cellules / mL sont insérés dans tous les puits à l'aide d'une micropipette multicanaux. Dans tous les puits de la 12ème colonne (Contrôle Cellules), 100 µL de milieu MEM enrichi sont ajoutés. Dans tous les puits de la 11ième colonne (Contrôle Virus), 50 µL de milieu MEM enrichi sont ajoutés.

L'évaluation de la cytotoxicité est réalisée dans les puits se trouvant dans les colonnes de 1 à 10 et dans les lignes d'A à D, dans lesquels sont ajoutés 50 µL de milieu MEM enrichi.

Dans tous les puits d'une colonne entière de A à H, 50 µL d'un même échantillon à une concentration donnée, préparé au préalable, sont ajoutés. À cette étape, rien n'est ajouté dans les puits des colonnes 11 et 12.

Dans tous les puits de la colonne 11 et dans les puits des colonnes de 1 à 10 et des lignes de E à H, 50µL d'une suspension virale, diluée pour obtenir une MOI égale à 0,001 DI_{50} par cellule, sont ajoutés à l'aide d'une pipette automatique vouée aux manipulations avec ce virus (**Figure 4. 18**).

		Échantillon 1						**Échantillon 2**				**CV**	**CC**
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Cytotoxicité	**A**	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5	CV	CC
	B	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5	CV	CC
	C	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5	CV	CC
	D	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5	CV	CC
Activité antivirale	**E**	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5	CV	CC
	F	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5	CV	CC
	G	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5	CV	CC
	H	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5	CV	CC

CV : Contrôle Virus (8 réplicats, des puits A11 à H11)
CC : Contrôle Cellules (8 réplicats, des puits A12 à H12)
C1 à C5 : Concentration de l'échantillon analysé, de la plus élevée à la plus faible
Dans les puits A1, B1, C1 et D1, un même échantillon à une concentration donnée est analysé pour une activité (cytotoxicité ou antivirale) en 4 réplicats de même que l'échantillon des puits A2, B2, C2 et D2 et que celui des puits E1, F1, G1 et H1, etc.

Figure 4. 18 Organisation de la microplaque 96 puits pour les évaluations de cytotoxicité et de l'activité antivirale.

La microplaque 96 puits est ensuite placée à l'étuve à 37°C sous 5 % de CO_2 et saturée en vapeur d'eau pendant 72 h, temps nécessaire pour que la multiplication du virus s'effectue et pour que la protection potentielle des cellules Vero apportée par les échantillons soit quantifiable au spectrophotomètre (Thermo scientific, Multiskan TM GO). Quand une série d'analyses de plusieurs microplaques 96 puits est lancée, il est impératif d'ajouter sur une des microplaques la molécule de référence.

Les effets du virus et des échantillons d'algues sur les cellules Vero sont par la suite révélés par la méthode du rouge neutre.

2.2.3.3. Révélation au rouge neutre de la viabilité cellulaire

Le rouge neutre se présente sous forme de solution liquide qui est conservée au froid et à l'abri de la lumière. Elle est préparée à partir de 150 mg de rouge neutre (Acros Organic) dans 100 mL de sérum physiologique (pH 5,5).

Après les 72 h d'incubation de la microplaque 96 puits (**Figure 4. 18**), 50 µL de solution de rouge neutre sont introduits dans tous les puits et la microplaque 96 puits est de nouveau placée à l'étuve à 37 °C pendant 45 min. Une étape de lavage est ensuite effectuée et répétée 2 fois de manière successive. Pour cela, la microplaque 96 puits est vidée, sous PSM-II, sur une pile de papiers absorbants puis 200 µL d'une solution PBS[11] à 450 mOsm et de pH 7,4 sont ajoutés dans chaque puits afin de laver le rouge neutre resté sur les parois des puits. Après avoir vidé le PBS du 2ème lavage, le rouge neutre présent dans les cellules Vero vivantes est élué par extraction avec 100 µl de tampon citrate-éthanol dans chaque puits de la microplaque. Cette solution tampon éclate les cellules et libère ainsi le rouge neutre intégré dans les lysosomes, qui est dosé par la suite par spectrophotométrie. La solution citrate-éthanol a été préparée en mélangeant un volume d'éthanol 90/95 % (Fisher) avec un volume de tampon Sorensen (**Tableau IV. VI**).

[11] De l'anglais Phosphate Buffered Saline est une solution de tampon phosphate salin. Pour une osmolarité de 450 mOsm et pour un volume final d'1 L, 9 g de NaCl, 1,48 g de Na_2HPO_4 et 0,43 g de KH_2PO_4 sont ajoutés dans de l'eau ultrapure. Le pH ajusté à 7,4.

Tableau IV. VI Composition du tampon Sorensen intervenant dans la solution tampon citrate-éthanol.

Tampon de Sorensen : 60,8 mL de **solution A** sont mélangés à 39,2 mL de **solution B**	
Solution A	**Solution B**
21 g d'acide citrique (Sigma) sont dilués dans 200 mL de NaOH 1 N (Fisher) et de l'eau ultrapure est additionnée afin d'atteindre un volume final d'1 L.	HCl 0,1 N (Fisher)

Avec des cônes stériles de pipettes, les fonds des puits sont grattés afin de bien homogénéiser le rouge neutre libéré des cellules par le tampon citrate-éthanol. Pour finir, les densités optiques de tous les puits de la microplaque 96 puits (**Figure 4. 19**) sont lues à $\lambda_{540\ nm}$ au spectrophotomètre de microplaque.

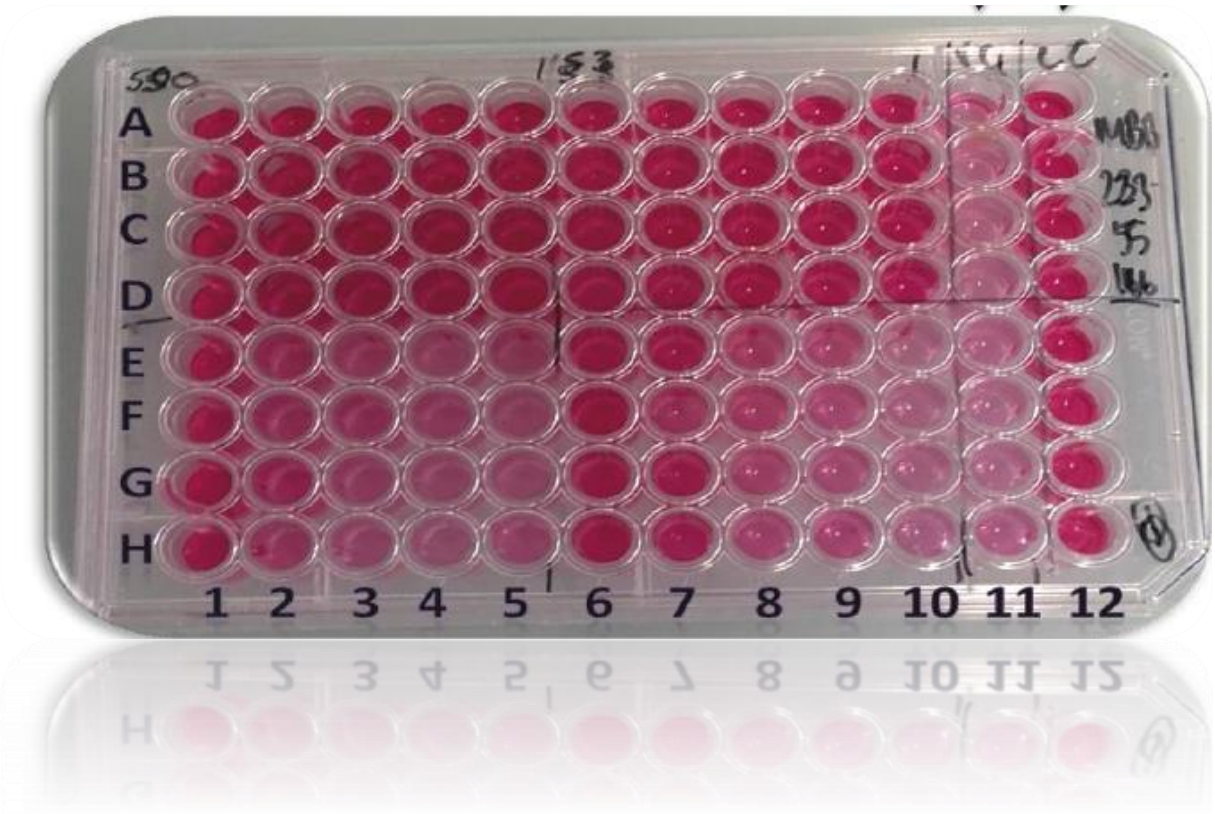


Figure 4. 19 Photographie d'une microplaque 96 puis après les évaluations de la cytotoxicité et de l'activité antivirale de deux échantillons de *S. chordalis* après la coloration au rouge neutre.

2.2.3.4. Déterminations de la CC_{50} et de la CE_{50}

La Concentration Cytotoxique à 50 % (CC_{50}) de l'échantillon à tester correspond à la concentration de cet échantillon qui réduit de 50 % la densité optique des cellules traitées par rapport à celle des cellules non-traitées. La CC_{50} est exprimée comme étant le pourcentage de destruction cellulaire, soit l'équation **Eq. H** suivante (Langlois *et al.* 1986) :

Eq. H

$$\% \text{ destruction} = (DO_{CC} - DO_{\text{cellules + échantillon}}) / DO_{CC} \times 100$$

*Avec DO_{CC}, la moyenne des 8 réplicats des densités optiques des Contrôles Cellules (12ème colonne de la microplaque de la **Figure 4. 18**) .*

La Concentration Effective antivirale 50 % (CE_{50}) est exprimée comme la concentration de l'extrait qui diminue de 50 % l'effet cytopathique du virus ou encore qui protège 50 % des cellules infectées par le virus. Pour une MOI fixée à 0,001 ID_{50} / cellule, la CE_{50} équivaut au pourcentage de protection cellulaire, qui est calculé selon l'équation **Eq. I** suivante (Langlois *et al.* 1986) :

Eq. I

$$\% \text{ protection} = (DO_{\text{cellule + virus + échantillon}} - DO_{CV}) / (DO_{\text{cellules + échantillon}} - DO_{CV}) \times 100$$

*Avec DO_{CV} la densité optique des 8 réplicats des Contrôles Virus (11ème colonne de la microplaque de la **Figure 4. 18**)*

2.2. Activités antibactérienne et immunostimulante : modèle de pathogénicité C. elegans-P. aeruginosa

2.2.1. Extraits d'algues analysés

Dans le cadre de cette étude, deux extraits ont été analysés sur le modèle de pathogénicité *C. elegans – P. aeruginosa*. Il s'agit d'extraits hydrosolubles obtenus à partir de *S. chordalis*

collectée en octobre 2013 à Saint Gildas de Rhuys. Un des EHs (Extraits Hydrosolubles) est produit après l'action de la protéase Alcalase à 2,5 % (g d'enzymes sur g de matière sèche de l'algue) pendant 180 min à 50 °C (*Cf.* Chapitre III. Optimisation de l'extraction assistée par enzymes de *S. chordalis*, page 215). L'autre extrait aqueux analysé est produit dans les mêmes conditions d'extraction mais sans apport d'enzyme. Pour les différencier, l'extrait obtenu après EAE est noté SCEE et celui obtenu après hydrolyse SCTN.

2.2.2. Souche PA14

La souche isolée d'origine clinique de PA14 a été donnée au Marine Bio-Products Research Laboratory de l'Université de Dalhousie par Eric Déziel (INRS, Institute Armand-Frappier- Microbiologie et Biotechnologie, Laval, QC, Canada).

2.3.1.1. Maintien et stockage des bactéries

PA14 peut être cultivée dans du milieu KB (King's B) liquide ou gélosé avec de l'agar. Pour 1 L de milieu KB, 10 g de proteose peptode (Fisher scientific), 1,5 g de K_2HPO_4 (Bioshop), et 15 g de glycérol 100 % (Bioshop) sont homogénéisés dans de l'eau distillée. Le pH est ajusté à 7. 10 g d'agar (Bioshop) sont ajoutés seulement pour obtenir un milieu KB solide-gélosé. Les milieux (avec et sans agar) sont autoclavés puis conservés entre 4 et 25 °C. Juste avant leur utilisation, 5 mL de solution tampon $MgSO_4$ 1M (BioShop) autoclavée sont ajoutés dans 1 L de milieu KB.

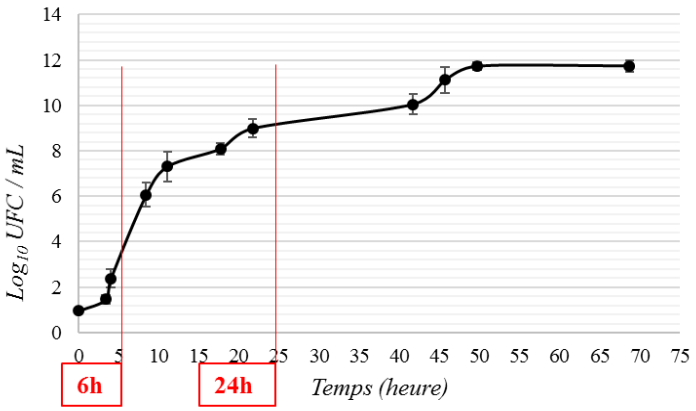
À partir d'une culture fraîche de PA14, les bactéries peuvent être stockées sur le long terme à - 80°C dans un milieu KB liquide avec 25 % de glycérol (Sigma-Aldrich) et aliquotées dans des cryotubes.

2.3.1.2. Lancement des cultures bactériennes et courbe de la croissance bactérienne

Sous PSM-II, 1 mL d'une suspension bactérienne conservée à - 80 °C est décongelée et mise en culture dans 3 mL de milieu KB à 37 °C pendant 6 h et sous agitation orbitale constante (200 tr / min). La culture bactérienne est ensuite ensemencée sur une boîte de Pétri (Fisher Scientifique) contenant une gélose KB selon la méthode des Cadrans à l'aide d'un inoculateur

stérile (Biolab). La boîte de Pétri inoculée est ensuite placée dans un incubateur à 37 °C pendant 12 h. Des colonies de PA14 se forment. Une colonie est prélevée à l'aide d'un inoculateur stérile et est introduite dans 10 mL d'un nouveau milieu KB liquide. Cette suspension bactérienne est mise dans un incubateur à 37 °C (Professional 3500, VWR) pendant 12 h et sous agitation constante à 150 tr / min. La culture bactérienne est ensuite diluée dans du milieu KB liquide afin d'obtenir une DO de 1,0 à une $\lambda_{600\ nm}$ puis stockée à 4 °C jusqu'à utilisation (utilisable seulement dans la semaine).

Au préalable des travaux menés avec les extraits d'algue, la croissance de PA14 a été étudiée pendant trois jours, sous agitation à 37°C, à l'aide d'un spectrophotomètre à $\lambda_{600\ nm}$. La courbe de la croissance bactérienne a été déterminée et est illustrée sur la **Figure 4. 20.**



À 6h de croissance, la culture bactérienne se trouve dans leur phase exponentielle. Après 24h, la culture bactérienne entre en phase stationnaire. La croissance bactérienne est limitée par l'épuisement des nutriments du milieu de culture, par l'épuisement de l'espace dans le milieu de culture et par l'accumulation de métabolites inhibiteurs de croissance.

Figure 4. 20 Courbe de croissance de PA14 au cours du temps.

2.2.3. <u>Caenorhabditis elegans</u>

La souche sauvage N2 Bristol de *C. elegans*, qui a été utilisée dans cette étude ainsi que sa source de nourriture bactérienne standard de laboratoire, la souche OP50 d'*Escherichia coli* ont été obtenus par le *Caenorhabditis* Genetics Center, de l'Université du Minnesota.

2.2.3.1. Maintien des nématodes

***Source de nourriture,* E. coli OP50**

Des cultures d'OP50 sont réalisées dans des milieux Luria-Bertani (LB) liquide et gélosé. 1 L de milieu LB contient 10 g de peptone (Bioshop), 5 g de levure (Bioshop) et 10 g de NaCl (Bioshop) dilués dans de l'eau distillée. Le pH est ajusté à 7 et 1 % d'agar (Bioshop) est ajouté pour produire un milieu de culture LB solide. Les milieux avec ou sans agar sont autoclavés et conservés entre 4 et 25 °C.

Après avoir ensemencé OP50 sur boîte de Pétri contenant une gélose de LB et laissé incuber pendant minimum 12 h à 37 °C, une colonie a été isolée puis introduite dans 30 mL de milieu LB liquide. La suspension bactérienne d'OP50 est incubée pendant 12 h à 37 °C sous agitation (150 tr / min). La suspension bactérienne est centrifugée afin de concentrer les bactéries et les 3 / 4 du surnageant sont éliminés. Cette suspension bactérienne concentrée est stockée à 4 °C jusqu'à utilisation.

***Milieu de culture de* C. elegans**

Les nématodes sont maintenus à 15 ou à 20 °C sur des boîtes de Pétri gélosées contenant du milieu NGM (Nematode Growth Medium). Pour 1 L de NGM, sont dilués dans de l'eau distillée 3 g de NaCl (Bioshop), 17 g d'agar (Bioshop) et 2,5 g de peptone. Le milieu est autoclavé et conservé entre 4 et 25°C. Avant son utilisation, dans 1 L de NGM, 25 mL de KPO_4 1M (Bioshop), 1 mL de CaCl 1M (Bioshop), 1 mL de $MgSO_4$ 1M (Bioshop) autoclavés et 1 mL de cholestérol à 5 mg / mL (Sigma-Aldrich) sont ajoutés. Ces solutions sont nécessaires pour la culture de *C. elegans* car elles apportent des composés organiques et minéraux dont le nématode a besoin pour se développer.

Entretien des nématodes

Avant de déposer les nématodes sur un nouveau milieu de culture, un volume de suspension bactérienne concentrée d'OP50 est ajouté au centre des boîtes gélosées de NGM (50 µL à 1,5 mL). Les boîtes sont ensuite placées sous hotte à flux laminaire et laissées ouvertes, le temps que la solution bactérienne d'OP50 sèche.

Les nématodes sont transférés d'anciennes boîtes appauvries en nourriture, conservées à 15 ou à 20 °C, sur des nouvelles boîtes en présence d'OP50. Un stockage des nématodes est possible en les conservant à – 80 °C ou dans de l'azote liquide dans une solution à base de glycérol (Couillault et Kurz 2010). Néanmoins, au Marine Bio-Products Research Laboratory, cette technique n'est pas utilisée. La méthode de transfert des nématodes sur des nouveaux milieu NGM enrichis avec OP50 est préférée. Les nématodes sont transférés sur des nouveaux milieux NGM enrichis d'OP50 toutes les 3 semaines si les nématodes sont maintenus à 20 °C ou tous les 3-4 mois s'ils sont maintenus à 15 °C. Pour transférer les nématodes de boîtes en boîtes, les manipulations s'effectuent sous hotte, avec une loupe binoculaire (TI.2, Olympus), un bec Bunsen et avec un pic en platine (**Figure 4. 21**). Le platine est un élément chimique qui peut être stérilisé après un passage au bec Bunsen et qui se refroidit en quelques secondes. Cette caractéristique est importante, car elle permet de ne pas brûler les nématodes lors de leurs transferts de boîtes en boîtes. En moyenne, une trentaine de nématodes partagent le même milieu de culture sur une boîte de 60 × 15 mm.

Figure 4. 21 Photographie de la hotte dédiée aux manipulations avec *C. elegans* au Marine Bio-Products Research Laboratory de l'Université de Dalhousie au Canada (*Burlot 2014*).

2.2.3.2. Synchronisation pour une population homogène de C. elegans

Une population synchronisée de *C. elegans* est nécessaire afin d'évaluer l'effet de l'infection bactérienne et l'effet de la protection potentielle apportée par les extraits d'algues sur leur espérance de vie. C'est pourquoi, il faut que tous les nématodes soient en phase dans leur cycle de vie. Ainsi, une population d'adultes est utilisée sur un milieu de culture NGM modifié qui empêche aux œufs pondus d'éclore. La synchronisation se fait en 5 jours.

Pendant le 1er jour, 15 à 20 nématodes adultes maintenus à 20 °C sont transférés, un à un, avec le pic en platine, sur de nouvelles boîtes de Pétri 60 × 15 mm contenant du milieu NGM gélosé enrichi avec OP50. Le 2ème jour, les mêmes nématodes adultes sont transférés sur de nouveaux milieux et entreposés à 20 ou 15 °C. Il ne reste alors que les œufs pondus par ces adultes sur les boîtes précédentes ainsi que le reste de nourriture pour les futures larves. Pendant le 3ème et le 4ème jour, les œufs éclosent puis les larves grandissent. Des vérifications sous la loupe binoculaire sont effectuées afin d'éviter une désynchronisation avec l'oubli d'un adulte ou autre. Au 5ème jour, tous les nématodes sont adultes et peuvent alors être transférés sur des milieux NGM modifiés avec 75 µM de fluorodeoxyuridine (FUdR, Sigma), un inhibiteur de la synthèse d'ADN rendant stériles les adultes sans modifier leur développement et leur comportement et en empêchant les œufs d'éclore s'il y en a de pondus (Mitchell *et al*. 1979).

2.2.3.3. Lavage des nématodes

Les nématodes sont lavés dans une solution M9 pour éliminer toute trace d'OP50 et ainsi éviter les éventuelles interférences bactériennes lors des évaluations de l'activité anti-PA14 et de l'activité immunostimulante chez *C. elegans* infecté par PA14.

1 L de solution M9 est constitué de 3 g de KH_2PO_4, de 6 g de Na_2HPO_4, de 5 g de NaCl et d'eau distillée. Elle est autoclavée et avant son utilisation, 1 mL de $MgSO_4$ 1M est ajouté. La solution M9 peut être stockée de 4 à 25 °C.

1 mL de solution de lavage M9 est ajouté sur une boîte de Pétri 60 × 15 mm contenant un milieu NGM gélosé sur lequel se trouvent des nématodes. En penchant la boîte de Pétri, la solution de lavage est aspirée de nouveau à la pipette afin de rincer tous les nématodes présents sur le milieu de culture. Une fois que tous les nématodes se trouvent aspiré dans la solution de lavage M9 par la micropipette, ils sont insérés dans des tubes Eppendorf, puis centrifugés à

2 000 g afin qu'ils sédimentent. Les 3 / 4 du surnageant sont éliminés et 800 µL de solution M9 sont ajoutés dans le tube Eppendorf contenant les nématodes. Une centrifugation à 2 000 g est effectuée et un nouveau lavage est réalisé avec 800 µL de solution M9 en soustrayant au préalable les 3 / 4 du surnageant. Au total, 3 lavages selon cette méthode sont réalisés pour un même tube Eppendorf contenant des nématodes. Au final, 100 µL de nématodes lavés à la solution M9 sont prêts à l'emploi. Leur utilisation a lieu dans les 4 heures qui suivent leur lavage.

*2.2.4. Évaluation de l'activité anti-***P. aeruginosa**

Au Marine Bio-Products Research Laboratory, au Canada, il a fallu sélectionner un extrait algal pour approfondir l'étude sur le modèle de pathogénicité *C. elegans – P. aeruginosa*. Ainsi, un 1er test antibactérien qualitatif par la méthode de diffusion sur gélose d'agar a permis de sélectionner les extraits de *S. chordalis* les plus actifs à l'encontre de PA14 parmi 39 extraits obtenus par EAE (*Cf.* Chapitre III. Optimisation de l'extraction assistée par enzymes de *S. chordalis*, 2.6 Plan d'expériences de Box Behnken pour des conditions de l'EAE, page 206-207). Ensuite, les activités anti-PA14 des extraits sélectionnés ont été quantifiées par un 2ème test à savoir par la méthode des microdilutions (Wiegand *et al.* 2008). Toutes les manipulations avec la bactérie PA14 ont été effectuées dans un laboratoire de microbiologie à accès limité et contrôlé sous un PSM-II. De plus, l'activité anti-PA14 a été étudiée d'un point de vue moléculaire en analysant l'expression génique des facteurs de virulence de PA14, qui permet de comprendre comment les bactéries sont affectées et se comportent face à un apport d'extrait d'algues dans leur milieu de culture.

2.2.4.1. Criblage d'extraits par la méthode de diffusion sur gélose d'agar : activité antibactérienne qualitative.

L'activité anti-PA14 a été évaluée sur 15 extraits de *S. chordalis* par la méthode de diffusion après avoir creusé des puits dans la gélose d'agar, d'après une méthode modifiée de Bennett *et al.* (1966) (Bennett *et al*. 1966; Kulshreshtha *et al*. 2016b).

20 mL de milieu KB contenant de l'agar ont été insérés dans une boîte de Pétri stérile de 9 cm de diamètre. Le milieu se solidifie en quelques minutes. 100 µL d'une suspension bactérienne fraîche de PA14 diluée dans du milieu liquide KB atteignant une DO égale à 0,1 à λ = 600 nm ont été étalés sur toute la surface de la gélose à l'aide d'un ensemenceur stérile. 6 puits ont ensuite été creusés dans la gélose d'agar à l'aide d'un emporte-pièce d'1 cm de diamètre. Dans 5 de ces puits a été ajouté 1 mL d'extrait hydrosoluble de *S. chordalis* à différentes concentrations. Les extraits lyophilisés ont été, au préalable, dilués dans de l'eau distillée stérilisée pour atteindre les concentrations suivantes : 250 µg/ mL ; 500 µg / mL ; 750 µg / mL ; 1 000 µg/ mL et 1 500 µg / mL. L'eau distillée stérilisée a servi de contrôle négatif et l'antibiotique carbénicilline (famille des pénicillines), a servi de contrôle positif (100 µg / mL, Sigma). La boîte de Pétri est mise dans un incubateur à 37 °C pendant 24 h. L'activité antibactérienne en triplicat a été déterminée visuellement par les zones d'inhibition de croissance bactérienne.

2.2.4.2. Méthode des microdilutions : activité antibactérienne quantitative

La méthode utilisée pour quantifier l'activité anti-PA14 est celle décrite par Wiegand *et al*. (2008) (Wiegand *et al.* 2008). Celle-ci se fait en plusieurs étapes et deux sortes de résultats sont produits : par lecture de DOs et par dénombrement de colonies bactériennes.

Tout d'abord, il faut réaliser une série de dilutions avec l'extrait à analyser ainsi qu'avec un antibiotique de référence, la carbénicilline dans cette étude. Ainsi, les dilutions sont réalisées dans du milieu liquide KB. Les gammes de concentrations de l'extrait de *S. chordalis* analysé et de la carbénicilline sont présentées dans le **Tableau IV. VII.**

Tableau IV. VII 10 concentrations différentes (C1 à C10) de l'extrait d'algue et de la molécule de référence sont évaluées afin de quantifier l'activité antibactérienne anti-PA14.

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
Extrait d'algue *µg / mL*	2,5	5	10	20	40	80	160	320	640	1 280
Carbénicilline *µg / mL*	0,175	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64

Le test d'effectue ensuite sur microplaque 96 puits de la manière illustrée sur la **Figure 4. 22**.

		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Echantillon 1	**A**	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	CB	CM
	B	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	CB	CM
	C	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	CB	CM
	D	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	CB	CM
Echantillon 2	**E**	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	CB	CM
	F	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	CB	CM
	G	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	CB	CM
	H	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	CB	CM

CM : Contrôle Milieu : dans tous les puits de la colonne 12 sont déposés 100 µL de milieu KB liquide.
CB : Contrôle Bactéries : dans tous les puits de la colonne 11 sont insérés 50 µL de suspension de PA14 avec une DO = 0,1 à λ = 600 nm et 50 µL de milieu KB liquide.
Dans tous les autres puits, des colonnes de 1 à 10 et des lignes de A à H, sont mélangés 50 µL de suspension de PA14 avec une DO = 0,1 à λ = 600 nm et 50 µL de solution d'extrait ou d'antibiotique à une concentration connue.
Dans cet exemple, la Concentration Minimale Inhibitrice (CM1) correspond à la C7 pour l'échantillon 1 et à la C3 pour l'échantillon 2. Si ces échantillons ont subi la même série de dilution, alors l'échantillon 2 est plus actif contre PA14 que l'échantillon 1.

Figure 4. 22 Organisation de la microplaque 96 puits pour évaluer et quantifier l'activité anti-PA14.

Après avoir déposé les échantillons à des concentrations connues, le milieu de culture KB ainsi que la suspension bactérienne de PA14 à une DO de 0,1 à $\lambda = 600$ nm comme expliqué sur la **Figure 4. 22**, la microplaque 96 puits est déposée dans un incubateur à 37 °C et est agitée très légèrement en continu (50 tr / min). Après 24 h d'incubation, les DOs des puits de la microplaque sont lues à λ=600 nm avec un spectrophotomètre de microplaques (Epoch ; BioTek).

En parallèle de la collecte des DOs, l'activité anti-PA14 est mesurée en calculant le nombre de colonies formées sur boîte de Pétri en présence ou non d'extraits d'algues ou d'antibiotiques. Pour cela, sur de nouvelles microplaques 96 puits, une série de dilution avec de l'eau distillée stérilisée est effectuée pour un extrait à une concentration donnée comme il est illustré sur la **Figure 4. 23**. Ainsi, pour un extrait de C1 à C10, 3 microplaques sont nécessaires pour réaliser les séries de dilutions en cascade. 99 µL d'eau distillée stérilisée sont distribués dans les 4 puits réplicats d'un échantillon à un concentration donnée diluée au 10^{-1}, puis 90 µL d'eau distillée stérilisée sont ajoutés dans tous les autres puits. 11 µl de suspension PA14 d'un échantillon à une concentration donnée sont insérés et homogénéisés dans les puits contenant 99 µL d'eau distillée stérilisée. De ces puits, 10 µL sont insérés dans les puits à coté contenant 90 µL d'eau distillée stérilisée pour atteindre une dilution au $10^{-2\ \text{ième}}$ et ainsi de suite. Après la dilution au $10^{-6\ \text{ième}}$, les 10 µl en excès sont éliminés.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
B	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
C	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
D	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
E	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
F	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
G	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
H	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}

Légende :

- *Échantillon 1 C1 dilué de 10^{-1} à 10^{-6}. De A1 à D1, ce sont 4 réplicats et ainsi de suite.*
- *Échantillon 1 C2 dilué de 10^{-1} à 10^{-6}. De A7 à D7, ce sont 4 réplicats.*
- *Échantillon 1 C3 dilué de 10^{-1} à 10^{-6}. De E1 à H1, ce sont 4 réplicats*
- *Échantillon 1 C4 dilué de 10^{-1} à 10^{-6}. De E7 à H7, ce sont 4 réplicats*

Figure 4. 23 Organisation de la microplaque 96 puits qui sert de support pour les séries de dilution au $10^{\text{ième}}$.

La prochaine étape consiste à prélever, dans 3 des 4 réplicats, 50 µL de suspension diluée au 10^{-6} de chaque échantillon à une concentration donnée. Les 50 µL sont ensuite étalés sur une boîte de Pétri de 9 cm de diamètre contenant un milieu KB gélosé. Le milieu inoculé est incubé à 37 °C pendant 24h. Après ce temps, les colonies formées sont dénombrées.

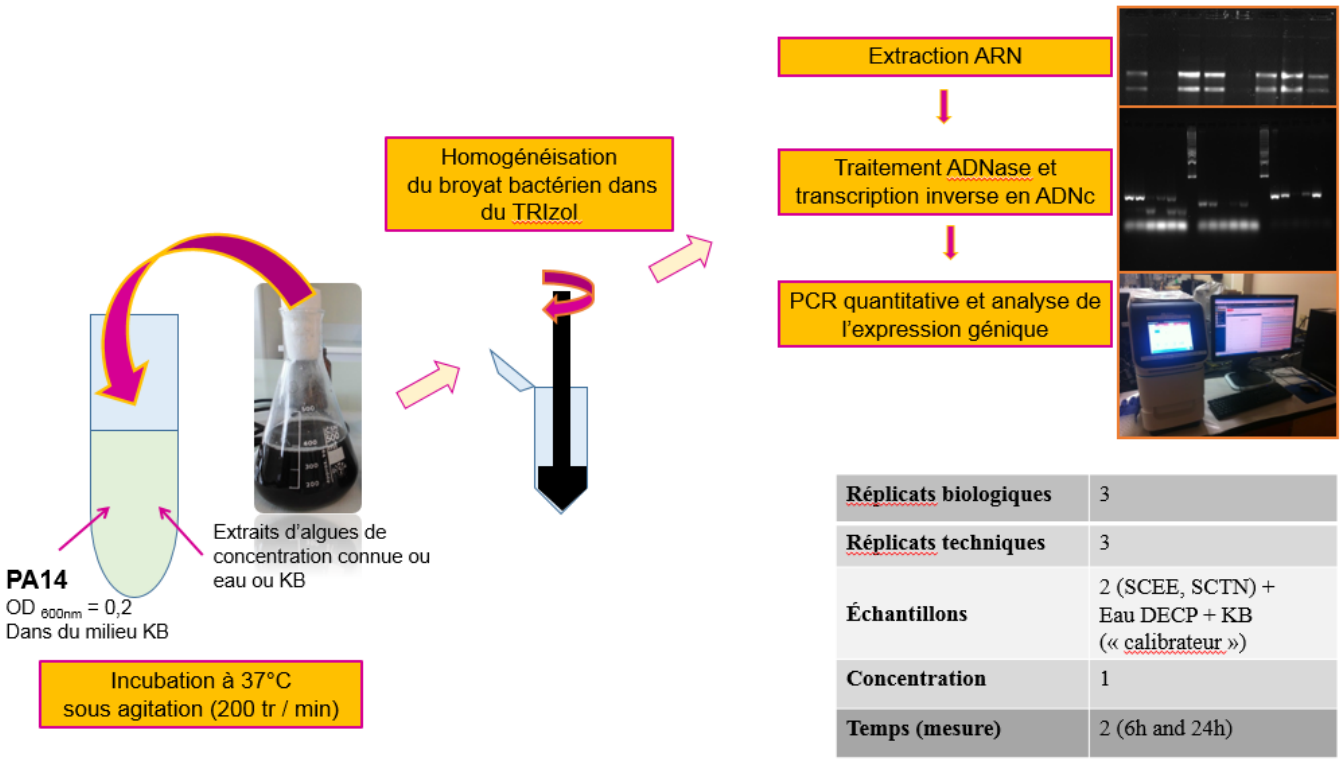
Au final, 2 RB ont été réalisés avec 4 RT pour les résultats sous forme de DOs et 3 RT pour les résultats sous forme de dénombrement de colonies. Les activités anti-PA14 de la carbénicilline et de deux extraits de *S. chordalis* (SCEE et SCTN) ont été évaluées par ces deux méthodes, excepté pour le SCTN dont l'activité anti-PA14 n'a été évaluée que par les résultats sous forme de DOs.

2.2.4.3. Activité anti-biofilm

Une culture de PA14 dans du milieu KB liquide est préparée à une DO $_{600\ nm}$ égale à 0,1 et est mise en contact ou non avec un extrait d'algue (SCEE) à une concentration connue (250, 500 et 750 µg /mL). 180 µL de ces différents mélanges sont insérés, séparément, dans des puits d'une microplaque de 96 puits. La microplaque est incubée à 37 °C pendant 24 h sans agitation. La formation de biofilm a été quantifiée en colorant les puits avec 20 µL de cristal violet (0,14 % m/v, dilué dans de l'eau distillée et stérilisée). La microplaque est laissée entre 20-25 °C pendant 20 min (Kulshreshtha 2016a). Les puits sont ensuite lavés 3 fois avec 200 µL d'eau distillée stérilisée afin d'éliminer l'excès de cristal violet et en faisant attention à ne pas toucher les parois des puits. Ce colorant est pour finir élué et homogénéisé avec de l'éthanol à 95 %. La DO de chaque puits est lue à 590 nm au spectrophotomètre (Liu *et al.* 2013).

2.2.4.4. Analyse de l'expression des gènes de virulence de PA14

Pour analyser l'expression des gènes de virulence de PA14, les ARNs codant pour les protéines effectrices ont été extraits après que les bactéries PA14 aient été en contact ou non avec des extraits de *S. chordalis*. Les ARNs de PA14 ont ensuite été transformés en ADN complémentaires par la transcription inverse et ces derniers ont été quantifiés par la méthode de l'amplification quantitative en chaîne par polymérase (de l'anglais qPCR) mesurée par un système couplant un thermocycleur et un logiciel d'analyse (StepOnePlus Real-Time PCR system ; ThermoFisher Scientific). La **Figure 4. 24** schématise les grandes étapes, détaillées dans la suite de ce manuscrit.



Réplicats biologiques	3
Réplicats techniques	3
Échantillons	2 (SCEE, SCTN) + Eau DECP + KB (« calibrateur »)
Concentration	1
Temps (mesure)	2 (6h and 24h)

Figure 4. 24 Schéma des étapes suivies pour l'analyse de l'expression des gènes de virulence de PA14.

Expérience de la mise en contact des échantillons avec PA14

Une suspension bactérienne de PA14 à une DO_{600nm} égale à 0,2 a été fraichement préparée dans du milieu de culture KB liquide. 5 mL de cette suspension sont ajoutés dans un tube à essai de culture ainsi qu'1 mL d'extraits dilués dans de l'eau distillée stérilisée (SCEE et TN). À la place de l'extrait, 1 mL de milieu KB ou d'eau distillée stérilisée a été ajouté pour servir de contrôles. La concentration finale des extraits de *S. chordalis* en contact avec la suspension bactérienne a été choisie en fonction des résultats anti-PA14 obtenus en amont. Le tube à essai contenant alors les 6 mL est placé dans l'étuve à 37 °C sous agitation constante (200 tr / min).

Deux prélèvements des ARN totaux ont été effectués : à 6h et à 24h, après la mise en contact PA14 – extrait d'algue. Le prélèvement se fait dans un cryotube Eppendorf, dans lequel 1 mL des 6 mL de suspension de PA14 en contact ou non avec les extraits d'algues est ajouté. Le tube est centrifugé à 2 000 g pendant 5 min et le surnageant est éliminé. Dans le même tube

Eppendorf contenant un culot de PA14, de nouveau, 1 mL des 5 mL restants de suspension de PA14-extrait est ajouté. Une 2ème centrifugation à 2 000 g pendant 5 min est réalisée, le surnageant est éliminé et ainsi de suite jusqu'à obtenir un culot important dans 0,1 mL, afin d'extraire une quantité maximale d'ARN.

Le tube Eppendorf contenant le culot de bactéries est placé dans un bac contenant de l'azote liquide et toutes les manipulations qui suivent se déroulent au froid (4°C). Avec un pilon adéquat pour broyer dans un tube Eppendorf (Fisherbrand ; Fisher Scientific), les bactéries et les constituants cellulaires sont détruits mécaniquement afin d'extraire les ARN, qui sont très instables. Après avoir bien homogénéisé dans le froid la suspension des bactéries détériorées, 500 µL de TRIzol sont ajoutés et homogénéisés. Le TRIzol est une solution chimique composée de guanidine, de thiocyanate, de phénol et de chloroforme et lyse chimiquement les composés cellulaires. Le tube est ensuite stocké à -80 °C avant l'extraction et la purification de l'ARN.

Extraction et purification de l'ARN de PA14

Le protocole fourni par le fournisseur du réactif TRIzol (ThermoFisher Scientific) a été suivi pour extraire et purifier l'ARN de PA14. Des modifications ont été apportées afin d'optimiser le rendement d'extraction. Le protocole comporte 5 étapes qui doivent être réalisées précautionneusement notamment dans le froid, à 4 °C et par le port et le changement régulier de gants. Les solutions utilisées dans le protocole sont entreposées à 4°C avant utilisation.

La 1ère étape consiste à récupérer les tubes à -80 °C, contenant les bactéries détériorées dans le TRIzol, qui sont placés dans un bac de glace. Une fois l'échantillon décongelé, le contenu est homogénéisé à l'agitateur de type Vortex.

Lors de la 2ème étape, 100 µL de chloroforme sont ajoutés dans le tube qui est retourné plusieurs fois afin de mélanger doucement. Après avoir laissé incuber dans la glace pendant 5 min, une centrifugation à 4 °C, à 12 000 g pendant 17 min est effectuée. Trois phases se distinguent. La phase supérieure, organique, composée de chloroforme et de phénol et l'interphase contiennent l'ADN et les protéines. Elles sont éliminées. Seule la phase inférieure, aqueuse, contenant l'ARN, est gardée.

La 3ème étape précipite l'ARN en ajoutant un volume d'isopropanol 100 % équivalent à celui de la phase aqueuse. Après avoir laissé incuber dans la glace pendant 10 minutes, une centrifugation à 12 000 g, pendant 12 min et à 4 °C est réalisée. Le surnageant est éliminé délicatement.

La 4ème étape correspond à deux lavages du culot d'ARN avec 500 µL d'éthanol à 75 % suivie d'une centrifugation à 7 500 g pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant est éliminé et le culot est séché à l'air libre, le temps que la dernière goutte d'éthanol s'évapore.

Enfin, lors de la dernière étape, le culot est re-suspendu dans 50 µL d'eau distillée stérilisée et traitée au DEPC (Diethyl Pyrocarbonate, FLUKA). Le DEPC modifie de manière covalente les nucléases en se fixant au site actif et donc les ARNases, qui sont trouvées un peu partout comme sur les mains et qui sont gênantes pour les expériences menées sur les ARNs puisque ces enzymes les dégradent. 10 µL d'ARN dissouts dans l'eau DEPC sont aliquotés et sont utilisés afin de déterminer la concentration et vérifier la pureté de l'ARN au spectrophotomètre microvolume sur lequel 1 µL d'ARN dissouts est déposé (NanoDrop ™ 2000 / 2000c ; ThermoFisher Scientific) et sur un gel d'agarose pour ARN (**Figure 4. 25**).

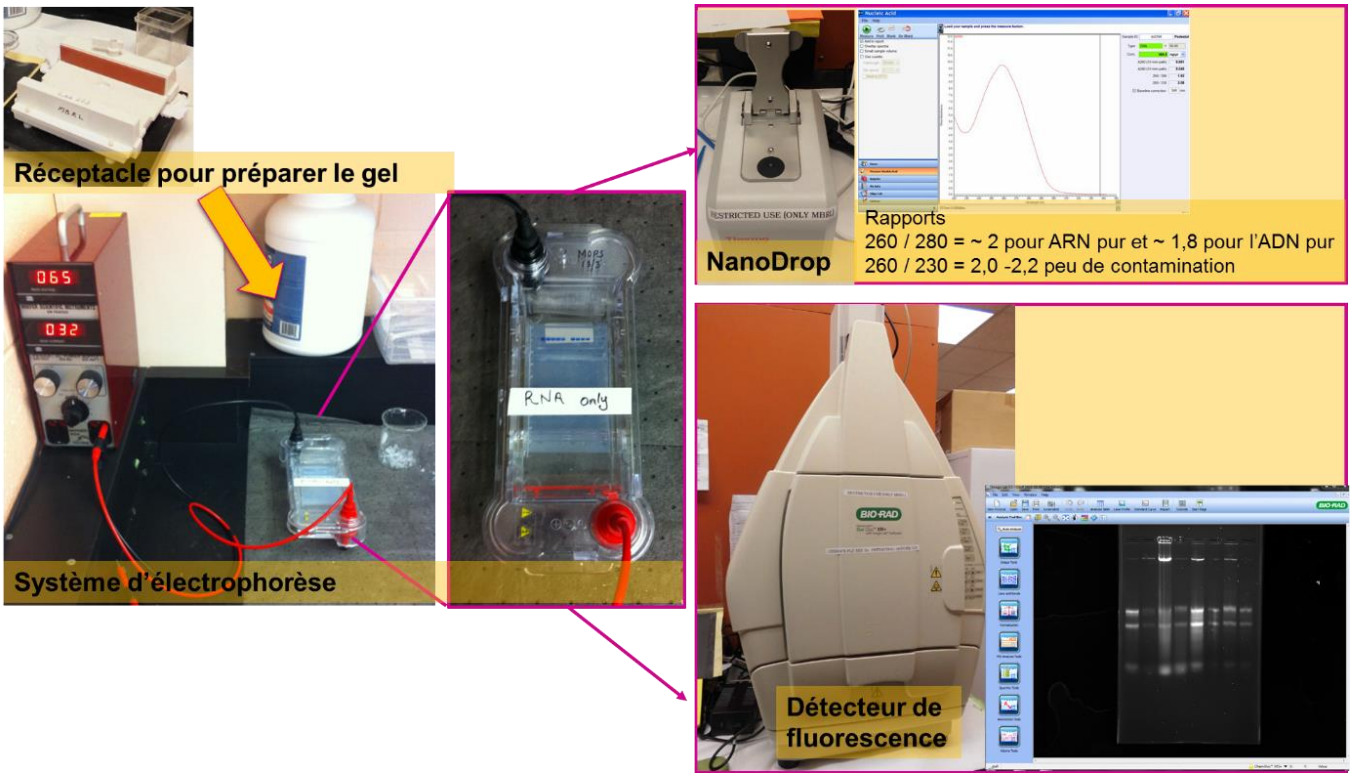


Figure 4. 25 Vérification de la pureté de l'ARN : étape importante avant la conversion en ADN complémentaire.

Pour réaliser un petit gel à ARN, 1,2 % d'agarose sont ajoutés dans 50 mL de tampon TBE 0,5X (Tris, Borate, EDTA dilués dans de l'eau DEPC). La dissolution est facilitée aux microondes pendant 2 min. Le gel est ensuite coulé dans un réceptacle adéquat où un peigne y est plongé pour former les puits de dépôts des échantillons. Pendant que le gel se solidifie, en parallèle, dans un microtube Eppendorf PCR (Eppendorf) sont homogénéisés 5 µL de colorant de charge 2X (Gel Loading Dye, Blue, New England BioLabs Inc.), 4 µL d'ARN dissouts et 1 µL de colorant fluorescent GelRed 1 000 X (Biotium). Le tout est centrifugé à 2 000 g (MySPIN^{TM}, ThermoFisher Scientific) puis chauffé à 65 °C pendant 10 min. Une fois le gel solide, le peigne est enlevé délicatement et le gel est posé dans la cuve à électrophorèse et plongé dans du tampon TBE 0,5 X. Les 10 µL préparés précédemment sont déposés dans un puits du gel. La cuve d'électrophorèse est ensuite mise sous tension (65-70 V) et la migration est laissée pendant 30 min à 1 h. Le gel est enfin lu par un détecteur de fluorescence sous rayons UV (Gel Doc TM XR+ Gel Documentation System ; Bio Rad) et par un logiciel (Image Lab ; Bio Rad).

Traitement et élimination de l'ADNase

Avant de réaliser la transcription inverse et obtenir un ADN complémentaire, qui est plus stable que l'ARN et dont l'analyse de l'expression est facilitée, il faut éliminer toute contamination d'ADN dans les échantillons d'ARN. Pour cela, un kit est utilisé (DNA-free ^{TM} DNA Removal Kit ; ThermoFisher Scientific).

8 µL d'ARN contenant 1 µg d'ARN (dilué dans de l'eau DEPC) sont mélangés à 1 µL de tampon ADNase et 1 µL d'enzymes ADNase. L'action des enzymes s'effectue à 37 °C pendant 30 min suivie d'une dénaturation et d'une inactivation des enzymes à 65 °C pendant 10 min. Enfin, le mélange est laissé à 4 °C avant de lancer la transcription inverse. Une PCR avec des amorces d'ADN puis une électrophorèse sont généralement effectuées pour vérifier de nouveau la pureté de l'ARN.

Transcription inverse de l'ARN extrait instable en ADNc stable

Un kit a également été utilisé pour produire l'ADN complémentaire à partir de l'ARN extrait et purifié (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit ; Applied Biosystems). Le

protocole du fournisseur a été suivi. Selon le nombre d'extraits d'ARN à transformer en ADNc, un mélange des réactifs doit être préparé pour l'ensemble des extraits d'ARN. Toutes les manipulations se font dans un bac de glace. Au final, dans un tube PCR, il doit y avoir 10 µL d'ARN pur après le traitement à la DNAse, 0,8 µL de nucléotides (25X dNTP Mix), 2 µL d'amorces (10X Random Primers), 4,2 µL d'eau DEPC, 2 µL de solution tampon pour la Reverse Transcriptase (RTr) et pour finir 1 µL d'enzymes RTr.

Le contenu du tube PCR est mélangé, homogénéisé puis placé dans un thermocycleur. La transcription inverse se réalise en 4 étapes. Premièrement, une incubation à 25 °C pendant 10 min est réalisée pour solubiliser le contenu. Puis, pendant 120 min, l'enzyme RTr est active à 37 °C et est inactivée à 85 °C pendant 5 min. Enfin, le contenu transcrit en ADNc est refroidi à 4 °C et stockable à – 20 °C jusqu'à utilisation.

La qualité et la quantité des ADNc produits par la transcription inverse est vérifiée en dosant au spectrophotomètre microvolume (Nanodrop) et en réalisant un gel.

Pour le gel à ADN, il faut tout d'abord amplifier l'ADNc en utilisant des amorces spécifiques aux gènes de *P. aeruginosa*. Dans un tube PCR, 10 µl de réactif contenant la *Taq* polymérase, les nucléotides et la solution tampon (GoTaq® Colorless Master Mix ; Promega) sont homogénéisés avec 0,5 µL d'amorces gauches sens 5'- 3' (Forward), 0,5 µL d'amorces droite anti-sens (Reverse) d'un même gène, 2 µL d'ADNc et avec 7 µL d'eau DEPC. Une PCR est ensuite effectuée selon un gradient qui commence par 5 min à 94°C puis 30 cycles constitués de 2 min à 94 °C, 30 s à 55 °C et 2 min à 72 °C et qui se terminent par 7 min à 72 °C. Les ADNc amplifiés sont, pour finir, laissés à 4°C. Ensuite, un grand gel de 100 mL de tampon TBE 0,5X dans lesquels 1 % d'agarose est ajouté, est chauffé aux microondes pendant 3 min. Après 1-2 min, 6 µL de colorant fluorescent GelRed 1 000 X sont versés dans le gel encore liquide. Le gel est mélangé et coulé dans un réceptacle adéquat où un peigne y sera immédiatement plongé. 5 µL de colorant de charge sont mélangés à 5 µL d'ADNc amplifiés ou à 5 µL d'un marqueur de poids moléculaire d'ADN (Thermo Scientific™ MassRuler DNA Ladder Mix, ThermoFischer Scientific). Après avoir retiré délicatement le peigne du gel placé dans la cuve à électrophorèse contenant une solution tampon de TBE 0,5X, les 10 µL sont déposés dans les puits du gel. La migration et la lecture des bandes se font comme décrit précédemment (*Cf.* Extraction et purification de l'ARN de PA14, page 308 Figure 4. 25).

PCR en temps réel ou qPCR

La méthode des réactions en chaîne par polymérase quantitative a permis de mesurer la quantité d'amplicons d'ADN définis par des couples d'amorces correspondant à des gènes de la virulence de PA14.

Pour cela, il est important de fixer la quantité d'ADNc initiale. Celle-ci est généralement de 10 ng par puits, néanmoins, dans cette étude, cette quantité est fixée à 5 ng, ce qui est supérieur à la concentration limite de détection (2 ng).

Comme pour la transcription inverse, selon le nombre d'extraits d'ADNc et selon le nombre de gènes à analyser en ADNc, un mélange des réactifs doit être préparé pour l'ensemble des extraits d'ARN. Toutes les manipulations se font dans un bac de glace. Au final, dans un tube PCR, il doit y avoir 5 µL de réactif SYBR Green, contenant le tampon, les nucléotides, le colorant SYBR Green et l'ADN polymérase (SYBR Green Real-Time PCR Master Mixes 2X; ThermoFisher Scientific), 0,3 µL d'amorces gauches à 10 µM (diluées dans de l'eau DEPC) d'un gène à analyser, 0,3 µL d'amorce droite à 10 µM du même gène à analyser et 3,4 µL d'eau DEPC. Les 9 µL du mélange réactif – amorces sont insérés dans un puits d'une microplaque 96 puits pour qPCR et au dernier moment 1 µL d'ADNc dilué au 10ième dans de l'eau DEPC pour atteindre une quantité finale de 5 ng dans le tube PCR est ajouté dans ce même puits. Le contenu des puits est homogénéisé en tapotant doucement la microplaque 96 puits et cette dernière est centrifugée à 2 000 tr / min afin de récupérer tout le contenu dans le fond du puits. Des triplicats (RT) sont réalisés pour un même échantillons.

Quand tous les puits de la microplaque 96 puits sont remplis, celle-ci est posée dans le système de la PCR quantitative (StepOnePlus ™ Real-Time PCR System ; Applied Biosystems) et subit un gradient de température de la façon suivante :

- Étape 1 : 10 min à 95 °C. Cette étape dénature tous les brins d'ANDc pour qu'ils ne forment que de simples brins prêts à être hybridé par des bases complémentaires grâce à l'action de l'ADN polymérase.

- Étape 2 : (15 s à 95 °C et 1 min à 60 °C) × 40 cycles. Cette étape des cycles d'amplification permet aux amorces de s'accrocher à leurs bases complémentaires, à

l'ADN polymérase d'amplifier les gènes entre les deux amorces et au colorant SYBR Green de s'intercaler entre les doubles brins d'ADN des gènes amplifiés.

- Étape 3 : 15 s à 95 °C ; 1 min à 60 °C et 15 s à 95 °C. C'est une étape programmée, supplémentaire à la fin des cycles d'amplification. L'acquisition de l'intensité de fluorescence s'effectue en continu, ce qui permet de vérifier qu'il n'y a qu'un seul produit de PCR amplifié par les amorces des gènes à analyser (courbe de fusion).

Le système qPCR est photographié en **Figure 4. 26**

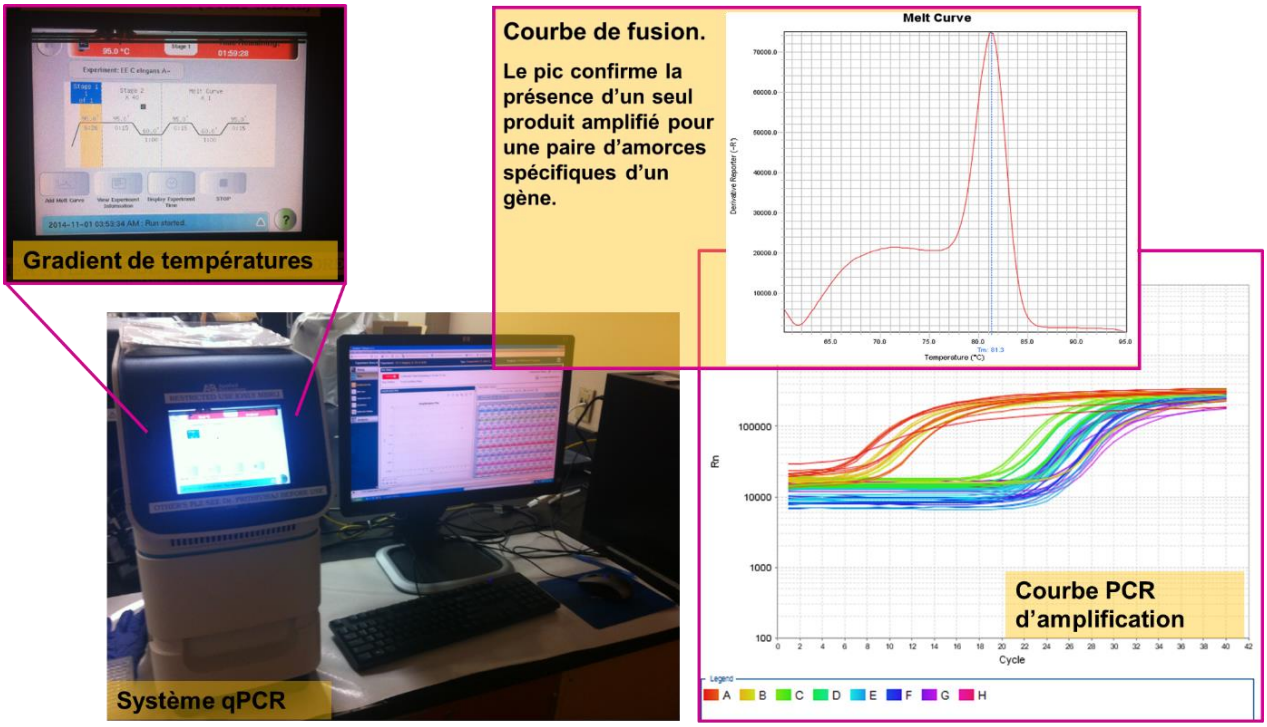


Figure 4. 26 Système qPCR, visualisation et validation des résultats bruts par les courbes de fusion et les courbes PCR d'amplification.

Le système de la PCR quantitative permet d'amplifier, indirectement, une région de l'ARNm avec des oligos et une sonde fluorescente. Ce système mesure l'intensité de fluorescence émise à chaque cycle PCR. Pendant les 1ers cycles, il n'y a pas assez de fluorescence pour être que celle-ci soit détectée, mais rapidement la réaction produit de plus en plus d'amplicons et la détection s'amplifie également. Une courbe PCR a typiquement une phase exponentielle suivie d'une phase plateau. La mesure du Ct (de l'anglais Cycle threshold) doit être prise dans la phase exponentielle, où la pente est linéaire. Un seuil est fixé dans cette

phase et la valeur du Ct se mesure où la courbe de fluorescence détectée croise ce seuil. Il y a 40 cycles d'amplification. Ainsi, plus la valeur du Ct est élevée (30-35), moins le gène détecté est présent ce qui signifie que ce gène n'est pas beaucoup exprimé. Au contraire, si la valeur du Ct est petite (10 - 15), le gène amplifié et détecté est fortement exprimé.

De plus, il est important d'avoir un contrôle endogène, c'est-à-dire un gène qui ne varie pas entre les échantillons testés comme par exemple le gène codant l'ARN ribosomique16S faisant partie intégrante de la petite sous-unité du ribosome, constituant essentiel pour la traduction des ARNm en protéines. Toute variation de l'expression de ce gène entre les échantillons traduit alors les erreurs de pipetages et de manipulations.

Enfin, il est important d'avoir un échantillon « calibrateur » auquel tous les autres sont comparés. Pour cette étude, il s'agit de l'échantillon « KB », qui correspond à la bactérie dans son milieu de culture. En effet, une expérience de qPCR exprime une « expression relative », qui correspond à une variation de l'expression d'un gène entre plusieurs échantillons.

L'analyse des résultats obtenus par qPCR commence par le calcul de Delta Ct, soit **l'Eq. I** :

Eq. I

$$\text{Delta Ct}_{\text{échantillon 1}} = \text{Ct}_{\text{gène}} - \text{Ct}_{\text{contrôle endogène}}$$

Ensuite, la variation par rapport à l'échantillon qui possède la plus faible expression est calculée par **l'Eq. J** :

Eq. J

$$\text{Delta Delta Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{échantillon 1}} - \Delta\text{Ct}_{\text{échantillon avec la plus faible expression}}$$

Enfin pour l'interprétation des résultats, la quantification relative (RQ) est utilisée, elle est calculée par **l'Eq. K** suivante :

Eq. K

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Le « calibrateur » est fixé à une valeur de 1. En effet, dans cette étude la bactérie se trouve dans son milieu de culture KB soit dans des conditions « normales » pour elle. Ses gènes s'expriment de façon « normale » et c'est par rapport à cette condition « normale » que l'effet des extraits d'algues sur la bactérie est mesuré. Ainsi, les autres échantillons ont une valeur par rapport à ce « calibrateur ». Un résultat est significatif lorsque que le facteur multiplicatif de l'expression d'un gène (sur- ou sous-exprimé) par rapport à l'expression de ce même gène chez le « calibrateur » est de minimum de 2, soit un RQ de plus de 2 ou moins de 0,5 *(IRIC, 2016).*

Le système qPCR est étalonné tous les ans environ (température, détection des signaux de fluorescence du colorant SYBR Green) en utilisant un kit propre au système (StepOnePlus™ Real-Time PCR System Spectral Calibration Kit (96 well) ; Applied Biosystem). Le protocole est fourni par le fournisseur.

Le système qPCR a été également étalonné avec toutes les amorces étudiées. 5 concentrations d'amorces ont été analysées pour la calibration (100, 20, 4, 0,8 et 0,16 µM). De même que plusieurs concentrations d'ADNc d'échantillons ont été utilisées pour déterminer celle qui permet d'obtenir des résultats (Ct) exploitables. Après calibration, la concentration a été fixée à 0,3 µM par amorce et la quantité d'ADNc par puits à 5ng.

Amorces des gènes de virulence de PA14

Les amorces utilisées dans l'étude de l'expression des gènes de virulence de PA14 sont données dans le **Tableau IV. VIII**. Leurs designs ont été réalisés par le laboratoire canadien qui a commandé les amorces au groupe Invitrogen (ThermoFisher Scientific). Les amorces à 1 mM, sont stockées à – 25 °C jusqu'à utilisation.

Tableau IV. VIII : Amorces des gènes de virulence de PA14 utilisées dans cette étude.

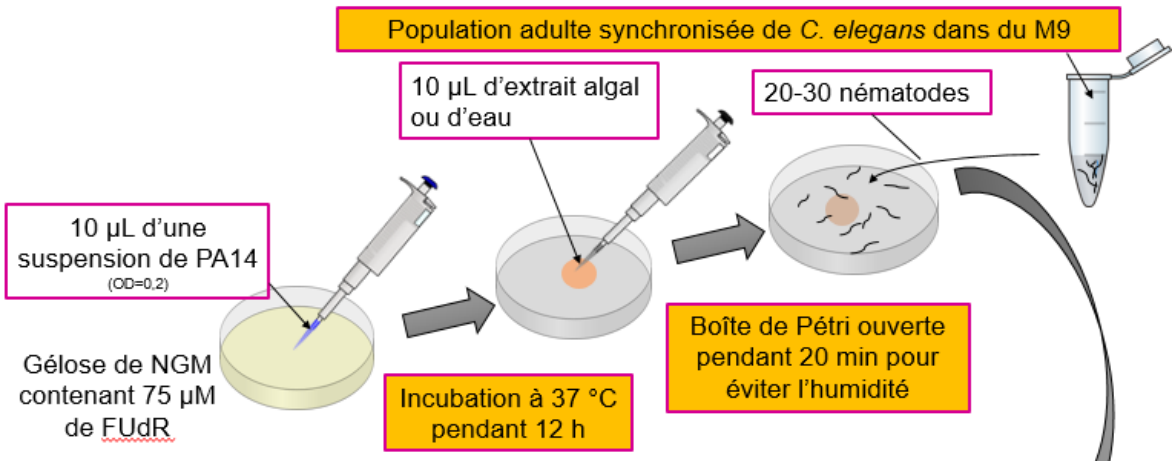
Nom du gène	Produit codé (Nombre d'acides aminés)	Localisation cellulaire	Fonction	Nom de l'amorce et séquences (5' - 3')	References
lasI	Protéine LasI (201 aa)	Cytoplasme	Intervient dans la régulation de la synthèse de l'élastase R, qui a un rôle dans la perméabilité membranaire. Intervient en tant que régulateur dans la cascade du QS.	lasI-F : GCTCCTTGAACACTTGAGCA lasI-R : GCGCGAAGAGTTCGATAAAA	*Pseudomonas.com*
lasR	Régulateur transcriptionnel LasR (239 aa)	Cytoplasme	Active la transcription du gène *lasB* codant pour la structure de l'élastase, qui a un rôle dans la perméabilité membranaire. Intervient en tant que régulateur dans la cascade du QS.	lasR-F : CCGCCGAATATTTCCCATA lasR-R : GATATCGGTTATCTGCAACTGCT	*Pseudomonas.com*
rhlI	Protéine RhlI (201 aa)	Inconnu	Intervient en tant que régulateur dans la cascade du QS et dans la synthèse des rhamnolipides.	rhlI-F : GGAGCGCTATTTCGTTCG rhlI-R : GTCTCGCCCTTGACCTTCT	*Pseudomonas.com*
rhlR	Régulateur transcriptionnel RhlR (241 aa)	Cytoplasme	Intervient en tant que régulateur dans la cascade du QS et dans la synthèse des rhamnolipides.	rhlR-F : TGCGTTGCATGATCGAGT rhlR-R : CGGGTTGGACATCAGCAT	*Pseudomonas.com*
hcnC	Enzyme synthase du cyanure d'hydrogène (417 aa)	Cytoplasme	Intervient dans la formation du cyanure d'hydrogène.	hcnC-F GCCTGGACAGTTGGTAGGC hcnC-R GAACAGAACCTATGACATCGTGA	*Pseudomonas.com*
aroE	Shikimate 5-dehydrogenase (274 aa)	Cytoplasme	Intervient dans la formation des biofilms et dans la susceptibilité aux antibiotiques.	aroE-F : TTCTTCGAGCAGGGCAAG aroE-R : CAATTCGTCCACCAGACGAT	*Pseudomonas.com* *Taylor et al. 2014*
rpoN	Polymérase d'ARN, facteur σ-54	Cytoplasme	Les facteurs σ permettent l'attachement de l'ARN polymérase pour l'initiation de la traduction génétique.	rpoN-F : ATACCTTCATGCGCAACCA rpoN-R : GGCTCTGCAGGCTCTTGAT	*Pseudomonas.com*
sodB	Superoxyde dismutase (188 aa)	Périplasme	Intervient dans la destruction des radicaux qui sont produits naturellement à l'intérieur des bactéries et qui sont toxiques.	sodB-F : GTTCAAGGAAGAGTTCACCAAGA sodB-R : GTCGGCCTTCTTCACCAG	*Pseudomonas.com*
sbe	Phosphatase alcaline liée à la surface	Paroi extérieure	Intervient dans l'abaissement du pH dans le milieu extérieur lors de le croissance de la bactérie et ainsi dans la perméabilité des membranes cellulaires.	sbe-F : CTCGTTGGTCTCCTCGAGTT sbe-R : CCATCTACCAGCGTGAAGG	*Bhatti et Ingram 1982; Kandasamy et al. 2012; Liu et al. 2013*
16 S	ARN de la petite sous-unité du ribosome	Cytoplasme	Intervient dans la lecture de l'ARN messager et donc dans la traduction en protéines du message génétique	16S rRNA-F : GATTAACGCTTGCACCCTTC 16S rRNA-R : TAAGCACCGGCTAACTTCGT	*Pseudomonas.com*

2.2.5. Évaluation de l'activité immunostimulante de C. elegans *sain et infecté par PA14.*

L'activité immunostimulante chez *C. elegans* a été évaluée d'un point de vue comportemental vis-à-vis de l'infection de PA14 et de l'apport d'extraits algaux dans son milieu de culture, et d'un point de vue moléculaire en analysant l'expression génique de son système immunitaire.

2.2.5.1. *Test de survie de* C. elegans *et détermination de la* TL_{50}.

Premièrement, la survie de *C. elegans* infecté par PA14 a été examinée à la loupe binoculaire. Le protocole est schématisé sur la **Figure 4. 27** ci-contre :



Réplicats biologiques	3
Réplicats techniques	3
Échantillons	2 (SCEE, SCTN) + contrôle (OP50)
Concentration s	6 (0 to 1 000 µg/mL)
Temps (mesure)	5 (24, 48, 72, 96, 120 h)

Figure 4. 27 Schéma de la démarche expérimentale pour évaluer la survie du nématode sain (avec OP50) ou infecté par PA14.

Sur des petites boîtes de Pétri 35 × 10 mm (Falcon) contenant du milieu NGM avec 75 µM de FUdR, 10 µL de solution de PA14 ou de OP50 de $DO_{600\ nm}$ égale à 0,1 sont ajoutés. Après une incubation dans une étuve à 37 °C pendant 12 h, 10 µL d'échantillon d'algues ou d'eau sont déposés au centre du milieu de culture inoculé par PA14 ou par OP50. Les boîtes de Pétri sont laissées ouvertes afin d'éviter toute trace d'humidité, qui pourrait gêner le développement de *C. elegans*. Ensuite, 20 à 30 nématodes d'une population adulte synchronisée et lavée de toutes traces bactériennes dans du M9 sont ajoutés sur le milieu et le nombre exact est vérifié à la loupe binoculaire et est noté. Les boîtes sont placées dans un incubateur à 25 °C tout le long de l'expérience qui dure jusqu'au dernier nématode survivant. Toutes les 24 h, le nombre de nématodes vivants (mobiles) est compté grâce à la loupe binoculaire.

3 RB ainsi que 3 RT ont été réalisés pour un même échantillon pour le test de survie. 2 extraits d'algues ont été appliqués indépendamment l'un de l'autre (SCEE et SCTN). 6 concentrations d'échantillons dilués dans de l'eau distillée et stérilisée ont été testées : 0, 250, 500, 640, 750 et 1 000 µg / mL sur des nématodes en présence de OP50 ou de PA14. Les résultats sont exprimés par la TL_{50}, le Temps Létal, qui correspond au temps nécessaire à l'agent pathogène pour tuer 50 % des nématodes. Il est calculé selon **l'équation L** suivante :

Eq. L

$$\% \text{ survie des nématodes} = \frac{\text{Nombre de nématodes}_{\text{PA14 + échantillon}} - \text{Nombre de nématodes}_{\text{PA14}} \times 100}{\text{Nombre de nématodes}_{\text{échantillon}} - \text{Nombre de nématodes}_{\text{PA14}}}$$

2.2.5.2. Analyse de l'expression des gènes de l'immunité de C. elegans

Expérience de la mise en contact des nématodes avec les échantillons et avec les bactéries

Le protocole du test de survie a été suivi sauf qu'à la place de mettre 20 à 30 nématodes sur les milieux inoculés de bactéries, une centaine de nématodes ont été déposés.

Deux prélèvements des nématodes ont été effectués, à 6h et à 24 h, après la mise en contact avec PA14 ou OP50 et avec ou sans les échantillons. Les nématodes sont récupérés dans 1 mL de solution M9 après avoir lavé le milieu de culture inoculé par les bactéries. Ils sont insérés dans un cryotube Eppendorf. Le tube est centrifugé à 2 000 g pendant 5 min et le surnageant est éliminé. 3 lavages avec la solution M9 sont réalisées (*Cf.* 2.2.3.3. Lavage des nématodes, page 299). Le surnageant est éliminé pour ne garder que 0,1 mL de culot de *C. elegans*. Le cryotube Eppendorf est alors placé dans un bac contenant de l'azote liquide et toutes les manipulations qui suivent se déroulent au froid (4°C).

De l'ARN à la quantification relative de l'expression génique

À partir de cette étape, les protocoles pour extraire et purifier l'ARN, pour obtenir l'ADNc et pour quantifier l'expression génique du système immunitaire de *C. elegans* par qPCR sont identiques à ceux présentés précédemment (*Cf.* 2.2.4.4. Analyse de l'expression des gènes de virulence de PA14, pages 305-314) avec un changement au niveau de la transcription inverse appliquée à des ARN d'eucaryotes.

En effet, pour la transcription inverse, les amorces utilisées pour *C. elegans* sont légèrement différentes. Ainsi, 2 µL d'amorces prises au hasard (10 X Random Primers, hexamère) mélangées à des amorces d'oligoT (Oligo(dT)18 Primer ; ThermoFisher Scientific) (1 :5) sont employés pour la transcription inverse. Chez les eucaryotes, des modifications post-transciptionnelles sont responsables de l'ajout de queues polyA au bout des ARNm. La transcription inverse des ARNm extraits de *C. elegans* en ADNc est favorisée par des amorces complémentaires riches en thymine (oligoT). Les amorces oligoT permettent également d'éviter la transcription inverse des traces d'ARN bactériens non éliminées par le lavage ou encore ingurgitées par les nématodes, gênantes pour l'analyse qPCR.

Amorces des gènes du système immunitaire de C. elegans

Les amorces utilisées dans l'étude de l'expression des gènes du SI de *C. elegans* sont données dans le **Tableau IV. IX**. Leurs designs ont été réalisés par le laboratoire canadien qui a commandé les amorces au groupe Invitrogen (ThermoFisher Scientific). Les amorces à 1 mM, sont stockées à – 25 °C jusqu'à utilisation.

Tableau IV. IX : Amorces des gènes du système immunitaire de *C. elegans* utilisées dans cette étude.

Nom du gène	Produit codé (Nombre d'acides aminés)	Localisation cellulaire	Fonction	Nom de l'amorce et séquences (5' - 3')	Reference
zk6.7	Lipase LIPL-5 (de 327 à 403 aa)	Intestin	Aide à l'acquisition de nutriments lors d'infections bactériennes.	zk6.7-F : CGAATTCCTCCCAAACAACT zk6.7-R : GAATAGGACGTTGTCGCAGA	
lys-1	Lysosyme LYS-1 (298 aa)	Intestin Neurone	Reconnaît et détruit la paroi bactérienne.	lys-1-F : TTCGGATCTTTCAAGAAGGC lys-1-R : TGGGATTCCAACAACGTAAA	
f28d1.3	Famille des thaumatines THN-1 (233 aa)	Inconnu	Reconnaît les bactéries à Gram négatif, induit des réponses de défense et intervient dans le contrôle de la longévité.	f28d1.3-F : AATCTGGATGCCTCGGATAC f28d1.3-R : CATCTGAGCAGTTGCAGAGC	
abf-1	Facteur antibactérien ABF-1 (85 aa)	Intestin	Intervient dans la production de protéines de surface antimicrobiennes.	abf-1-F : TGCCTTCTCCTTGTTCTCCT abf-1-R : ATCCTCTGCATTACCGGAAC	
f38a1.5	Lectine de type C, CLEC-166 (466 aa)	Rectum	Reconnaît la surface, notamment les LPS des bactéries.	f38a1.5-F : CTGGGCCGGTATTAATTTGT f38a1.5-R : GTCTTCTTCGTCACGCACAT	*wormbase.org*
t20g5.7	Protéine DOD-6 (60 aa)	Inconnu	Reconnaît les bactéries et intervient dans le contrôle de la longévité.	t20g5.7-F : ATGTTCTCCCTCAAGACCGT t20g5.7-R : CGGAAGTGTAAACGACGAAG	
ama-1	Polymérase ARN (1 856 aa)	Noyau	Intervient dans la transcription de l'ADN en ARNm.	ama-1-F : CTGACCCAAAGAACACGGTGA ama-1-R : TCCAATTCGATCCGAAGAAGC	
spp-1	Caenopore, une protéine contenant un domaine saposine (108 aa)	Intestin	Intervient dans la production de protéines lysosomales	spp-1-F : TGAACATCGGAACTCTTTGC spp-1-R : TCAGCTCTTCCTCACACTCG	

2.3. Analyses statistiques

Pour l'étude sur l'impact de la saisonnalité sur l'activité anti-VHS-1 et la cytotoxicité, évaluée sur la matière première hydrosolubilisée (MPHS) et sur les polysaccharides de *S. chordalis* (Cible 1), les résultats sont exprimés en moyennes ± écart-type (n = 4). Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R en utilisant le package « agricolae » de Mendiburu 2016. Des analyses de variances à un facteur ont été réalisées suivis d'un test de Fisher de la plus petite différence (LSD) pour un seuil de significativité fixé à 5 % ($p<0,05$). Ainsi, des échantillons sont significativement différents si la p-valeur calculée par le test est

inférieure à 0,05 ($p<0,05$). De plus, des analyses en composantes principales et une matrice de corrélation entre les facteurs abiotiques, le taux de matière sèche, la composition biochimique de la MPHS, le rendement d'extraction des PSs et les activités biologiques au cours des saisons ont été utilisées pour évaluer les associations entre ces variables. Les packages de « FactoMineR » (Husson *et al.* 2016) et « Corrplot » (Wei 2016) ont aidé à l'analyse des résultats sous le logiciel R. Enfin, le test de Pearson est utilisé. Le coefficient de corrélation de Pearson mesure une corrélation linéaire entre deux variables continues. La p-valeur, représentative du niveau de significativité de la corrélation, est également calculée pour un produit de corrélation entre deux variables au seuil de 5 % ($p<0,05$). Les représentations graphiques ainsi que les valeurs de significativité du test de Pearson ont été obtenues sous R avec les packages Corrplot (Wei 2016) et Hmisc (Miscellaneous 2016). Quand le facteur de corrélation (r) est significatif, la p-valeur est indiquée entre parenthèse.

Quant à l'étude sur l'impact de l'Extraction Assistée par Enzyme sur la cytotoxicité et sur l'activité antivirale des extraits hydrosolubles et de leurs polysaccharides, les analyses mathématiques et statistiques ont été réalisées avec le logiciel Minitab 17. Une analyse de variance à un facteur (ANOVA) a été employée selon le test de Fisher de la plus petite différence significative (LSD, $p < 0,05$). Cette analyse statistique a été utilisée afin d'évaluer les différences entre les rendements d'extraction des EHs et entre les paramètres d'extraction étudiés. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes avec leurs écarts-types.

L'étude sur le modèle de pathogénicité *C. elegans – P. aeruginosa* a été statistiquement traitée avec le logiciel R. Une analyse de variance à un facteur (ANOVA) a été employée selon le test de Fisher de la plus petite différence significative (LSD, $p < 0,05$). Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes avec leurs écarts-types.

3. Résultats et Discussion

Trois études ont été réalisées indépendamment les unes des autres. La cytotoxicité, l'activité anti- herpétique, l'activité immunostimulante et l'activité antibactérienne ont été évaluées sur des extraits hydrosolubles et/ou des composés issus de *S. chordalis*.

La première étude s'est focalisée sur l'impact de la saisonnalité sur la cytotoxicité et sur l'activité anti-VHS-1 de la matière première hydrosolubilisée (**MPHS**) et des polysaccharides (**PS**). Les résultats ont été mis en relation avec ceux trouvés dans le Chapitre II concernant la variation saisonnière de la composition biochimique de *S. chordalis.*

La deuxième étude a consisté à mesurer l'impact de l'Extraction Assistée par Enzymes (EAE) et des paramètres d'extraction (température, ratio E/S et durée de l'extraction) sur ces mêmes activités biologiques évaluées sur les extraits hydrosolubles (**EH**s) et leurs polysaccharides (**PS**). Ces derniers sont tous issus d'une même matière première de *S. chordalis* collectée en octobre 2013. Les résultats ont été interprétés et discutés en prenant en compte ceux obtenus dans le Chapitre III concernant l'optimisation des conditions de l'EAE suivant une méthodologie des surfaces de réponse pour un rendement d'extraction maximal.

La troisième et dernière étude, réalisée au Marine Bio-Products Research Laboratory au Canada, a permis l'évaluation de l'activité immunostimulante et de l'activité antibactérienne de deux extraits hydrosolubles de *S. chordalis,* en utilisant le système de pathogénicité *Caenorhabditis elegans – Pseudomonas aeruginosa*. Parmi ces deux extraits, l'un, nommé **SCEE**, a été obtenu après EAE et l'autre sous l'appellation **SCTN** a été produit dans les mêmes conditions d'extraction, mais sans enzyme. Ainsi, l'effet du procédé d'extraction a aussi été étudié.

La **Figure 4. 28** est un organigramme présentant les démarches scientifiques suivies pour ces trois études. Ces dernières vont être traitées, dans ce manuscrit, dans l'ordre numéroté et mentionné dans l'organigramme.

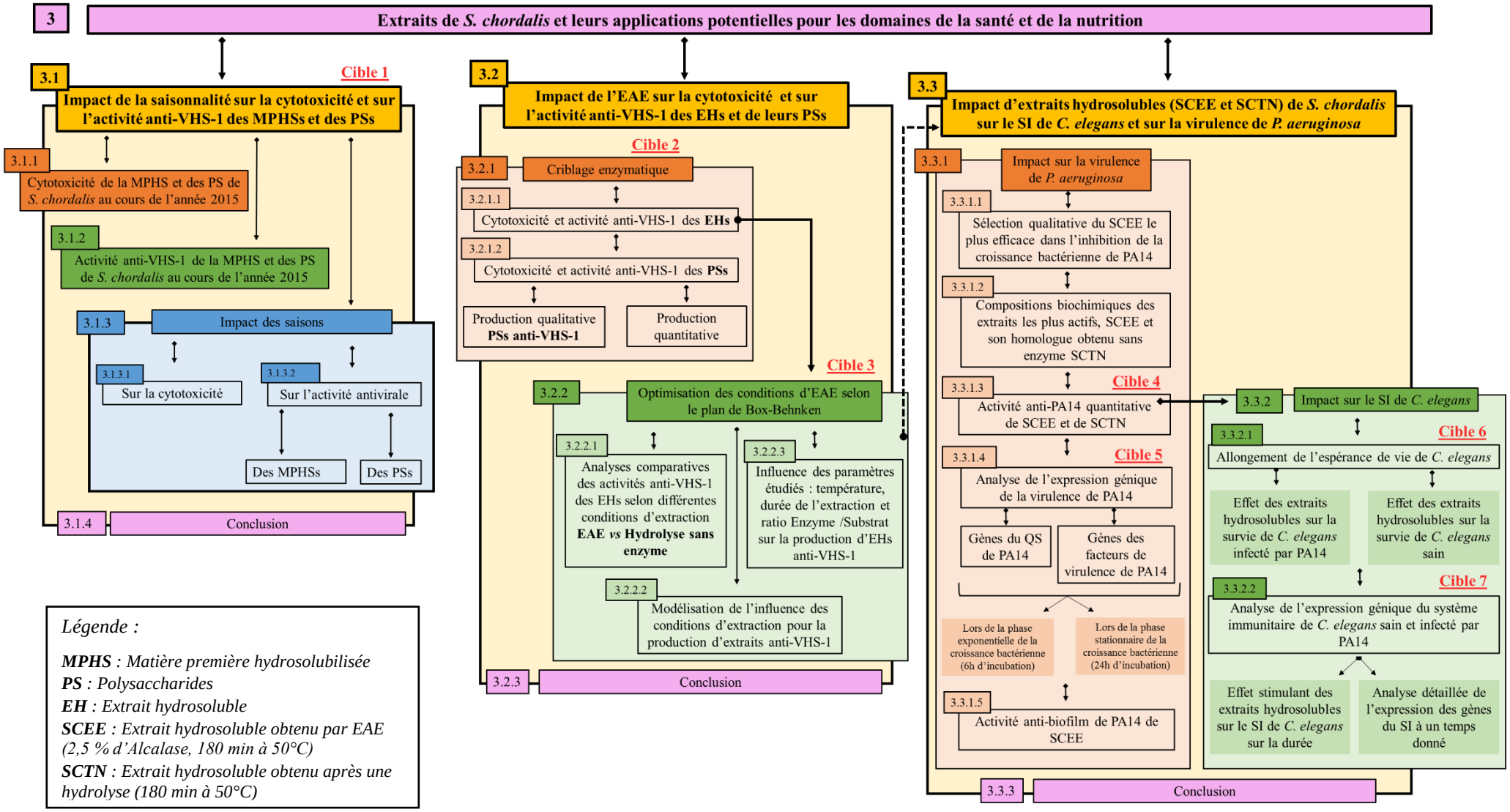


Figure 4. 28 Démarches scientifiques suivies pour les trois études concernant les perspectives d'applications des extraits de *S. chordalis* de la Presqu'île de Rhuys. Les cibles mentionnées dans la partie introductive de ce chapitre sont rappelées sur cet organigramme.

3.1. Impact de la saisonnalité sur la cytotoxicité et sur l'activité anti-VHS-1, évaluée sur la matière première hydrosolubilisée et sur les polysaccharides de S. chordalis (Cible 1)

La cytotoxicité et l'activité antivirale de la matière première hydrosolubilisée (MPHS) et des polysaccharides (PS) isolés de *S. chordalis*, collectée tous les mois durant l'année 2015, sont présentées dans le **Tableau IV. X**.

Tableau IV. X Cytotoxicité et activité antivirale des MPHSs de *S. chordalis* et de ses polysaccharides au cours de l'année 2015.

			Janvier	Février	Mars
Hiver	MPHS	CC_{50}	428,8 ^{de} ± 1,3	> 500 ^{e}	> 500 ^{e}
		CE_{50}	180,9 ^{b} ± 44,9	68,2 ^{a} ± 16,3	64,3 ^{a} ± 2
	PS	CC_{50}	> 200	> 200	> 200
		CE_{50}	1,8 ^{a} ± 0,3	> 200 ^{f}	57,3 ^{d} ± 6,8

			Avril	Mai	Juin
Printemps	MPHS	CC_{50}	330 ^{bc} ± 6,5	> 500 ^{e}	ND
		CE_{50}	> 500 ^{d}	302,0 ^{c} ± 37,5	
	PS	CC_{50}	> 200	> 200	> 200
		CE_{50}	4,5 ^{ab} ± 0,3	2,3 ^{ab} ± 0,2	132,6 ^{e} ± 5,1

			Juillet	Août	Septembre
Été	MPHS	CC_{50}	421,5 ^{de} ± 1,0	356,6 ^{cd} ± 10,5	354,3 ^{cd} ± 1,0
		CE_{50}	456,8 ^{d} ± 44,0	480,9 ^{d} ± 36,9	> 500 ^{d}
	PS	CC_{50}	> 200	> 200	> 200
		CE_{50}	6,3 ^{ab} ± 0,2	10,5 ^{b} ± 0,5	9,6 ^{ab} ± 0,9

			Octobre	Novembre	Décembre
Automne	MPHS	CC_{50}	226,1 ^{a} ± 33,7	241,8 ^{ab} ± 2,6	279,5 ^{abc} ± 21,5
		CE_{50}	227,9 ^{bc} ± 7,9	> 500 ^{d}	> 500 ^{d}
	PS	CC_{50}	> 200	> 200	> 200
		CE_{50}	6,9 ^{ab} ± 0,8	4,0 ^{ab} ± 0,4	19,7 ^{c} ± 1,0

Légende :

ND, donnée Non Disponible.

Pour chaque ligne, les valeurs avec des lettres différentes sont significativement différentes (n=4, p<0,05) selon le test de Fisher LSD. L'ordre des lettres est corrélé avec l'efficacité de l'activité antivirale ou avec la cytotoxicité.

3.1.1. Cytotoxicité de la matière première hydrosolubilisée et des polysaccharides au cours de l'année 2015

Les matières premières hydrosolubilisées (MPHS) et les polysaccharides (PS) extraits de *S. chordalis* ne présentent pas de cytotoxicité pour des concentrations inférieures à 200 µg / mL (**Tableau IV. X**). Néanmoins, il peut être remarqué qu'à partir de juillet jusqu'à décembre, une cytotoxicité dont la CC_{50} est comprise entre 226,1 (octobre) et 421,5 µg / mL (juillet) a été mesurée sur les MPHSs. Quant aux polysaccharides, ils n'ont montré aucune cytotoxicité au cours de l'année 2015 sur la gamme de concentrations évaluées de 1 à 200 µg / mL. Ces données sont en accord avec la littérature (Harden *et al.* 2009; Bouhlal *et al.* 2011; Zainal Ariffin *et al.* 2014).

Deux familles de composés, retrouvées chez les Gigartinales, ont montré des cytotoxicités envers des cellules animales et humaines saines et cancéreuses. Il s'agit des composés terpénoïdes halogénés comme l'halomon issu de *Portiera hornemanii* et des polysaccharides hautement sulfatés et plus particulièrement des fractions de faibles poids moléculaires de carraghénanes dégradés, produites par des extractions en présence d'acides (Fuller *et al.* 1994; Bourgougnon *et al.* 1996; Zubia *et al.* 2009; Bondu *et al.* 2010; Zainal Ariffin *et al.* 2014). Ces deux familles de composés ont été retrouvées chez *S. chordalis* (Bondu *et al.* 2008; Bondu *et al.* 2010). En outre, à cette période de l'année (été-automne), la matière première de *S. chordalis* présente plus de matière minérale (> 31 % de la MS), comparé au reste de l'année, (< 26 % MS) (*Cf.* Chapitre II. Effets de la saisonnalité sur les caractéristiques biochimiques et biologiques de *Solieria chordalis*, **Tableau II. VIII**, page 176). Ainsi, l'intégrité des cellules Vero peut être compromise par un changement d'osmolarité de leur milieu de culture après l'ajout de MPHS de *S. chordalis*.

3.1.2. Activité antivirale évaluée sur la matière première hydrosolubilisée et sur les polysaccharides au cours de l'année 2015

Les extraits hydrosolubles de *S. chordalis* montrent une activité antiherpétique. En effet, seule une étape de solubilisation de la matière première dans de l'eau permet déjà d'obtenir des CE_{50} allant de 64,3 (mars) à 480,9 µg / mL (août). C'est en hiver que l'activité antivirale évaluée sur la matière première hydrosolubilisée est la plus efficace (de 64,3 à 180,9 µg / mL (janvier)) (**Tableau IV. X**).

Afin de rechercher les molécules actives, différentes étapes d'extraction et de purification ont été effectuées, notamment une extraction utilisant l'appareil de Soxhlet pendant 2h suivie d'une hydrolyse à 90 °C et d'une précipitation à l'éthanol. Les polysaccharides (PSs) sont isolés et ont effectivement montré une activité anti-VHS-1 plus élevée avec des CE_{50} comprises entre 1,8 (janvier) et 132,6 µg /mL (juin). Entre l'activité antivirale la plus efficace, mesurée sur les MPHSs (64,3 µg/ mL, mars) et celle mesurée sur les PSs (1,8 µg / mL, janvier), un facteur multiplicatif d'environ 35 est applicable.

Concernant l'activité antivirale évaluée sur les PS, il est difficile de lier la variabilité de l'activité à une saison. En outre, il apparaît des différences significatives pour les mois de mars (57,3 µg / mL), de juin (132,6 µg / mL) et de décembre (19,7 µg / mL).

En comparaison aux données de la littérature, présentées précédemment dans le **Tableau IV. IV** (page 264-266), les activités anti-VHS-1 mesurées sur les polysaccharides de *S. chordalis* sont du même ordre de grandeur que celles trouvées par Bouhlal *et al.* (2011) sur des polysaccharides sulfatés de *Sphaerococcus coronopifolius* (CE_{50} de 4,1 µg/ mL) (Bouhlal *et al.* 2011); par Harden *et al.* (2009) sur des carraghénanes de *Gigartina atropurpurea* (CE_{50} de 2,5 à 3,6 µg / mL) et par Bourgougnon *et al.* (1993) sur des galactanes sulfatés de *Schizymenia dubyi* (CE_{50} de 1,5 à 5 µg/mL). Matsuhiro *et al.* (2005) ont mesuré une activité anti-VHS-1 due aux polysaccharides sulfatés de *Callophyllis variegata* avec une CE_{50} de 0,76 µg/ mL. Cette forte activité s'explique certainement par l'étape de purification par chromatographie stérique qui a permis d'isoler des galactanes sulfatés de masse moléculaire moyenne de 380 kDa (Matsuhiro *et al.* 2005).

3.1.3. Impact des saisons

Les saisons caractérisées par un ensemble de paramètres extérieurs tels que l'ensoleillement, la température ou encore la salinité de l'eau de mer influencent la génétique et donc le phénotype et la physiologie des algues (Hurd *et al.* 2014). Les algues s'adaptent et s'acclimatent en modulant notamment leurs voies métaboliques, qui anabolisent et/ou catabolisent des composés actifs en particulier.

Une Analyse en Composante Principales (ACP) a été appliquée à un tableau croisant des individus correspondant aux mois de l'année 2015 et des variables quantitatives que sont les facteurs environnementaux collectés près de la Presqu'île de Rhuys (*Cf.* Chapitre II. Effets de la saisonnalité sur les caractéristiques biochimiques et biologiques de *Solieria chordalis* **Tableau II. VIII**, page 175*)*, les valeurs de l'activité antivirale et la cytotoxicité évaluées sur les MPHS et sur les PS de *S. chordalis*. L'étude consiste à appréhender les ressemblances entre les échantillons de *S. chordalis* collectés mensuellement en fonction de l'ensemble des paramètres saisonniers, de leur cytotoxicité et de leur activité antivirale. Ainsi, la **Figure 4. 29,** représentant le graphe des variables et celui des individus, est obtenue avec le logiciel R.

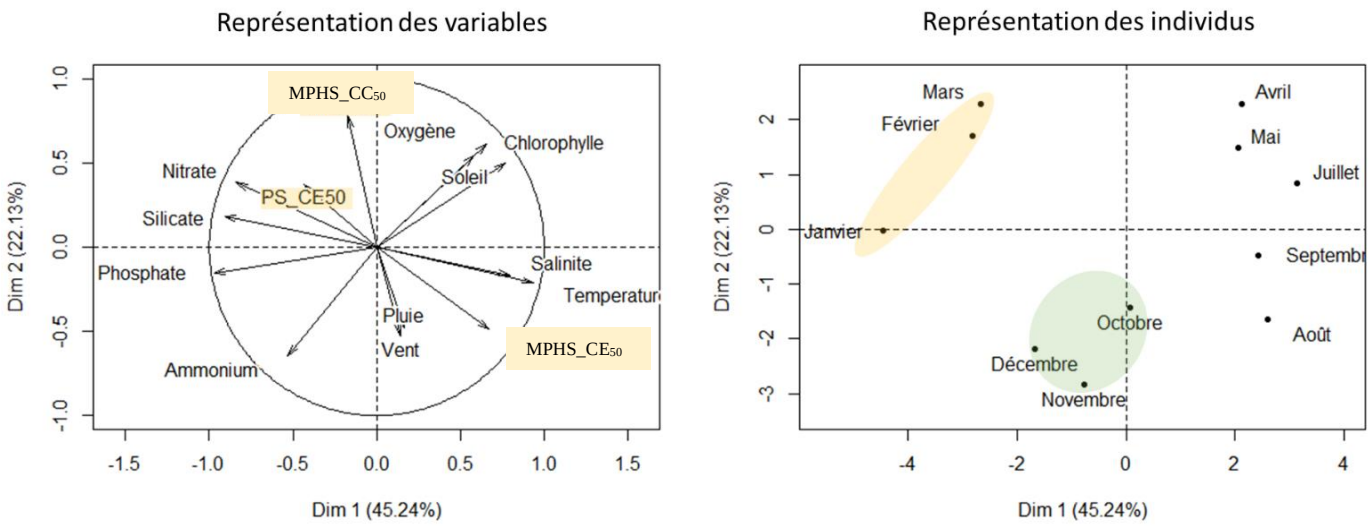


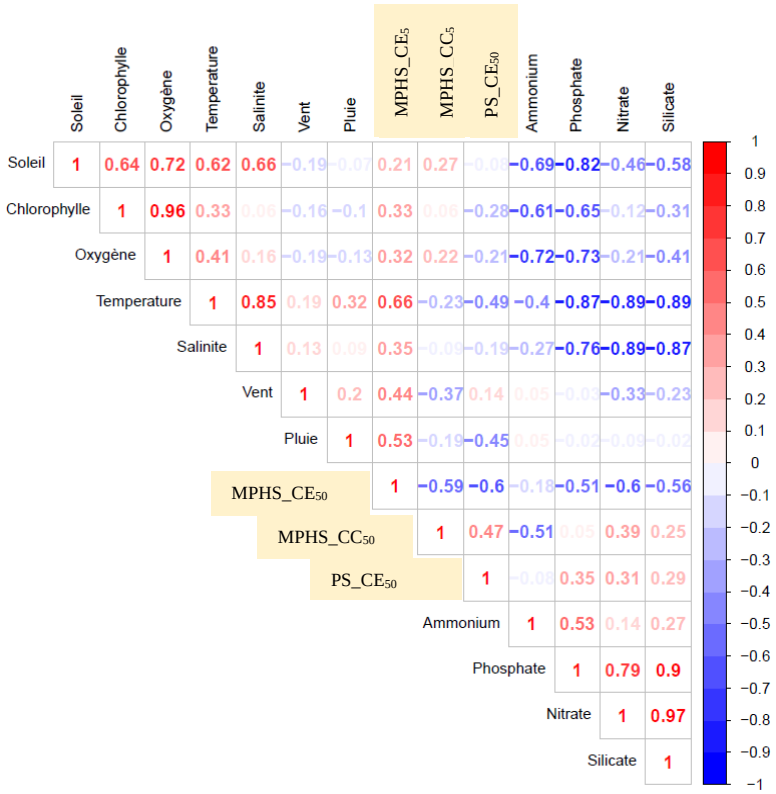
Figure 4. 29 Analyse en Composantes Principales des facteurs environnementaux, de la cytotoxicité des MPHSs et de l'activité antivirale des MPHSs et des PSs de *S. chordalis* collectée mensuellement.

L'ACP utilisée dans cette étude est normée, c'est-à-dire qu'elle centre et réduit les valeurs des variables afin de standardiser, d'harmoniser la variabilité propre à chaque paramètre saisonnier, à la cytotoxicité et à l'activité antivirale. Cette opération est indispensable puisque les variables ne sont pas dans les mêmes unités de mesure, elle revient donc à accorder la même importance à chaque variable (Husson *et al.* 2009). Les dimensions (« Dim » sur les graphes) ou composantes principales (PC) ou encore les axes factoriels correspondent à des variables synthétiques. Elles indiquent les corrélations entre variables et suggèrent le nombre de composantes principales à interpréter, en fonction du pourcentage indiqué. D'après la **Figure 4. 29**, les deux premiers axes de ce premier plan (Dim 1 et Dim 2) expriment 67,37 % de la

variabilité totale entre les individus ou entre les variables. Les 32,63 % d'informations restantes sont représentés par 8 autres axes ayant des pourcentages compris entre 0,02 à 12,19 % (données non fournies).

Les variables les mieux représentées sont visibles grâce à la proximité entre l'extrémité de leur flèche respective et le cercle de rayon 1. Il faut cependant faire attention du fait que plus les valeurs des CC_{50} et des CE_{50} sont grandes, moins les échantillons sont cytotoxiques et moins leur activité antivirale est efficace, respectivement. Les flèches de la CC_{50} de la MPHS et des CE_{50} de la MPHS et des PS doivent être lues à l'opposé pour analyser les résultats montrant une activité antivirale efficace et une cytotoxicité importante. Quant à la représentation des individus, elle montre les mois situés du côté des variables saisonnières et des activités biologiques pour lesquelles ils prennent de fortes valeurs et à l'opposé pour lesquelles ils prennent de petites valeurs.

Pour compléter l'interprétation de la **Figure 4. 29**, les valeurs des coefficients de corrélation entre variables sont données sur la **Figure 4. 30.**



Légende :
Deux variables sont fortement corrélées positivement quand le coefficient de corrélation est égal à 1 (rouge). Quand ce dernier vaut -1, alors les deux variables sont fortement corrélées négativement (bleu).

Figure 4. 30 Matrice des corrélations entre la cytotoxicité, l'activité anti-VHS-1 et les paramètres du milieu de vie des algues en fonction des mois de collecte (package « corrplot » de Wei et Simko, 2016).

3.1.3.1. Influence des saisons sur la cytotoxicité

D'après la représentation des variables de la **Figure 4. 29** et les coefficients de corrélation de la **Figure 4. 30**, la MPHS de *S. chordalis* est toxique envers les cellules Vero quand cette même MPHS ne montre pas d'activité antivirale (coefficient de corrélation r= 0,59, p < 0,1), quand la mer se trouve enrichie en ammonium (r=0,51), quand il pleut (r=0,19), quand il y a du vent (0,37), quand la température de l'eau de mer est encore élevée durant l'été (r=0,23) et dans une moindre mesure quand la salinité est un peu plus élevée (> à 31,2 g/kg, coefficient de corrélation de 0,09).

La représentation des individus (**Figure 4. 29**) met en évidence une disposition remarquable, dépendante des saisons, de la cytotoxicité et de l'activité antivirale des MPHS et des PS. Bien qu'entre le printemps et l'été, la différence entre les échantillons est moins évidente. En interprétant de manière conjointe les deux représentations (des variables et des individus de la **Figure 4. 29**), il est notable que les MPHSs collectées en automne (octobre, novembre et décembre) sont plus cytotoxiques que celles collectées pendant le reste de l'année.

En automne, la saliné oscille autour de 31 g/kg. L'apport de pluie compense l'évaporation due aux températures élevées de l'été et la salinité ne varie alors pas beaucoup. D'après Bondu *et al.* (2008), la période d'ensoleillement et l'intensité lumineuse favorise la synthèse de composés halogénés volatils. À ces données s'ajoute l'ammonium présent dans la mer à cette époque de l'année. L'ammonium provient des excrétions animales et de la décomposition bactérienne des composés organiques azotés (Chifflet *et al.* 2004). Gordillo (2012) écrit qu'une quantité importante d'ammonium est associée à une augmentation du nombre d'espèces d'algues et par conséquent d'herbivores. Ainsi, pour se défendre, l'algue augmenterait sa production de composés actifs comme par exemple les composés halogénés volatils cytotoxiques *(*Kornprobst 2005, Bedoux et Bourgougnon 2015*)*. En outre, le vent participe à la formation des courants marins responsables des mouvements d'eau (Hurd *et al.* 2014). L'algue se trouverait plus souvent en contact avec d'autres organismes marins. Un suivi de la teneur en composés halogénés volatils cytotoxiques au cours de l'année serait intéressant à réaliser pour confirmer l'hypothèse de la production de ces composés à partir de l'automne.

Dans cette étude, les polysaccharides de *S. chordalis* n'ont montré aucune toxicité envers les cellules Vero, alors que Bourgougnon *et al.* (1996) ont montré que les polysaccharides sulfatés essentiellement de type λ (de 5 à 100 µg/mL) de *Schizymenia dubyi* (Rhodophyta, Gigartinales) étaient plus toxiques envers des cellules T du système immunitaire humaines (MT4) durant l'automne, notamment à cause d'un taux de sulfatation maximum *(*Bourgougnon *et al.* 1993*).*

3.1.3.2. Influence des saisons sur l'activité antivirale

L'activité antivirale des MPHSs est plus élevée en hiver (**Figure 4. 29**), alors que celle évaluée sur les PSs n'est pas plus importante à cette période, comparé aux autres saisons. Deux aspects apparaissent alors : l'un concernant la composition biochimique de la MPHS et l'autre la qualité des PS extraits de l'algue, au cours des saisons.

Impacts des facteurs abiotiques saisonniers sur la MPHS

D'après la représentation des variables de la **Figure 4. 29** et les coefficients de corrélation de la **Figure 4. 30**, l'activité anti-herpétique de la MPHS, élevée en hiver, est corrélée positivement avec une baisse de la température ($r=-0,66$, $p < 0,05$) et avec de fortes teneurs en nitrate, phosphate, silicate et en ammonium dans l'eau de mer ($r=0,60$, $p < 0,1$; $r= 0,51$; $r=0,56$, $p < 0,1$ et 0,18, respectivement).

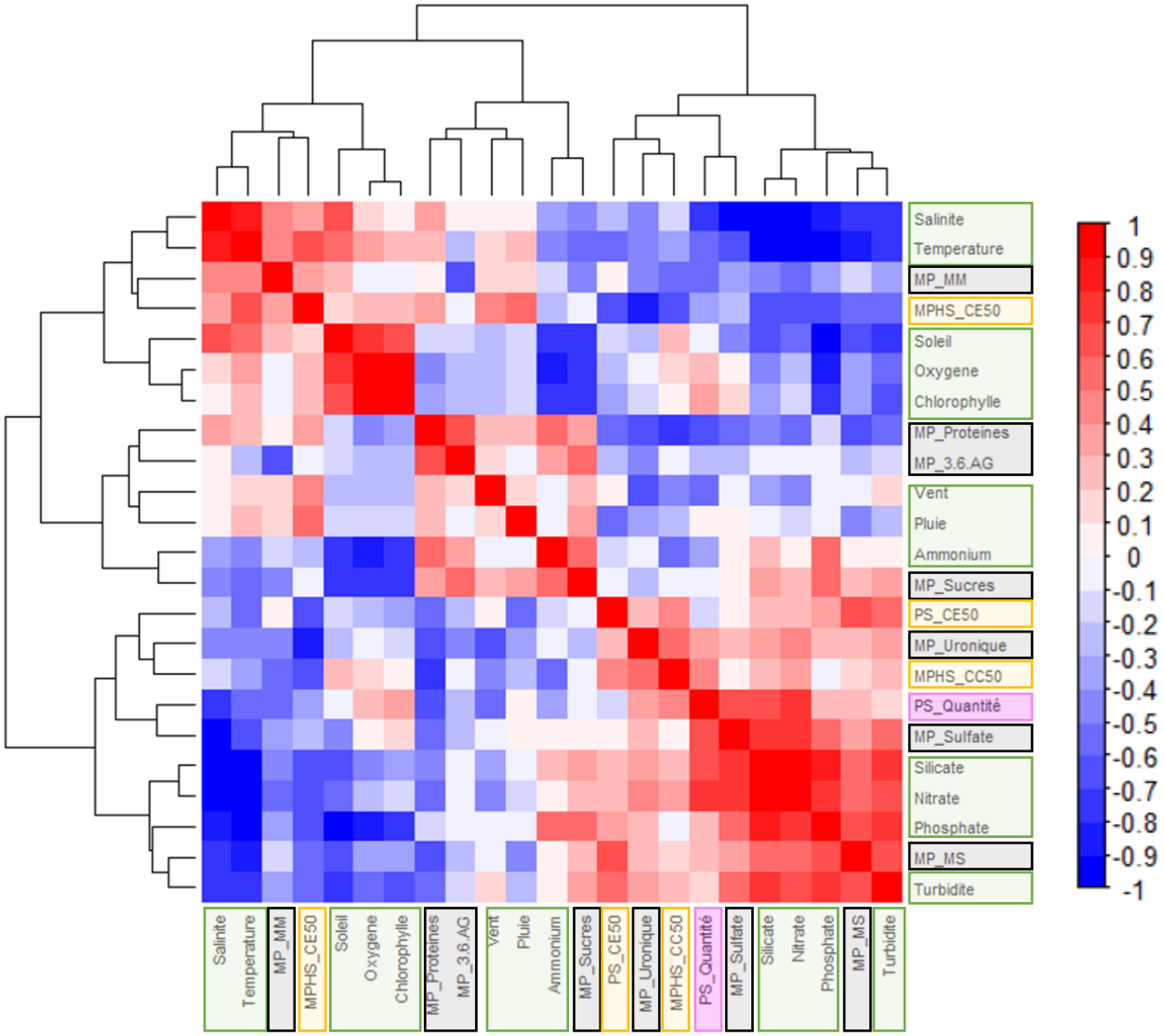
Dans le chapitre II, la matière première a été caractérisée biochimiquement au cours des saisons. Les résultats ont montré qu'en hiver, des proportions plus importantes en galactose, en groupements sulfates et en acides uroniques ont été mesurée contrairement à la teneur en matière minérale, qui est plus faible, comparé aux autres saisons (*Cf.* Chapitre II. Effets de la saisonnalité sur les caractéristiques biochimiques et biologiques de *Solieria chordalis* **Tableau II. VIII**, page 175*)*, En supposant que ces composés soient retrouvés dans les MPHSs, cette activité antivirale pourrait s'expliquer par cette composition biochimique. Durant cette période, les glucides produits par photosynthèse en été et accumulés sous forme de granules d'amidon floridéen jusqu'en automne sont mobilisés et peuvent être convertis en polysaccharides sulfatés pariétaux. L'algue est en période de croissance, il y a donc une synthèse de carraghénanes, qui se révèlent disponibles et actifs après solubilisation de la matière première.

Impacts des facteurs abiotiques saisonniers sur les PS

Bien qu'il n'y ait pas de saison qui se démarque par rapport à une autre en ce qui concerne l'activité anti-herpétique des PSs extraits de *S. chordalis* (**Tableau IV. X,** page 323), il semblerait quand même qu'une activité antivirale plus efficace soit en lien avec des conditions environnementales particulières. En effet, les plus fortes activités anti-VHS-1 des PSs ont été observées pour les algues récoltées pendant les mois durant lesquels la température de l'eau augmente (r=0,49), associée à de fortes pluies (r=0,45) et à une activité photosynthétique et phytoplanctonique modérément élevée (chlorophylle et oxygène, r=0,28 et r=0,21). Dans une moindre mesure, l'activité antivirale des PS peut être renforcée par l'ensoleillement (r=0,08) de même que par la salinité (r=0,19) (**Figure 4. 30**). Ces conditions sont remplies pour la période allant du printemps à l'automne.

De plus, cette activité est renforcée quand la MP présente de fortes proportions en protéines (r=0,51) et en 3,6 anhydrogalactose (r=0,15) potentiellement retrouvés dans la fraction soluble de la MPHS. En effet, des corrélations positives (bleu) sont perceptibles entre l'activité anti-VHS-1 et ces teneurs sur la **Figure 4. 31**.

La **Figure 4. 31** représente la matrice de corrélation entre les paramètres environnementaux saisonniers, la composition biochimique de la matière première (MP) et des PS de *S. chordalis* collectée tous les mois en 2015 et les activités biologiques (cytotoxicité et anti-VHS-1) de la MPHS et des PS.



Légende : Deux variables sont fortement corrélées positivement quand le coefficient de corrélation est égal à 1 (rouge). Quand ce dernier vaut -1 (bleu), alors les deux variables sont fortement corrélées négativement. En vert : les facteurs environnementeaux saisonniers du milieu. En gris : la composition biochimique de la MP. En rose : la quantité des PS extraits de la MP. En jaune : la cytotoxicité et l'activité antivirale évaluées sur la MPHS et sur les PS de S. chordalis.

Figure 4. 31 Matrice des corrélations entre les paramètres saisonniers du milieu, les compositions biochimiques de la MP et des PS, la cytotoxicité de la MPHS et l'activité antivirale de la MPHS et des PS de *S. chordalis* collectée tous les mois de 2015 (sous R avec le package « corrplot » de Wei et Simko, *2016*).

Ce résultat est lié avec ce qui a été démontré dans le chapitre II au sujet de la variation saisonnière des types de polysaccharides présents chez *S. chordalis* (*Cf.* Chapitre II. Effets de la saisonnalité sur les caractéristiques biochimiques et biologiques de *Solieria chordalis*, **Figure 2. 41**, page 170*)*. Les polysaccharides ne sont pas de même structure au cours du temps. De plus, il a été démontré, qu'il existe un cycle au cours des saisons hypothétiquement lié à la biosynthèse des carraghénanes. Ainsi de l'hiver à la fin de l'été, des précurseurs plus sulfatés comme les carraghénanes de type ν ou de type λ sont potentiellement présents (Rhein-Knudsen *et al*. 2015, Bouhlo *et al.* 2016 soumis).

Des études ont été menées sur la variation saisonnière de l'activité antimicrobienne des algues rouges. Cependant, elles incluaient seulement des activités à l'encontre de bactéries, de champignons et de levures (Manilal *et al.* 2009; Kulanthaiyesu Arunkumar et Sivakumar 2012; Osman *et al.* 2012). Finalement, très peu d'études ont traité l'impact des saisons sur l'activité antivirale des Gigartinales. Seuls les travaux de Bourgougnon *et al*. (1996) décrivent la variation annuelle de la composition biochimique et de l'activité anti-VIH-1 des glucuronogalactanes extraits de la Gigartinale *Schizymenia dubyi.* Ces chercheurs ont montré que la formation du syncytium[12] du VIH-1 et la production de la reverse transcriptase associée au virus du SIDA étaient complètement inhibées en présence de 5 µg / mL de glucuronogalactanes extraits d'échantillons collectés pendant les mois d'avril à juillet. Les chercheurs expliquent que cette forte activité anti-VIH est liée à une proportion en L-galactose plus faible que celle en D-galactose, à une viscosité des polysaccharides plus faible et à une faible teneur en groupements sulfate. De plus, d'après ces scientifiques, les acides uroniques n'interfèreraient pas dans l'action contre les virus (Bourgougnon *et al.* 1996). L'activité antivirale pourrait alors être attribuée à des polysaccharides possédant en moyenne 2-3 groupements sulfates par unité disaccharidique. En effet, *S. dubyi* contient essentiellement des λ-carraghénanes (3-4 groupements sulfate par unité disaccharidique), alors que *S. chordalis* comporte essentiellement des ι- voire des carraghénanes plus sulfatés (type ν par exemple , 2-3 groupement(s) sulfate) (Deslandes *et al*. 1985; Deslandes *et al.* 1993; Bourgougnon 1994; Bourgougnon *et al.* 1996; Carlucci *et al*. 1997, Bouhlo *et al.* 2016 *soumis*).

[12] Cellule comprenant plusieurs noyaux.

Dans l'eau de mer, les algues sont continuellement exposées à des microorganismes incluant des virus. Les présences d'ammonium, de nitrate, de phosphate et de silicate en quantités importantes, résultent d'une importante pluviométrie notamment en automne-hiver et d'une consommation importante du plancton par les animaux marins. En effet, ces éléments chimiques sont fournis par les sédiments, par les flux entrants d'eau douce des fleuves et des rivières, et par les déchets biologiques des animaux marins (Gordillo 2012). Ils sont nécessaires pour le bon développement des algues, mais aussi pour produire des métabolites primaires et secondaires notamment grâce à l'enclenchement de voies métaboliques impliquant des enzymes. Les virus nécessitent d'hôtes pour survivre. Du printemps jusqu'en automne, l'augmentation des biomasses marines (plancton et macroalgues par exemple), due entre autre au soleil, à la photosynthèse et à la consommation de nutriments, favorise le risque pour les algues d'être infectées par des virus (Personnic *et al.* 2006). Le renforcement des parois cellulaires, la production et la sécrétion de composés par les algues peuvent alors être utiles et efficaces en tant que stratégies de défense à l'encontre d'autres organismes (Bedoux et Bourgougnon 2015).

3.1.4. Conclusion

Le **Tableau IV. XI** fait le bilan de l'influence des facteurs environnementaux sur les compositions biochimiques de la MP et des PS de *S. chordalis* ainsi que sur la cytotoxicité et l'activité antivirale des MPHS et des PS, en fonction des saisons. Pour conclure, l'étude de l'impact des saisons sur la cytotoxicité et sur l'activité antivirale de la matière première hydrosolubilisée et des polysaccharides de *S. chordalis* met de nouveau en évidence la variabilité en termes de compositions biochimiques associées aux activités biologiques conférées aux algues. Avant d'envisager toute application potentielle, connaître la matière première est une étape essentielle.

Tableau IV. XI Bilan de l'impact des saisons sur l'activité antivirale et la cytotoxicité de la MPHS et des PSs de *S. chordalis.*

		Hiver *(janvier, février, mars)*	**Printemps** *(avril, mai, juin)*	**Été** *(juillet, août, septembre)*	**Automne** *(octobre, novembre, décembre)*
Paramètres saisonniers		Eau de mer froide (< 9,5°C), riche en nitrate, silicate, phosphate et en ammonium. Salinité plus faible (< 30 g/kg).	Eau de mer riche en ammonium et relativement chaude > 12°C Soleil, pluie, vent, oxygène et présence d'organismes chlorophylliens		
MP	*Taux de MS (% MF)*	>15	< 13,5		
	Composition biochimique	Plus de groupements sulfates (> 16 % MS) Moins de matière minérale (< 20 % MS)	Plus de sucres totaux (> 27,9 % MS), mais moins de groupements sulfates (< 13,4 % MS). Plus de protéines et de matière minérale (> 25 % MS) Composés halogénés ?		
MPHS	*Activités biologiques*	Non -cytotoxique *(CC_{50} >425 µg/mL)* **Anti-VHS-1** *(CE_{50} > 60 µg/mL)*	Un peu cytotoxique *(CC_{50} > 330 µg/mL)* Pas Anti-VHS-1 *(CE_{50} > 300 µg/mL)*	Un peu cytotoxique *(CC_{50} > 355 µg/mL)* Pas Anti-VHS-1 *(CE_{50} > 455 µg/mL)*	**Cytotoxique** *(CC_{50} > 280 µg/mL)* Peu Anti-VHS-1 *(CE_{50} > 225 µg/mL)*
PS	*Quantité (% MS)*	> 6,3	<5,6		
	Profil IR	Spectres structuraux IR qui se ressemblent (Carraghénanes hybrides et/ou précurseurs ?)			Spectres structuraux montrant un type particulier de PS (dominance des carraghénanes de type iota)
	Activités biologiques	Non-cytotoxique *(CC_{50} >200 µg/mL)* **Moins anti-VHS-1** *(1,8 >CE_{50} >200 µg/mL)*	Non-cytotoxique *(CC_{50} >200 µg/mL)* **Anti-VHS-1** *(CE_{50} > 2,3 µg/m)L*	Non-cytotoxique *(CC_{50} >200 µg/mL)* **Anti-VHS-1** *(CE_{50} > 6,3 µg/mL)*	Non-cytotoxique *(CC_{50} >200 µg/mL)* **Anti-VHS-1** *(CE_{50} > 4,0 µg/mL)*

En ce qui concerne *S. chordalis,* 3 voies de recherche et de développement voire d'exploitation de l'activité antivirale peuvent être envisagées.

Tout d'abord, les algues collectées en hiver, voire cultivées dans des conditions hivernales, peuvent être utilisées, par exemple, en tant que compléments nutritionnels et fonctionnels pour les animaux. *S. chordalis* ne fait pas partie de la liste des algues alimentaires pour les humains en France. Des exigences sanitaires imposent le contrôle des teneurs en bactéries et en métaux lourds avant la commercialisation. Au sein de l'Union Européenne, seules la France et la Belgique imposent une réglementation sanitaire pour les algues alimentaires (UEB-Idéalg 2016). Cependant, en tant qu'algue, elle fait partie de la liste non exhaustive des matières premières pour aliments des animaux (Deniaud *et al*. 2005). D'après le décret n°2000-778 du 23 août 2000 portant sur « l'application de la loi du 1er août 1905 sur les fraude et falsifications en matière de produits ou de services en ce qui concerne la commercialisation des produits et substances destinés à l'alimentation animale », la matière première de *S. chordalis* obtenue par séchage et broyage peut être dénommée « farines d'algues marines » (Deniaud *et al.* 2005). Bien que le VHS-1 infecte les humains, il peut servir de modèle pour étudier les actions et lutter contre les virus de l'herpès des animaux comme le BoHV-1 ou le SuHV-1, difficiles à isoler (Olicard 2002; Diogo *et al.* 2015). Riche en fibres et une fois hydrosolubilisée, *S. chordalis* peut alors être apportée sous forme de farines afin de préserver le bon transit intestinal et en prévention contre les maladies virales.

Les algues collectées entre le printemps et l'été sont intéressantes d'un point de vue nutritionnel pour les animaux, puisqu'elles sont riches en fibres, mais aussi en protéines et en minéraux (Evans et Critchley 2014). Des étapes d'extraction et de purification des polysaccharides sulfatés sont nécessaires afin d'obtenir une activité antivirale plus efficace que celle évaluée sur les matières premières hydrosolubilisées des algues collectées en hiver. Ainsi, des coûts de production plus importants seraient engendrés dans le cadre d'une possible exploitation de l'algue pour le domaine de la santé animale, voire humaine. Pour un industriel, l'objectif n'est pas forcément d'atteindre un produit pur dont plus de 80 % correspondent aux composés actifs. En effet, la législation et la règlementation ne sont pas les mêmes entre un composé isolé actif et un extrait actif (Décret n°2006-352 du 20 mars 2006 relatif aux compléments alimentaires et article L5138-3 du code de la santé publique). Avant de passer à l'étape de commercialisation d'un composé isolé, les mécanismes d'action doivent être

élucidés, une autre série de tests microbiologiques, de cytotoxicités, de métaux lourds ainsi que des essais sur les animaux et sur les hommes, afin de vérifier et de valider l'activité, seraient nécessaires et facturés. Dans certains cas, il est alors plus avantageux, économiquement, de vendre un extrait moins purifié et un peu moins actif (communication personnelle).

Enfin, en ce qui concerne les algues d'automne, elles sont très intéressantes au regard de leur composition biochimique puisqu'elles sont riches en protéines, en minéraux et en composés actifs. En effet, les extraits hydrosolubles issus de la matière première ont montré une cytotoxicité envers des cellules de mammifères et les PSs isolés de cette MP protègent ces mêmes cellules infectées par le VHS-1. En outre, c'est à cette période qu'elles se trouvent en abondance dans le rideau d'eau et sur les plages, facilitant la collecte en quantité (*Cf.* Chapitre II. Effets de la saisonnalité sur les caractéristiques biochimiques et biologiques de *Solieria chordalis*, **Figure 2. 31**, page 149*)* Des recherches appliquées et approfondies sur l'ensemble des composés actifs responsables de la cytotoxicité de l'algue seraient judicieuses afin d'ajouter de la valeur à *S. chordalis.*

La disponibilité et la qualité de la matière première sont des éléments de base importants pour lancer un usage à valeur ajoutée de *S. chordalis*, de même que l'impact des méthodes d'extraction et de purification. Qu'elles soient éco-responsables, elles sont également à prendre en compte dans les propriétés physico-chimiques et/ou dans les activités biologiques recherchées des extraits produits et/ou des composés isolés.

Un résumé des principaux résultats de l'étude sur l'impact de la saisonnalité sur la cytotoxicité et sur l'activité antivirale de la matière première hydrosolubilisée et des polysaccharides de *S. chordalis* est donné sur la **Figure 4. 32.**

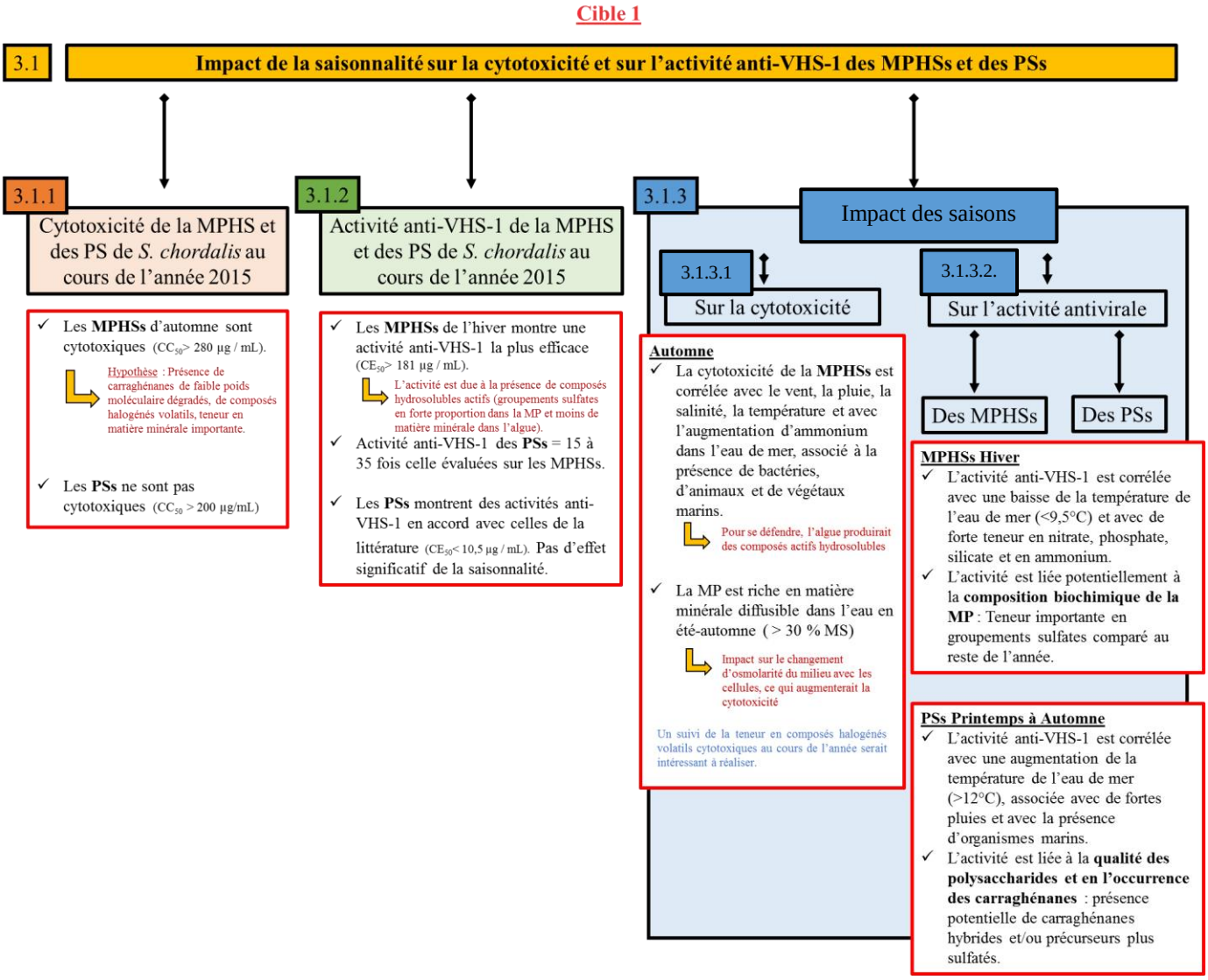


Figure 4. 32 Résumé des principaux résultats de l'étude sur l'impact de la saisonnalité sur la cytotoxicité et sur l'activité antivirale de la matière première hydrosolubilisée (MPHS) et des polysaccharides (PS) de *S. chordalis.*

3.2. Impact de l'EAE sur la cytotoxicité et sur l'activité anti-VHS-1 évaluée sur les extraits hydrosolubles et sur leurs polysaccharides obtenus de **S. chordalis** (Cibles 2 et 3)

L'EAE est une des méthodes d'extraction alternatives, connue comme étant efficace dans l'obtention d'extraits ou de composés actifs issus d'organismes vivants dans un temps réduit et sans nécessiter de solvants organiques polluants (Wijesinghe et Jeon 2012; Grosso *et al.* 2015; Hardouin *et al.* 2016). Due à la nature biochimique des parois cellulaires des algues, les enzymes GRAS (Generally Recognized As Safe), communément utilisées, sont des protéases et des glycosidases. Elles peuvent être en effet employées pour dégrader la paroi cellulaire et par conséquent pour libérer le contenu cellulaire (Grosso *et al.* 2015; Hardouin *et al.* 2016). Les enzymes correspondent le plus souvent à des préparations commerciales de l'industrie alimentaire, produites en quantité par des bactéries ou des champignons (enzymes de fermentation). Ces préparations d'enzymes commerciales peuvent avoir une ou plusieurs activité(s) déclarée(s) par le fournisseur (Hardouin *et al.* 2014). Comme il a été montré dans le chapitre précédent (*Cf.* Chapitre III. Optimisation de l'extraction assistée par enzymes de *S. chordalis*), les extraits obtenus ne présentent ni la même quantité de matière sèche, ni la même composition biochimique. Ainsi, la nature des enzymes employées pourrait avoir un impact sur l'activité antivirale reportée chez les extraits obtenus à partir de *S. chordalis.*

La **Figure 4. 33** montre toutes les valeurs de cytotoxicité et d'activités antivirales, évaluées sur les extraits, obtenus après les extractions assistées par différentes enzymes, détaillées dans le chapitre III *(Cf.* Chapitre III. Optimisation de l'extraction assistée par enzymes de *S. chordalis*) et sur leurs PSs isolés.

MP — *Solieria chordalis, collectée en Octobre 2013*

	Matière sèche (% MP)[a]	Matière minérale (% MS)[b]	Protéines (% MS)[b]	Lipides (% MS)[b]	Acides uroniques (% MS)[b]	Groupement sulfate (% MS)[b]	Sucres neutres (% MS)[b]	3,6-AG (% MS)[b]	CC 50 (µg / mL)	CE 50 (µg / mL)
S. chordalis	10,0 ± 0,6	43,3 ± 3,1	22,0 ± 2,0	3,0 ± 0,01	3,1 ± 0,1	14,7 ± 1,0	31,7 ± 0,7	7,3 ± 0,3	> 500	193,3 ± 12,4

EH

		TN	AMG	TER	SHE	ULT	VIN	ALC	NEU	FLA
Rendement d'extraction *(% MF)*		[c] 41,3 ± 3,9	[b] 50,1 ± 2,6	[b] 49,6 ± 3,2	[bc] 46,1 ± 6,4	[c] 42,7 ± 1,7	[c] 41,6 ± 3,8	[a] 55,8 ± 0,8	[bc] 47,1 ± 1,4	[c] 43,0 ± 1,8
Composition biochimique *(% MS)*	*Sucres neutres*	[g] 12,8 ± 0,1	[d] 22,8 ± 0,9	[cd] 24,1 ± 1,3	[e] 19,9 ± 0,8	[h] 9,1 ± 1,5	[a] 33,3 ± 0,8	[b] 27,5 ± 0,3	[f] 17,6 ± 0,8	[c] 25,4 ± 1,2
	Groupements sulfate	[f] 1,6 ± 0,4	[ab] 3,7 ± 0,2	[cd] 2,7 ± 0,3	[b] 3,4 ± 0,3	[de] 2,3 ± 0,3	[b] 3,3 ± 0,1	[bc] 3,2 ± 0,1	[ef] 1,9 ± 0,2	[a] 4,2 ± 0,5
	Acides uroniques	[b] 1,1 ± 0,1	[c] 0,6 ± 0,1	[b] 1,0 ± 0,1	[d] 0,2 ± 0,1	[b] 1,1 ± 0,1	[d] 0,2 ± 0,1	[d] 0,3 ± 0,2	[a] 1,3 ± 0,1	[c] 0,5 ± 0,1
	3,6-AG	[e] 0,9 ± 0,2	[bc] 2,2 ± 0,2	[a] 3,6 ± 0,2	[c] 1,9 ± 0,1	[de] 1,2 ± 0,2	[a] 3,5 ± 0,5	[a] 3,8 ± 0,2	[d] 1,5 ± 0,01	[b] 2,5 ± 0,1
	Protéines	[d] 4,5 ± 0,1	[abc] 8,4 ± 0,6	[abc] 7,8 ± 0,8	[c] 7,1 ± 0,1	[d] 5,3 ± 0,2	[ab] 8,5 ± 0,7	[a] 8,9 ± 2	[a] 8,8 ± 0,4	[bc] 7,3 ± 0,3
	Matière minérale	[a] 70,9 ± 1,0	[b] 64,2 ± 0,4	[d] 55,0 ± 0,9	[b] 64,0 ± 4,4	[b] 64,0 ± 4,6	[bcd] 58,9 ± 2,4	[cd] 56,5 ± 1,6	[bc] 61,2 ± 6,6	[b] 63,9 ± 0,5
	Autres	[b] 8,2 ± 0,3	[e] 0	[bc] 5,8 ± 0,6	[d] 3,5 ± 1,0	[a] 17 ± 1,2	[e] 0	[e] 0	[bc] 7,7 ± 1,4	[e] 0
Activités biologiques *(µg / mL)*	CC 50	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
	CE 50	[d] 170,7 ± 11,9	[a] 98,6 ± 7,1	[ab] 109,8 ± 12,1	[ab] 113,7 ± 19,1	[cd] 136,2 ± 46,3	[ab] 110 ± 6,5	[a] 86 ± 9,1	[cd] 145,9 ± 12,2	[a] 96,7 ± 4,7

PS

OCT 13			TN	AMG	TER	SHE	ULT	VIN	ALC	NEU	FLA
[f] 3,1 ± 0,4	**Rendement d'extraction** *(% MS)*		[ab] 16,2 ± 2,5	[ab] 16,3 ± 0,3	[d] 12,3 ± 1,3	[a] 17,5 ± 0,7	[cd] 13,2 ± 0,5	[bc] 14,5 ± 0,9	[cd] 12,6 ± 0,6	[e] 10,2 ± 0,8	[cd] 12,9 ± 1,2
[g] 27,9 ± 0,9	**Composition biochimique** *(% MS)*	*Sucres neutres*	[d] 33,4 ± 1,0	h21,6 ± 0,1	[e] 32 ± 0,6	[a] 43,9 ± 1,1	[c] 36,3 ± 1,4	[a] 44,9 ± 1,0	[f] 30,5 ± 0,1	[b] 41,4 ± 0,2	[a] 43,7 ± 0,5
[e] 7,9 ± 0,3		*3,6-AG*	[e] 8,2 ± 0,2	[b] 14,7 ± 0,3	[e] 8,9 ± 0,3	[d] 9,8 ± 0,6	[c] 11,8 ± 0,3	[d] 10,1 ± 0,2	[c] 12,3 ± 0,4	[e] 8,5 ± 0,3	[a] 15,8 ± 0,9
[b] 11,6 ± 0,2		*Protéines*	[b] 9,0 ± 4,0	[a] 21,3 ± 6,2	[b] 10,3 ± 4,8	[b] 12,2 ± 4,6	[ab] 13,9 ± 5,6	[ab] 13,6 ± 7,9	[b] 12,4 ± 2,5	[b] 8,1 ± 2,2	[b] 12,3 ± 4,5
[a] 49,5 ± 0,5		*Autres*	[a] 49,4 ± 1,7	[b] 42,4 ± 2,2	[a] 48,8 ± 1,9	[d] 34,1 ± 2,1	[c] 38,0 ± 2,4	[de] 31,4 ± 3,0	[b] 44,8 ± 1,0	[a] 42,0 ± 0,9	[e] 28,2 ± 2,0
>200	**Activités biologiques** *(µg / mL)*	CC 50	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
[i] 14,6 ± 1,1		CE 50	[d] 3,6 ± 0,2	[g] 6,6 ± 0,2	[a] 1,3 ± 0,4	[b] 9,1 ± 0,1	[b] 2,6 ± 0,1	[e] 4,1 ± 0,2	[d] 3,5 ± 0,1	[c] 3,1 ± 0,2	[f] 4,6 ± 0,1

Hydrolyse
EAE
Soxhlet, extraction aqueuse à 80°C et précipitation à l'alcool

MP Matière Première
EH Extrait Hydrosoluble
PS Polysaccharides

L'acyclovir n'a pas montré de cytotoxicité envers les cellules Vero et a une activité anti-VHS-1 avec une CE_{50} de 0,5 ± 0,4 µg/mL.
Pour chaque ligne, les valeurs avec des lettres différentes sont significativement différentes (n=8, p<0,05) selon le test de Fisher LSD (logiciel R, package agricolae de de Mendiburu 2016). L'ordre des lettres est corrélé avec la teneur des composés ou avec l'efficacité de l'activité antivirale ou avec la cytotoxicité.

Figure 4. 33 Impact de l'extraction assistée par différentes enzymes sur l'activité antivirale.

3.2.1. Criblage enzymatique (Cible 2)

*3.2.1.1. Cytotoxicité et activité anti-*VHS-1 *des extraits hydrosolubles*

Après les 3 jours d'infection virale, des altérations au niveau de la morphologie des cellules Vero ont été observées au microscope inversé. Ces altérations étaient de moindre ampleur sur les cellules en contact avec des échantillons de *S. chordalis.* De plus, aucun effet cytotoxique n'a été détecté pour des concentrations inférieures à 200 µg / mL (**Figure 4. 33**). Concernant les extraits hydrosolubles (EH) obtenus directement après l'action de différentes enzymes, la plus faible CE_{50}, qui représente l'activité antivirale la plus efficace, a été obtenue par l'EH après l'action de la protéase Alcalase (ALC, 86,0 µg / mL), suivis par les EHs obtenus avec la protéase Flavourzyme (FLA, 96,7 µg / mL) et avec les glycosidases AMG (98,6 µg /mL), Termamyl (TER, 109,8 µg / mL), VinoTaste (VIN, 110,0 µg / mL) et Shearzyme (SHE, 113,7 µg / mL). Les extractions assistées par la protéase Neutrase et par la glycosidase Ultraflo ont été les moins efficaces dans l'obtention d'extraits anti-VHS-1. Elles n'ont pas permis d'obtenir des résultats significativement différents que ceux obtenus avec le témoin négatif qui consiste en une hydrolyse effectuée dans les mêmes conditions, mais sans apport d'enzymes (TN, 170,7 µg/mL). Les activités antivirales dernièrement mentionnées sont similaires à celle évaluée sur la MPHS (193,3 µg /mL). Ces résultats sont conformes à ceux décrits dans la littérature et qui sont présentés dans le **Tableau IV. IV** (pages 264-266) de la partie introductive de ce chapitre (Jeon *et al.* 2011; Wijesinghe et Jeon 2012; Hardouin *et al.* 2013; Kulshreshtha *et al.* 2015).

Comme il a été vu dans la partie introductive, les polysaccharides sulfatés tels que les carraghénanes sont connus comme étant des composés antiviraux. Les résultats de la **Figure 4. 33** confirment cette affirmation. Des corrélations positives entre les teneurs en sucres totaux, en groupements sulfates et l'activité antivirale sont perceptibles. Les extraits hydrosolubles obtenus après les actions d'Alcalase, de Flavourzyme, d'AMG, de Termamyl, de Shearzyme et de VinoTaste inhibent l'activité pathogène du VHS-1 sans différence significative dans leur CE_{50} (86,0 à 113,7 µg/mL). Ces extraits contiennent plus de 25 % de polysaccharides sulfatés (en faisant la somme des valeurs des teneurs en sucres totaux, acides uroniques, groupements sulfate et en 3,6 AG en % de la MS de l'extrait EH), contrairement au témoin négatif et aux extraits obtenus avec Neutrase et Ultraflo. Kulshreshtha *et al.* (2015) ont montré qu'un extrait de *Chondrus crispus,* obtenu après l'action d'une protéase, était anti-VHS-1 avec une CE_{50} de

77,6 µg / mL et Hardouin *et al*. (2013) ont trouvé des CE_{50} entre 23 et 101,1 µg / mL contre le même virus après une application d'un extrait hydrosoluble de *S. chordalis* collectée en mars. Néanmoins, toutes ces activités antivirales mentionnées d'extraits de Gigartinales sont moins efficaces que la molécule de référence, l'acyclovir (CE_{50} de 0,5 µg / ml). L'activité anti-VHS-1 est augmentée en isolant les polysaccharides sulfatés hydrosolubles (Bouhlal *et al. 2011)*.

Ces résultats ont été publiés dans la revue internationale Enzyme Engineering en juillet 2016 (Burlot *et al*. 2016).

*3.2.1.2.Cytotoxicité et activité anti-*VHS-1 *des polysaccharides*

Production qualitative anti-*VHS-1 *des polysaccharides

Tout d'abord, concernant la cytotoxicité, les résultats de la **Figure 4. 33** confirment une fois de plus que les PS hydrosolubles ne sont pas toxiques envers des cellules de mammifères.

En isolant les polysaccharides sulfatés, l'activité anti-VHS-1 augmente avec ou sans étape d'extraction, quelles que soient les conditions. Néanmoins, le facteur multiplicatif de cette augmentation est plus important quand une EAE est réalisée au préalable. En effet, sans EAE, l'activité antivirale des PS isolés de la MP (CE_{50} = 14,6 µg / mL) est 13 fois plus efficace que celle de la MP hydrosolubilisée (CE_{50} = 193,3 µg / mL). Tandis que celles des PS isolés des extraits hydrosolubles après EAE sont, au minimum, 21 fois plus efficaces et peuvent même être plus de 100 fois plus efficace dans l'inhibition de l'activité pathogène du virus. Les meilleures activités ont été trouvées sur les PS isolés des extraits obtenus après l'action de l'α-amylase Termamyl (1,3 µg / mL) suivis par ceux isolés des extraits produits après les actions de l'endo-β- 1,3- ou 1,4-glucanase Ultraflo (2,6 µg / mL) et de l'endoprotéase neutre Neutrase (3,1 µg / mL). Les PSs du témoin négatif se trouvent en 4ème position concernant l'activité anti-VHS-1 (CE_{50} de 3,6 µg : mL). Ainsi, les PS actifs ne proviennent pas forcément des extraits hydrosolubles les plus actifs, excepté l'extrait et les PS obtenus après l'action de la Termamyl. Ces PS isolés, révélés actifs, se différencient des autres par leur plus faible quantité dans les extraits et par leur composition biochimique. En effet, les PS actifs sont constitués d'un peu moins de sucres, de moins de 3,6 AG et ont autant de traces de protéines que les PS moins

efficace vis-à-vis du VHS-1. Il est ainsi fort probable que les groupements sulfates soient plus abondants dans la catégorie « Autres ».

L'application des enzymes pour convertir la matière première en extraits puis en composés actifs isolés est finalement très peu développée chez les algues rouges, alors que des études concernant cette biotechnologie éco-responsable existent sur les alginates et les fucanes sulfatés anticoagulants des algues brunes ou sur des polymères glucidiques comme l'amidon ou la pectine des plantes (de Ruiter et Rudolph 1997; Berteau et Mulloy 2003; Athukorala et al. 2006; Kusaykin *et al.* 2008; Wijesinghe *et al.* 2011; Wijesinghe et Jeon 201; Hardouin *et al.* 2014). D'après la revue d'Hardouin *et al.* (2014), aucune étude n'a mesuré l'impact de l'EAE sur la quantité et sur la qualité des polysaccharides antiviraux d'algues rouges jusqu'à aujourd'hui. Les seules études disponibles mettent en évidence des activités biologiques notamment contre le virus de l'herpès mesurées sur des extraits hydrosolubles obtenus après EAE. Les études d'Hardouin *et al.* (2013) de Kuslshreshtha *et al.* (2015) peuvent être citées en exemple. Wang *et al.* (2010) ont mesuré l'impact de différentes enzymes sur l'extraction des ingrédients antioxydants de l'algue rouge *Palmaria palmata*. Curieusement, ce sont les mêmes enzymes qui sont responsables de la production enrichie en composés glucidiques actifs. D'après leurs travaux, les extraits hydrosolubles obtenus avec Termamyl, Ultraflo et Neutrase ont montré d'importantes activités biologiques comparé à l'EH produit après l'action d'AMG (Wang *et al.* 2010). D'après ces résultats et ceux obtenus dans l'étude présentée dans ce manuscrit, ces enzymes auraient la capacité de lyser les parois et les constituants cellulaires pour en libérer des polysaccharides actifs.

Termamyl est une α-amylase produite par la bactérie *Bacillus licheniformis.* Comme il a été vu dans le chapitre III, cette enzyme permet aussi d'accéder à une forte proportion de composés hydrosolubles *(Cf.* Chapitre III Optimisation des conditions de l'extraction assistée par enzymes en suivant une méthodologie des surfaces de réponse, page 210*).* L'hydrolyse mécanique ainsi que celle de l'amidon floridéen présentant des liaisons α-1,4 glucane favoriseraient la libération de composés actifs. De plus, il a été démontré que la préparation commerciale enzymatique Termamyl possédait aussi une activité protéolytique dégradant la paroi cellulaire. Cela a été observée chez une microalgue (Imam et Snell 1987; Choi *et al.* 2010). À quoi s'ajoutent le pic d'activité hydrolytique de Termamyl qui est situé aux alentours des 60°C et le fait que l'enzyme reste stable et active jusqu'à 90 °C (Synowiecki 2007; Wang

et al. 2010; Grosso *et al.* 2015). Il se pourrait alors que pendant les 180 min d'extraction à 50°C, l'activité hydrolytique de Termamyl ait un impact sur la dégradation de la paroi cellulaire et sur la libération des composants de l'algue et notamment de protéines (**Figure 4. 33**). De plus, durant les 15 min de « dénaturation » à 85 °C, l'activité de la Termamyl serait importante de même que pendant l'extraction des polysaccharides. L'amidon floridéen et l'hémicellulose des parois cellulaire sont lysés ainsi pendant plus de 6h, ce qui favorise l'extraction de composés actifs. L'extrait en présence de Termamyl est stable une fois sec, puisque toutes les enzymes utilisées sont des hydrolases et nécessitent donc de l'eau pour être actives. De plus, il faut atteindre les 60-90 °C pour que l'enzyme « non dénaturée » soit très active dans le cas d'une potentielle application.

En outre, l'effet du sel et/ou de la matière minérale sur l'activité anti-VHS-1 peut être exclu, car l'activité antivirale mesurée sur l'EH du témoin négatif est plus faible que celles évaluée sur les EHs après EAE. Pourtant, l'EH du TN est l'extrait possédant le plus de matière minérale.

Production quantitative des polysaccharides

Le rendement en PSs isolés directement de la MP de *S. chordalis* collectée en Octobre 2013 (3,1 % de la MS) est très faible par rapport à celui mentionné dans la littérature. Ce résultat a déjà été noté dans le deuxième chapitre de ce manuscrit. Cependant, grâce au témoin négatif, la comparaison est possible et l'impact des enzymes sur l'activité anti-VHS-1 a pu être jugé. Blanco-Pascual *et al.* (2014) ont obtenu un rendement de carraghénanes de 28,7 % de la MS, provenant de la Gigartinale *Mastocarpus stellatus*. Ils ont procédé en commençant par une EAE avec 5 % d'alcalase, pendant 3h à 50°C et à un pH de 8. Ensuite, ils ont effectué deux extractions à la suite de carraghénanes, similaires à celle utilisée dans cette étude (2h à 4°C et précipitation à l'éthanol 1:3) (Blanco-Pascual *et al.* 2014). Rhein-Knudsen *et al.* (2015) écrivent que les travaux de Blanco-Pascal *et al*. (2014) seraient un exemple de la sélectivité des enzymes. La protéase Alcalase permettrait d'extraire des carraghénanes hybrides cibles, en l'occurrence des κ/ι- carraghénanes hybrides chez *M. stellatus.* Ainsi, l'efficacité de l'extraction en termes de rendement serait aussi influencée par les types de carraghénanes présents dans l'algue. D'après la **Figure 4. 33**, avec le traitement à l'Alcalase dans les mêmes conditions que Blanco-Pascual

et al. (2014), environ deux fois moins de PS ont été obtenus (12,6 % de la MS). Plusieurs raisons peuvent expliquer cette différence. Par exemple, la nature des carraghénanes de *S. chordalis* collectée en octobre (en grande partie des ι-carraghénanes) ou encore la stabilité des extraits lyophilisés et stockés (Hardouin *et al.* 2014). Le stockage des algues peut avoir un impact sur l'efficacité de l'extraction comme l'ont montré Romero *et al* (2008) notamment sur l'extraction des agars de *Gracilaria eucheumatoides*.

La nature de l'enzyme est un élément important à prendre en considération dans la production de composés actifs de même que les pré- et post-traitements ainsi que les conditions d'extraction, qui dépendent de la température, des proportions d'enzymes sur le substrat, du pH, de la durée ou encore du type de solvant (eau ou solvant approprié) (Grosso *et al.* 2015).

3.2.2. Optimisation des conditions d'EAE selon le plan de Box-Behnken (Cible 3)

Des extractions assistées par la protéase commerciale Alcalase ont été réalisées dans des conditions contrôlées en faisant varier trois paramètres que sont la température, la durée d'extraction et le ratio enzyme sur substrat selon un plan expérimental du Box-Behnken. La cytotoxicité et l'activité antivirale de tous les extraits produits ont été évaluées afin de les comparer et afin de sélectionner les meilleures conditions d'extraction. Le **Tableau IV. XII** illustre les résultats regroupant les conditions d'extraction, le rendement d'extraction, la CC_{50}, la CE_{50} et la désirabilité. Dans un premier temps, seules la CC_{50} et la CE_{50} en fonction des conditions d'extractions assistées par la protéase Alcalase sont décrites et discutées. Quant au rendement d'extraction et à la désirabilité, ils seront pris en compte dans la discussion après avoir analysé l'impact des conditions d'extraction sur les activités biologiques.

Aucune toxicité n'a été observée sur les cellules Vero. La meilleure activité antivirale (38,7 µg / mL) a été mesurée sur un extrait produit avec 5 % d'Alcalase, à 50 °C et pendant 270 minutes. Cependant, elle n'est pas significativement plus efficace que la majorité des extraits produits. Les extraits produits avec 7,5 % d'enzymes, au-delà de 37,5 °C et pendant moins de 180 minutes sont les moins actifs (CE_{50} allant de 105,7 à 178,4 µg / mL). La valeur de la CE_{50} mesurée lors du criblage enzymatique (86,0 µg / mL) fait partie des bonnes activés anti-VHS-1 retrouvées lors de l'application du plan expérimental en vue d'optimiser les conditions d'extraction.

Tableau IV. XII Rendement d'extraction et activité anti-VHS-1 de *S. chordalis* selon différentes conditions d'extractions assistées par la protéase Alcalase.

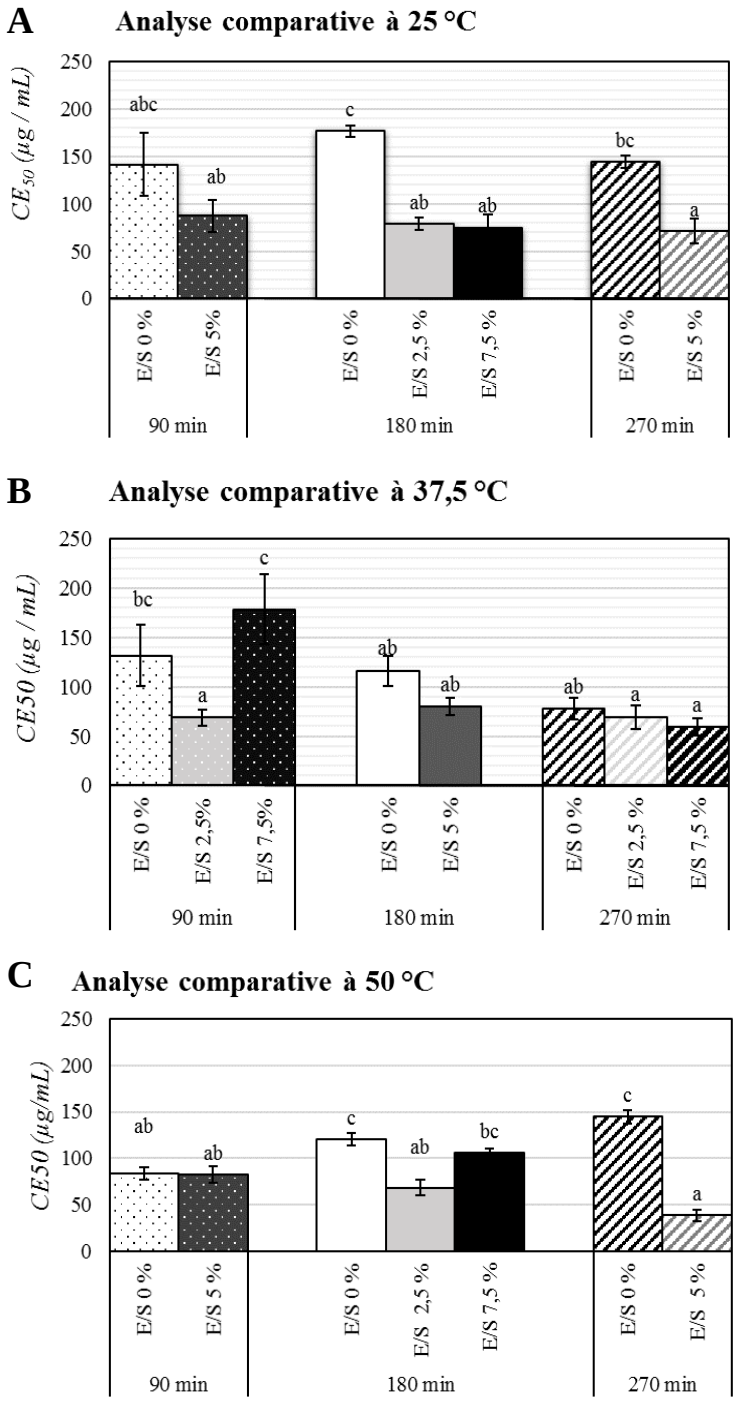
Conditions d'extraction			Réponses obtenues			Désirabilité *(%)*
Temps d'extraction *(min)*	Température *(°C)*	E/S *(% MS/MS)*	Rendement d'extraction *(% MS de l'algue)*	CC_{50} *(µg / mL)*	CE_{50} *(µg /mL)*	
180	25,0	2,5	^{bc} 53,9 ± 1,9		^{ab} 78,7 ± 6,6	78,2
270	37,5	2,5	^{cde} 51,7 ± 2,5		^{ab} 69,6 ± 11,9	66,6
180	50,0	2,5	^{ab} 57,5 ± 2,1		^{ab} 68,6 ± 8,7	83,4
90	37,5	2,5	^{f} 35,6 ± 4,0		^{ab} 68,7 ± 8,0	46,3
90	25,0	5,0	^{e} 46,1 ± 6,8		^{ab} 87,4 ± 16,6	39,4
270	25,0	5,0	^{cde} 49,6 ± 1,6		^{ab} 71,3 ± 13,2	75,4
90	50,0	5,0	^{de} 48,4 ± 2,9	> 500	^{ab} 82,7 ± 8,6	58,3
270	50,0	5,0	^{de} 48,0 ± 2,8		^{a} 38,7 ± 6,0	83,0
180	25,0	7,5	^{bc} 54,0 ± 1,4		^{ab} 75,0 ± 13,8	69,0
270	37,5	7,5	^{ab} 56,5 ± 2,5		^{ab} 59,3 ± 8,7	75,7
180	50,0	7,5	^{a} 59,4 ± 1,6		^{b} 105,7 ± 4,4	84,1
90	37,5	7,5	^{f} 40,4 ± 1,7		^{c} 178,4 ± 35,7	27,4
180	37,5	5,0	^{bcd} 52,4 ± 3,0		^{ab} 80,2 ± 8,4	71,5

Les valeurs correspondent à des moyennes ± écart-type (avec n = 9 pour le rendement d'extraction et n = 8 pour la CC_{50} et la CE_{50}.).

Les valeurs avec des lettres différentes sont significativement différentes (p <0,05) selon le test de Fisher LSD. Chaque colonne est analysée indépendamment l'une de l'autre. L'ordre des lettres est corrélé avec le rendement d'extraction ou avec l'efficacité de l'activité antivirale.

3.2.2.1.Efficacité de l'EAE comparée à des hydrolyses sans enzyme dans la production d'extraits anti-VHS-1

En parallèle des EAEs, des hydrolyses ont été réalisées dans les mêmes conditions sans ajouter d'enzymes. Aucune toxicité n'a été observée sur les cellules Vero en contact avec les extraits aqueux produits sans l'action d'enzymes (Données non montrées). Les activités antivirales de ces extraits sont comparées avec celles des extraits obtenus après EAE et sont illustrées sur la **Figure 4. 34**. L'action de la protéase Alcalase favorise l'extraction de composés actifs, avec des résultats évidents pour les extractions réalisées à 25°C.



Pour chaque graphique, les barres représentant les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (n=8, p<0,05) selon le test de Fisher LSD (logiciel R, package agricolae de de Mendiburu 2016). L'ordre des lettres est corrélé avec l'efficacité de l'activité antivirale.

Figure 4. 34 Activité antivirale des extraits de *S. chordalis* obtenus après EAE et après hydrolyse sans apport d'enzyme selon des températures, des temps et des quantités d'enzymes différentes. Le rapport E / S est représenté par les barres ; ces dernières sont regroupées selon le temps d'extraction. Pour chaque graphique, une température d'extraction est fixée à 25 °C (**A**) ; à 37,5 °C (**B**) et à 50 °C (**C**).

Au-delà des 180 min, l'activité anti-VHS-1 des extraits obtenus après EAE est significativement plus importante, de plus de 50 %. À 37,5 °C, l'avantage des enzymes est moins perceptible, hormis l'extraction réalisée pendant 90 min avec 2,5 % d'enzymes. Un effet « enzyme » est également constaté à 50 °C au-delà de 180 min avec entre 2,5 à 5 % d'enzymes. Néanmoins, à cette température, les activités anti-VHS-1 des extraits sans action d'enzymes sont autant opérantes que celles des extraits enzymatiques produits à 25 et à 37,5 °C. En effet, en augmentant la température, le coefficient de diffusion des polysaccharides sulfatés augmente aussi. Leur solubilité dans l'eau et donc leur accessibilité sont alors amplifiées, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de l'activité antivirale (Pereira-Pacheco *et al*. 2007; Bono *et al.* 2014; Ye *et al.* 2015; Moreira *et al.* 2016).

D'une part**,** l'emploi d'enzymes pour produire des extraits antiviraux est nécessaire pour des extractions réalisées à basse température (25 °C). Dumay *et al.* (2013) ont montré qu'une xylanase était plus productive dans la libération de composés actifs, en l'occurrence de la R-phycoérythrine de l'algue rouge *Palmaria palmata,* qu'un contrôle sans enzyme à 40°C puis à 25 °C. D'autre part, à températures plus élevées (50°C), les enzymes sont bénéfiques sur l'extraction de molécules actives pour des extractions longues, à partir de 180 min.

3.2.2.2. Modélisation de l'influence des conditions d'extraction pour la production d'extraits actifs

D'après les résultats du **Tableau IV. XII** (page 345), une analyse de régression multiple a été réalisée en utilisant le logiciel Minitab 17. De cette analyse, afin d'anticiper l'activité antivirale (CE_{50} en µg /mL) en prenant en compte la température (T en °C), le temps d'extraction (t en min) et le ratio enzyme sur substrat (E/S en %), l'équation polynomiale quadratique est la suivante :

$$CE_{50} = -138{,}4 + 6{,}9 \times T + 6{,}4.10^{-1} \times t + 22{,}4 \times E/S - 6{,}7.10^{-2} \times T^2 + 2{,}3\ .10^{-5} \times t^2 + 2{,}2 \times (E/S)^2 - 6{,}2.10^{-3} \times T \times t - 3{,}5.10^{-1} \times T \times (E/S) - 1{,}3.10^{-1} \times t \times (E/S)$$

Les résultats des analyses de variances des paramètres d'extraction sont listés dans la **Tableau IV. XIII**. Tout d'abord, le fort coefficient de corrélation (R^2 = 0,79) indique que le modèle proposé explique 79,3 % de la variabilité de l'activité anti-VHS-1.

Tableau IV. XIII Analyses de variances des paramètres d'extraction pour la réponse de la CE_{50} des extraits hydrosolubles

Source	Valeur de F	Valeur de p
Modèle	8,52	0,000*
Linéaire	2,05	0,139
T	3,63	0,071**
t	2,54	0,127
E / S	2,38	0,138
Carré	2,28	0,111
T^2	2,36	0,140
t^2	0,00	0,979
$(E/S)^2$	3,96	0,061**
Interaction à 2 facteurs	8,34	0,001*
T × t	1,13	0,299
T × (E / S)	2,81	0,109
t × (E / S)	21,06	0,000*

R^2 = 0,793

* significatif à 1 %

** significatif à 10 %

Le terme linéaire de la température et le terme de second ordre du ratio enzyme sur substrat sont significatifs à 10 %. Quant à l'interaction entre le temps et le rapport enzyme sur substrat, il est significatif à un seuil de probabilité d'1 %. D'après le **Tableau IV. XIII**, la valeur F du modèle est de 8,52 et la valeur p est inférieure à 0,001, ainsi le modèle est significatif. Les valeurs de *F* montrent que la corrélation entre le temps et le rapport E / S et dans une moindre mesure la température de l'extraction, impactent de manière significative l'activité antivirale ($p < 0,10$).

Selon la plus petite valeur des coefficients de régression (pour une CE_{50} faible) de l'équation mathématique du modèle, le temps d'extraction paraît être le paramètre le plus influent sur l'activité antivirale, bien qu'il ne soit pas significatif (p = 0,127). Des graphiques en 3 dimensions sont illustrés sur la **Figure 4. 35** et mettent en avant l'impact des paramètres d'extraction étudiés sur l'activité anti-VHS-1 et notamment l'effet du temps. D'après ces graphiques, il est clair qu'en ajoutant beaucoup d'enzymes (7,2 %), la CE_{50} devient plus faible avec le temps et avec la température (**Figure 4. 35 A**). Le modèle calcule une CE_{50} inférieure à 30 µg / mL pour une température supérieure à 47,5 °C, pour une durée d'extraction supérieure à 250 min et pour un ajout d'Alcalase de plus de 4,5 %. En outre, le modèle prédit deux solutions de conditions optimisées en vue de minimiser la CE_{50} des extraits de *S. chordalis.* La première solution propose des extraits anti-VHS-1, dont la CE_{50} atteindraient 17,7 µg / mL avec une désirabilité de 100 %, en réalisant une extraction réalisée pendant 270 min, à 50 °C et en ajoutant 7,2 % d'Alcalase par rapport à la MS de l'algue (**Figure 4. 35**). Le terme de désirabilité désigne dans ce cas précis la volonté d'obtenir une CE_{50} minimale. Quant à la deuxième solution, elle est plus intéressante d'un point de vue énergétique et économique, mais moins par rapport à l'activité anti-VHS-1. En effet, selon une désirabilité de 89,3 %, une extraction réalisée à 25 °C, pendant 90 min et avec 2,5 % d'Alcalase permettrait d'obtenir un extrait dont la CE_{50} serait égale à 53,3 µg / mL, comprise dans un intervalle de confiance à 95 % situé entre 21,1 et 85,5 µg / mL.

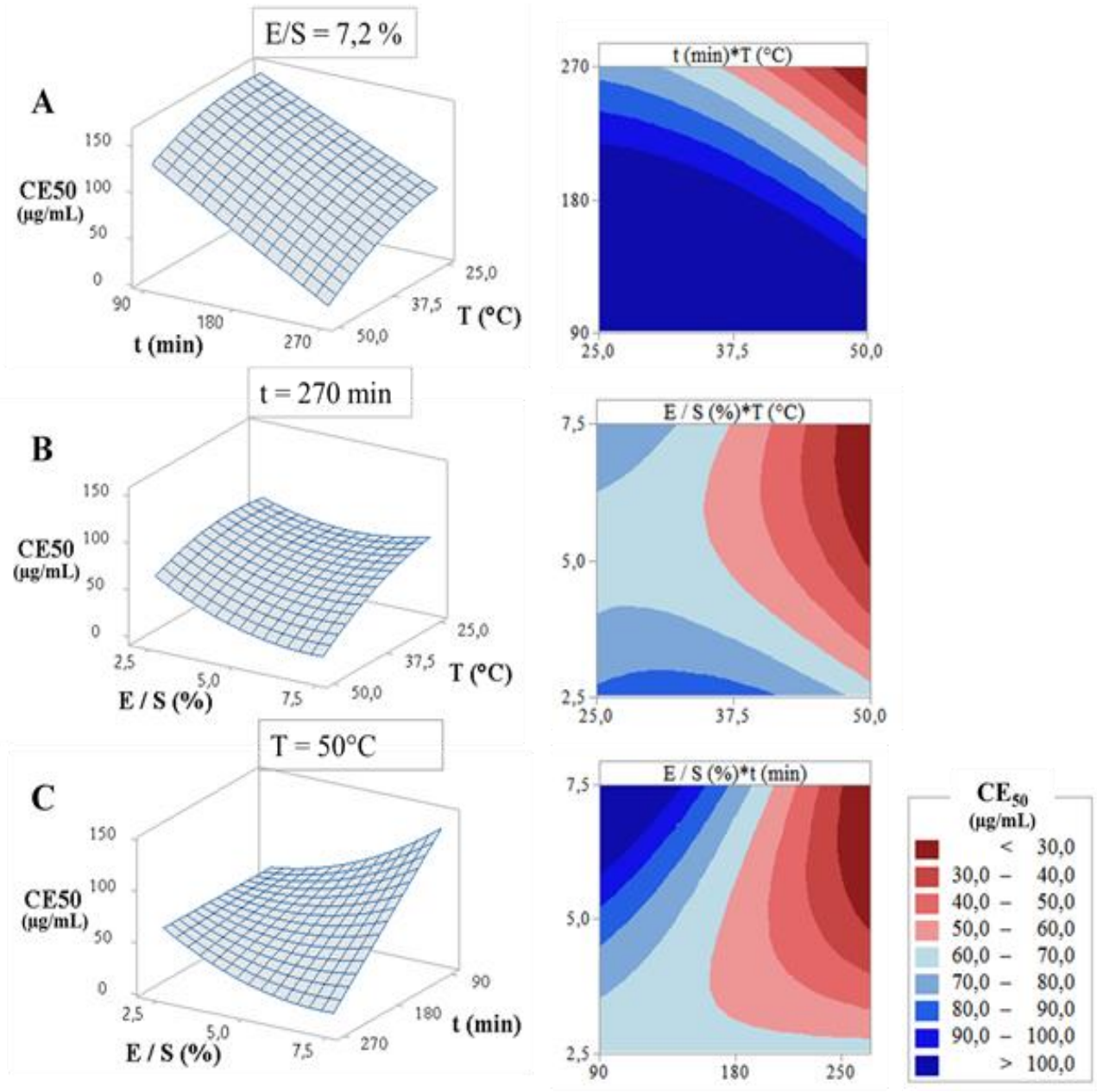


Figure 4. 35 Représentation en 3D de l'activité anti-VHS-1 sous forme de diagramme tridimensionnel (à gauche) et d'un tracé de contours (à droite) ; en fonction de la température et de la durée d'extraction (**A**), de la température et du rapport E / S (**B**) et en fonction de la durée et du rapport E / S (**C**). L'encadré au-dessus de chaque diagramme tridimensionnel indique la troisième variable fixe, selon une des solutions proposées des conditions d'extraction optimisées et prédites par le modèle.

De nombreuses études, en particulier sur les algues brunes, ont montré que les EAEs réalisées dans différentes conditions influencent les activités biologiques des polysaccharides des algues (Wijesinghe et Jeon 2012; Kang *et al.* 2014; Lakmal *et al.* 2015; Rhein-Knudsen et al. 2015; Charoensiddhi *et al*. 2016). Néanmoins, l'impact des différents paramètres tels que la température, le pH, la nature et la quantité de l'enzyme ou encore la durée d'extraction sur la qualité des polysaccharides n'est pas beaucoup étudié. Chez les algues rouges, des optimisations de conditions d'extraction en vue d'obtenir des hydrocolloïdes de qualité (gélifiants ou anti-cancéreux) et en quantité ont été réalisées, dont deux sur des Gigartinales (Bono *et al.* 2014; Ye *et al.* 2015), mais elles n'ont pas nécessité d'enzymes (Pereira-Pacheco *et al.* 2007). Ainsi, l'étude présentée dans ce manuscrit est la première concernant la production par EAE d'extraits antiviraux d'une algue rouge en envisageant des conditions d'extraction optimisées.

3.2.2.3. Influences des paramètres étudiés

Comme il a été vu dans le chapitre III (*Cf.* Chapitre III. Optimisation de l'extraction assistée par enzymes de *S. chordalis*), la quantité et la nature des enzymes sont deux paramètres importants. Ils permettent de dégrader, de manière plus ou moins sélective, la paroi cellulaire des algues. Chez les algues rouges et en l'occurrence chez *S. chordalis,* une forte teneur en protéines est présente dans l'algue (22 %). En ciblant des protéines, (Blanco-Pascual *et al.* 2014; Rhein-Knudsen *et al.* 2015), l'Alcalase permet d'obtenir un extrait plus riche en molécules organiques et plus actif contre le VHS-1, comparé à un extrait produit par une hydrolyse sans enzyme réalisée dans les mêmes conditions. Les polysaccharides sulfatés sont responsables de l'activité antivirale comme il a été détaillé dans la partie introductive de ce chapitre. En appliquant un protocole expérimental pour les isoler (hydrolyse à chaud suivie d'une précipitation), l'activité anti-VHS-1 est effectivement augmentée.

La température d'extraction a plusieurs impacts. En élevant la température, le coefficient de diffusion des polysaccharides augmente. Les températures idéales de solubilisation des polysaccharides d'algues sont comprises entre 80 et 100 °C (Bouhlal *et al.* 2010; Ye *et al.* 2015). En plus de la diffusion des polysaccharides dans l'eau par la chaleur, la dégradation des parois cellulaires par les enzymes doit faciliter leur libération et rendre leur activité biologique disponible. Néanmoins, si la température atteint les 80°C, la grande majorité

des enzymes utilisées au préalable pour solubiliser un maximum de matière organique sont dénaturées (Wijesinghe et Jeon 2012; Hardouin *et al.* 2014; Grosso *et al.* 2015). La Termamyl, stable à 90°C, devient alors une bonne enzyme candidate pour extraire les polysaccharides actifs, comme l'ont montré les résultats de la **Figure 4. 33.**

Le temps est un paramètre important dans l'extraction, et notamment en vue d'obtenir des extraits antiviraux. Pendant l'extraction à une température donnée (50°C-100°C), les polysaccharides diffusent petit à petit. Ils se solubilisent ainsi que d'autres constituants potentiellement actifs, dans le solvant d'extraction, soit dans l'eau. Cependant, un temps trop long peut conduire à la dégradation des composés actifs. À 90 °C, le temps nécessaire pour extraire les polysaccharides est compris entre 4 et 6 h d'après certains scientifiques (Pereira-Pacheco *et al.* 2007; Dumay *et al.* 2013; Ye *et al.* 2015). Cela pourrait expliquer les faibles rendements en polysaccharides isolés des extraits produits par EAE dans l'étude sur le criblage enzymatique (l'extraction des PS a duré 4h à 90°C).

Le ratio enzyme sur substrat semble ne pas être le paramètre le plus important dans la production d'extraits actifs, mais principalement la nature de l'enzyme. En effet, si l'enzyme a une activité très spécifique, mais que l'algue ne correspond pas à son substrat sur lequel elle peut agir, alors même avec beaucoup d'enzymes, la quantité de composés potentiellement actifs libérés provenant du substrat ne sera pas beaucoup plus importante. Dans l'étude présentée dans ce manuscrit et dans celle de Dumay *et al.* (2013), l'algue n'est pas le substrat adéquat et spécifique pour l'activité hydrolytique des enzymes employées. Dans ces études, les enzymes facilitent la liquéfaction et la solubilisation des composés organiques hydrosolubles actifs (Dumay *et al.* 2013). Aujourd'hui, les recherches sur l'organisation des composants de la paroi cellulaire des algues (Deniaud-Bouet *et al*. 2014; Fernández *et al.* 2015; Raimundo *et al*. 2016a; Raimundo *et al*. 2016b*)*, sur les interactions ligands-protéines, sur les bactéries productrices d'enzymes dégradant les polysaccharides de parois cellulaire d'algues et sur la production d'enzymes spécifiques continuent à être intenses. Des κ et des λ- carraghénases ont été purifiées de la bactérie marine *Pseudoalteromonas carrageenovora* (Potin *et al*. 1995; Guibet *et al*. 2007) et des ι-carraghénanases d'une autre bactérie marine, *Zobellia galactanivorans* (Barbeyron *et al.* 2000). Ces enzymes spécifiques digèrent les carraghénanes et génèrent des oligo-galactanes (Grosso *et al.* 2015), qui peuvent, comme mentionné dans la partie introductive *(Cf 1.3.* Production d'extraits et de composés antiviraux, antibactériens et immunostimulants issus de

Gigartinales, page 263*)*, s'avérer actifs. Cependant, ces enzymes spécifiques, du fait de leur pureté et de leur coût d'achat, ne sont pas employées par les industriels. Pour donner un ordre de grandeur, les enzymes commerciales utilisées dans cette étude, produites en grande quantité, ont un prix compris entre 15 et 160 € le kg.

3.2.3. Conclusion

L'Alcalase a été sélectionnée pour optimiser les conditions d'extraction afin de produire des extraits riches en composés anti-VHS-1. Les réponses correspondant aux rendements d'extraction et aux activités anti-VHS-1 suivant différentes conditions de digestion enzymatique sont reportées dans le **Tableau IV. XII** (page 345). De plus, les valeurs de la colonne titrée « Désirabilité » correspondent à la volonté, exprimée en pourcentage, d'obtenir un extrait contenant des composés anti-VHS-1 en quantité. Après avoir modélisé par une nouvelle analyse de régressions multiples, l'équation polynomiale quadratique à appliquer pour obtenir un extrait de *S. chordalis* enrichi en composés anti-VHS-1 est la suivante :

$$D = 0{,}59 - 3{,}6.10^{-2} \times T + 8{,}3.10^{-3} \times t - 7{,}2.10^{-2} \times E/S + 5{,}5.10^{-4} \times T^2 - 2{,}0\ .10^{-5} \times t^2 - 2{,}3.10^{-3} \times (E/S)^2 - 2{,}5.10^{-5} \times T \times t + 8{,}0.10^{-4} \times T \times (E/S) + 3{,}1.10^{-4} \times t \times (E/S)$$

Le coefficient de corrélation R^2 est de 0,93. Le modèle est significatif ($p < 0{,}001$), de même que tous les termes linéaires des paramètres, que deux termes de second ordre (T^2 et t^2) et que le terme de l'interaction entre le temps et le ratio E/S. Les termes des autres interactions sont significatifs à 5%. (Données non montrées).

Deux solutions sont proposées par le modèle concernant la prédiction des conditions d'extraction optimisées. La première solution proposée est une extraction à 50°C, pendant 241 min et avec 7,5 % d'Alcalase. Sous ces conditions, la CE_{50} s'approcherait de 37 µg/mL et le rendement d'extraction de 57,4 %, avec une désirabilité de 91 %. Quant à la deuxième solution, illustrée sur la **Figure 4. 36**, le modèle propose une extraction à 50°C, pendant 225 min et avec 2,8 % d'enzyme par rapport au substrat algal. Néanmoins, même si le rendement d'extraction serait sensiblement le même (56 %) avec une désirabilité de 84 %, une plus faible activité anti-VHS-1 est attendue (CE_{50} de 61 µg/mL).

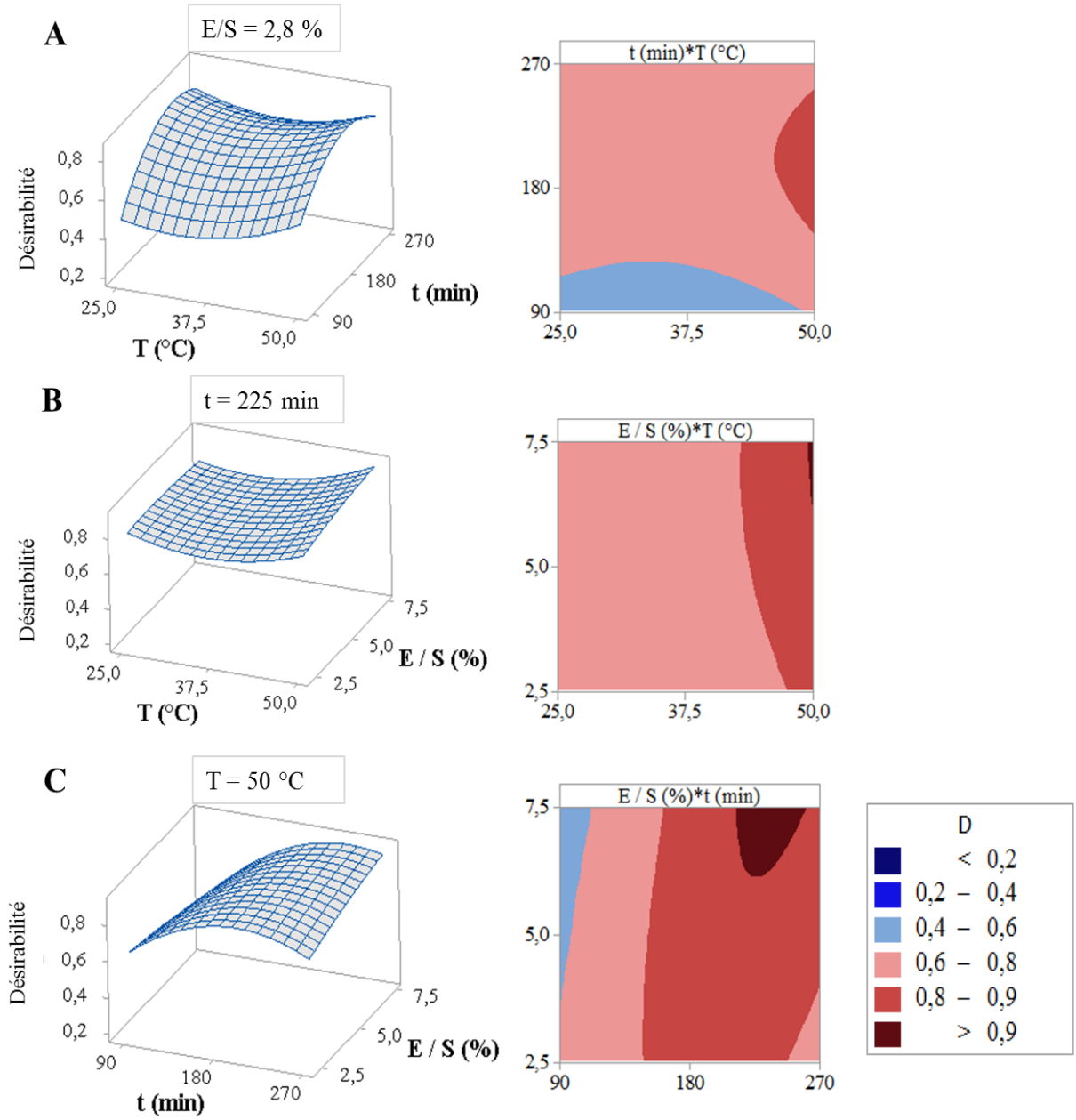


Figure 4. 36 Représentation en 3D de la désirabilité d'obtenir des extraits riches en composés anti-VHS-1 sous forme de diagramme tridimensionnel (à gauche) et d'un tracé de contours (à droite) ; en fonction de la température et de la durée d'extraction (**A**), de la température et du rapport E / S (**B**) et en fonction de la durée et du rapport E / S (**C**). L'encadré au-dessus de chaque diagramme tridimensionnel indique la troisième variable fixe, selon une solution proposée des conditions d'extraction optimisées et prédites par le modèle.

Lors de la validation du modèle proposé pour optimiser le rendement d'extraction des composés de *S. chordalis* dans l'eau (*Cf.* Chapitre III. Optimisation de l'extraction assistée par enzymes de *S. chordalis*), une extraction à 50°C, pendant 200 min et avec 7,5 % d'Alcalase a effectivement augmenté le rendement d'extraction. Néanmoins, l'activité anti-VHS-1 était plus faible (CE_{50} = 163,9 µg / mL) que celle mesurée lors du criblage enzymatique (CE_{50} = 86,0 µg / mL , extraction à 50 °C pendant 180 min avec 5 % d'Alcalase).

Ainsi, ce résultat ainsi que l'ensemble des résultats présentés dans cette sous-partie, montrent que pour produire des extraits anti-VHS-1 de *S. chordalis*, une extraction en présence de la protéase Alcalase à 50 °C est essentielle. Cette température garantit l'activité hydrolytique de l'enzyme (Athukorala *et al.* 2006; Wang *et al.* 2010; Wijesinghe *et al.* 2011; Hardouin *et al.* 2013; Hardouin *et al.* 2014).

De plus, l'interaction entre le temps et le rapport E/S ($p < 0,05$) est corrélée positivement à l'activité antivirale, bien que celle-ci, après un certain temps et avec un ajout d'enzymes trop important, tend à s'inverser (**Figure 4. 36 C**). L'activité anti-VHS-1, dont la CE_{50} est égale à 163,9 µg /mL, est faible à cause du temps d'extraction qui n'est pas suffisant. Les PS n'ont pas le temps de diffuser et de se libérer, malgré la quantité plus importante d'Alcalase. La plus faible activité est expliquée de plus par la proportion moins importante en saccharides sulfatés de l'extrait hydrosoluble obtenu. A quoi s'ajoute la teneur en protéines qui s'élève. Une hypothèse peut alors être émise, à savoir la formation d'agglomérat entre protéines avec des polysaccharides sulfatés, qui ne sont alors plus quantifiées avec les méthodes de dosage utilisées et qui perdent leur activité. Enfin, les études sur le vivant (cellules, virus, extrait d'algue) sont complexes et les variabilités de réponses peuvent être importantes. Pour faire face à ce biais, un grand nombre de réplicats biologiques et techniques doit être appliqué. Dans cette étude, les expériences de l'évaluation de l'activité antivirale ont été limitées à un dupliqua biologique et à 4 réplicats techniques (n=8).

Pour conclure, cette étude confirme que l'EAE est une méthode alternative d'extraction éco-responsable efficace dans la libération de composés actifs issus d'algues rouges et notamment contre le virus de l'*Herpes simplex* de type 1. L'approche scientifique de cette étude peut servir de base dans la solubilisation de composés cibles actifs dans l'eau, facilitant leur

disponibilité et leur accessibilité pour des applications dans les domaines de la nutrition et de la santé animale, végétale voire humaine.

Les choix et l'étude de la nature de l'enzyme et des conditions d'extraction sont très importants et ont un impact direct sur la quantité et sur la qualité des extraits produits. En perspective de ce travail, des expériences de validation des modèles statistiques proposés et traités, dans cette sous-partie de ce chapitre, sont fortement recommandées.

Concernant l'activité antivirale, des EAEs en présence de 2,8 % d'Alcalase à 50 °C, pendant 225 min, suivie d'une étape de concentration de polysaccharides en ajoutant la Termamyl à 85 °C pendant au moins 120 minutes seraient à envisager. Une optimisation de l'EAE avec la Termamyl serait nécessaire dans l'optique de favoriser la purification en quantité des composés anti-VHS.

Des recherches se focalisant sur le scale-up (réalisation à plus grande échelle) du procédé en sélectionnant les conditions optimales trouvées en laboratoire seraient à mener de même qu'une analyse économique. Enfin, une étude sur la composition biochimique des extraits produits est grandement à prendre en considération afin de mieux comprendre les effets des enzymes et des paramètres d'extraction sur la dégradation des parois cellulaires et sur la libération des composés intracellulaires des algues.

Un résumé des principaux résultats de l'étude, sur l'impact de l'Extraction Assistée par Enzymes et des paramètres d'extraction sur la cytotoxicité et sur l'activité antivirale évaluées sur les extraits hydrosolubles et sur les polysaccharides de *S. chordalis*, est donné sur la **Figure 4. 37.**

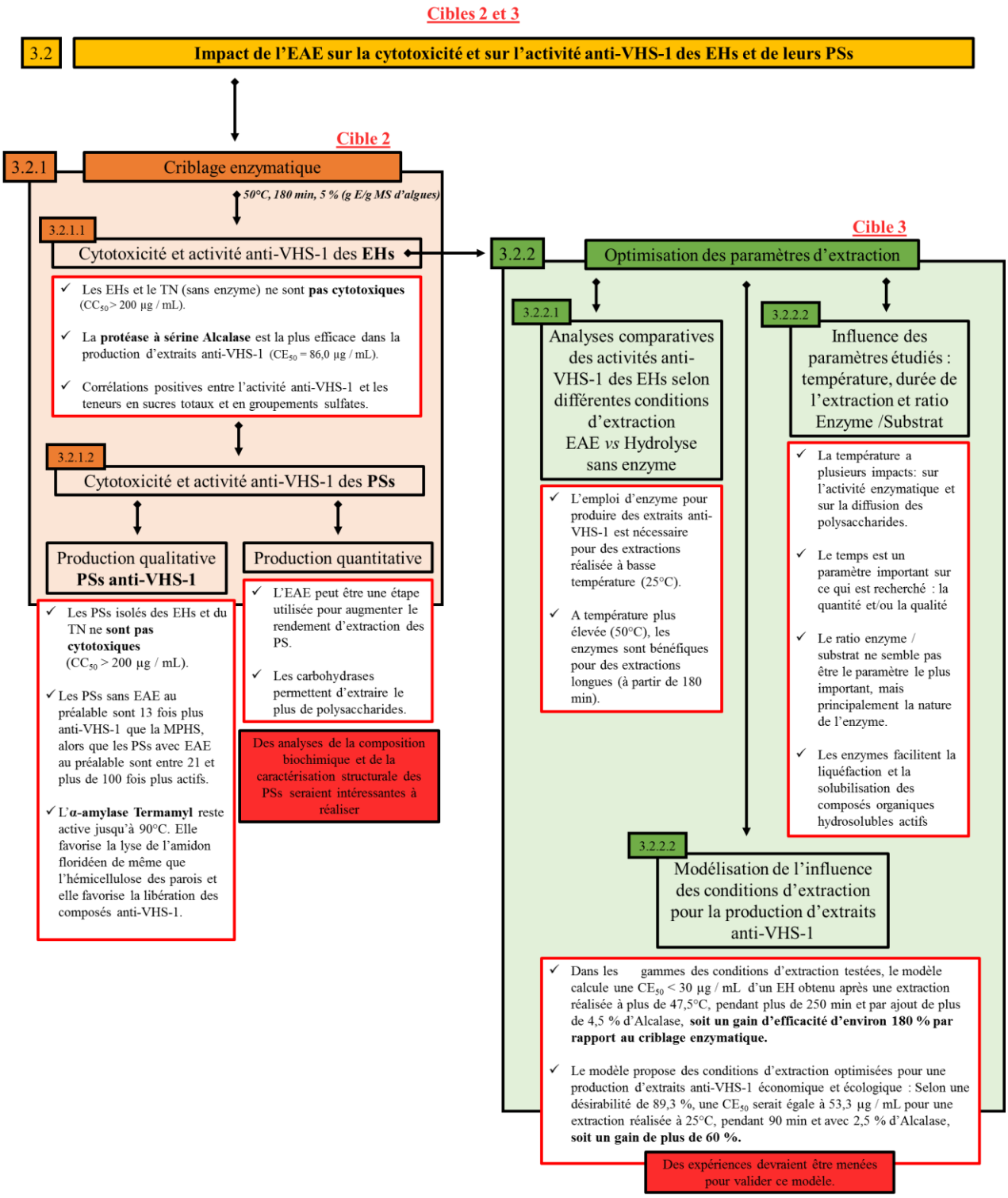
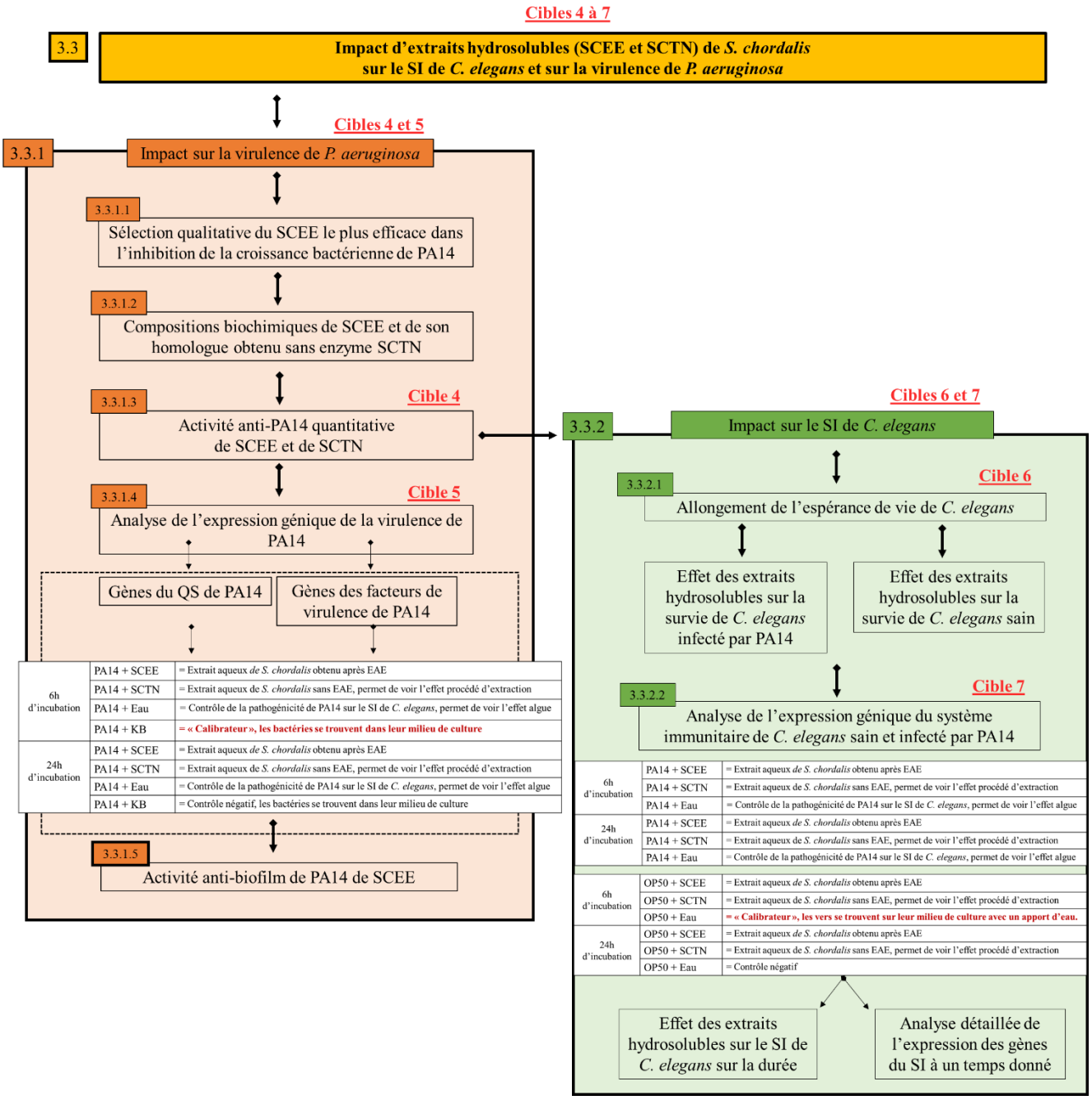


Figure 4. 37 Résumé des principaux résultats de l'étude sur l'impact de l'Extraction Assistée par Enzymes et des paramètres d'extraction sur la cytotoxicité et sur l'activité antivirale évaluées sur les extraits hydrosolubles et les polysaccharides de *S. chordalis*.

3.3. Impact d'extraits hydrosolubles de **S. chordalis** *sur le système immunitaire de* **C. elegans** *et sur la virulence de* **P. aeruginosa** (Cibles 4 à7)

Les résultats obtenus lors de ce doctorat complètent les travaux sur les activités immunostimulante et antimicrobienne d'un extrait hydrosoluble de *S. chordalis* (Bondu *et al.* 2010). Cependant, l'originalité de l'étude réside dans l'utilisation du modèle *in vivo* de pathogénicité entre *C. elegans* et *P. aeruginosa* afin de mieux comprendre le mode d'action des extraits algaux. Ainsi, les expériences ont consisté à mettre en contact des organismes de trois règnes du Vivant, à savoir : un extrait préparé à partir de l'algue rouge *S. chordalis* (Végétal), la bactérie *P. aeruginosa* (Bactérie) et l'invertébré *C. elegans* (Animal). Les effets positifs et/ou négatifs d'extraits de *S. chordalis* sur *P. aeruginosa* et sur *C. elegans* ont été analysés.

La démarche scientifique de cette étude, schématisée sur la **Figure 4. 28,** est rappelée et détaillée sur la **Figure 4. 38.**



SI : Système Immunitaire

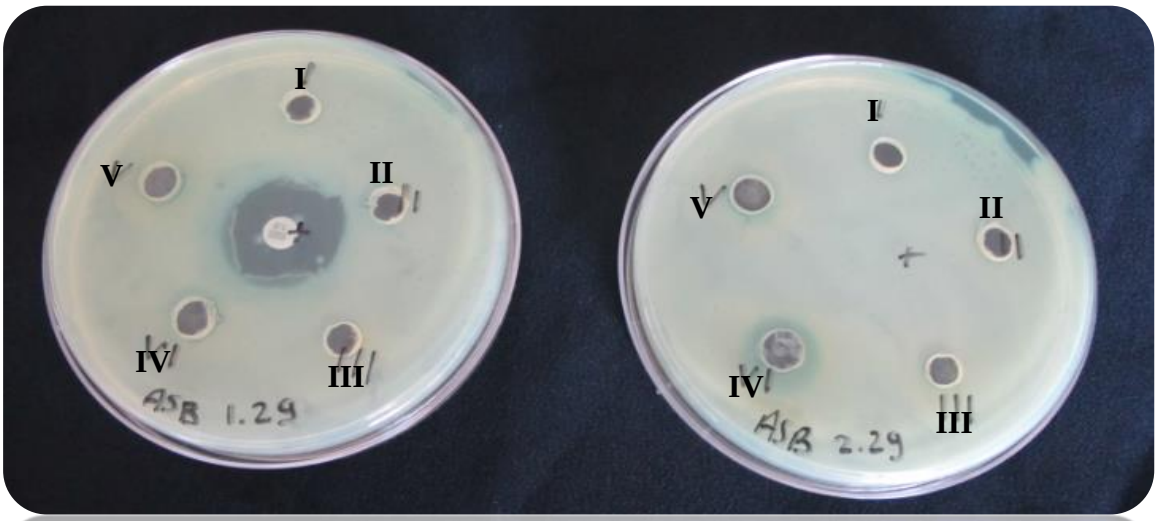
Figure 4. 38 Démarche scientifique suivie pour l'étude concernant l'activité immunostimulante et l'activité antibactérienne évaluées sur des extraits hydrosolubles de *S. chordalis* obtenus après et sans EAE. Le modèle de pathogénicité entre *C. elegans* et *P. aeruginosa* a été utilisé.

3.3.1. Impact sur la virulence de **P. aeruginosa** (Cibles 4 et 5).

Parmi les nombreux extraits hydrosolubles de *S. chordalis* produits pour l'étude de l'optimisation des conditions d'extraction de l'EAE, l'extrait présentant « potentiellement » l'activité antibactérienne la plus efficace a été sélectionné. Ainsi, une analyse qualitative visuelle préalable a été accomplie.

3.3.1.1. Sélection qualitative de l'extrait hydrosoluble (SCEE) le plus efficace dans l'inhibition de la croissance bactérienne de PA14

Pour identifier le potentiel antibactérien de treize extraits hydrosolubles de *S. chordalis*, ces derniers ont été mis en contact avec *P. aeruginosa* selon la méthode de diffusion sur gélose d'agar. Pour des concentrations allant de 250 µg / mL à 1 500 µg / mL, très peu d'inhibition de la croissance bactérienne a été observée, quel que soit l'extrait appliqué. Un exemple de l'effet d'un extrait hydrosoluble de *S. chordalis* sur la croissance de PA14 est donné sur la **Figure 4. 39.**



Légende:
I : 250 µg / mL
II : 500 µg / mL
III : 750 µg / mL
IV: 1 000 µg / mL
V : 1 500 µg / mL
Au centre de la boîte de Pétri de gauche, a été déposé un antibiotique, la carbénicilline.
Les extraits sont deux réplicats issus d'extractions réalisées à 50°C, pendant 3h avec 2,5 % d'Alcalase.

Figure 4. 39 Observation qualitative de l'effet d'un extrait hydrosoluble de *S. chordalis* sur la croissance de *P. aeruginosa.*

Des extraits organiques de Gigartinales ont mis en évidence des activités antibactériennes, notamment contre *P. aeruginosa* (Manilal *et al.* 2009; Cox *et al.* 2010), alors que de faibles activités inhibitrices de la croissance de bactéries à Gram négatif ont été mesurées après l'application d'extrait aqueux. Kulshreshtha *et al*. (2016) ont montré des faibles zones d'inhibition de la croissance de *Salmonella enteritidis* au contact d'1 mg d'extrait aqueux de *C. crispus* (Kulshreshtha *et al.* 2016a). Ces mêmes extraits à différentes concentrations (de 0 à 1 000 µg / mL) n'ont pas eu d'activité directe anti-PA14 selon la même méthode de diffusion sur gélose. Cependant, l'activité anti-PA14 des extraits de *C. crispus* a été démontrée par d'autres méthodes d'analyse plus poussées (Liu *et al.* 2013). La diffusion des composés actifs de l'extrait sur la gélose peut être un problème et peut ainsi biaiser les résultats.

Malgrès la faible activité antibactérienne précedemment observée, l'extrait hydrosoluble produit par une extraction à 50°C, pendant 3h en présence de 2,5 % d'Alcalase (SCEE) a été retenu, ainsi que l'extrait homologue obtenu dans les mêmes conditions sans enzyme (SCTN).

3.3.1.2.Compositions biochimiques de l'extrait hydrosoluble SCEE et de son homologue obtenu sans enzyme SCTN

Les compositions biochimiques des extraits de *S. chordalis* étudiés sont données dans le **Tableau IV. XIV.**

Tableau IV. XIV Compositions biochimiques des extraits hydrosolubles de *S. chordalis* obtenus après une extraction à 50°C pendant 3h avec 2,5 % d'Alcalase (SCEE) et sans enzyme (SCTN).

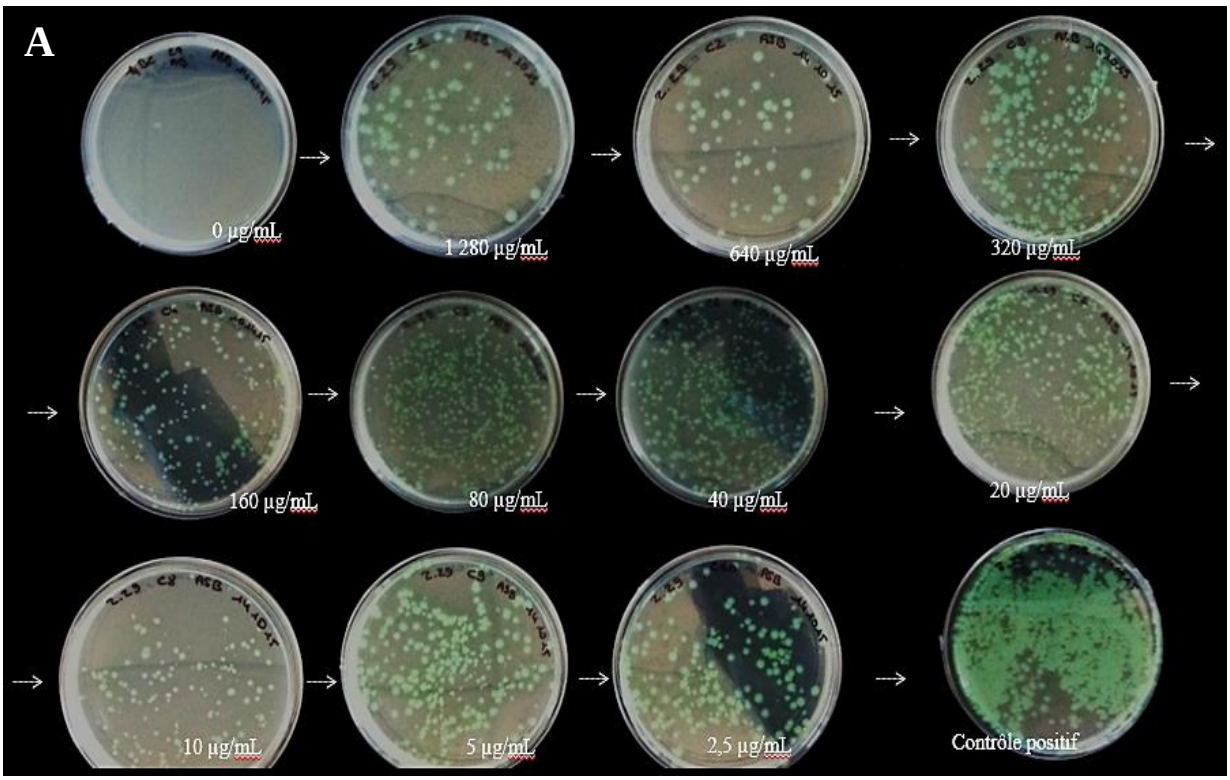
	Rendement d'extraction *(%)*	Sucres neutres *(% MS)*	Groupements sulfate *(% MS)*	Acides uroniques *(% MS)*	Protéines *(% MS)*	Matière minérale *(% MS)*	Autres *(% MS)*
SCEE	59,2 ± 0,9	27,5 ± 0,3	3,2 ± 0,1	0,3 ± 0,2	8,9 ± 2,0	56,5 ± 1,6	3,6 ± 4,2
SCTN	43,1 ± 4,5	12,8 ± 0,1	1,6 ± 0,4	1,0 ± 0,1	4,5 ± 0,1	70,9 ± 1,0	9,2 ± 3,6

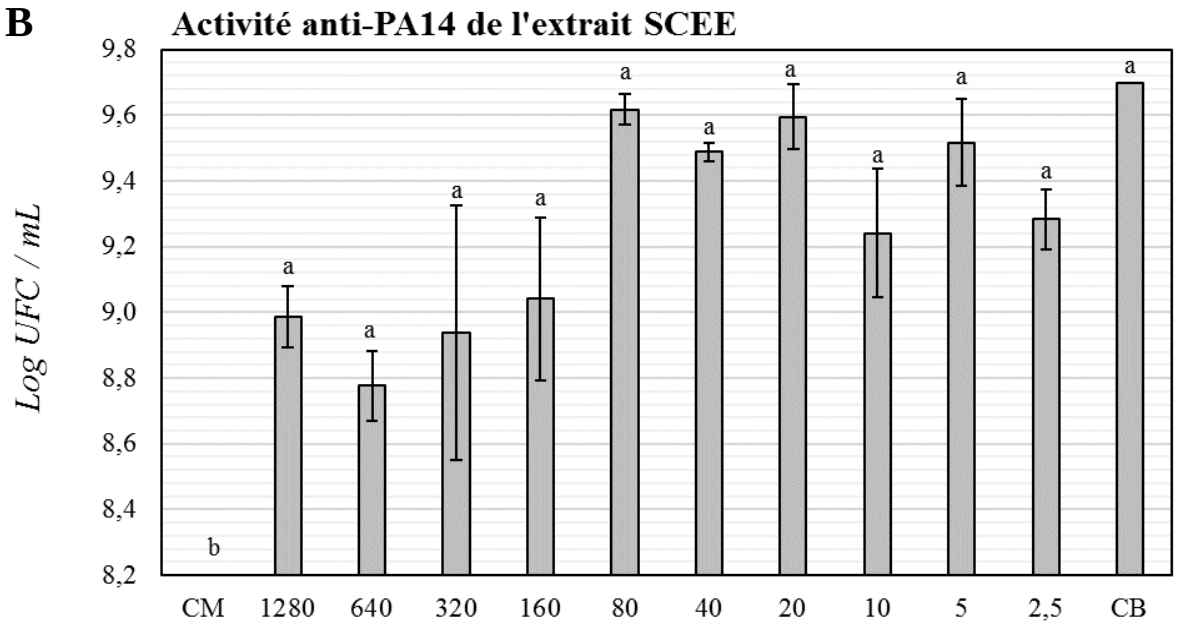
L'extrait obtenu après EAE est plus riche en matière organique notamment en sucres neutres, en groupements sulfates et en protéines, comparé à l'extrait produit sans l'ajout d'enzyme. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus lors des travaux précédents.

3.3.1.3.Activité anti-PA14 quantitative de SCEE et de SCTN (Cible 4)

La méthode des microdilutions décrite par Wiegand *et al.* (2008) a été appliquée pour contrôler l'activité anti-PA14 observée sur les boîtes de gélose (**Figure 4. 39**) (Wiegand *et al.* 2008). Un antibiotique à effet bactéricide après 24h de contact avec *P. aeruginosa* a été utilisé comme contrôle. Il s'agit de la carbénicilline (Chadwick 1969). Le dénombrement de colonies bactériennes montre un effet de l'extrait SCEE, moins important que celui produit par la carbénicilline. Les résultats des dénombrements de colonies bactériennes sont présentés sur les **Figures 4. 40 et 4. 41**.

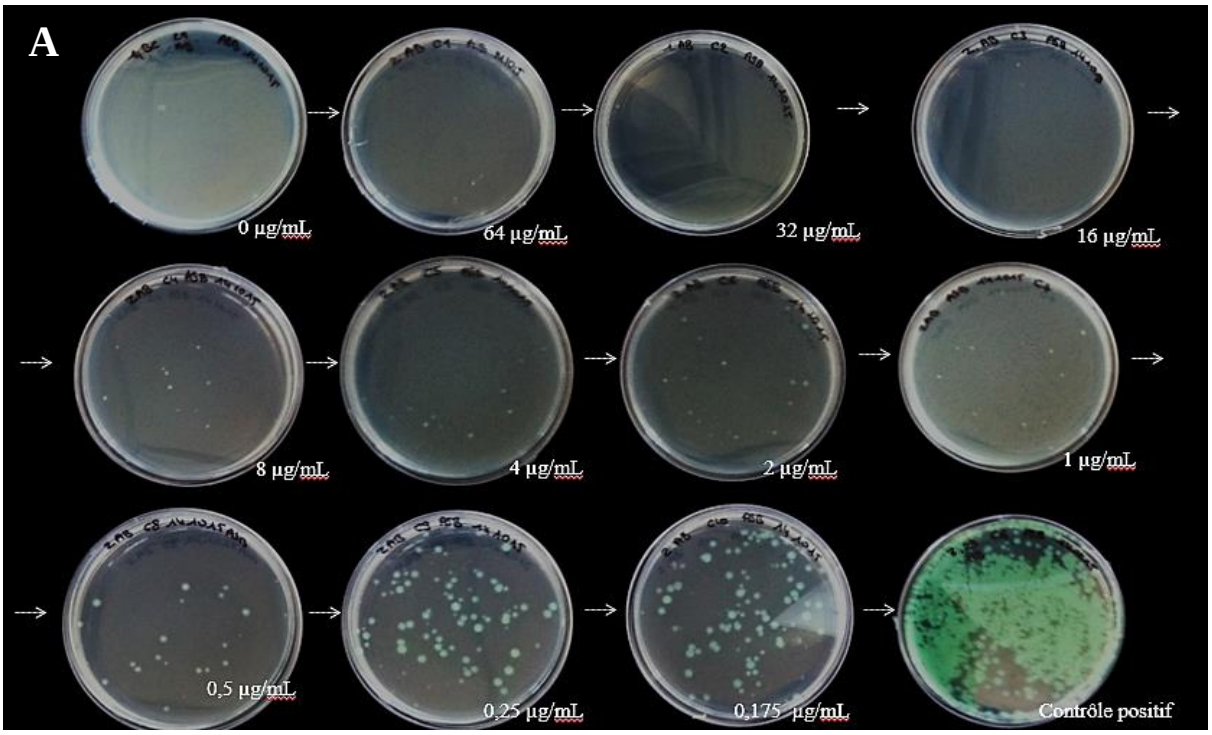
Sur la **Figure 4. 40**, un effet dose de l'extrait SCEE est perceptible, même si ce dernier n'est pas significatif. Le nombre de colonies formés décroit avec l'augmentation de la concentration de l'extrait. Dix fois moins de colonies de PA14 se développent en présence d'extrait SCEE à 640 µg / mL par rapport au contrôle bactérien (CB). Quant à la carbénicilline (**Figure 4. 41**), elle inhibe significativement la croissance de PA14. En effet, après 24h de contact, des bactéries n'arrivent à se former qu'en présence d'antibiotiques faiblement concentrés, à moins de 16 µg / mL. Néanmoins, dès 0,175 µg / mL de carbénicilline, la croissance bactérienne est significativement affaiblie comparé au contrôle bactérien (CB).

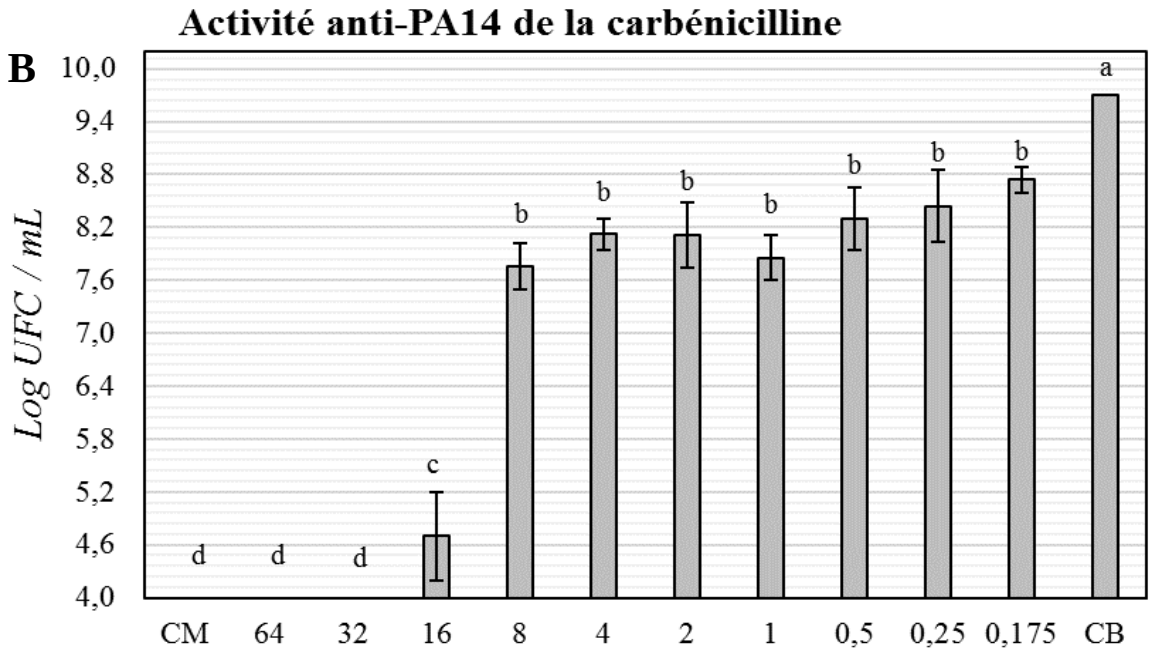




Légende :
UFC : Unité Formant Colonie
CM : Contrôle Milieu
CB : Contrôle Bactéries
Les valeurs, sous les barres grises allant de 2,5 à 1280 représentent les concentrations d'extrait SCEE en µg / mL.
Les barres grises représentant les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (n=3, p<0,05) selon le test de Fisher LSD (logiciel R, package agricolae de de Mendiburu 2016*).*

Figure 4. 40 Dénombrement de colonies de PA14 après la méthode des microdilutions appliquée sur l'extrait SCEE (**A**) et les résultats quantitatifs (**B**).





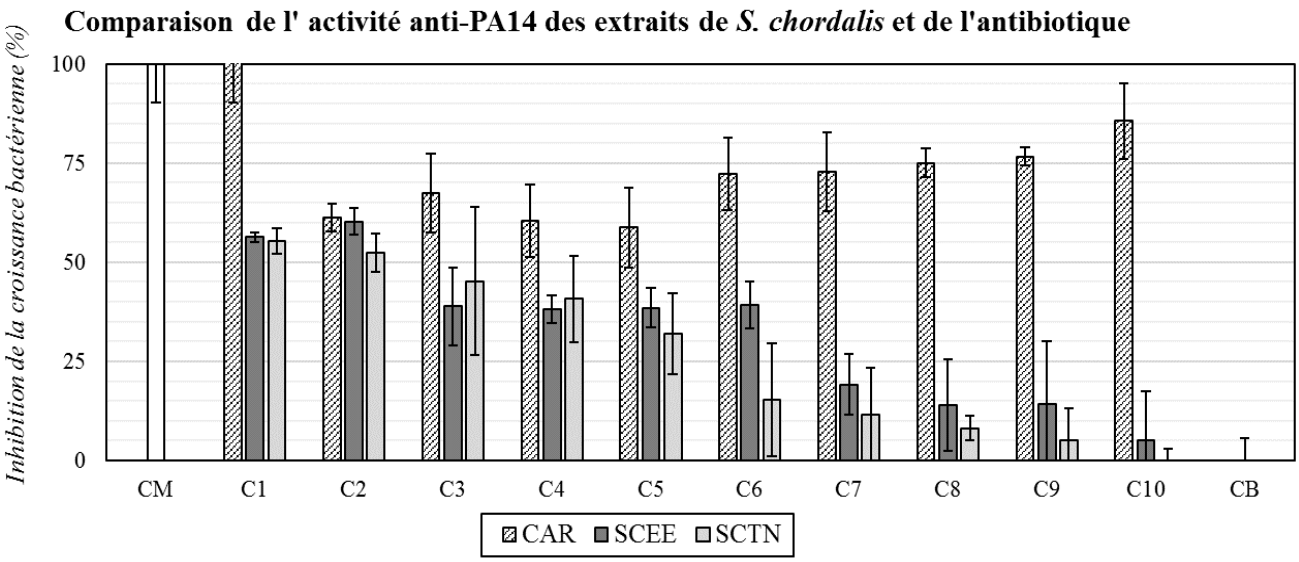
Légende :
UFC : Unité Formant Colonie
CM : Contrôle Milieu
CB : Contrôle Bactéries
Les valeurs, sous les barres grises allant de 0,175 à 64 représentent les concentrations de carbénicilline en µg / mL.
Les barres grises représentant les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (n=3, p<0,05) selon le test de Fisher LSD (logiciel R, package agricolae de de Mendiburu 2016).

Figure 4. 41 Dénombrement de colonies de PA14 après la méthode des microdilutions appliquée en présence de carbénicilline (**A**) et les résultats quantitatifs (**B**).

En outre, un effet sur la morphologie des colonies bactériennes peut être également constaté. Après l'application d'un extrait algal concentré (> 320 µg / mL) et faiblement concentré (< 5 µg / mL) , l'aspect des colonies semble plus mucoïde. D'une part, cet aspect dépend de facteurs intrinsèques à la bactérie comme sa mobilité, sa production de matériel extracellulaire ou encore sa morphologie (Persat *et al.* 2015; Kulshreshtha *et al.* 2016b). D'autre part, son aspect peut aussi être expliqué par des facteurs extrinsèques comme un gradient de salinité autour des colonies *(Collégiale des enseignants de bactériologie-virologie-hygiène 2014).*

Afin de compléter ces résultats, l'analyse des densités optiques à 600 nm, plus objective, est exposée sous forme d'histogramme sur la **Figure 4. 42.**

Les résultats obtenus après lecture de la densité optique, corrélée à la concentration de bactéries, confirment les résultats du dénombrement de colonies bactériennes et prouvent l'effet anti-PA14 des extraits hydrosolubles de *S. chordalis.* De plus, la méthode d'extraction ne semble pas influencer de manière significative l'effet anti-PA14 selon la méthode des microdilutions, bien que l'extrait obtenu après l'action de la protéase montre généralement une inhibition de la croissance bactérienne plus efficace (**Figure 4. 42**).



Légende :
CM : Contrôle Milieu
CB : Contrôle Bactéries
Les valeurs, sous les barres correspondent aux 10 concentrations évaluées (C1 à C10) allant de 64 à 0,175 µg / mL pour la carbénicilline (CAR) et de 1280 à 2,5 µg / mL pour les extraits de S. chordalis *(SCEE et SCTN)*
Des analyses de variances ont été réalisées sur les extraits SCEE et SCTN (n=4). Par manque de lisibilité, les significativités entre groupes ne sont pas indiquées. Le pourcentage d'inhibition du CM se démarque (p<0,05). Il n'y a pas de grandes différences entre les extraits SCEE et SCTN sauf à C6 (40 µg / mL, p<0,05). Enfin, une inhibition significative de la croissance de PA14 par rapport au CB est mesurée sur SCEE à partir de 40 µg / mL (C6) et sur SCTN à partir de 160 µg / mL (C4) (p<0,05).

Figure 4. 42 Inhibition de la croissance de PA14 après application d'un antibiotique et de deux extraits hydrosolubles de *S. chordalis.*

Le pourcentage d'inhibition le plus élevé (60,3 %) a été calculé après l'application d'un extrait SCEE à 640 µg / mL (C2 de la **Figure 4. 42**). Quant à la carbénicilline, les résultats de la **Figure 4. 42** confirment ceux trouvés lors du dénombrement de colonies bactériennes. Pour des concentrations comprises entre 0,175 à 64 µg /ml, la carbénicilline inhibe à plus de 60 % la croissance bactérienne.

En fonction de l'attachement des bactéries sur une surface, du développement et de l'aspect des colonies, les facteurs de virulence sont activés de manière plus ou moins intense (Siryaporn *et al.* 2014). Pour comprendre l'origine de cet effet anti-PA14 des extraits hydrosolubles de *S. chordalis*, les expressions des gènes de virulence de PA14 ont été analysées.

3.3.1.4. Analyse de l'expression génique de la virulence de PA14 (Cible 5).

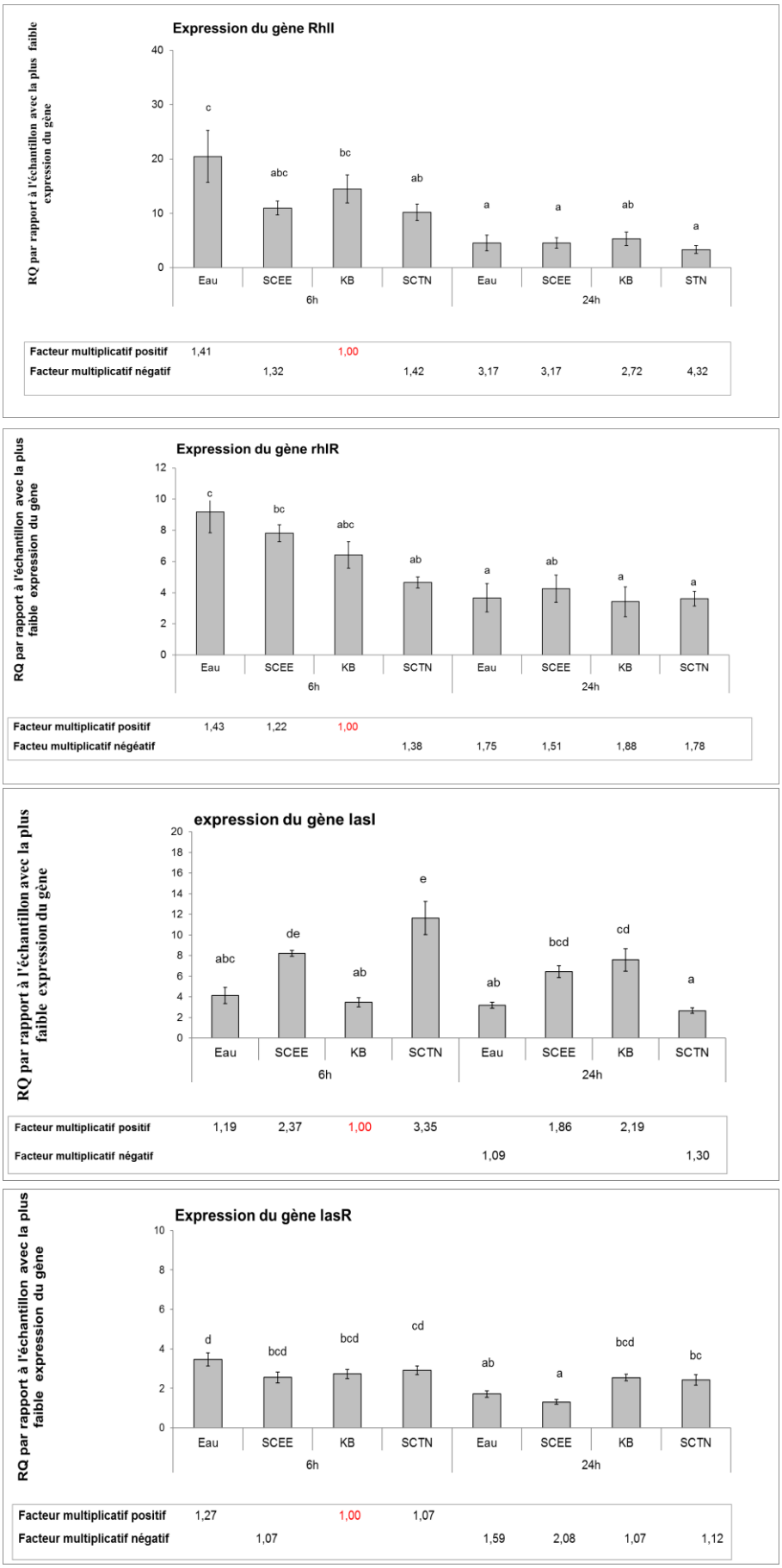
Pour analyser l'activité immunostimulante des extraits de *S. chordalis* sur *C. elegans*, d'autres mécanismes qui pourraient jouer un rôle dans l'atténuation de la mort du ver infecté par PA14 ont été recherchés. Les expressions des gènes des facteurs de virulence et du Quorum Sensing (QS) ont donc été analysées après 6h et après 24h de contact. En effet, le ver comme la bactérie réagissent et s'adaptent en fonction de leur environnement mais aussi en fonction de leur cycle de vie, comme c'est le cas pour *P. aeruginosa*, dont la courbe de croissance est illustrée sur la **Figure 4. 20** (*Cf.* Matériels et méthode, page 296)**.**

***Impact des extraits hydrosolubles sur l'expression génique du QS de* P. aeruginosa**

Plusieurs systèmes de QS, dont deux sont nommés *las* et *rhl*, ont été identifiés chez *P. aeruginosa* (Ruimy et Andremont 2004). Les expressions des gènes de ces systèmes *las* et *rhl* sont directement responsables de la synthèse des autoinducteurs AHL (*Cf.* Introduction pages 255-256).

Ainsi, les expressions des gènes intervenant dans le QS de PA14 après 6h et 24h de contact avec des extraits hydrosolubles de *S. chordalis* à 640 µg/mL (SCEE ou SCTN) sont présentées sur la **Figure 4. 43**. L'eau distillée stérilisée a servi de contrôle pour mettre en évident le potentiel effet des extraits de *S. chordalis* et le milieu de culture KB de la bactérie a servi de « calibrateur » (*Cf.* Matériels et Méthode, page 313). Le gène 16S codant l'ARN ribosomique a été utilisé en tant que gène de référence d'expression stable. Il a constitué le contrôle endogène, c'est pourquoi il n'apparaît pas sur la **Figure 4. 43.**

Les histogrammes de la **Figure 4. 43** présentent en abscisse les différents échantillons analysés (SCEE, SCTN, Eau et KB), après 6h et après 24h d'incubation. Sur l'axe des ordonnées est représentée l'expression quantitative du gène étudié relative (RQ) par rapport à l'expression la plus faible de ce gène, obtenue parmi les échantillons analysés. Chaque histogramme présente l'étude d'un gène. Les encadrés se trouvant sous chaque histogramme montrent les facteurs multiplicatifs. Ce facteur correspond au rapport de l'expression quantitative d'un gène chez un échantillon sur l'expression de ce même gène chez le calibrateur (*Cf.* Matériel et méthodes, pages 313-314).



Pour chaque graphique, les barres grises représentant les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (n=9, p<0,05), selon le test de Fisher LSD (logiciel R, package agricolae de de Mendiburu 2016)

Figure 4. 43 Expressions des gènes intervenant dans le quorum sensing de PA14 après 6h et 24h de contact avec les extraits de *S. chordalis.*

Après 24 h de contact, les gènes du QS sont moins exprimés qu'après 6h de contact. Les gènes du QS sont alors plus fortement exprimés lorsque la bactérie se trouve en phase exponentielle de croissance (6h + 12 h d'incubation = 18h, *Cf.* Matériels et méthodes, **Figure 4. 20,** page 296) que quand elle se trouve en phase stationnaire (36h). Pendant la phase exponentielle de croissance, la densité bactérienne augmente ce qui active les gènes de virulence de la bactérie par le mécanisme génétique de régulation, le QS.

Concernant le gène *lasR*, son expression semble baisser par rapport à celle chez le contrôle KB (calibrateur) après 6 h et significativement après 24h de contact avec l'extrait de *S. chordalis* obtenu par EAE (2,08). L'expression du gène *lasI* est celle qui varie le plus. Après 6h de contact entre la bactérie et les deux extraits algaux, le gène est significativement surexprimé (2,37 et 3,35) alors qu'il devient sous exprimé par rapport au contrôle KB respectif après 24h. Néanmoins, l'effet « extrait algue » n'est pas perceptible puisque les bactéries en contact avec l'eau ont vu leur gène *lasI* diminuer également (1,09). Quant à l'expression de gène *rhlR*, il n'y a pas de grand changement significatif à signaler. Seule l'expression du gène en présence de l'extrait SCTN est un peu plus faible que le « calibrateur » (KB) après 6h de contact. Enfin, un effet anti-virulence des extraits algaux est discernable après 6 h de contact au niveau de l'expression du gène *rhlI*, bien qu'il ne soit pas significatif.

Pour conclure, mise à part le gène *lasR* en présence de l'extrait SCEE après 24h d'infection, aucun effet « extrait algue » n'est significatif sur le QS de PA14 d'après les résultats obtenus par qPCR, bien qu'une tendance à la répression des gènes du QS soit évidente.

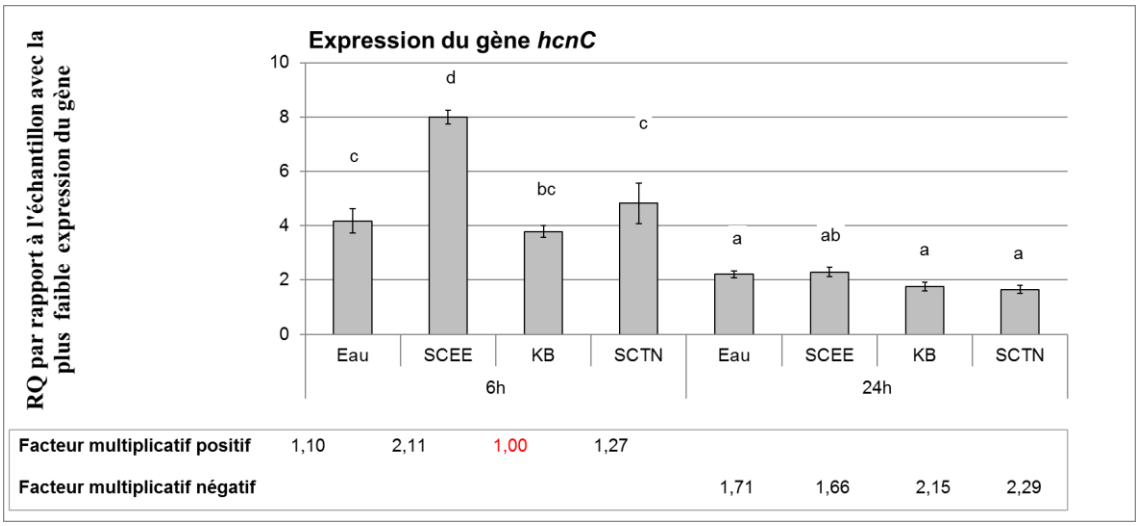
Néanmoins, il peut être noté que le système *las* est le plus affecté par la présence d'extraits d'algues. En effet, après 6h de contact, l'expression du gène codant pour la protéine autoinductrice lasI augmente de manière significative alors qu'au bout de 24h, cette expression tend à s'inverser. Cette dernière est accompagnée d'une baisse de l'expression significative du gène codant pour la protéine régulatrice lasR en contact avec l'extrait SCEE, après 24h. Ces gènes interviennent aussi dans la synthèse de l'élastase, une enzyme qui possède un rôle dans la perméabilité membranaire et dans la structure des microcolonies puis des biofilms (Pearson *et al.* 1997; Tielen *et al.* 2013).

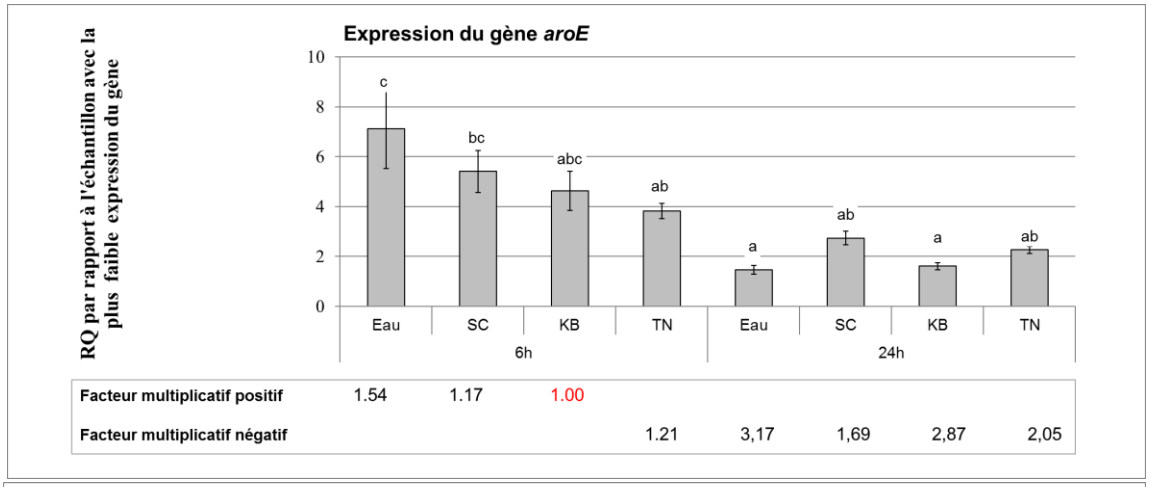
Le sel apporté par l'algue, pouvant changer l'osmolarité du milieu et affecter directement la bactérie, n'explique pas cette baisse d'expression du gène *lasR*. En effet, l'échantillon « contrôle eau » montre aussi une répression de ce gène. À quoi s'ajoute l'extrait SCTN riche en matière minérale, mais dont la répression du gène *lasR* est significativement moins importante que celle causée par l'extrait SCEE. Quant au système *rhl*, il n'est que faiblement affecté négativement pas la présence d'extraits de *S. chordalis*. D'après Yu *et al*. (2014), le système *las* favoriserait la formation de biofilms par une régulation passant par les rhamnolipides, dont la production est issue du système *rhl* (Yu *et al.* 2014). Ces composés forment un biosurfactant qui joue un rôle physiologique complexe chez la bactérie, notamment dans la maintenance de l'architecture des biofilms (Davey *et al.* 2003). Les facteurs de virulence incluant ceux qui interviennent dans le QS sont nécessaires pour les étapes de l'attachement et de la colonisation de l'épithélium intestinal de *C. elegans* (Kulshreshtha *et al*. 2016a). Les gènes des systèmes *rhl* et *las* de PA14 ont aussi été affectés négativement après l'application d'extrait aqueux de *C. crispus* ainsi qu'après l'application d'un extrait aqueux de Tasco®, produit commercialisé provenant de l'algue brune *Ascophyllum nodosum* (Kandasamy *et al*. 2012; Liu *et al.* 2013).

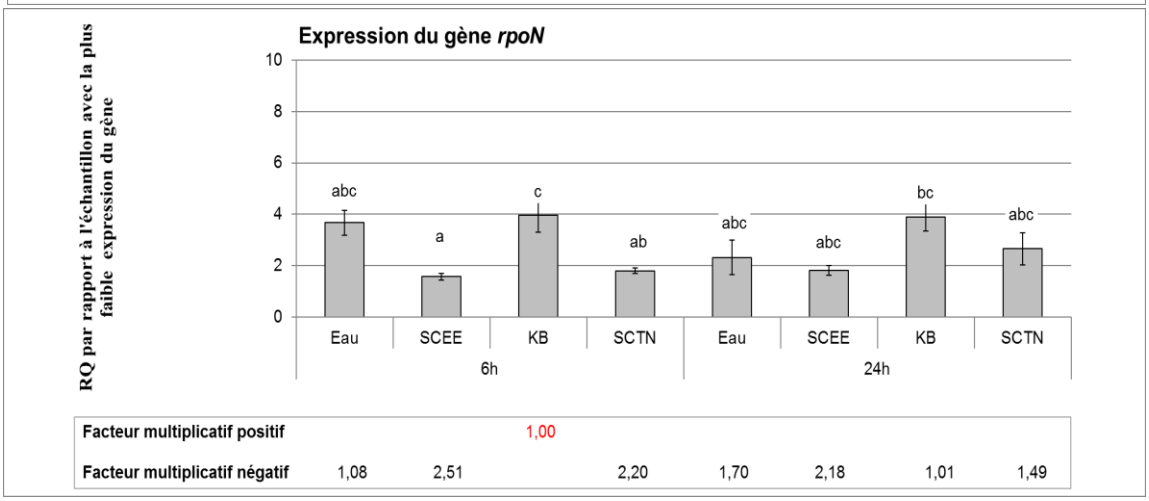
Impact des extraits hydrosolubles sur l'expression des gènes de facteurs de virulence de P. aeruginosa.

Les gènes de virulence de PA14 incluent, dans cette étude, les gènes *hcnC* , *aroE, rpoN, sodB et sde*. Leurs expressions, illustrées sur la **Figure 4. 44**, ont été évaluées sur une culture de PA14 avec un milieu supplémenté par 640 µg / mL d'extraits hydrosolubles de *S. chordalis* pendant 6h et pendant 24h.

De même que pour les gènes du QS, les gènes des facteurs de virulence sont plus faiblement exprimés à 24h qu'à 6h de contact.

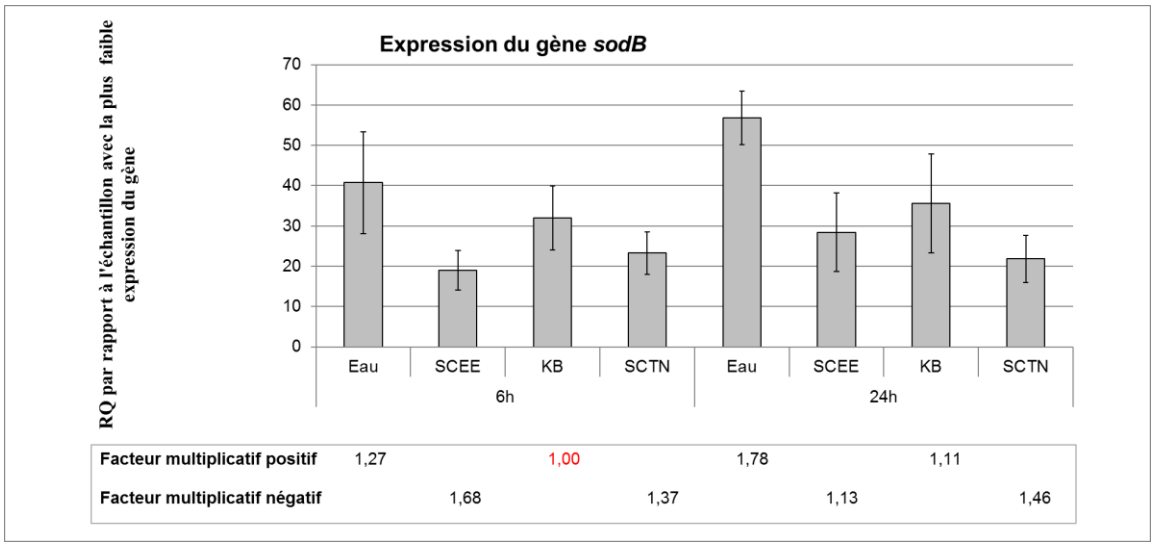


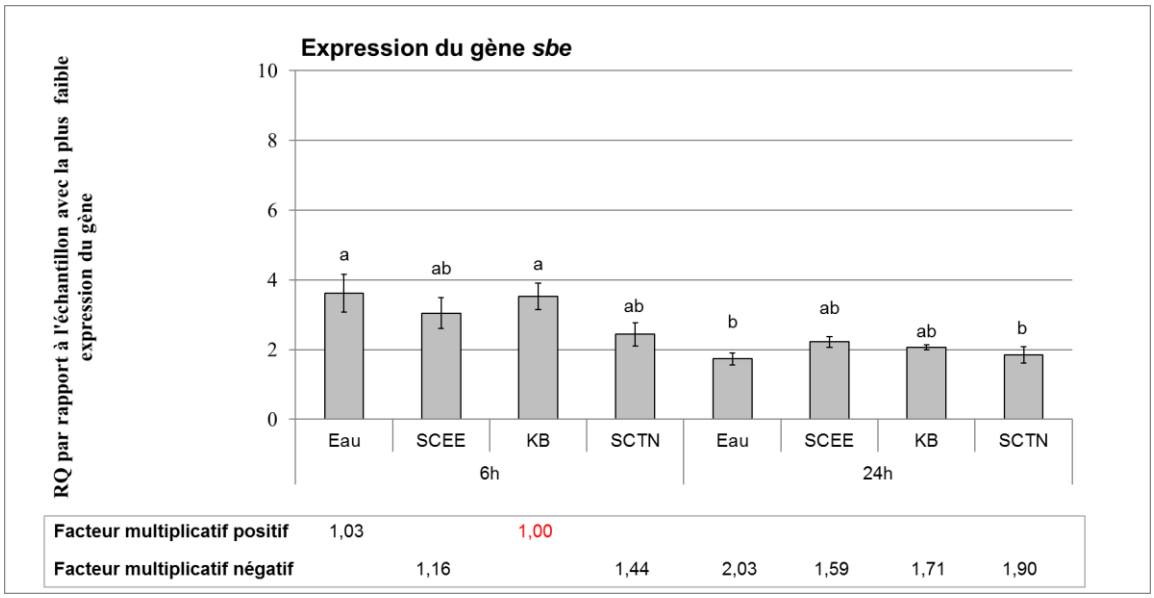




Pour chaque graphique, les barres représentant les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (n=9, p<0,05), selon le test de Fisher LSD (logiciel R, package agricolae de de Mendiburu 2016)

Figure 4. 44 Expressions des gènes intervenant dans la virulence de PA14 après 6h et 24h de contact avec les extraits de *S. chordalis (1/2).*





Pour chaque graphique, les barres représentant les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (n=9, p<0,05), selon le test de Fisher LSD (logiciel R, package agricolae de de Mendiburu 2016)

Figure 4. 44 Expressions des gènes intervenant dans la virulence de PA14 après 6h et 24h de contact avec les extraits de *S. chordalis (2/2).*

Le gène *hcnC* code pour une sous-unité de la synthase du cyanure d'hydrogène, considéré comme un facteur primaire de toxicité de *P. aeruginosa* tuant notamment *C. elegans* (Gallagher et Manoil 2001). Une augmentation significative, d'un facteur deux (2,11), de son expression est à noter. Au bout de 6h, l'extrait SCEE favoriserait la production de ce facteur toxique. Cependant, après 24h de contact, l'expression diminue et n'est pas différente que celle mesurée sur la bactérie évoluant dans son milieu de culture KB.

D'après les facteurs multiplicatifs positifs ou négatifs (inférieurs à 2) (*Cf.* Matériels et méthodes, page 314), aucun effet significatif des extraits hydrosolubles d'algues n'est remarquable sur l'expression des gènes, *aroE, sodB et sde*, bien qu'une tendance montre une activité anti-*sodB* des extraits de *S. chordalis* ainsi qu'une activité anti-*sbe* après 6h de contact.

Le gène *sodB* fait partie d'un ensemble de gènes ayant un rôle dans la synthèse de la superoxyde dismutase. L'expression de ces gènes est contrôlée par les facteurs environnementaux. En effet, ces gènes interviennent notamment dans la défense contre le stress oxydatif. Ils ont un rôle vital pour la bactérie. En permettant la survie de la bactérie, l'expression du gène *sodB* contribue à sa virulence (Vasil et Ochsner 1999; Iiyama *et al.* 2007).

Quant au gène *sbe,* son expression serait un peu moins importante après 6h de contact avec les extraits de *S. chordalis* par rapport à celles du contrôle « Eau » et du « calibrateur KB ». Le gène *sbe* a un rôle dans la synthèse d'une phosphatase alcaline liée à la surface membranaire de la bactérie. Elle influence la perméabilité de la membrane bactérienne (Bhatti et Ingram 1982). En présence de *S. chordalis* et pendant la phase exponentielle de la croissance bactérienne, cette protéine est un peu moins produite. Soit elle laisse place à d'autres constituants comme les LPS et la virulence de la bactérie n'est pas affaiblie (Bhatti et Ingram 1982), soit la perméabilité membranaire est détériorée et la bactérie peut devenir alors plus susceptible et vulnérable.

Enfin, l'activité la plus considérable des extraits de *S. chordalis* est celle à l'encontre de l'expression du gène *rpoN* (Facteur multiplicatif négatif > 2). En effet, ce gène de PA14 est significativement réprimé après 6h et 24h d'incubation en présence de 640 µg / mL d'extraits algaux et plus particulièrement avec l'extrait obtenu après EAE, plus riche en matière organique, en sucres neutres, en groupements sulfate et en protéines (**Tableau IV. XIV,** page 361). Ces résultats sont en concordance avec ceux trouvés dans la littérature, notamment après

la mise en contact entre PA14 et des polymères riches en sucres neutres, en l'occurrence en fucose d'algues brunes (Kandasamy *et al.* 2012; Liu *et al.* 2013; Kandasamy *et al.* 2015*)*. *rpoN* est un gène qui code pour le facteur σ 54, une sous-unité de l'ARN polymérase. Il régule certaines fonctions cellulaires comme la mobilité, le QS et la virulence. Cai *et al* (2015) mentionnent que chez des personnes atteintes de mucoviscidose par exemple, *P. aeruginosa* évolue souvent en un mutant dont l'expression de *rpoN* est atténuée. En effet, une des caractéristiques de l'adaptation de *P. aeruginosa* chez les personnes malades est la réduction de la virulence après avoir été activée pour coloniser les voies respiratoires. Dans leur étude, les chercheurs ont montré que *rpoN* régulait la virulence de *P. aeruginosa* en modulant le QS *(Cai et al. 2015).*

Pour conclure, les extraits hydrosolubles de *S. chordalis* présentent un effet dans l'inhibition de certains gènes des facteurs de virulence de la bactérie pathogène PA14, en particulier sur l'expression du gène *rpoN*. La différence entre les deux extraits SCEE et SCTN n'est pas significative, même si l'inhibition de l'expression du gène *rpoN* est plus importante en présence de l'extrait obtenu après EAE (facteur multiplicatif de 2,51 et 2,20 à 6h et 2,18 et 1,47 à 24h, respectivement). En réduisant l'expression de ce gène, lors des premières étapes de colonisation de *P. aeruginosa*, l'efficacité de la pathogénicité de PA14 serait alors réduite.

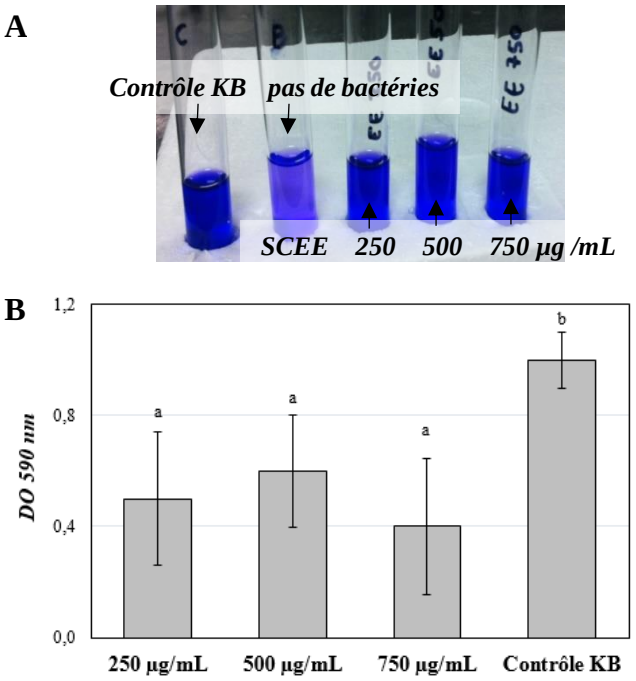
3.3.1.5.Activité anti-biofilm de SCEE

La formation de biofilms est considérée comme un facteur de virulence qui favorise la survie des bactéries dans tous types d'environnements (Kulshreshtha *et al.* 2016b). L'activité anti-biofilm a été évaluée sur l'extrait SCEE à différentes concentrations : 250, 500 et 750 µg / mL. Les résultats après 24h d'incubation sans agitation sont présentés sur la **Figure 4. 45.**

L'ajout d'un extrait de *S. chordalis* obtenu après EAE, concentré à hauteur de 250 à 750 µg / mL, diminue significativement la formation de biofilm de PA14. En effet, la densité optique mesurée en présence de l'extrait d'algue SCEE (en moyenne 0,5) est deux fois plus faible que celle du contrôle KB dans lequel les bactéries forment un biofilm important ($OD_{590\ nm}$=1). Ces résultats sont en accord avec les précédentes recherches sur l'activité antibiofilm de bactéries à Gram négatif, après l'application d'extraits aqueux d'algues. Kulshreshtha *et al.* (2016) ont montré une diminution d'un facteur 3-4 du biofilm formé par *Salmonella enteritidis* en présence d'extrait aqueux de *C. crispus* à 200 µg / mL (Kulshreshtha *et al.* 2016b). Quant à Kandasamy

et al. (2012), leur extrait aqueux d'*A. nodosum* inhibe d'un facteur 4 la formation de biofilm de PA14 *(*Kandasamy *et al. 2012)*

Les résultats présentés sur la **Figure 4. 45** viennent appuyer les résultats de l'analyse de l'expression des gènes du QS et de la virulence de *P. aeruginosa.* L'inhibition du biofilm peut être expliquée notamment par la répression du gène *rpoN* et celle de *lasR.*



Les barres grises de l'histogramme représentant les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (n=16, p<0,05), selon le test de Fisher LSD (logiciel R, package agricolae de de Mendiburu 2016) La photographie (**A**) *et l'histogramme* (**B**) *ont été obtenus indépendamment. Moins d'éthanol a été mis pour la photographie afin de concentrer le cristal violet.*

Figure 4. 45 Effet de l'extrait hydrosoluble de *S. chordalis*, SCEE, sur la formation de biofilm de PA14.

3.3.2. Un extrait hydrosoluble de S. chordalis*, obtenu après EAE protège et stimule le système immunitaire de* C. elegans *de l'infection par* P. aeruginosa (Cibles 6 et7)**.**

En utilisant le système de pathogénicité *C. elegans –P. aeruginosa*, les nématodes de la souche N2 ont été mis sur un milieu de culture inoculé soit par *E. coli OP50*, soit par la bactérie pathogène *PA14* en absence ou en présence d'extraits aqueux de *S. chordalis.* La survie de *C.*

elegans au contact des extraits d'algues et de la bactérie pathogène ainsi que l'expression génique de son système immunitaire inné ont été étudiées.

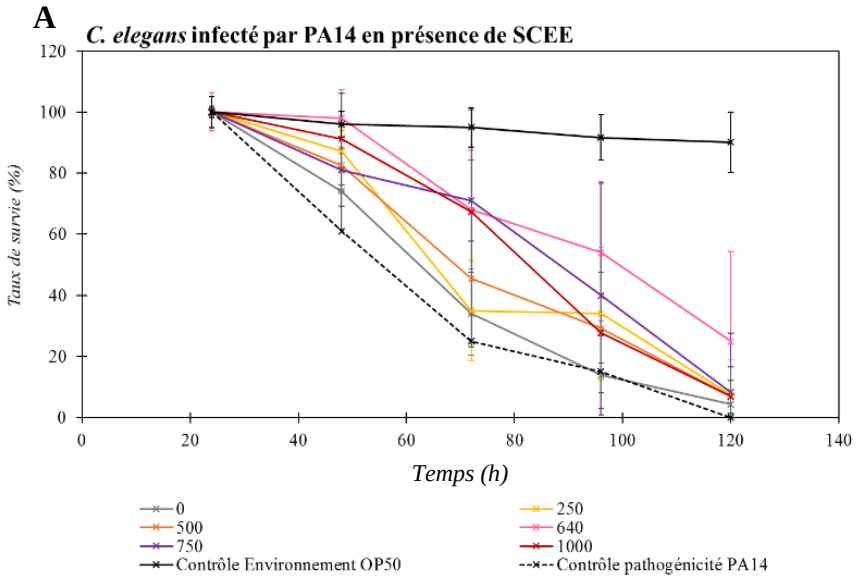
3.3.2.1. *Allongement de l'espérance de vie de* C. elegans (Cible 6)

Dans un premier temps, l'effet des extraits d'algues a été observé chez *C. elegans* infecté par PA14. Puis, dans un deuxième temps, pour vérifier la non- pathogénicité des algues et pour confirmer la mort des nématodes par PA14, les mêmes expériences ont été réalisées en absence de PA14.

Effet des extraits hydrosolubles de* S. chordalis *sur la survie de* C. elegans *infecté par PA14, au cours du temps.

Les nématodes de la souche N2 ont été mis sur un milieu de culture inoculé par la bactérie pathogène PA14 en présence d'extraits aqueux de *S. chordalis* à différentes concentrations (de 0 à 1 000 µg / mL). Le taux de survie des nématodes a été mesuré toutes les 24 heures jusqu'à la mort de tous les nématodes du « contrôle pathogénicité PA14 ». Dans ce contrôle, seuls les nématodes se trouvent sur le milieu inoculé avec PA14. D'après la **Figure 4. 46**, en présence d'extraits aqueux de *S. chordalis*, l'espérance de vie de *C. elegans* est affectée positivement, bien qu'il n'y ait pas de différence significative ($p < 0,05$) avec le contrôle de la pathogénicité de PA14 et le contrôle négatif (0 µg/mL, soit de l'eau distillée et stérilisée). Des résultats similaires ont été observés chez *C. elegans – PA14* en présence d'extraits aqueux de *C. crispus*, de κ-carraghénanes commerciaux, *d'A. nodosum* et de polymères riches en fucose de cette dernière algue (Kandasamy *et al*. 2012; Liu *et al.* 2013; Kandasamy *et al.* 2015). De même, des extraits aqueux de *C. crispus* allongent l'espérance de vie de *C. elegans* infecté par *Salmonella enteritidis* (Kulshreshtha *et al.* 2016b).

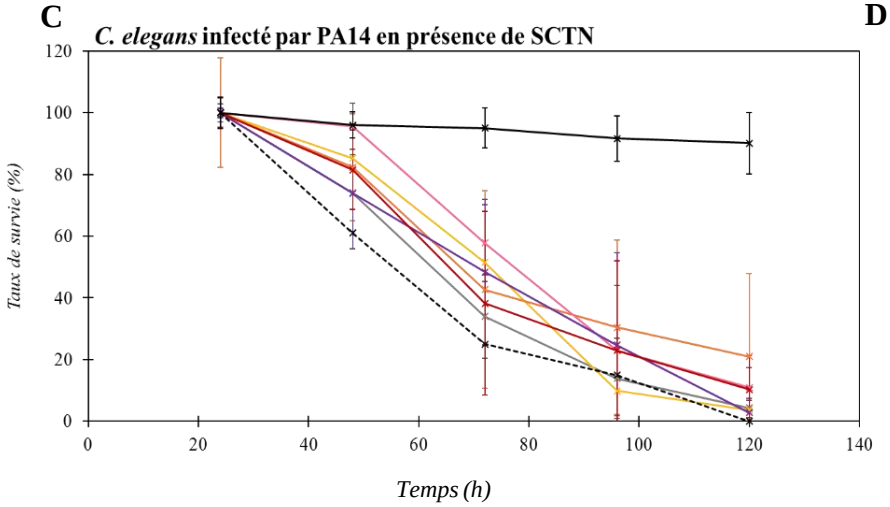
A



B

SCEE (µg / mL)	TL_{50} (h)	R^2
0	[b] 67,5 ± 4,1	0,97
250	[b] 74,7 ± 7,9	0,93
500	[b] 74,8 ± 1,7	0,98
640	[b] 95,5 ± 9,0	0,94
750	[b] 82,7 ± 6,3	0,96
1000	[b] 80,3 ± 4,5	0,96
Contrôle environnement	[a] 514,9 ± 23,4	0,97
Contrôle pathogénicité PA14	[b] 62,4 ± 6,0	0,97

C



D

SCTN (µg / mL)	TL_{50} (h)	R^2
0	[b] 67,5 ± 4,1	0,97
250	[b] 72,1 ± 4,3	0,96
500	[b] 78,0 ± 6,5	0,94
640	[b] 79,1 ± 5,6	0,95
750	[b] 72,0 ± 0,1	1,00
1000	[b] 72,6 ± 4,7	0,95
Contrôle environnement	[a] 532,2 ± 70,8	0,91
Contrôle pathogénicité PA14	[b] 62,4 ± 6,0	0,97

Légende :

*Sur les graphiques (**A et C**), les courbes représentent, au cours du temps, les évolutions du pourcentage de survie des nématodes infectés par PA14 en absence ou en présence d'extraits d'algues, à différentes concentrations en µg/mL, obtenus après l'action de l'Alcalase (**A**) ou sans enzyme (**C**). Le « Contrôle Environnement OP50 » correspond au taux de survie de nématodes sur un milieu de culture en présence d'OP50 pour vérifier l'état des nématodes sans infection.*
*Les tableaux (**B et D**) donnent le temps pendant lequel 50 % de la population des nématodes meurent (Temps Létal 50 %). Des tendances linaires ont été considérées, entre 24 et 120h, quand $R^2 > 0,5$. Les tests de significativité ont été réalisés dans ce contexte, qu'il faut alors prendre en considération. Les TL_{50} supérieurs à 120 h sont à titre indicatif selon l'hypothèse d'une tendance linéaire après 120h. Les valeurs sont des moyennes ± écart-type. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (n=9, p<0,05), selon le test de Fisher LSD (logiciel R, package agricolae de de Mendiburu 2016).*

Figure 4. 46 Effets d'extraits aqueux de *S. chordalis* obtenus après EAE (**A**) ou dans les mêmes conditions mais sans enzyme (**C**) sur l'espérance de vie de *C. elegans* infecté par PA14 au cours du temps et le temps létal 50% (TL_{50})(**B et D** respectivement).

Dans l'étude de Tan *et al.* (1999), une des premières publications mettant en évidence l'avantage de l'utilisation du système de pathogénicité *C. elegans-P. aeruginosa*, les chercheurs ont déterminé un temps léthal, TL_{50}, égal à 39,8 h, soit environ 20h de moins que le TL_{50} trouvé dans cette étude (**Figure 4. 46)**, (« contrôle de pathogénicité PA14 » ; 62,4h). De plus, le contrôle négatif (courbes en gris sur les graphiques **A** et **C** de la **Figure 4. 46** correspondant à de l'eau distillée et stérilisée) montre un TL_{50} de 67,5 h alors que Liu *et al.* (2013) et Kandasamy *et al.* (2015) ont trouvé un temps de survie de *C. elegans* compris entre 83,1h et 85,2h. Ces différences peuvent être expliquées par le protocole utilisé pour chaque étude. Tan *et al.* (1999) ont débuté leur expérience dite du « slow killing » en mettant en contact PA14 avec des nématodes en phase L4 alors que dans l'étude présenté dans ce manuscrit, les expériences ont été menées sur des nématodes adultes. La quantité et la virulence de la bactérie peuvent également différer d'une étude à l'autre de même que l'analyse des résultats (Liu *et al.* 2013; Kandasamy *et al.* 2015). Néanmoins, ces contrôles sont indispensables pour réaliser des analyses de comparaisons au sein d'une même étude. Parmi les études citées, le temps nécessaire à *PA14* pour tuer 50 % d'une population de *C. elegans* varie entre un et deux jours. Les nématodes infectés par *PA14* survivent alors entre 3 et 5 jours avant de mourir

Quels que soient les extraits d'algues appliqués (SCEE ou SCTN), les meilleurs résultats, c'est-à-dire les valeurs des TL_{50} les plus importantes, ont été obtenus avec les extraits concentrés à 640 µg /mL (95,5h avec SCEE et 79,1h avec SCTN). De plus, l'extrait qui est plus riche en matière organique, en sucres neutres, en protéines et en groupement sulfate produit par l'EAE, montre de nouveau une meilleure activité que l'extrait SCTN. Ces résultats sont cohérents avec ce qui a été trouvé en présence d'extraits aqueux de *Chondrus crispus*. En effet, le temps de survie de *C. elegans* est significativement plus important ($p < 0,0001$) après l'application d'un extrait de *C. crispus* à 500 µg/mL qu'après l'application de ce même extrait à 250 et à 750 µg/ mL. Aucune explication n'est donnée (Liu *et al.* 2013). Cependant, une hypothèse peut être émise en considérant les résultats anti-PA14 présentés sur la **Figure 4. 40**. Une corrélation positive entre l'activité directe antibactérienne et celle de la protection de *C. elegans* envers cette même bactérie serait logique et à envisager.

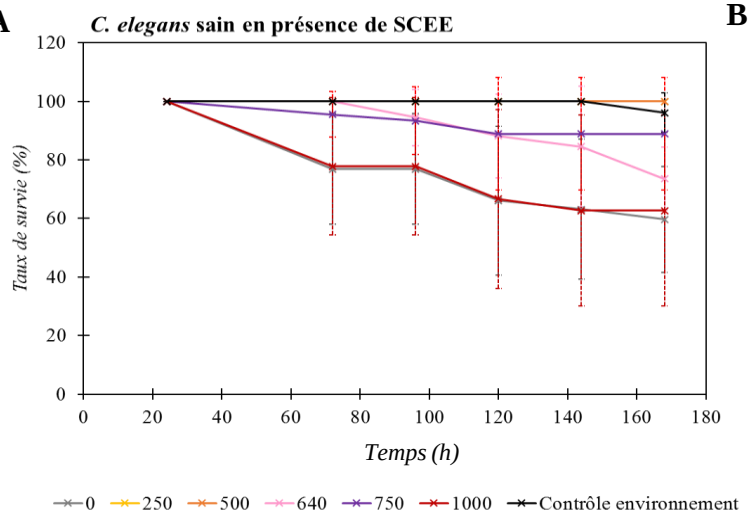
Avant d'analyser l'expression génique du système immunitaire du nématode infecté par PA14, la non-pathogénicité des extraits hydrosolubles sur *C. elegans* a été vérifiée.

Effet des extraits hydrosolubles de* S. chordalis *sur le taux de survie de* C. elegans *sain, au cours du temps.

Sur la **Figure 4. 47**, les taux de survie au cours du temps de *C. elegans,* cultivé dans son milieu de culture avec des extraits hydrosolubles d'algues, sont exposés. Comme pour les expériences précédentes, le taux de survie des nématodes a été mesuré toutes les 24 heures pendant 168h, soit une semaine, pendant laquelle très peu de vers sont morts avec ou sans extrait SCEE dans leur milieu de culture.

Les extraits SCEE et SCTN de 0 à 1 000 µg/ mL ne sont pas nocifs à l'encontre de *C. elegans*. Liu *et al.* (2013) ont aussi observé ce même résultat avec des extraits aqueux de *C. crispus*. Il est néanmoins constaté que l'apport d'eau sur les vers (courbes grises 0 µg / mL) a un impact mortel qui peut aller jusqu'à 40 % (taux de mortalité) après une semaine. *C. elegans* est sensible à l'humidité par sa petite taille, son petit volume (environ $3{,}8.10^6$ μm^3) et son squelette hydrostatique, qui le rendent vulnérable à la dessiccation mais aussi à la surhydratation, qui lui sont souvent létales (Russell *et al.* 2014). Ainsi, pendant le temps de l'expérience qui se déroule à 25°C dans une boîte de Pétri fermée, *C. elegans* peut s'affaiblir dans cette atmosphère riche en humidité. Comparé au contrôle négatif (eau), les extraits aqueux d'algues permettent des taux de survie plus importants, montrant un aperçu de leur activité protectrice dans l'allongement de l'espérance de vie du ver. Les extraits peuvent également représenter une source nutritionnelle et/ou hygroscopiques pour le nématode. Pour comprendre l'origine de cette activité bénéfique, l'analyse de l'expression des gènes du système immunitaire de *C. elegans* a été réalisée.

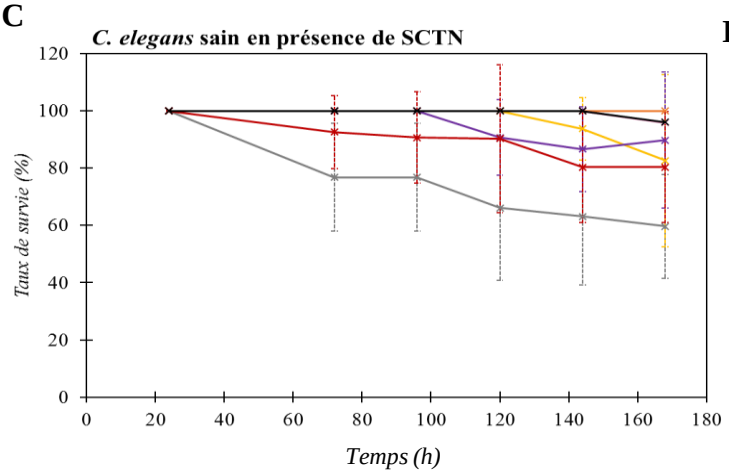
A



B

SCEE (µg / mL)		TL_{50} (h)	R^2
0	b	191,0 ± 13,2	0,93
250		> 168	
500		> 168	
640	ab	323,1 ± 46	0,86
750	a	607,1 ± 52,1	0,91
1000	b	197,1 ± 17,1	0,91
Contrôle environnement		> 168	

C



D

SCTN (µg / mL)		TL_{50} (h)	R^2
0	b	191,0 ± 13	0,93
250	a	558,9 ± 350	0,56
500		> 168	
640		> 168	
750	ab	552,2 ± 232	0,70
1000	ab	382,7 ± 44,2	0,92
Contrôle environnement		> 168	

Légende :

*Sur les graphiques (**A et C**), les courbes représentent, au cours du temps, les évolutions du pourcentage de survie des nématodes en absence ou en présence d'extraits d'algues à différentes concentrations en µg / mL, obtenus après l'action de l'Alcalase (**A**) ou sans enzyme (**C**). Le « Contrôle Environnement OP50 » correspond au taux de survie de nématodes sur un milieu de culture en présence d'OP50 pour vérifier l'état des nématodes dans l'environnement de l'expérience.*
*Les tableaux (**B et D**) donnent le temps pendant lequel 50 % de la population des nématodes meurent (Temps Létal 50 %). Des tendances linaires ont été considérées, entre 24 et 168h, quand R^2 > 0,5. Les tests de significativité ont été réalisés dans ce contexte, qu'il faut alors prendre en considération. Les TL_{50} supérieurs à 168h sont à titre indicatif selon l'hypothèse d'une tendance linéaire après 168h. Les valeurs sont des moyennes ± écart-type. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (n=9, p<0,05), selon le test de Fisher LSD (logiciel R, package agricolae de de Mendiburu 2016).*

Figure 4. 47 Effets d'extrait aqueux de *S. chordalis* obtenus après EAE (**A**) ou dans les mêmes conditions mais sans enzyme (**C**) sur la santé de *C. elegans*, au cours du temps et leur temps létal 50% (**B et D** respectivement).

3.3.2.2. Analyse de l'expression des gènes du système immunitaire de C. elegans *sain et infecté par* P. aeruginosa (Cible 7).

D'après l'ensemble des résultats présentés précédemment, les extraits hydrosolubles de *S. chordalis* à 640 µg / mL ont été retenus pour l'analyse de l'expression génique du système immunitaire (SI) de *C. elegans.* Comme pour l'analyse de l'expression des gènes des facteurs de virulence et du QS de PA14, celle de l'expression des gènes du SI de *C. elegans* sain et infecté s'est basée sur les collectes d'ARN des nématodes après 6h et après 24h d'incubation.

Dans cette analyse, l'échantillon « calibrateur » fixé à 1, correspond à *C. elegans* sur son milieu de culture après 6h d'incubation avec sa nourriture *OP50* et avec de l'eau (témoin). C'est par rapport à cette condition que l'effet de PA14 et des extraits hydrosolubles d'algues sur les nématodes ont été comparés après 6h et après 24h de contact. Le **Tableau IV. XV** présente les valeurs des facteurs multiplicatifs de l'expression quantitative des gènes du SI de *C. elegans* par rapport à l'expression de ces mêmes gènes chez le « calibrateur ». Dans un premier temps, le **Tableau IV. XV** a pour intérêt de comparer sur la durée l'expression génique du SI de *C. elegans* dans sa globalité. Dans un deuxième temps, les expressions spécifiques et remarquables des gènes analysés à un temps donné sont détaillées.

Tableau IV. XV Expression quantitative de 7 gènes du SI de *C. elegans* sain et infecté par PA14 après 6h et 24h d'incubation par rapport à *C. elegans* en présence d'OP50 et d'eau après 6h de contact.

			6h					24h					
			OP50		*PA14*			*OP50*			*PA14*		
		Contrôle (calibrateur)	SCEE	SCTN	Contrôle	SCEE	SCTN	Contrôle	SCEE	SCTN	Contrôle	SCEE	SCTN
zk6.7	*Acquisition de nutriments (intestin)*	1,0 ± 0,4	3,2 ± 1,1	1,6 ± 0,3	5,5 ± 0,4	10,8 ± 3,7	6,7 ± 0,3	1,9 ± 0,9	2,3 ± 0,3	-47,1 ± 0,0	4,3 ± 0,4	7,2 ± 0,8	2,1 ± 1
lys-1	*Reconnaît et détruit la paroi bactérienne (intestin et neurone)*	1,0 ± 0,0	1,9 ± 0,3	-1,6 ± 0,2	8,2 ± 1,3	3,0 ± 0,1	1,0 ± 0,5	5,9 ± 0,4	5,6 ± 0,9	-3,1 ± 0,1	-89,8 ± 0,0	-1,7 ± 0,1	-12,8 ± 0,1
f28d1.3	*Reconnaît, induit réponses et intervient dans le contrôle de la longévité (inconnu)*	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,2	-13,4 ± 0,0	2,5 ± 0,5	9,0 ± 2,6	6,5 ± 0,3	-2,2 ± 0,2	-2,3 ± 0,1	- (>100) ± 0,0	2,3 ± 0,1	4,8 ± 0,3	4,1 ± 1,4
abf-1	*Intervient dans la production de protéines de surface antimicrobiennes (intestin)*	1,0 ± 2,6	1,5 ± 4,2	- (>100) ± 0,1	1,5 ± 3,5	1,3 ± 2,0	-1,3 ± 2,3	-1,4 ± 6,1	-2,2 ± 0,8	-2,1 ± 0,9	1,1 ± 2,3	-1,2 ± 1,1	1,9 ± 5,3
f38a1.5	*Reconnaît la surface, notamment les LPS des bactéries (rectum)*	1,0 ± 0,4	1,8 ± 0,8	-8,3 ± 0,3	4,5 ± 2,0	5,3 ± 0,1	5,2 ± 1,2	-2,7 ± 0,1	1,2 ± 0,6	- (>100) ± 0,0	5,2 ± 1,1	4,8 ± 0,4	4,3 ± 1
t20g5.7	*Reconnaît et intervient dans le contrôle de la longévité (inconnu)*	1,0 ± 0,5	1,1 ± 0,4	1,5 ± 0,7	1,7 ± 0,6	-1,1 ± 0,2	-1,9 ± 0,5	-2,7 ± 0,8	-1,4 ± 0,5	- (>100) ± 0,0	-4,5 ± 0,4	-2,1 ± 0,8	-2,3 ± 0,2
spp-1	*Intervient dans la production de protéines lysosomales (intestin)*	1,0 ± 0,5	3,1 ± 1,5	1,3 ± 0,1	5,1 ± 0,4	9,5 ± 3,9	6,8 ± 2,3	1,4 ± 0,3	1,6 ± 0,4	- (>100) ± 0,0	3,8 ± 0,4	6,2 ± 0,3	2,2 ± 0,2

Légende :

L'analyse qPCR a été réalisée suivant la méthode du ΔΔCt en utilisant le gène ama-1 comme gène endogène. L'expression quantitative des différents gènes a été analysée en rapport avec l'expression de ces mêmes gènes chez le « calibrateur », soit quand C. elegans se trouve dans des conditions non défavorables, en présence d'OP50 et d'eau après 6h de contact.
SCEE : Extrait aqueux de S. chordalis obtenu après EAE (Alcalase 2,5 %, 3h à 50 °C)
SCTN : Extrait aqueux de S. chordalis obtenu dans les mêmes conditions sans ajout d'enzyme.
Le contrôle en présence d'OP50 (C. elegans sain) correspond à des nématodes sur leur milieu de culture en présence d'E. coli OP50 et d'eau distillée et stérilisée (solvant d'extraction).
Le contrôle en présence de PA14 (C. elegans infecté) correspond à des nématodes sur leur milieu de culture en présence de P. aeruginosa PA14 et d'eau distillée et stérilisée (solvant d'extraction).
Les nombres dans les cases oranges correspondent à des facteurs multiplicatifs positifs d'expression de gènes surexprimés (>2) par rapport au contrôle « calibrateur ».
Les nombres dans les cases bleues correspondent à des facteurs multiplicatifs négatifs d'expression de gènes réprimés (>2) par rapport à leur contrôle « calibrateur ».

Effet des extraits hydrosolubles sur le SI de* C. elegans *dans la durée.

De nombreuses cases du **Tableau IV. XV** sont oranges, ce qui signifie que beaucoup de gènes sont surexprimés d'un facteur multiplicatif supérieur à 2 par rapport au « calibrateur ». En outre, comme attendu, les gènes du SI sont particulièrement surexprimés lorsque le nématode est infecté par la bactérie pathogène, que ce soit après 6h ou après 24h de contact (Mallo *et al.* 2002). Bien qu'après 24h, la surexpression de la plupart de ces gènes diminue. Les extraits d'algues et en particulier l'extrait SCEE, montrent des facteurs multiplicatifs de surexpression plus importants notamment pour les gènes *zk6.7, f28d1.3 et spp-1* et dans une moindre mesure pour le gène *f38a1.5*. Ainsi, ces extraits stimulent et renforcent les défenses du SI de *C. elegans* quand ce dernier est infecté.

En présence de sa nourriture OP50 et en présence d'extraits hydrosolubles de *S. chordalis*, le SI des nématodes ne varie pas beaucoup après 6h de contact. Deux gènes sur sept sont surexprimés en présence de SCEE, il s'agit des gènes *zk6.7* et *spp-1*. Après 24h de contact avec OP50, aucune activité immunostimulante des extraits d'algues n'est perceptible comparé à leur contrôle respectif. Une répression de l'expression des gènes du SI est même remarquable en présence de SCTN riche en matière minérale, ce qui n'empêche pas le nématode de vivre « normalement » sans que sa vie ne soit menacée (**Figure 4. 47 C**).

Analyse détaillée de l'expression des gènes du SI à un temps donné.

La régulation des gènes de réponse du SI de *C. elegans* peut être responsable de la protection apportée par les extraits d'algues contre l'infection à PA14. Les sept gènes analysés interviennent dans l'acquisition de nutriments, dans la reconnaissance des bactéries pathogènes, dans l'action antibactérienne et dans le contrôle de la longévité. Ils sont régulés par différentes voies de signalisation cellulaire (*Cf.* Introduction **Figure 4. 13**, page 261).

Au bout de 6h de contact (**Tableau IV. XV**), les gènes *zk6.7* (3,2) et *spp-1* (3,1) sont surexprimés quand de l'extrait SCEE est ajouté sur le milieu de culture de *C. elegans* non infecté, par rapport au contrôle « calibrateur ». La surexpression de ces deux gènes, associés à l'acquisition et à la digestion intracellulaire (production de protéines lysosomales), pourrait mettre en évidence un rôle nutritif voire fonctionnel et immunostimulant de l'extrait de *S. chordalis*. La matière organique, en plus grande quantité dans l'extrait SCEE, pourrait être

responsable de cette surexpression puisque l'extrait SCTN ne montre pas de tels résultats et inhibe même certains gènes de l'immunité du ver.

Dans les conditions d'infection, en présence ou non d'extraits algaux, tous les gènes étudiés de *C. elegans*, exceptés *abf-1* et *t20g5.7*, sont surexprimés de 2,5 à 10,8 fois plus que chez le contrôle calibrateur. Les extraits algaux ont un impact modulant positivement les gènes *zk6.7*, *f28d1.3* et *spp-1* qui sont fortement surexprimés par rapport au contrôle des conditions d'infection (Eau). En outre, la surexpression des gènes du SI de *C. elegans* est toujours plus importante en présence de l'extrait SCEE qu'en présence de l'extrait SCTN.

Après 24h de contact (**Tableau IV. XV,** page 382), trois gènes sur sept de *C. elegans* infecté par PA14 sont surexprimés en présence de l'extrait SCEE (*zk6.7, f28d1.3 et spp-1*). Dans des conditions de non-infection, l'effet stimulant des extraits d'algues sur le SI s'est dissipé (les cases bleues ou blanches dominent).

Dans l'étude de Liu *et al*. (2013), la même tendance a été observée. Après 6 h d'infection de *C. elegans* avec PA14 et en présence de l'extrait aqueux de *C. crispus* à 500 µg / mL, les mêmes gènes à ceux analysés dans cette présente étude sont surexprimés excepté le gène *t20g5.7.* Après 24h, seule la moitié des gènes restaient surexprimés et en particulier les gènes *f28d1.3*, *zk6.7* et *lys-1* Cette surexpression serait encore plus importante après l'application de carraghénanes (Liu *et al.* 2013). Kulshreshtha *et al.* (2015) ont montré que le gène *spp-1* de *C. elegans* infecté par *S. enteritis* était 12 fois plus surexprimé en présence d'un extrait aqueux de *C. crispus* par rapport au contrôle (Kulshreshtha *et al.* 2016a). S'ajoutent les travaux de Kandasamy *et al*. (2012) qui ont mesuré une expression quantitativement plus importante du gène *spp-1* comparé aux autres gènes analysés du SI de *C. elegans* infecté par PA14 en présence d'extrait aqueux *d'A. nodosum.*

Les deux gènes *spp-1* et *f28d1.3* ainsi que le gène *lys-1* sont modulés par la même voie de signalisation cellulaire transcriptionnelle du DAF-2/DAF-16. Cette voie impliquée dans les défenses antibactériennes régule également la longévité de *C. elegans.* Des études ont monté qu'elle était activée par les bactéries pathogènes (Apidianakis *et al.* 2005; Evans *et al.* 2008). Activée, cette voie permet la translocation du facteur de transcription DAF-16 dans les noyaux des cellules de *C. elegans.* Quand le facteur de transcription DAF-16 se trouve dans le noyau de la cellule, il active l'expression des gènes antibactériens. Au cours du temps, la surexpression

de ces gènes par rapport au contrôle des conditions d'infection (eau) diminue (**Tableau IV. XV**). La suppression du SI peut être une stratégie pour la survie de la bactérie pathogène.

Dans la présente étude et comme l'ont montré les extraits de *C. crispus* dans les études de Liu *et al*. (2013) et de Kulshreshtha *et al.* (2015), il apparaît évident que les extraits hydrosolubles de *S. chordalis*, en particulier l'extrait SCEE, stimulent le SI de *C. elegans* et/ou contourne la suppression du SI par la bactérie pathogène. DAf-16 régule positivement l'expression de gènes codant deux sortes de protéines qui sont importantes pour la défense du nématode : les effecteurs antimicrobiens et les protéines de résistance au stress. Les gènes *spp-1*, *lys-1*, *f28d1.3* et *t20g5.7* interviennent dans la production de protéines effectrices antibactériennes (Shivers *et al.* 2008).

Le gène *spp-1* intervient dans la formation de caenopores (Roeder *et al.* 2010). Ces derniers correspondent à une famille de protéines avec des domaines protéiques saposines utilisées comme activateurs d'enzymes lysosomales. Les caenopores ont un rôle dans la perméabilité membranaire, dans la formation de pores, mais aussi possèdent un rôle antibactérien. Le gène *spp-1* est connu comme étant un gène qui protège *C. elegans* contre *P. aeruginosa* (Sun *et al.* 2015). Toutes les études mentionnées ci-dessus mettent en avant des résultats similaires, ce qui appuie l'effet bénéfique des extraits d'algues sur le SI de *C. elegans* infecté par *P. aeruginosa*.

Le gène *f28d1.3* code pour une protéine effectrice antimicrobienne de la famille des thaumatines, qui détruit la membrane bactérienne des bactéries.

Quant au gène *t20g5.7*, il code pour une protéine homologue à une protéine antimicrobienne trouvée chez les plantes infectée par des champignons phytopathogènes (Shivers *et al*. 2008), c'est pourquoi il n'est pas beaucoup exprimé à l'encontre de PA14.

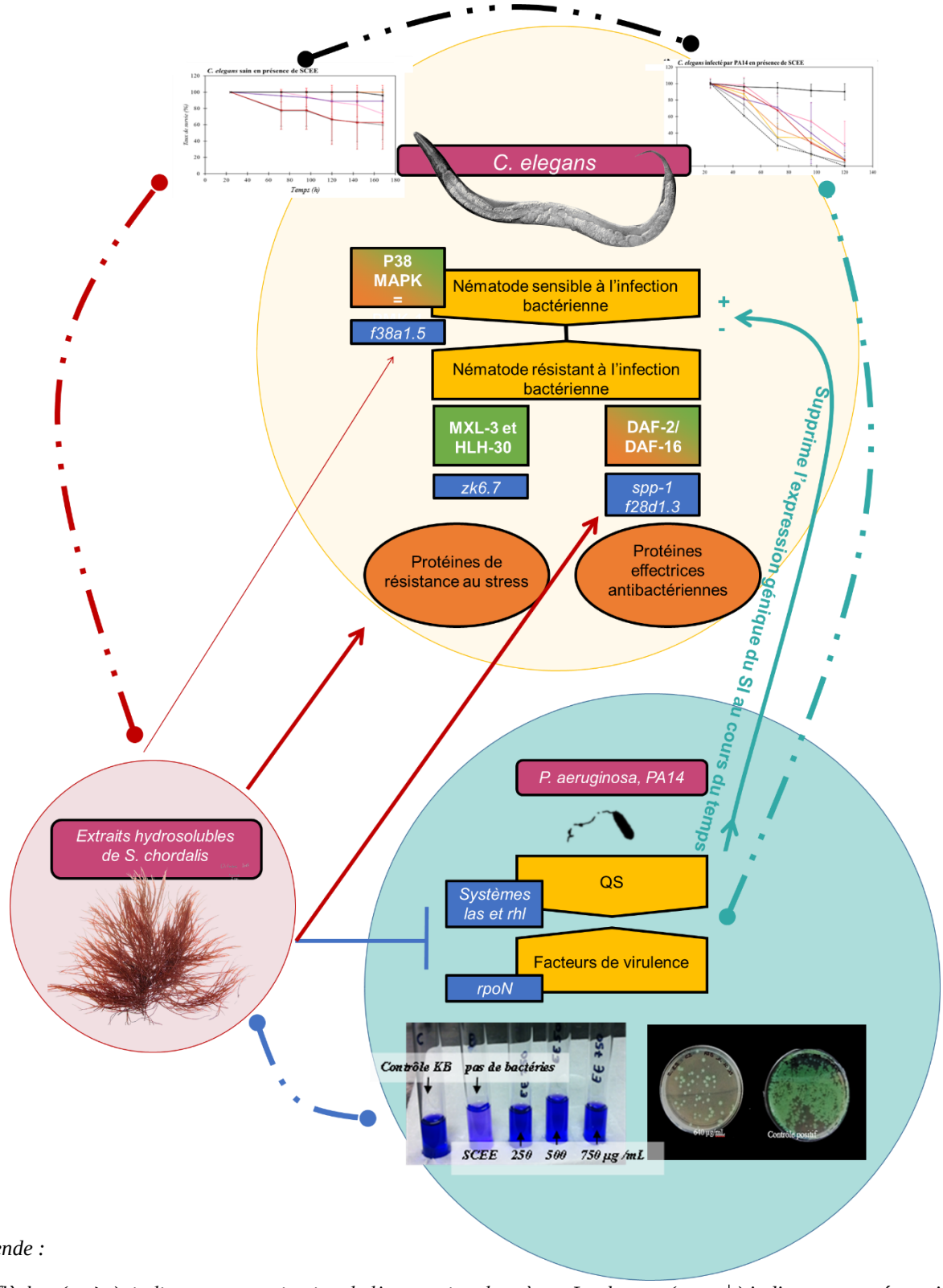
Le gène *zk6.7*, impliqué dans la synthèse d'une lipase et dans l'acquisition de nutriments est surexprimé. La protéine dont la traduction est codée par ce gène possède une grande homologie avec les lipases gastriques trouvées chez les vertébrés. Comme par exemple chez *Drosophila* chez qui, il a été démontré que 4 gènes homologues à *zk6.7* sont induits quand le système immunitaire est activé (Mallo *et al.* 2002).

Enfin, le gène *f38a1.5* de *C. elegans* est intéressant dans le sens où il est toujours surexprimé quand *C. elegans* est infecté par PA14. Cependant, aucun effet des extraits hydrosolubles d'algues n'est visible comparé au contrôle en condition d'infection que ça soit après 6h ou après 24h d'infection. Ce gène est activé par la voie de signalisation transcriptionnelle du P38 MAPK ou du PMK-1. Cette voie avec celle du DAF-2/DAF-16 contrôlent l'immunité innée et la longévité de *C. elegans.* La voie P38 MAPK influence la sensitivité du nématode à l'infection, tandis que la voie du DAF-2/DAF-16 enclenche la résistance face au pathogène. Ainsi, les deux fonctionnent ensemble et c'est pourquoi *f38a1.5* est surexprimé lors d'une infection à PA14. La voie du DAF-2/DAF-16 nécessite l'activation au préalable de la voie du P38 MAPK (Troemel *et al.* 2006).

3.3.3. Conclusion

En utilisant le modèle d'interaction hôte -pathogène, *C. elegans – P. aeruginosa* et en prenant en considération l'ensemble des résultats, il peut être avancé que les extraits hydrosolubles de *S. chordalis,* en particulier celui obtenu par EAE, ont un effet anti-*P. aeruginosa* significatif ainsi qu'un effet positif sur l'immunité de *C. elegans* infecté par cette bactérie, ce qui augmente son temps de survie.

Un bilan des interactions et de la stimulation du système immunitaire de *C. elegans* infecté par *P. aeruginosa* en présence d'extraits hydrosolubles de *S. chordalis* est proposé sur la **Figure 4. 48.** Sur cette **Figure 4. 48,** seuls les gènes du SI de *C. elegans* affectés positivement et les gènes de virulence et du QS de *P. aeruginosa* affectés négativement en présence d'extraits hydrosolubles de *S. chordalis* obtenu après EAE sont mis en avant. Les voies de signalisation cellulaires les plus touchées par ces interactions entre les trois espèces étudiées sont également indiquées sur la **Figure 4. 48**.



Légende :

Les flèches (⟶) indiquent une activation de l'expression des gènes. Les barres (——┤) indiquent une répression de l'expression des gènes. L'épaisseur des flèches et des barres représente l'intensité de la régulation génique. Les interactions sont matérialisées par des pointillés et les couleurs sont représentatives des espèces. Le vert pour P. aeruginosa *et* C. elegans, *le rouge pour* S. chordalis *et* C. elegans, *le bleu pour* P. aeruginosa *et* S. chordalis *et le noir pour les trois en même temps.*

Figure 4. 48 Bilan de l'interaction entre *C. elegans* et *P. aeruginosa* en présence d'extraits hydrosolubles de *S. chordalis.*

Les gènes sélectionnés dans cette étude sont régulés par quatre voies distinctes de signalisation. Néanmoins, il serait intéressant d'envisager d'étudier plus de gènes intervenant dans d'autres voies de signalisation afin d'approfondir la compréhension des interactions. La modulation du SI de *C. elegans* par les extraits de *S. chordalis* résulte de sa composition biochimique. Parmi les composés potentiellement actifs présents dans les extraits, les carraghénanes peuvent être de bons candidats (Liu *et al.* 2013). D'autres études sont nécessaires afin d'élucider le mécanisme d'action de cette modulation du SI de *C. elegans* par les extraits d'algues.

Une fois de plus, les extraits d'algues peuvent représenter une bonne source nutritionnelle et fonctionnelle améliorant l'effet prébiotique (au niveau du système digestif, notamment dans l'intestin) et immunostimulant du SI des animaux. Les polyssacharides tels que les carraghénanes résistants à la digestion servent de nutriments à la flore intestinale probiotiques du système digestif des animaux. La complémentation nutritionnelle et fonctionnelle de prébiotiques et/ ou probiotiques, apportée par les extraits de *S. chordalis* peut aider à maintenir un ratio favorable des bactéries bénéfiques sur les bactéries néfastes dans le transit intestinal de l'hôte. Cet apport bénéfique a déjà été prouvé avec des extraits aqueux de *C. crispus* au niveau de la microflore de l'intestin de rats (Liu *et al.* 2015). Les extraits hydrosolubles de Gigartinales pourraient être alors donnés aux animaux, mais aussi aux plantes en prévention de maladies infectieuses.

Conclusion générale et perspectives

Depuis plus d'une décennie, des arrivées massives périodiques de macroalgues rouges causent de réels problèmes économiques et écologiques pour les communes du littoral breton. Aujourd'hui, les algues d'échouages comme *Solieria chordalis* sont encore peu valorisées. Elles peuvent être stockées sur des terrains communaux ou en pied de falaises (Neveu 2016) ou alors être utilisées en tant que fertilisants dans les champs agricoles des communes aux alentours.

L'objectif de ces travaux de recherche a été d'étudier la macroalgue rouge *S. chordalis,* dans l'optique de proposer une gestion rationnelle et des perspectives d'applications notamment par la production d'extraits hydrosolubles actifs.

Comprendre les proliférations de *S. chordalis* ; anticiper la présence de l'algue dans un lieu donné et ses échouages massifs en fonction des paramètres environnementaux ; déterminer son taux de matière sèche ainsi que sa composition biochimique en fonction des saisons ; produire des extraits hydrosolubles riches en composés actifs par un procédé éco-responsable ; mesurer les impacts de la saisonnalité et du procédé d'extraction sur les extraits algaux obtenus ont été des éléments d'interrogations, auxquelles il est désormais possible de répondre.

Les proliférations de *S. chordalis* sont annuelles et récurrentes pendant la période estivale. Quatre raisons expliquent ce phénomène d'échouage : un temps agité associé à des pluies et du vent, un milieu marin riche en éléments nutritifs (nitrates, phosphate), une géomorphologie particulière permettant une zone semi-abritée et des algues matures et fragiles, liées à leur cycle de vie.

Pendant une période de deux ans, le suivi mensuel des caractéristiques biochimiques et biologiques de *S. chordalis* de la Presqu'île de Rhuys a montré une variation saisonnière de la morphologie à la fois macro- et microscopique, de son taux de matière sèche ainsi que dans sa composition biochimique. Néanmoins, ces variations sont reproductibles d'année en année, ce

qui appuie l'idée d'un cycle de vie annuelle de l'algue. En été, le métabolisme de l'espèce est orienté vers la production de glucides. À la fin de l'automne et en hiver, après les échouages, il est davantage orienté vers la synthèse de protéines ou de composés azotés tels que par exemple les phycobiliprotéines et les mycosporines like amino-acides. En outre, deux types de croissance de l'algue ont été caractérisés. Une phase de croissance lente a lieu à partir de la fin de l'été jusqu'en hiver. Pendant cette période, le taux de matière sèche de l'algue augmente progressivement (de 11,4 à 15,6 % de la matière fraîche de l'algue). La synthèse de composés est intense (protéines et polysaccharides pariétaux présentant probablement des précurseurs et/ou des hybrides). Alors qu'à partir de la fin de l'hiver jusqu'au printemps, une phase de croissance rapide prend place. La synthèse de composés se poursuit et le taux de matière sèche est élevé. Puis ce dernier diminue car l'algue se développe en taille et ses cellules se remplissent d'eau. La présence de nitrates dans l'eau de mer est un facteur environnemental qui a son importance. Une corrélation positive significative ($p<0,05$) entre le taux de matière sèche de l'algue et la présence de nitrate dans l'eau de mer a été mesurée.

L'étude des effets de la saisonnalité sur *S. chordalis* a apporté de nombreuses informations concernant l'éco-physiologie et les conditions de vie de l'algue. Pour une gestion rationnelle et durable, il est primordial de réaliser ce genre d'étude avant d'exploiter une biomasse naturelle vivante, sujette aux variations environnementales. S'il s'avérait qu'un des composés de cette matière première soit intéressant à produire en grande quantité dans le but de le commercialiser, des solutions seraient alors envisagées, comme une collecte saisonnière et la production de molécules à l'échelle industrielle en bioréacteurs de gros volumes. La question de l'accès à la biomasse reste d'actualité. Comment s'affranchir de potentiels échouages et de collectes ? L'aquaculture reste aujourd'hui l'une des voies majeures de gestion durable d'une biomasse naturelle. Pour une stabilisation voire une standardisation de la biomasse, *S. chordalis* pourrait être cultivée selon des paramètres extérieurs contrôlés dans la perspective d'extraire des métabolites d'intérêt en grande quantité.

L'optimisation des conditions de l'Extraction Assistée par Enzymes en suivant une méthodologie des surfaces de réponse a constitué une importante étude réalisée pendant ce doctorat. Ce bioprocédé d'extraction est une alternative prometteuse pour la production d'extraits et/ou de composés actifs tout en respectant l'environnement. En effet, des enzymes produites par des microorganismes sont utilisées afin de dégrader les parois cellulaires et rompre l'intégrité cellulaire des algues. Les métabolites de la paroi et du milieu intracellulaire

de l'algue sont alors libérés dans de l'eau, ce qui permet d'envisager des applications dans les domaines de la santé et de la nutrition des plantes, des animaux et pourquoi pas en santé humaine.

Les résultats de cette étude ont montré que l'endo-protéase Alcalase permet d'augmenter significativement de 30 % la quantité de composés hydrosolubles disponibles et anti-herpétiques de *S. chordalis* (CE_{50} de 86,0 µg / mL) par rapport à une extraction sans enzyme (CE_{50} de 170,7 µg / mL). En outre, des corrélations positives entre l'activité anti-herpétique et les teneurs en sucres totaux et en groupements sulfates ont été démontrées. Le rendement d'extraction augmente de manière non-significative de 4 % après avoir optimisé les conditions d'extraction. L'optimisation confirme l'efficacité de l'extraction assistée par l'Alcalase par la répétabilité des rendements d'extraction. Près de 60 % de la matière sèche de l'algue a été liquéfiée et solubilisée dans l'eau. De plus, cette étude a permis de faire ressortir quelques conditions d'extraction inattendues et intéressantes dans la production d'extraits actifs avec des coûts de production et d'énergie plus faibles. Par exemple, à des températures d'extraction plus basses (25°C) que celles indiquées comme étant optimales pour les enzymes (50°C) et en ajoutant une quantité plus faible d'enzymes (2,5 % E/S), la production d'extraits hydrosolubles anti-herpétiques resterait satisfaisante.

En perspectives de ces travaux de recherche, des expériences devront être complétées au laboratoire pour confirmer le modèle mathématique proposant des conditions douces d'extraction en présence d'Alcalase pour une production économique et écologique d'extraits hydrosolubles anti-herpétiques. A quoi s'ajoutent d'autres recherches expérimentales et économiques à réaliser sur le passage de ces expériences menées à l'échelle du laboratoire aux échelles pilote voire industrielle.

Des études sur les impacts de la saisonnalité et de l'Extraction Assistée par Enzymes ont également été réalisées sur des métabolites d'intérêt de *S. chordalis* notamment sur ses polysaccharides sulfatés. Les principaux résultats ont montré que les polysaccharides ne sont pas cytotoxiques (CC_{50} > 200 µg / mL) et possèdent une activité anti-herpétique an accord avec celles trouvées dans la littérature (CE_{50} < 10,5 µg / mL).
La saisonnalité n'a pas montré d'influence significative, bien que l'activité antivirale semble liée à des conditions de croissance de l'algue dans un milieu caractérisé par une température de l'eau de mer supérieure à 12°C, de fortes pluies et par la présence d'organismes marins.

Les polysaccharides isolés des extraits hydrosolubles ont montré des efficacités anti-herpétiques de 20 à 100 fois plus importantes que celles évaluées sur les extraits. En outre, l'α-amylase Termamyl, active à 90°C, favorise la lyse de l'amidon floridéen, ce qui améliore l'accessibilité des composés anti-herpétiques.

Un fractionnement bio-guidé consistant en une extraction assistée par 2,8 % Alcalase, à 50 °C, pendant 225 min, suivie d'une étape de purification des polysaccharides en présence de Termamyl, à 90°C pendant au moins 120 minutes serait à réaliser pour vérifier la production optimisée de polysaccharides à activités anti-herpétiques.

Enfin, une dernière étude effectuée en collaboration avec l'Université de Dalhousie au Canada a consisté à mettre en contact des extraits hydrosolubles de *S. chordalis* obtenus sans et avec l'action de l'Alcalase, la bactérie virulente *P. aeruginosa* et le nématode *C. elegans*.

En appliquant des extraits hydrosolubles de *S. chordalis* sur le modèle d'interaction de pathogénicité *C. elegans – P. aeruginosa*, il a été mis en évidence des changements comportementaux et génétiques de *C. elegans* et de *P. aeruginosa.* En effet, une inhibition de la croissance bactérienne et une répression de l'expression de certains gènes contribuant à la virulence de la bactérie ont été évaluées (*rpoN* et dans une moindre mesure des gènes des systèmes *las* et *rhl* intervenant dans le *quorum sensing*). De plus, l'application d'extraits hydrosolubles de *S. chordalis* allonge l'espérance de vie du nématode infecté et permet la surexpression de certains gènes de son immunité innée (*zk6.7, spp-1, f28d1.3* et *f38a1.5*).

L'effet du procédé d'extraction ne semble pas montrer de différence significative dans la protection de *C. elegans* infecté par *P. aeruginosa*. Néanmoins, les résultats observés après l'application de l'extrait hydrosoluble produit par l'action de l'Alcalase (SCEE) montraient souvent plus d'efficacité. Un lien avec la composition biochimique plus riche en matière organique (sucres totaux, groupements sulfates et protéines) de cet extrait peut être suggéré.

Lors de la conduite de futurs travaux, il serait intéressant d'élucider le mécanisme d'action des composés actifs isolés de ces extraits de *S. chordalis* sur la modulation observée du système immunitaire de *C. elegans* infecté par *P. aeruginosa*.

En conclusion, les extraits hydrosolubles de *S. chordalis* représentent une source naturelle et disponible avec des propriétés nutritionnelle et fonctionnelle. En effet, ils peuvent être utilisés pour leur composition biochimique. Les extraits sont riches en matière minérale, en protéines constituées d'acides aminés essentiels et en fibres glucidiques. De plus, ils ont montré des activités antivirale, antibactérienne et immunostimulante. Ainsi, la complémentation nutritionnelle et fonctionnelle apportée par ces extraits de *S. chordalis,* peut être utilisée en prévention de maladies infectieuses chez les plantes et chez les animaux. En France, pour pouvoir appliquer ces extraits chez l'homme, il faudrait que des travaux soient entrepris afin d'inscrire *S. chordalis* sur la liste des algues éligibles à la consommation alimentaire.

La disponibilité, l'écophysiologie et la qualité de la matière première de *S. chordalis,* à partir de laquelle sont produits les extraits hydrosolubles*,* sont des éléments de base importants pour envisager de tels usages avec une valeur ajoutée. De même, l'impact des méthodes d'extraction et de purification, éco-responsables, sont à prendre en compte dans les activités biologiques recherchées.

Références bibliographiques

A

ADEME, Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie (2014) Évaluation du gisement potentiel de ressources algales pour l'e'énergie et la chimie en France à l'horizon 2030. Rapport final.

Agardh, J.G. (1842). Algae maris Mediterranei et Adriatici, observationes in diagnosin specierum et dispositionem generum. pp. [i]-x, 1-164. Parisis [Paris]: Apud Fortin, Masson et Cie.

Algaebase © M.D. Guiry. (1996 – 2016). URL : http://www.algaebase.org/

Amine, A., Moscone, D., & Palleschi, G. (2000). Rapid Determination of Lactulose in Milk Using Seliwanoff's Reaction. *Analytical Letters*, *33*(1), 125–135. doi:10.1080/00032710008543041

Amor BB (2008) Thèse : Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs : texturation par Détente Instantanée Controlée DIC. Université de la Rochelle

Amsler CD, ed (2008) Algal Chemical Ecology. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg

Angell AR, Mata L, Nys R de, Paul NA (2015) The protein content of seaweeds: a universal nitrogen-to-protein conversion factor of five. J Appl Phycol 1–14

Anger Emilie (2015) L'encadrement juridique relatif à l'exploitation des algues. Rapport de stage 2015 M2. Université Bretagne Sud

Apidianakis, Y., Mindrinos, M. N., Xiao, W., Lau, G. W., Baldini, R. L., Davis, R. W., & Rahme, L. G. (2005). Profiling early infection responses: *Pseudomonas aeruginosa* eludes host defenses by suppressing antimicrobial peptide gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(7), 2573–2578. http://doi.org/10.1073/pnas.0409588102

Ar Gall, E., Cornec, L., Deslandes, E. (2008). Oligocarrageenans and tissue-dependant oxidative burst in *Solieria chordalis* (Rhodophyceae, Gigartinales). *Phycological Research*, *56*(1), 7–12. http://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2008.00479.x

Araújo, P. G., Ribeiro, A. L. N. L., Yokoya, N. S., Fujii, M. T. (2014). Temperature and salinity responses of drifting specimens of *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta) farmed on the Brazilian tropical coast. *Journal of Applied Phycology*, *26*(5), 1979–1988. http://doi.org/10.1007/s10811-014-0303-9

Arsenault, G. P., & Yaphe, W. (1965). Effect of acetaldehyde, acetic acid and ethanol on the resorcinol test for fructose. *Analytical Biochemistry*, *13*(1), 133–142. doi:10.1016/0003-2697(65)90127-2

Astorga-España MS, Rodríguez Galdón B, Rodríguez Rodríguez EM, Díaz Romero C (2015) Mineral and trace element concentrations in seaweeds from the sub-Antarctic ecoregion of Magallanes (Chile). Journal of Food Composition and Analysis **39**: 69–76

Athukorala, Y., Jung, W.-K., Vasanthan, T., Jeon, Y.-J. (2006). An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. *Carbohydrate Polymers*, *66*(2), 184–191. doi:10.1016/j.carbpol.2006.03.002

B

Bafeel SO, Alaklabi A, Arif IA, Khan HA, Alfarhan AH, Ahamed A, Thomas J, Bakir MA (2012) Ribulose-1, 5-biphosphate carboxylase (rbcL) gene sequence and random amplification of polymorphic DNA (RAPD) profile of regionally endangered tree species *Coptosperma graveolens subsp. arabicum* (S. Moore) Degreef [online]. Plant Omics, Vol. 5, No. 3, May 2012: 285-290.

Banskota AH, Stefanova R, Sperker S, Lall S, Craigie JS, Hafting JT (2013) Lipids isolated from the cultivated red alga *Chondrus crispus* inhibit nitric oxide production. J Appl Phycol **26**: 1565–1571

Banskota AH, Stefanova R, Sperker S, Lall SP, Craigie JS, Hafting JT, Critchley AT (2014) Polar lipids from the marine macroalga inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW264.7 macrophage cells. Phytochemistry **101**: 101–108

Barbeyron T, Michel G, Potin P, et al (2000) iota-Carrageenases constitute a novel family of glycoside hydrolases, unrelated to that of kappa-carrageenases. J Biol Chem 275:35499–505. doi: 10.1074/jbc.M003404200

Barsanti L, Gualtieri P (2014) Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology, Second Edition. CRC Press

Bast, F. (2014). An Illustrated Review on Cultivation and Life History of Agronomically Important Seaplants, 39–70. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/268806067

Bazire A, Dufour A (2014) The *Pseudomonas aeruginosa* rhlG and rhlAB genes are inversely regulated and RhlG is not required for rhamnolipid synthesis. BMC Microbiol 14:160. doi: 10.1186/1471-2180-14-160

Beaux J-F, Cariou F, Maury S, Salgueiro E, Queinnec E, Peycru P, Grandperrin D, Perrier C, Augère B, Darribère T, et al (2012) Biologie tout-en-un BCPST 2e année - 3e éd.: nouveau programme 2014. Dunod. Chapitre 12: les ecosystems, structure et fonctionnement: interactions trophiques et flux d'énergie. Pp 424-452

Bedoux G, Bourgougnon N (2015) Bioactivity of Secondary Metabolites from Macroalgae. Springer Netherlands, pp 391–401

Bedoux, G., Hardouin, K., Marty, C., Taupin, L., Vandanjon, L., & Bourgougnon, N. (2014). Chemical characterization and photoprotective activity measurement of extracts from the red macroalga *Solieria chordalis*. *Botanica Marina*, *57*(4). http://doi.org/10.1515/bot-2013-0118

Beer J, Mende W, Stellmacher R (2000) The role of the sun in climate forcing. Quaternary Science Reviews **19**: 403–415

Bennett J V, Brodie JL, Benner EJ, Kirby WM (1966) Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. Appl Microbiol 14:170–7.

Berdeaux A, Monneret C, Gouyette A, Éberlé F, Braun S (2016). « Biotechs » dans le domaine de la santé. Académie nationale de pharmacie snté publiquee – Médicament- Produit de Santé-Biologie-Santé et environnement. Acadnat Pharm / Lettre no 38 – mai 2016 p.6

Berteau, O. and Mulloy, B. (2003). Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology*, *13*(6), 29R–40R. doi:10.1093/glycob/cwg058

Berthou C, Bondu S, Deslandes É, et al (2015) Mannosylglycerate et ses dérivés pour utilisation en tant qu'agent immunostimulant.

Bhatia, S., Garg, A., Sharma, K., Kumar, S., Sharma, A., Purohit, A. P. (2011). Mycosporine and mycosporine-like amino acids: A paramount tool against ultra violet irradiation. *Pharmacognosy Reviews*, *5*(10), 138–46. http://doi.org/10.4103/0973-7847.91107

Bhattacharya D, Price DC, Chan CX, Qiu H, Rose N, Ball S, Weber APM, Cecilia Arias M, Henrissat B, Coutinho PM, et al (2013) Genome of the red alga *Porphyridium purpureum.* Nat Commun. doi: 10.1038/ncomms2931

Bhatti AR, Ingram JM (1982) The Mechanism of Binding and Secretion of Alkaline Phosphatase Across the Cell Membranes of Pseudomonas aeruginosa.

Bidwell RGS, McLachlan J (1985) Carbon nutrition of seaweeds: Photosynthesis, photorespiration and respiration. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **86**: 15–46

Blanco-Pascual, N., Alemán, A., Gómez-Guillén, M. C., Montero, M. P., Fleurence, J., Jimenez-Escrig, A., Vicente, A. A. (2014). Enzyme-assisted extraction of κ/ι-hybrid carrageenan from *Mastocarpus stellatus* for obtaining bioactive ingredients and their application for edible active film development. *Food Funct.*, *5*(2), 319–329. doi:10.1039/C3FO60310E

Blandin P, Denis Couvet D, Lamotte M, S. Sacchi C, (2015) « ÉCOLOGIE», Encyclopædia Universalis [en ligne], consulté le 6 août 2015. URL: http://www.universalis.fr/encyclopedie/ecologie/

Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. Analytical Biochemistry. 54, **484-489**.

Bondu S, Cerantola S, Kervarec N, Deslandes E (2009) Impact of the salt stress on the photosynthetic carbon flux and 13C-label distribution within floridoside and digeneaside in *Solieria chordalis.* Phytochemistry **70**: 173–184

Bondu S, Cocquempot B, Deslandes E, Morin P (2008) Effects of salt and light stress on the release of volatile halogenated organic compounds by *Solieria chordalis*: a laboratory incubation study. Bot Mar. doi: 10.1515/BOT.2008.056

Bondu S, Deslandes E, Fabre M-S, Berthou C, Li YG (2010) Carrageenan from *Solieria chordalis* (Gigartinales): Structural analysis and immunological activities of the low molecular weight fractions. Carbohydrate Polymers **81**: 448–460

Bondu, S., Bonnet, C., Gaubert, J., Deslandes, É., Turgeon, S. L., Beaulieu, L. (2014). Bioassay-guided fractionation approach for determination of protein precursors of proteolytic bioactive metabolites from macroalgae. *Journal of Applied Phycology*, *27*(5), 2059–2074. http://doi.org/10.1007/s10811-014-0425-0

Bono, A., Anisuzzaman, S. M., Ding, O. W. (2014). Effect of process conditions on the gel viscosity and gel strength of semi-refined carrageenan (SRC) produced from seaweed (*Kappaphycus alvarezii*). *Journal of King Saud University - Engineering Sciences*, *26*(1), 3–9. doi:10.1016/j.jksues.2012.06.001

Borgen K. (2012) Thèse : Evaluation of physicochemical properties of modified algae protein adhesives.

Bouarab K, Adas F, Gaquerel E, Kloareg B, Salaün J-P, Potin P (2004) The Innate Immunity of a Marine Red Alga Involves Oxylipins from Both the Eicosanoid and Octadecanoid Pathways. Plant Physiol **135**: 1838–1848

Bouhlal R, Haslin C, Chermann J-C, et al (2011) Antiviral activities of sulfated polysaccharides isolated from *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophytha, Gigartinales) and *Boergeseniella thuyoides* (Rhodophyta, Ceramiales). Mar Drugs 9:1187–209. doi: 10.3390/md9071187

Bouhlal R, Riadi H, Bourgougnon N (2010) Antiviral activity of the extracts of *Rhodophyceae* from Morocco. African J Biotechnol 9:7968–7975. doi: 10.5897/AJB09.2023

Boulho R, Freile-Pelegrin Y, Marty C, Robledo D, Bourgougnon N, Bedoux G (2016, *soumis)* Conventional Conventional and sustainable bioprocesses for the extraction of antiherpetic oligo- and polysaccharides from the invasive *Solieria chordalis* (Rhodophyta, Gigartinales).

Bourgougnon N (1994) Activité antivirale et antiprolifératice in vitro du polysaccharide sulfaté de Schizymena dubi (Rhodophytes, Gigartinales). Thèse Université de Nantes. Faculté de pharmacie

Bourgougnon N, Lahaye M, Chermann J-C, Kornprobst J (1993) Composition and antiviral activities of a sulfated polysaccharide from *Schizymenia dubyi* (rhodophyta, gigartinales). Bioorg Med Chem Lett 3:1141–1146. doi: 10.1016/S0960-894X(00)80303-0

Bourgougnon N, Stiger-Pouvreau V (2011) Chemodiversity and Bioactivity within Red and Brown Macroalgae Along the French coasts, Metropole and Overseas Departements and Territories. *In* S-K Kim, ed, Handbook of Marine Macroalgae. John Wiley & Sons, Ltd, pp 58–105

Bourgougnon, Lahaye, Quemener, et al (1996) Annual variation in composition and in vitro anti-HIV-1 activity of the sulfated glucuronogalactan from *Schizymenia dubyi* (Rhodophyta, Gigartinales).

Bourgougnon, N., Quemener, B., Lahaye, M., Cormaci, M., Furnari, G., & Kornprobst, J. M. (1996). Chemical structural approach of water-soluble sulfated glucuronogalactan from *Schizymenia dubyi* (Rhodophyta, Gigartinales). *J. Appl. Phys*, *8*, 147-159

Braekman C, Daloze D (1983). Les médicaments de la mer. La Recherche; 143 : 465-72

Bretagne Développement Innovation (2012) Etude de marché et d'opportunité économique relative au secteur de l'algue alimentaire en France, en Europe et à l'international. Projet Beizh'alg.

Brown, M. T. (1995). Interactions between environmental variables on growth rate and carrageenan content of *Solieria chordalis* (Solieriaceae, Rhodophyceae) in culture. *Journal of applied phycology*, *7*(4), 427-432.

Bulboa C, Macchiavello J. (2001) The Effects of Light and Temperature on Different Phases of the Life Cycle in the Carrageenan Producing Alga *Chondracanthus chamissoi* (Rhodophyta, Gigartinales). Bot Mar 44:371–374.

Burlot, A.-S., Bedoux, G., Bourgougnon, N. (2016). Response Surface Methodology for Enzyme-Assisted Extraction of Water- Soluble Antiviral Compounds from the Proliferative Macroalga *Solieria chordalis*. *Enzyme Engineering*, *5*(2). http://doi.org/10.4172/2329-6674.1000148

Burtin P (2003). Nutritional value of seaweeds. *EJEAFChe*, *2*(4), 498-503.

C

Cabioc'h J, Floc'h JY, Le Toquin A, Boudouresque JF, Meinesz A, Verlaque M (2006) Guide des algues des mers d'Europe. , Manche et Atlantique. , Méditerranée. Delachaux et Niestlé. Paris

Cai Z, Liu Y, Chen Y, *et al* (2015) RpoN Regulates Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* via Modulating the PqsR Quorum Sensing Regulator. Int J Mol Sci 16:28311–9. doi: 10.3390/ijms161226103

Camaya A., Soliman V., Mendoza Jr. A., Okuda K (2014) Status of seaweeds in San Miguel Island, Lagonoy Gulf, Philippines: a review related to the effects of changing environment and local issues. AAB Bioflux 6:199–218.

Candia A, Lindstrom S, Reyes E (1999) *Porphyra sp.* (Bangiales, Rhodophyta): reproduction and life form. Hydrobiologia 398-399:115–119. doi: 10.1023/A:1017071923317

Cardoso M, Costa R, Mano J (2016) Marine Origin Polysaccharides in Drug Delivery Systems. Mar Drugs 14:34. doi: 10.3390/md14020034

Carlucci, M. ., Ciancia, M., Matulewicz, M. ., Cerezo, A. ., & Damonte, E. . (1999). Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. *Antiviral Research*, *43*(2), 93–102. http://doi.org/10.1016/S0166-3542(99)00038-8

Carlucci, M. ., Ciancia, M., Matulewicz, M. ., Cerezo, A. ., & Damonte, E. . (1999). Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. *Antiviral Research*, *43*(2), 93–102. doi:10.1016/S0166-3542(99)00038-8

Carlucci, M. J., Pujol, C. A., Ciancia, M., Noseda, M. D., Matulewicz, M. C., Damonte, E. B., Cerezo, A. S. (1997). Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, *20*(2), 97–105. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9184941

Carlucci, M. J., Pujol, C. A., Ciancia, M., Noseda, M. D., Matulewicz, M. C., Damonte, E. B., & Cerezo, A. S. (1997). Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed Gigartina skottsbergii and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, *20*(2), 97–105. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9184941

Cavallero, S., Huot, N., Francelle, L., Lomonte, P., Naas, T., & Labetoulle, M. (2014). Biological features of herpes simplex virus type 1 latency in mice according to experimental conditions and type of neurones. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *55*(12), 7761–74. http://doi.org/10.1167/iovs.14-14673

CBI Market Intelligence (en ligne, consulté en 2015) CBI Product Factsheet: Carrageenan in Europe. URL : https://www.cbi.eu/market-information/

Cecere, E., Petrocelli, A., & Verlaque, M. (2011). Vegetative reproduction by multicellular propagules in Rhodophyta: an overview. Marine Ecology, 32(4), 419–437. http://doi.org/10.1111/j.1439-0485.2011.00448.x

CEVA Centre d'étude et de valorisation des algues (-2016) Compléments d'étude sur les processus biologiques, hydrologiques et sédimentologiques impliqués des blooms macroalgaux. Rapports annuels de 2012, 2013, 2014 disponibles URL : http://www.ceva.fr/

Chadwick P (1969) Effect of carbenicillin on Pseudomonas aeruginosa. Can Med Assoc J 101:74–80.

Charoensiddhi, S., Lorbeer, A. J., Lahnstein, J., Bulone, V., Franco, C. M. M., Zhang, W. (2016). Enzyme-assisted extraction of carbohydrates from the brown alga *Ecklonia radiata*: Effect of

enzyme type, pH and buffer on sugar yield and molecular weight profiles. *Process Biochemistry*. doi:10.1016/j.procbio.2016.07.014

Chauvet S, Ewbank J (2000) *Caenorhabditis elegans :* un modèle d'étude des interactions hôtes-organisme pathogène.

Cheung PC. (1999) Temperature and pressure effects on supercritical carbon dioxide extraction of n-3 fatty acids from red seaweed. Food Chem 65:399–403. doi: 10.1016/S0308-8146(98)00210-6

Chifflet S, Gérard P, Fichez R (2004) Manuel d'analyses chimiques dans l'eau de mer. Nouméa : IRD, 2004, (6), 82 p. multigr. (Sciences de la Mer.Biologie Marine.Notes Techniques ; 6).

Choi, J., Shin, D., Kim, M., Park, J., Lim, S., Ryu, S. (2012). LsrR-mediated quorum sensing controls invasiveness of *Salmonella Typhimurium* by regulating SPI-1 and flagella genes. PLoS ONE 7:e37059. doi: 10.1371/journal.pone.0037059

Choi, S. P., Nguyen, M. T., Sim, S. J. (2010). Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *Bioresource Technology*, *101*(14), 5330–5336. doi:10.1016/j.biortech.2010.02.026

Chopin T, Kerin BF, Mazerolle R (1999a) Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae: A review and current developments using Fourier transform infrared diffuse reflectance spectroscopy. Phycological Research **47**: 167–188

Chopin T, Sharp G, Belyea E, Semple R, Jones D (1999b) Open-water aquaculture of the red alga *Chondrus crispus* in Prince Edward Island, Canada. Hydrobiologia **398-399**: 417–425

Cochet J. (2015) Les échouages de macro-algues sur la Presqu'île de Rhuys, Impacts environnementaux et Outil de régénération de l'avant-dune, Expérimentation AlgoBox®. Laboratoire de Géosciences Marines et de Géomophologie du Littoral, Université de Bretagne Sud. Mémoire de Master 2.

Coelho SM, Rijstenbil JW, Brown MT (2000) Impacts of anthropogenic stresses on the early development stages of seaweeds. J Aquat Ecosyst Stress Recover 7:317–333. doi: 10.1023/A:1009916129009

Collégiale des enseignants de bactériologie-virologie-hygiène (2014) Croissance des bactéries. UMVF - Université Médicale Virtuelle Francophone

Collén J, Cornish ML, Craigie J, Ficko-Blean E, Hervé C, Krueger-Hadfield SA, Leblanc C, Michel G, Potin P, Tonon T, et al (2014) *Chondrus crispus* – A Present and Historical Model Organism for Red Seaweeds. Advances in Botanical Research. Elsevier, pp 53–89

Collén J, Porcel B, Carré W, Ball SG, Chaparro C, Tonon T, Barbeyron T, Michel G, Noel B, Valentin K, et al (2013) Genome structure and metabolic features in the red seaweed *Chondrus crispus* shed light on evolution of the Archaeplastida. Proc Natl Acad Sci USA **110**: 5247–5252

Collen, J., Davison, I. R. (1999). Stress tolerance and reactive oxygen metabolism in the intertidal red seaweeds *Mastocarpus stellatus* and *Chondrus crispus*. *Plant, Cell and Environment*, *22*(9), 1143–1151. http://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1999.00477.x

Corsi AK, Wightman B, Chalfie M, et al (2015) A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. Genetics 200:387–407. doi: 10.1534/genetics.115.176099

Couillault C et Kurz C.L (2010) Du nematode *Caenorhabditis elegans* et de son utilization en laboratoire. STAL Volume 36/ 4ème Trimestre.

Courtois A, Simon-Colin C, Boisset C, et al (2008) Floridoside extracted from the red alga *Mastocarpus stellatus* is a potent activator of the classical complement pathway. Mar Drugs 6:407–17. doi: 10.3390/md20080019

Cox S, Abu-Ghannam N, Gupta S (2010) An Assessment of the Antioxidant and Antimicrobial Activity of Six Species of Edible Irish Seaweeds.

Craigie JS (2011) Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. J Appl Phycol 23:371–393

Craigie, JS (1990). Cell wall. In *Biology of the Red Algae, Cambridge University Press* (pp. 221–257).

Crouch IJ, van Staden J (1993) Evidence for the presence of plant growth regulators in commercial seaweed products. Plant Growth Regul **13**: 21–29

Culetto E, Sattelle DB (2000) A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. Hum Mol Genet 9:869–77.

D

Dam H, Glavind J (1938) Vitamin K in the plant. Biochem J **32**: 485–487

Damonte EB, Matulewicz MC, Cerezo AS (2004) Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. Curr Med Chem 11:2399–419.

Davey ME, Caiazza NC, O'Toole GA (2003) Rhamnolipid Surfactant Production Affects Biofilm Architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J Bacteriol 185:1027–1036. doi: 10.1128/JB.185.3.1027-1036.2003

Dawes CJ, Mathieson AC, Cheney DP (2014) Ecological Studies of Floridian *Eucheuma* (Rhodophyta, Gigartinales). I. Seasonal Growth and Reproduction. Bulletin of Marine Science, Volume 24, Number 2, June 1974, pp. 235-273(39)

Dawes CJ, Orduña-rojas J, Robledo D (1998) Response of the tropical red seaweed *Gracilaria cornea* to temperature, salinity and irradiance. Journal of Applied Phycology **10**: 419–425

de Araújo IWF, Vanderlei E de SO, Rodrigues JAG, et al (2011) Effects of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Solieria filiformis* on models of nociception and inflammation. Carbohydr Polym 86:1207–1215. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.06.016

de Bentzmann S, Plésiat P (2011) *Pseudomonas aeruginosa*: Une virulence complexe. Rev Francoph des Lab 2011:73–81. doi: 10.1016/S1773-035X(11)71104-2

de Mendiburu, F. (2016). Package agricolae. Statistical Procedures for Agricultural Research. *CRAN*.

de Reviers. B (2003). Biologie et phylogénie des algues, Tome 2

De Ruiter, G. A. and Rudolph, B. (1997). Carrageenan biotechnology. *Trends in Food Science & Technology*, *8*(12), 389–395. doi:10.1016/S0924-2244(97)01091-1

de S.F-Tischer PC, Talarico LB, Noseda MD, et al (2006) Chemical structure and antiviral activity of carrageenans from *Meristiella gelidium* against herpes simplex and dengue virus. Carbohydr Polym 63:459–465. doi: 10.1016/j.carbpol.2005.09.020

Delattre C, Fenoradosoa TA, Michaud P (2011) Galactans: an overview of their most important sourcing and applications as natural polysaccharides. Brazilian Arch Biol Technol 54:1075–1092. doi: 10.1590/S1516-89132011000600002

Dembitsky VM, Rozentsvet OA (1990) Phospholipid composition of some marine red algae, Phytochemistry, Volume 29, Issue 10, Pages 3149-3152

Deniaud E, Dion P, Le Marrec M-C, Duché D (2005) Algues et alimentation animale. Algorythme 72:8.

Deniaud, E., Dion, P., Le Marrec, M.-C., Duché, D. (2005). Algues et alimentation animale. *Algorythme*, *72*, 8.

Deniaud-Bouet, E., Kervarec, N., Michel, G., Tonon, T., Kloareg, B., Herve, C. (2014). Chemical and enzymatic fractionation of cell walls from Fucales: insights into the structure of the extracellular matrix of brown algae. *Annals of Botany*, *114*(6), 1203–1216. doi:10.1093/aob/mcu096

Denis Claire (2009) Caractérisation biochimique de l'algue *Grateloupia turuturu*, évaluation de ses potentialité de valorisation via un proécdé de digestion enzymatique et la pruriofication partielle d'un pigment d'intérêt (R-phycoérythrine). Thèse de Doctorat de l'Université de Nantes.

Deslandes E, Floc'h J.Y, Bodeau-Bellion C, Brault D, Braud J.P (1985) Evidence for ι-carrageenans in *Solieria chordalis* (Solieriaceae) and *Calliblepharis jubata, Calliblepharis ciliata, Cystoclonium purpureum* (Rhodophyllidaceae) Botanica Marina. Volume 28, Issue **7**, Pages 317–318

Deslandes, É., Bodeau, C. (2006). Composition cosmétique comprenant un extrait d'algue rouge comprenant une association de floridoside et d'acide iséthionique. Brevet EP 1743628 A1

Deslandes, É., Floc'h, J.-Y., Bodeau-Bellion, C., Brault, D. & Braud, J.P. (1985). Evidence for (iota)-carrageenans in *Solieria chordalis* (Solieriaceae) and *Calliblepharis jubata*, *Calliblepharis purpureum* (Rhodophyllidaceae). *Botanica Marina* 28: 317-318.

Deslandes, É., Zinoun, M., Potin, P. (1993). Structural Anlysis of the Phycocolloid Extracted from *Schizymenia dubyi* (Gigartinales, Rhodophyceae). *Natural Product Letters*, *2*(3), 209–213. doi:10.1080/10575639308043810

DigitalGloble de Google map [document cartographique] 2016. https://www.google.fr/maps/place/Port+Aux+Moines,+56730+Saint-Gildas-de Rhuys/@47.488528,2.8400416,5579m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0x481005d8aa74936b:0x6 06fa38c6f8303b!8m2!3d47.4926425!4d-2.833099

Dinesh S., Manasi K, Vinodhini S, Vidhya G, Hemalatha K, Sudhakaran R (2014) Confirmation of Anti-WSSV activity from Red Algae *Hypnae spinella* in freshwater crab *Paratelphusa hydrodomous*. International Journal of ChemTech Research 6(8):4022-4026

Ding, L., Ma, Y., Huang, B., & Chen, S. (2013). Effects of Seawater Salinity and Temperature on Growth and Pigment Contents in *Hypnea cervicornis* J. Agardh (Gigartinales, Rhodophyta). *BioMed Research International*, *2013*, 1–10. http://doi.org/10.1155/2013/594308

Diogo J V., Novo SG, González MJ, et al (2015) Antiviral activity of lambda-carrageenan prepared from red seaweed (*Gigartina skottsbergii*) against BoHV-1 and SuHV-1. Res Vet Sci.;98:142-4. doi: 10.1016/j.rvsc.2014.11.010.

Dionex. Analysis of Carbohydrates by High-PerformanceAnion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD) *[en ligne, consulté le 3/06/2013]* URL : http://www.dionex.com/en-us/documents/technical-notes/ic-hplc/lp-72156.html

Domozych, S D (2001) Algal Cell Walls. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK

Dubois A (2012) Comportement morphodynamique des plages de poche en milieu mésotidal semi-abrité : exemple des plages méridionales de la presqu'île de Rhuys, Bretagne sud, France. Thèse. Université Bretagne Sud

DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal Chem **28**: 350–356

Dumay J (2006) Extraction de lipides en voie aqueuse par bioréacteur enzymatique combiné à l'ultrafiltration : application à la valoration des co-produits de poisson (*Sardina pilchardus).* Thèse. Université de Nantes

Dumay J, Clément N, Morançais M, Fleurence J (2013) Optimization of hydrolysis conditions of *Palmaria palmata* to enhance R-phycoerythrin extraction. Bioresource Technology **131**: 21–27

E

Eccles R, Meier C, Jawad M, et al (2010) Efficacy and safety of an antiviral Iota-Carrageenan nasal spray: a randomized, double-blind, placebo-controlled exploratory study in volunteers with early symptoms of the common cold. Respir Res 11:108. doi: 10.1186/1465-9921-11-108

Egan S, Fernandes ND, Kumar V, Gardiner M, Thomas T (2014) Bacterial pathogens, virulence mechanism and host defence in marine macroalgae. Environ Microbiol **16**: 925–938

Eggert, A. (2012). Seaweed responses to temperature, ***in***: Wiencke, C. *et al.* (Ed.) *Seaweed biology: Novel insights into ecophysiology, ecology and utilization. Ecological Studies,* 219: pp. 47-66

El Baz FK, Ibrahim A. Abd El Baky H (2014) Cytotoxicity, antioxidants and antimicrobial activities of crude lipids extracted from some marine algae.", J. of Aquaculture Research & Development, , vol. 284: 1-5, pp. 1-5

Ellis, M. N., Martin, J. L., Lobe, D. C., Johnsrude, J. D., & Barry, D. W. (1986). Induction of acyclovir-resistant mutants of herpes simplex virus type I in athymic nude mice. *J. Antimicrob. Chemother.*, *18*(Supplement_B), 95–101. http://doi.org/10.1093/jac/18.Supplement_B.95

Elrod RP, Braun AC (1942) *Pseudomonas aeruginosa*: Its Rôle as a Plant Pathogen. J Bacteriol 44:633–45.

Ermolaeva MA, Schumacher B (2014) Insights from the worm: the *C. elegans* model for innate immunity. Semin Immunol 26:303–9. doi: 10.1016/j.smim.2014.04.005

Estes KA, Dunbar TL, Powell JR, et al (2010) bZIP transcription factor zip-2 mediates an early response to *Pseudomonas aeruginosa* infection in *Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci 107:2153–2158. doi: 10.1073/pnas.0914643107

Evans FD, Critchley AT (2014) Seaweeds for animal production use. J Appl Phycol **26**: 891–899

Evans, E. A., Kawli, T., & Tan, M.-W. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* Suppresses Host Immunity by Activating the DAF-2 Insulin-Like Signaling Pathway in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathogens*, *4*(10), e1000175. http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000175

Ewbank J (2006) Signaling in the immune response. wormbook.org

F

Faculté de médecine Pierre et Marie Curie (2003) Université Pierre et Marie Curie. Bactériologie. Niveau DCEM1 2002 – 2003. Service de Bactériologie. Mise à jour : 24 mars 2003 URL : http://www.chups.jussieu.fr/

FAO (2014). The state of world fisheries and aquaculture. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.p. 230.

Farnham W.F. (1980) Studies on aliens in the marine flora of southern England. In: The shore environment, volume 2: ecosystems, ed. by J.H. Price, D.E.G. Irvine & W.F. Farnham, 875-914. London, Academic Press. (Systematics Association Special Volume, No. 17B.)

Farnham W.F., & Jephson N.A. (1977). A survey of the maerl beds of Falmouth (Cornwall). British Phycological Journal, 12: 119.

Fazekas T, Eickhoff P, Pruckner N, et al (2012) Lessons learned from a double-blind randomised placebo-controlled study with a iota-carrageenan nasal spray as medical device in children with acute symptoms of common cold. BMC Complement Altern Med 12:147. doi: 10.1186/1472-6882-12-147

Feinbaum RL, Urbach JM, Liberati NT, et al (2012) Genome-Wide Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence-Related Genes Using a *Caenorhabditis elegans* Infection Model. PLoS Pathog 8:e1002813. doi: 10.1371/journal.ppat.1002813

Feldmann J., Algues, *Encyclopædia Universalis* (2011) *[en ligne, consulté le 7 novembre 2013]*. URL : http://www.universalis-edu.com/encyclopedie/algues/

Filisetti-Cozzi, T.M., & Carpita, N.C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. Analytical Biochemistry. **197**, 157-162.

Fito-Boncompte L, Chapalain A, Bouffartigues E, et al (2011) Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. Infect Immun 79:1176–86. doi: 10.1128/IAI.00850-10

Fleurence J (1999) Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. Trends Food Sci Tech 10:25–28

Fleurence J, Massiani L, Guyader O, Mabeau S (1995) Use of enzymatic cell wall degradation for improvement of protein extraction from *Chondrus crispus*, *Gracilaria verrucosa* and *Palmaria palmata*. J Appl Phycol 7:393–397. doi: 10.1007/BF00003796

Fleurence J, Morançais M, Dumay J, Decottignies P, Turpin V, Munier M, Garcia-Bueno N, Jaouen P (2012) What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture? Trends in Food Science & Technology 27: 57–61

Floc'h J-Y, Deslandes E, Le Gall Y (1987) Evidence for Vegetative Propagation of the Carrageenophyte *Solieria chordalis* (Solieriaceae, Rhodophyceae) on the Coast of Brittany (France) and in Culture. Botanica Marina **30**: 315–322

Flores-Molina MR, Thomas D, Lovazzano C, *et al* (2014) Desiccation stress in intertidal seaweeds: Effects on morphology, antioxidant responses and photosynthetic performance. Aquat Bot 113:90–99. doi: 10.1016/j.aquabot.2013.11.004

Flukes, E. B., Wright, J. T., & Johnson, C. R. (2015). Phenotypic plasticity and biogeographic variation in physiology of habitat-forming seaweed: response to temperature and nitrate. *Journal of Phycology*, *51*(5), 896–909. http://doi.org/10.1111/jpy.12330

Foscarini R, Prakash J (1990) Handbook on *Eucheuma* seaweed cultivation in Fiji. South Pacific Aquaculture Development Project, No GCP/RAS/116/JPN unpaginated

Fournet, I., Zinoun, M., Deslandes, E., Diouris, M. & Floc'h, J.Y. (1999). Floridean starch and carrageenan contents as responses of the red alga *Solieria chordalis* to culture conditions. European Journal of Phycology 34: 125-130

Fournet, I., Zunoun, M., Deslandes, E., Diouris, M., Floc'h, J-Y. (1997). Floridean starch and carrageenan contents as responses of the red alga *Solieria chordalis* to culture conditions. *European Journal of Phycology*, *34*(2), 125–130.

Francavilla M, Manara P, Kamaterou P , Monteleone M, Zabaniotou A (2015), Cascade approach of red macroalgae *Gracilaria gracilis* sustainable valorization by extraction of

phycobiliproteins and pyrolysis of residue, Bioresource Technology, Volume 184, Pages 305-313, ISSN 0960-8524, http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.147.

Frank D (2012) Research topic on *Pseudomonas aeruginosa*, biology, genetics, and host–pathogen interactions. Front Microbiol. doi: 10.3389/fmicb.2012.00020

Franklin MJ, Nivens DE, Weadge JT, Howell PL (2011) Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. Front Microbiol. doi: 10.3389/fmicb.2011.00167

Fredericq S, Freshwater DW, Hommersand MH (1999) Observations on the phylogenetic systematics and biogeography of the *Solieriaceae* (Gigartinales, Rhodophyta) inferred from rbcL sequences and morphological evidence. Hydrobiologia **398-399**: 25–38

Freile-Pelegrín, Y et Robledo, D. (2006). Carrageenan of *Eucheuma isiforme* (*Solieriaceae*, Rhodophyta) from Yucatán, Mexico. II. Seasonal variations in carrageenan and biochemical characteristics. *Botanica Marina*, *49*(1), 72–78. doi:10.1515/BOT.2006.009

Friedrich MW (2012) Bacterial Communities on Macroalgae. *In* C Wiencke, K Bischof, eds, Seaweed Biology. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 189–201

Friendly M (2002). Corrgrams: Exploratory displays for correlation matrices. The American Statistician, 56, 316–324

Frontier S., Pichod-Viale D., Lepretre A., Davoult D., Luczak C., 2004, Ecosystèmes. Structure, fonctionnement, évolution, 3e édition, Dunod, 549 p.

Fuller, R. W., Cardellina, J. H., Jurek, J., Scheuer, P. J., Alvarado-Lindner, B., McGuire, M., Clardy, J. (1994). Isolation and Structure/Activity Features of Halomon-Related Antitumor Monoterpenes from the Red Alga *Portieria hornemannii*. *Journal of Medicinal Chemistry*, *37*(25), 4407–4411. doi:10.1021/jm00051a019

G

Gabrielson PW, Hommersand MH (1982) The atlantic species of *Solieria* (Gigartinales, Rhodophyta) : their morphology, distribution and affinities.. Journal of Phycology **18**: 31–45

Gallagher LA, Manoil C (2001) *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. J Bacteriol 183:6207–14. doi: 10.1128/JB.183.21.6207-6214.2001

Garbary DJ, Tompkins E, White K, et al (2011) Temporal and spatial variation in the distribution of life history phases of *Chondrus crispus* (Gigartinales, Rhodophyta). Algae 26:61–71. doi: 10.4490/algae.2011.26.1.061

García-Bueno, N., Decottignies, P., Turpin, V., Dumay, J., Paillard, C., Stiger-Pouvreau, V., Fleurence, J. (2014). Seasonal antibacterial activity of two red seaweeds, *Palmaria palmata* and *Grateloupia turuturu* , on European abalone pathogen Vibrio harveyi. *Aquatic Living Resources*, *27*(2), 83–89. http://doi.org/10.1051/alr/2014009

Garon-Lardiere S. (2004) Thèse : Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales). Université de Bretagne Occidentale.

Gayral P, Casson J (1986) Connaître et reconnaître les algues marines. Ouest-France

Genicot, S. M., Groisillier, A., Rogniaux, H., Meslet-Cladière, L., Barbeyron, T., Helbert, W. (2014). Discovery of a novel iota carrageenan sulfatase isolated from the marine bacterium *Pseudoalteromonas carrageenovora*. *Frontiers in Chemistry*, *2*, 67. doi:10.3389/fchem.2014.00067

Ghannam, A., Abbas, A., Alek, H., Al-Waari, Z., & Al-Ktaifani, M. (2013). Enhancement of local plant immunity against tobacco mosaic virus infection after treatment with sulphated-carrageenan from red alga (*Hypnea musciformis*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *84*, 19–27. doi:10.1016/j.pmpp.2013.07.001

Ghosh, T., Chattopadhyay, K., Marschall, M., Karmakar, P., Mandal, P., & Ray, B. (2009). Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: from structure-activity analysis to clinical evaluation. *Glycobiology*, *19*(1), 2–15. http://doi.org/10.1093/glycob/cwn092

Glazer AN (1984) Phycobilisome a macromolecular complex optimized for light energy transfer, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics, Volume 768, Issue 1, 1984, Pages 29-51

Glenn, E. P., Doty, M. S. (1992). Water motion affects the growth rates of *Kappaphycus alvarezii* and related red seaweeds. *Aquaculture*, *108*(3), 233–246. http://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90109-X

Gómez-Zorrilla S, Juan C, Cabot G, et al (2016) Impact of multidrug resistance on the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*: *in vitro* and *in vivo* studies. Int J Antimicrob Agents 47:368–374. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.02.010

Gordillo F, Dring M, Savidge G (2002) Nitrate and phosphate uptake characteristics of three species of brown algae cultured at low salinity. Mar Ecol Prog Ser 234:111–118. doi: 10.3354/meps234111

Gordillo FJL (2012) Environment and Algal Nutrition. Chapter 4 in Seaweed Biology, Volume 219 of the series Ecological Studies. 67-86 pp 67–86

Goulard F, Diouris M, Deslandes E, Floc'h J-Y (1999) Nucleotides, nucleoside sugars and UDP-glucose-4-epimerase activity in the iota-carrageenophytes *Solieria chordalis* and *Calliblepharis jubata* (Rhodophyceae). European Journal of Phycology **34**: 21–25

Goulard, F., Diouris, M., Quere, G., Deslandes, E. & Floc'h, J.-Y. (2001). Salinity effects on NDP-sugars, floridoside, starch, and carrageenan yield, and UDP-glucose-pyrophosphorylase and -epimerase activities of cultivated *Solieria chordalis.* Journal of Plant Physiology 158: 1387-1394.

Goupy J (1997) Plan d'expériences. techniques de l'ingénieur.

Goussen B (2013) Analyse par modélisation mécanistique des réponses microévolutives d'une population de *Caenorhabditis elegans* exposée à un stress métallique radioactif. Thèse AgroParisTech.

Grosso, C., Valentão, P., Ferreres, F., Andrade, P. (2015). Alternative and Efficient Extraction Methods for Marine-Derived Compounds. *Marine Drugs*, *13*(5), 3182–3230. doi:10.3390/md13053182

Guibet M. (2007) Analyse structural des carraghénanes par hydrolyse enzymatique. Thèse de l'Université de Bretagne occidentale.

Guimaraens, M. A. de, Macedo, S. J. de, Oliveira-Carvalho, M. de F. de, Burgos, D. C., & Pereira, S. M. B. (2012). Modeling temporal variations of *Gracilaria* Greville and *Hypnea* J.V. Lamouroux (Rhodophyta) assemblages on a midlittoral reef platform at Piedade Beach, Pernambuco State, Brazil. *Brazilian Journal of Botany*, *35*(4), 377–384. http://doi.org/10.1590/S0100-84042012000400010

Guiry, W. (2013) In M. D. Guiry, & G. M. Guiry (Eds.), *AlgaeBase*. Galway: World-wide electronic publication, National University of Ireland. http://www.algaebase.org.

Gunstone FD, Harwood JL, Padley FB (1994) The Lipid Handbook, Second Edition. CRC Press

Gupta V, Thakur RS, Baghel RS, Reddy CRK, Jha B (2014) Seaweed Metabolomics: A New Facet of Functional Genomics. Sea plants 31

Guschina IA, Harwood JL (2006) Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. Progress in Lipid Research **45**: 160–186

Guschina, I. A., Harwood, J. L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*, *45*(2), 160–86. http://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.001

Gutierrez, L. M., Fernandez, C. (1992). Water motion and morphology in *Chondrus crispus (*Rhodophyta) 1. *Journal of Phycology*, *28*(2), 156–162. http://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1992.00156.x

H

Hamed I, Özogul F, Özogul Y, Regenstein JM (2015) Marine Bioactive Compounds and Their Health Benefits: A Review. Comprehensive reviews in food science and food safety **14**: 446–465

Hancock REW, Speert DP (2000) Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. Drug Resist Updat 3:247–255. doi: 10.1054/drup.2000.0152

Hanelt, D., Figueroa, F. L. (2012). Physiological and Photomorphogenic Effects of Light on Marine Macrophytes (pp. 3–23). Springer Berlin Heidelberg. http://doi.org/10.1007/978-3-642-28451-9_1

Harden EA, Falshaw R, Carnachan SM, et al (2009) Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against herpes simplex virus. Antiviral Res 83:282–289. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.06.007

Hardouin K, Burlot A-S, Umami A, Tanniou A, Stiger-Pouvreau V, Widowati I, Bedoux G, Bourgougnon N (2013) Biochemical and antiviral activities of enzymatic hydrolysates from different invasive French seaweeds. J Appl Phycol **26**: 1029–1042

Hardouin, K., Bedoux, G., Burlot, A. S., Nyvall-Collen, P., & Bourgougnon, N. (2014). Enzymatic recovery of metabolites from seaweeds: Potential applications. *Advances in Botanical Research*, *71*, 279–320.

Hardouin, K., Bedoux, G., Burlot, A.-S., Donnay-Moreno, C., Bergé, J.-P., Nyvall-Collén, P, Bourgougnon, N. (2016). Enzyme-assisted extraction (EAE) for the production of antiviral and antioxidant extracts from the green seaweed *Ulva armoricana* (Ulvales, Ulvophyceae). *Algal Research*, *16*, 233–239. doi:10.1016/j.algal.2016.03.013

Harrell F (2016) Package "Hmisc." Cran-r-project.org

Harrison, P. J., Hurd, C. L. (2001). Nutrient physiology of seaweeds: application of concepts to aquaculture. *Cahiers de Biologie Marine*, (1–2).

Hayashi, L., Hurtado, A.Q., Msuya, F.E., Lhonneur, G.B., Critchley, A.T., (2010). A review of *Kappaphycus* farming: prospects and constraints. Seaweeds and their Role in Globally Changing Environments Cellular Origins, Life in Extreme Habitats and Astrobiology 15, 251–283.

Hebar A, Koller C, Seifert J-M, et al (2015) Non-Clinical Safety Evaluation of Intranasal Iota-Carrageenan. PLoS One 10:e0122911. doi: 10.1371/journal.pone.0122911

Heisler J, Glibert PM, Burkholder JM, et al (2008) Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. Harmful Algae 8:3–13. doi: 10.1016/j.hal.2008.08.006

Hellio C, De La Broise D, Dufossé L, et al (2001) Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: potential use for environmentally friendly antifouling paints. Mar Environ Res 52:231–247. doi: 10.1016/S0141-1136(01)00092-7

Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science 284:1313–8.

Hommersand SF (1994) Phylogenetic Systematics and Biogeography of the *Gigartinaceae* (Gigartinales, Rhodophyta) Based on Sequence Analysis of rbcL. Botanica Marina - BOT MAR **37**: 193–204

Hudson JB, Kim JH, Lee MK, et al (1998) Antiviral compounds in extracts of Korean seaweeds: Evidence for multiple activities. J Appl Phycol 10:427–434. doi: 10.1023/A:1008004117305

Hurd CL, Harrison PJ, Bischof K, Lobban CS (2014) Seaweed Ecology and Physiology. Cambridge University Press

Hurtado AQ, Gerung GS, Yasir S, Critchley AT (2013) Cultivation of tropical red seaweeds in the BIMP-EAGA region. J Appl Phycol **26**: 707–718

Husson F, Pagès J, Lê S (2009) Analyse de données avec R. Presses universitaires de Rennes

I

IFREMER Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer. (-2016). URL : http://wwz.ifremer.fr/. Rapports annuels sur la Qualité du Milieu Marin Littoral, Bulletin de la surveillance 2013, 2014, 2015

Iiyama K, Chieda Y, Lee JM, *et al* (2007) Effect of superoxide dismutase gene inactivation on virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 toward the silkworm, Bombyx mori. Appl Environ Microbiol 73:1569–75. doi: 10.1128/AEM.00981-06

Iken K (2012) Grazers on Benthic Seaweeds. *In* C Wiencke, K Bischof, eds, Seaweed Biology. Springer Berlin Heidelberg, pp 157–175

Imam, S. H. et Snell, W. J. (1987). Degradation of the framework of the C*hlamydomonas* cell wall by proteases present in a commercially available alpha-amylase preparation. *Applied and Environmental Microbiology*, *53*(7), 1701–4. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3310882

IRIC Plateforme génomique (en ligne consulté en février 2016) URL https://genomique.iric.ca/resources/files/Quoi_faire_avec_des_resultats_qPCR.pdf

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). (-2016) Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: http://goldbook.iupac.org (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. doi:10.1351/goldbook. [en ligne] consulté le 13 août 2015. URL : http://goldbook.iupac.org/L03571.html

J

Jaques, L.B., Ballieux, R.E, Dietrich, C.P., Kavanagh, L.W. (1968). A microelectrophoresis method for heparin. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. **46**, 351-360.

Jeon, Y.-J., Wijesinghe, W. A. J. P., & Kim, S.-K. (2011). Enzyme-assisted Extraction and Recovery of Bioactive Components from Seaweeds. In S.-K. Kim (Ed.), *Handbook of Marine Macroalgae* (pp. 221–228). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. doi:10.1002/9781119977087.ch10

Jiao, G., Yu, G., Zhang, J., & Ewart, H. S. (2011). Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. Marine Drugs, 9(2), 196–223. http://doi.org/10.3390/md9020196

Jouanneau D (2010) Détermination de la composition et de la distribution des carraghénanes par hydrolyse enzymatique. Université de Paris 6

Judd WS; Campbell C. S, Kellog E. A, Stevens P. F, Donoghue M. J (2002) Plant Systematics: A Phylogenetic Approach, Second Edition edition. Sinauer Associates, Inc.

K

Kain, J., Notron, T. (1990). Marine ecology. In *Biology of the Red Algae, Cambridge University Press* (pp. 377–422).

Kaletta T, Hengartner MO (2006) Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. Nat Rev Drug Discov 5:387–399. doi: 10.1038/nrd2031

Kandasamy, S., Khan, W., Evans, F., Critchley, A. T., & Prithiviraj, B. (2012). Tasco®: A Product of *Ascophyllum nodosum* Enhances Immune Response of *Caenorhabditis elegans* Against *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *Marine Drugs*, *10*(12), 84–105. http://doi.org/10.3390/md10010084

Kandasamy, S., Khan, W., Kulshreshtha, G., Evans, F., Critchley, A. T., Fitton, J. H., Prithiviraj, B. (2015). The fucose containing polymer (FCP) rich fraction of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. protects *Caenorhabditis elegans* against *Pseudomonas aeruginosa* by triggering innate immune signaling pathways and suppression of pathogen virulence factors. *ALGAE*, *30*(2), 147–161. http://doi.org/10.4490/algae.2015.30.2.147

Kang, O. L., Ghani, M., Hassan, O., Rahmati, S., Ramli, N. (2014). Novel agaro-oligosaccharide production through enzymatic hydrolysis: Physicochemical properties and antioxidant activities. *Food Hydrocolloids*, *42*, 304–308. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.04.031

Karleskint G, Turner R, Small J (2012) Introduction to Marine Biology. Cengage Learning

Karsten, U. (2012). Seaweed Acclimation to Salinity and Desiccation Stress (pp. 87–107). Springer Berlin Heidelberg. http://doi.org/10.1007/978-3-642-28451-9_5

Kasanah, N., Triyanto, T., Seto, D. S., Amelia, W., & Isnansetyo, A. (2015) Antibacterial Compounds from Red Seaweeds (Rhodophyta). *Indonesian Journal of Chemistry*. Retrieved from http://pdm-mipa.ugm.ac.id/ojs/index.php/ijc/article/view/975

Kasting JF, Siefert JL (2002) Life and the evolution of Earth's atmosphere. Science **296**: 1066–1068

Kendel, M., Wielgosz-Collin, G., 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. *Marine Drugs*, *13*(9), 5606–28. http://doi.org/10.3390/md13095606

Kennedy, P. G. E. (2002). *Herpes simplex* encephalitis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *73*(3), 237–238. http://doi.org/10.1136/jnnp.73.3.237

Kim S-K (2011) Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology. John Wiley & Sons. Ladislava Misurcova. Ch 7 : Chemical Composition of Seaweeds. Pp 236-277

Kim S-K, Chojnacka K (2015) Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications, 2 Volume Set. John Wiley & Sons

Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J (2006) Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Médecine Mal Infect 36:78–91. doi: 10.1016/j.medmal.2005.10.007

Klejdus, B., Lojková, L., Plaza, M., Snóblová, M., & Stěrbová, D. (2010). Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, *1217*(51), 7956–65. http://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.020

Knochel A (en ligne, consulté en 2015) Gravelot à collier interrompu - Charadrius alexandrinus - Kentish Plover. Oiseaux.net URL : http://www.oiseaux.net/oiseaux/gravelot.a.collier.interrompu.html

Knutsen, S.H. & Grasdalen, H. (1987). Characterization of water-extractable polysaccarides from Norwegian *Furcellaria lumbricalis* (Huds.) Lamour. (Gigartinales, Rhodophyceae) by IR and NMR spectroscopy. Botanica Marina 30: 497-505.

Kobayashi M, Fujita D (2013) Can thallus color of red algae be used as an environmental indicator in shallow waters? J Appl Phycol **26**: 1123–1131

Kopel, M., Helbert, W., Henrissat, B., Doniger, T., Banin, E. (2014). Draft Genome Sequence of *Pseudoalteromonas* sp. Strain PLSV, an Ulvan-Degrading Bacterium. *Genome Announcements*, *2*(6). doi:10.1128/genomeA.01257-14

Kornprobst J-M (2005) Substances naturelles d'origine marine : chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologies. Tec & Doc Lavoisier, Paris

Kubanek J, Jensen PR, Keifer PA, Sullards MC, Collins DO, Fenical W (2003) Seaweed resistance to microbial attack: A targeted chemical defense against marine fungi. Proc Natl Acad Sci U S A **100**: 6916–6921

Kübler, J. E., Davison, I. R. (1993). High-temperature tolerance of photosynthesis in the red alga *Chondrus crispus*. *Marine Biology*, *117*(2), 327–335. http://doi.org/10.1007/BF00345678

Kulanthaiyesu Arunkumar K, Sivakumar SR (2012) Seasonal influence on bioactivity of seaweeds against plant pathogenic bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (Hasse) Vauterin et al. African J Microbiol Res 6:4324–4331. doi: 10.5897/AJMR11.977

Kulshreshtha G (2016a) The use of selected red macroalgae (seaweeds) for the reduction of *Salmonella enteritidis* in poultry. Thèse de l'Université de Dalhousie. Nouvelle-Écosse, Canada

Kulshreshtha G, Borza T, Rathgeber B, et al (2016b) Red Seaweeds *Sarcodiotheca gaudichaudii* and *Chondrus crispus* down Regulate Virulence Factors of *Salmonella Enteritidis* and Induce Immune Responses in Caenorhabditis elegans. Front Microbiol 7:421. doi: 10.3389/fmicb.2016.00421

Kulshreshtha G, Burlot A-S, Marty C, et al (2015) Enzyme-assisted extraction of bioactive material from *Chondrus crispus* and *Codium fragile* and its effect on *herpes simplex* virus (HSV-1). Mar Drugs 13:558–80. doi: 10.3390/md13010558

Kumar, K., Ganesan, K., Subba Rao, P. V. (2015). Seasonal variation in nutritional composition of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty—an edible seaweed. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(5), 2751–2760. http://doi.org/10.1007/s13197-014-1372-0

Kusaykin, M., Bakunina, I., Sova, V., Ermakova, S., Kuznetsova, T., Besednova, N., Zvyagintseva, T. (2008). Structure, biological activity, and enzymatic transformation of fucoidans from the brown seaweeds. *Biotechnology Journal*, *3*(7), 904–15. doi:10.1002/biot.200700054

L

Lakmal, H. H. C., Lee, J.-H., Jeon, Y.-J. (2015). Enzyme-Assisted Extraction of a Marine Algal Polysaccharide, Fucoidan and Bioactivities. In *Polysaccharides* (pp. 1065–1077). Cham: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-16298-0_46

Langlois M, Allard JP, Nugier F, Aymard M (1986) A rapid and automated colorimetric assay for evaluating the sensitivity of herpes simplex strains to antiviral drugs. J Biol Stand 14:201–11.

Larousse, dictionnaire (en ligne consulté en 2016) URL :http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/

Lauret M, Oheix J, Derolez V, Laugier T (2011) Guide de reconnaissance et de suivi des macrophytes des lagunes du Languedoc-Rousillon. Rapport IFREMER, Cépralmar, Agence de l'eau RM&C, Région Languedoc-Roussillon

Lavialle M, Layé S (2010) Acides gras poly-insaturés (omega 3, omega 6) et fonctionnement du système nerveux central. Innovations Agronomique 10, 25-42

Le Gall, L., Saunders, G. W. (2007). A nuclear phylogeny of the Florideophyceae (Rhodophyta) inferred from combined EF2, small subunit and large subunit ribosomal DNA: establishing the new red algal subclass *Corallinophycidae*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *43*(3), 1118–30. http://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.11.012

Le Guillard C, Bergé J-P, Donnay-Moreno C, et al (2016) Soft liquefaction of the red seaweed *Grateloupia turuturu* Yamada by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis process. J Appl Phycol 28:2575–2585. doi: 10.1007/s10811-015-0788-x

Lê, S., Josse, J., Husson, F. (2008). FactoMineR : An *R* Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*, *25*(1), 1–18. doi:10.18637/jss.v025.i01

Leray C (2010) Les lipides dans le monde vivant. Lavoisier

Leucémie Espoir. (*En ligne, consulté en 2016)*. URL : www.eucémie-espoir.org

Linné C von, Gmelin JF, Metcalf Collection (North Carolina State University). NCRS, Tippmann Collection (North Carolina State University). NCRS (1788) Caroli a Linné. Systema naturae per regna tria naturae : secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Lipsiae : impensis Georg. Emanuel. Beer

Liu D, Keesing JK, Xing Q, Shi P (2009) World's largest macroalgal bloom caused by expansion of seaweed aquaculture in China. Marine Pollution Bulletin **58**: 888–895

Liu J, Hafting J, Critchley AT, et al (2013) Components of the Cultivated Red Seaweed *Chondrus crispus* Enhance the Immune Response of *Caenorhabditis elegans* to *Pseudomonas aeruginosa* through the pmk-1, daf-2/daf-16, and skn-1 Pathways. Appl Environ Microbiol 79:7343–7350. doi: 10.1128/AEM.01927-13

Liu, J., Kandasamy, S., Zhang, J., Kirby, C. W., Karakach, T., Hafting, J., Lichtenberger, L. (2015). Prebiotic effects of diet supplemented with the cultivated red seaweed *Chondrus crispus* or with fructo-oligo-saccharide on host immunity, colonic microbiota and gut microbial metabolites. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *15*(1), 279. http://doi.org/10.1186/s12906-015-0802-5

Livermore DM (2002) Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? Clin Infect Dis 34:634–640. doi: 10.1086/338782

Lobban CS, Harrison PJ (1994) Seaweed Ecology and Physiology. Cambridge University Press

Lobban CS, Wynne MJ (1981) The Biology of Seaweeds. University of California Press

Lodish H, Darnell JE (1997) Biologie moléculaire de la cellule. De Boeck Supérieur

Lortat-Jacob, H., Fender, P., & Vivès, R. (2005). Virus et héparane sulfate : des mécanismes d'adsorption cellulaire à l'entrée virale. *Virologie*, *9*(4), 315–325. Retrieved from http://www.jle.com/fr/revues/vir/e-docs/virus_et_heparane_sulfate_des_mecanismes_dadsorption_cellulaire_a_lentree_virale_266498/article.phtml?tab=texte

Ludwig M, Enzenhofer E, Schneider S, et al (2013) Efficacy of a Carrageenan nasal spray in patients with common cold: a randomized controlled trial. Respir Res 14:124. doi: 10.1186/1465-9921-14-124

Lüning K, Yarish C, Kirkman H (1990) Seaweeds: Their Environment, Biogeography, and Ecophysiology. John Wiley & Sons

M

Maberly et Madsen (1990) Contribution of air and water to the carbon balance of *Fucus spiralis* Marine Ecology Progress Series 62(1-2):175-183

Maberly SC (1990) Exogenous Sources of Inorganic Carbon for Photosynthesis by Marine Macroalgae1. Journal of Phycology **26**: 439–449

Maehre HK, Malde MK, Eilertsen K-E, Elvevoll EO (2014) Characterization of protein, lipid and mineral contents in common Norwegian seaweeds and evaluation of their potential as food and feed. J Sci Food Agric **94**: 3281–3290

Maharana, D., Das, P. B., Verlecar, X. N., Pise, N. M., Gauns, M. (2015). Oxidative stress tolerance in intertidal red seaweed Hypnea musciformis (Wulfen) in relation to environmental components. *Environmental Science and Pollution Research International*, *22*(23), 18741–9. http://doi.org/10.1007/s11356-015-4985-6

Mallo, G. V, Kurz, C. L., Couillault, C., Pujol, N., Granjeaud, S., Kohara, Y., Rasmuson, B. (2002). Inducible antibacterial defense system in *C. elegans. Current Biology : CB*, *12*(14), 1209–14. http://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00928-4

Manilal A, Sujith S, Kiran GS, et al (2009) Antimicrobial potential and seasonality of red algae collected from the southwest coast of India tested against shrimp, human and phytopathogens. Ann Microbiol 59:207–219. doi: 10.1007/BF03178319

Mansilla, A., Palacios, M., Navarro, N. P., Avila, M. (2007). Growth and survival performance of the gametophyte of *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta, Gigartinales) under defined nutrient conditions in laboratory culture. In *Nineteenth International Seaweed Symposium* (pp. 439–446). Dordrecht: Springer Netherlands. http://doi.org/10.1007/978-1-4020-9619-8_53

Marais D, Gawarecki D, Allan B, et al (2011) The effectiveness of Carraguard, a vaginal microbicide, in protecting women against high-risk human papillomavirus infection. Antivir Ther 16:1219–26. doi: 10.3851/IMP1890

Marfaing H (2013) Development of sustainable edible seaweed in France : an opportunity to integrate a healthy vegetable in the western diet. 21ème Symposium International sur les Algues, Bali du 22 au 26 avril 2013

Masarin F, Cedeno FRP, Chavez EGS, et al (2016) Chemical analysis and biorefinery of red algae *Kappaphycus alvarezii* for efficient production of glucose from residue of carrageenan extraction process. Biotechnol Biofuels 9:122. doi: 10.1186/s13068-016-0535-9

Mathieson, A. C., Burns, R. L. (1975). Ecological studies of economic red algae. v. growth and reproduction of natural and harvested populations of *Chondrus crispus* Stackhouse in New Hampshire. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *17*(2), 137–156. http://doi.org/10.1016/0022-0981(75)90027-1

Matsuhiro B, Conte AF, Damonte EB, et al (2005) Structural analysis and antiviral activity of a sulfated galactan from the red seaweed *Schizymenia binderi* (Gigartinales, Rhodophyta). Carbohydr Res 340:2392–2402. doi: 10.1016/j.carres.2005.08.004

Mayaud and Belec (2000) L'importance de l'herpès comme cofacteur de VIH. In TranscriptaseS **87** : 45 -49

McCandless EL, Craigie JS, Hansen JE (1975) Carrageenans of gametangial and tetrasporangial stages of *Iridaea cordata* (Gigartinaceae). Can J Bot 53:2315–2318. doi: 10.1139/b75-256

McCracken, D. A., Cain, J. R. (2006). Amylose in floriden starch. *New Phytologist*, *88*(1), 67–71. http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1981.tb04568.x

Mesnildrey L, Jacob Céline, Frangoudes K, Reunavot M, Lesueur M, (2012). Seaweed industry in France. Report. Interreg program NETALGAE. Les publications du Pôle halieutique agrocampus ouest n°9, 34 p.

Météo France [document en ligne] 2016. http://www.meteofrance.com/ climat/ france/ lorient/ 56185001/ releves

Mezzi I (2012) Application of response surface methodology for the implementation, optimization and characterization of a new radiation sensor based on commercial glass doped with copper. 2012; 82 p; Also available from Institut National des Sciences Appliquees et de Technologie de Tunis, Tunisia(TN); 77 refs.; Memoire de Projet de Fin d'Etudes (Mastere)

Michalak I, Chojnacka K (2014) Algal extracts: Technology and advances. Eng Life Sci 14:581–591. doi: 10.1002/elsc.201400139

Mineur F, Arenas F, Assis J, et al (2015) European seaweeds under pressure: Consequences for communities and ecosystem functioning. J Sea Res 98:91–108. doi: 10.1016/j.seares.2014.11.004

Mineur, F., Auguste, L. R., Stegenga, H., Verlaque, M., Maggs, C. A. (2012). Four new exotic red seaweeds on European shores. *Biol Invasions*, *14*, 1635–1641.

Minitab (en ligne, consulté en 2016) http://www.minitab.com/fr-fr/

Miscellaneaous Harrell (2016) Package Hmisc. CRAN

Mišurcová L (2011) Chemical Composition of Seaweeds. *In* S-K Kim, ed, Handbook of Marine Macroalgae. John Wiley & Sons, Ltd, pp 171–192

Mišurcová L (2011) Chemical Composition of Seaweeds. *In* S-K Kim, ed, Handbook of Marine Macroalgae. John Wiley & Sons, Ltd, pp 171–192

Mitchell DH, Stiles JW, Santelli J, Sanadi DR (1979) Synchronous growth and aging of *Caenorhabditis elegans* in the presence of fluorodeoxyuridine. J Gerontol 34:28–36.

Mollion J (1977) Recerches sur les carraghénanes et leur extraction : variations saisonnières du carraghénane de Hypnea. Université de Lille 1

Moncheva S, Gotsis-Skretas O, Pagou K, Krastev A (2001) Phytoplankton Blooms in Black Sea and Mediterranean Coastal Ecosystems Subjected to Anthropogenic Eutrophication: Similarities and Differences. Estuarine, Coastal and Shelf Science **53**: 281–295

Moreira R, Chenlo F, Torres MD (2016) Gelling characteristics and rheology of kappa/iota-hybrid carrageenans extracted from *Mastocarpus stellatus* dried at different temperatures. J Appl Phycol 1–10. doi: 10.1007/s10811-016-0879-3

Moreira, R., Chenlo, F., & Torres, M. D. (2016). Gelling characteristics and rheology of kappa/iota-hybrid carrageenans extracted from *Mastocarpus stellatus* dried at different temperatures. *Journal of Applied Phycology*. doi:10.1007/s10811-016-0879-3

Morgan KC, Wright JLC, Simpson FJ (1980) Review of chemical constituents of the red alga *Palmaria palmata* (dulse). Econ Bot 34:27–50. doi: 10.1007/BF02859553

Mouritsen OG, Dawczynski C, Duelund L, Jahreis G, Vetter W, Schröder M (2013) On the human consumption of the red seaweed dulse (*Palmaria palmata* (L.) Weber & Mohr). Journal of Applied Phycology **25**: 1777–1791

Mozzo (1990) Plan quadratique gigogne. Rev. Statist. Appli. 38(3),23-34

Mtolera, M., Buriyo, A. (2004). Studies on Tanzanian *Hypneaceae*: Seasonal Variation in Content and Quality of Kappa-Carrageenan from *Hypnea musciformis* (Gigartinales : Rhodophyta). *Western Indian Ocean Journal of Marine Science*, *3*(1), 43–49.

Munier M (2013) Étude du polymorphisme pigmentaire de l'algue rouge *Grateloupia turuturu* au travers de la purification et la caractérisation de la R-Phycoérythrine en vue d'une valorisation industrielle. Thèse de Doctorat de l'Université de Nantes.

N

Nakamura Y, Sasaki N, Kobayashi M, Ojima N, Yasuike M, Shigenobu Y, Satomi M, Fukuma Y, Shiwaku K, Tsujimoto A, et al (2013) The First Symbiont-Free Genome Sequence of Marine Red Alga, Susabi-nori (Pyropia yezoensis). PLoS ONE **8**: e57122

NASA (consulté en 2015) : http://science.nasa.gov/earth-science/oceanography/ocean-earth-system/ocean-water-cycle/

Neveu, T. (2016). Les échouages d'algues dans le Morbihan : quelles modalités de gestion et de valorisation ? Mémoire master 2. Université de Bretagne Sud

Neveux N, Magnusson M, Maschmeyer T, Nys R, Paul NA (2014) Comparing the potential production and value of high- energy liquid fuels and protein from marine and freshwater macroalgae. GCB Bioenergy. doi:10.1111/gcbb.12171

Nguyen TMH (2009) Valorisation de matières premières marines de faible valeur ajoutée : application aux co-produits de thon. Thèse. Université de Nantes

Nisizawa K, Noda H, Kikuchi R, Watanabe T (1987) The main seaweed foods in Japan. Hydrobiologia 151-152:5–29. doi: 10.1007/BF00046102

Niwa K, Furuita H, Yamamoto T (2007) Changes of growth characteristics and free amino acid content of cultivated *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales Rhodophyta) blades with the progression of the number of harvests in a nori farm. In: Nineteenth International Seaweed Symposium. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 237–243

Nobelprize (en ligne, consulté en 2016) pour Brenner. URL : nobelpreize.org

Norziah MH, Ching CY (2000) Nutritional composition of edible seaweed *Gracilaria changgi*. Food Chemistry **68**: 69–76

Novozyme (en ligne en 2016) URL : https://www.novozymes.com

Nozaki H, Takano H, Misumi O, Terasawa K, Matsuzaki M, Maruyama S, Nishida K, Yagisawa F, Yoshida Y, Fujiwara T, et al (2007) A 100%-complete sequence reveals unusually simple genomic features in the hot-spring red alga *Cyanidioschyzon merolae*. BMC Biol **5**: 28

Nyvall Collén, P., Sassi, J.-F., Rogniaux, H., Marfaing, H., Helbert, W. (2011). Ulvan lyases isolated from the Flavobacteria Persicivirga ulvanivorans are the first members of a new polysaccharide lyase family. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(49), 42063–71. doi:10.1074/jbc.M111.271825

O

O'Colla P (1952) Floridean Starch. Proceedings of the Royal Irish Academy Section B: Biological, Geological, and Chemical Science **55**: 321–329

O'Rourke EJ, Ruvkun G (2013) MXL-3 and HLH-30 transcriptionally link lipolysis and autophagy to nutrient availability. Nat Cell Biol 15:668–76. doi: 10.1038/ncb2741

Ohkubo S, Miyashita H, Murakami A, *et al* (2006) Molecular detection of epiphytic Acaryochloris spp. on marine macroalgae. Appl Environ Microbiol 72:7912–5. doi: 10.1128/AEM.01148-06

Okuda K, Oka K, Onda A, et al (2008) Hydrothermal fractional pretreatment of sea algae and its enhanced enzymatic hydrolysis. J Chem Technol Biotechnol 83:836–841. doi: 10.1002/jctb.1877

Olicard C. (2002) Etude des mécanismes antiviraux développés par les huîtres lors d'infections à virus de type herpès Rapport d'activité n°3 - troisième semestre IFREMER

OMS, Organisation Mondiale de la Santé (en ligne, consulté en 2016). URL : http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs400/es/

Osman EHM, Abu-Shady MA, Elshobary EM (2012) The Seasonal Fluctuation of the Antimicrobial Activity of Some Macroalgae Collected from Alexandria Coast, Egypt. In: *Salmonell*a - Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies. InTech,

Otaíza RD, Abades SR, Brante AJ (2001) Seasonal changes in abundance and shifts in dominance of life history stages of the carrageenophyte *Sarcothalia crispata* (Rhodophyta, Gigartinales) in south central Chile. J Appl Phycol 13:161–171. doi: 10.1023/A:1011135308283

P

Pasquier, C., Bertagnoli, S., Dunia, D., & Izopet, J. (2013). *Virologie humaine et zoonoses* DUNOD (Sciences S).

Pearson JP, Pesci EC, Iglewski BH (1997) Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. J Bacteriol 179:5756–67.

Pereira, L. (2013). Population studies and carrageenan properties in eight Gigartinales (Rhodophyta) from Western Coast of Portugal. *TheScientificWorldJournal*, *2013*, 939830. doi:10.1155/2013/939830

Pereira-Pacheco, F., Robledo, D., Rodríguez-Carvajal, L., & Freile-Pelegrín, Y. (2007). Optimization of native agar extraction from *Hydropuntia cornea* from Yucatán, México. *Bioresource Technology*, *98*(6), 1278–1284. doi:10.1016/j.biortech.2006.05.016

Perini, V., Bracken, M. E. S. (2014). Nitrogen availability limits phosphorus uptake in an intertidal macroalga. *Oecologia*, *175*(2), 667–676. http://doi.org/10.1007/s00442-014-2914-x

Perrin B, Pierson P (2015) Etape d'échantillonage du stock de *Solieria chordalis* en plongée sous-marine. Rapport pour le projet Littoralg.

Persat A, Nadell CD, Kim MK, et al (2015) The Mechanical World of Bacteria. Cell 161:988–997. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.005

Personnic S, Duhamel S, Bettarel Y, et al (2006) Les virus planctoniques : un compartiment biologique clé des milieux aquatiques. Le Courr l'environnement l'INRA 53:19–34.

Pierre G (2010). Caractérisation biochimique d'exopolymères d'origine algale du bassin de Marennes-Oléron et étude des propriétés physico-chimiques de surface de micro-organismes impliquées dans leur adhésion. Thèse. Université de la Rochelle.

Pierre G, Delattre C, Laroche C, Michaud P (2014) Galactans and Its Applications Galactans applications of. In: Polysaccharides. Springer International Publishing, Cham, pp 753–794

Pierre, G., Delattre, C., Laroche, C., & Michaud, P. (2015). Galactans and Its Applications Galactans applications of. In *Polysaccharides* (pp. 753–794). Cham: Springer International Publishing. http://doi.org/10.1007/978-3-319-16298-0_69

Piriz ML, Cerezo AS (1991) Seasonal variation of carrageenans in tetrasporic, cystocarpic and ?sterile? stages of *Gigartina skottsbergii* S. et G. (Rhodophyta, Gigartinales). Hydrobiologia 226:65–69. doi: 10.1007/BF00006807

Potin P (2008) Oxidative Burst and Related Responses in Biotic Interactions of Algae. In: Algal Chemical Ecology. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 245–271

Potin P, Richard C, Barbeyron T, et al (1995) Processing and hydrolytic mechanism of the cgkA-encoded kappa-carrageenase of *Alteromonas carrageenovora.* Eur J Biochem 228:971–5.

Powell JR, Kim DH, Ausubel FM (2009) The G protein-coupled receptor FSHR-1 is required for the *Caenorhabditis elegans* innate immune response. Proc Natl Acad Sci U S A 106:2782–7. doi: 10.1073/pnas.0813048106

Prajapati VD, Maheriya PM, Jani GK, Solanki HK (2014) Carrageenan: a natural seaweed polysaccharide and its applications. Carbohydr Polym 105:97–112. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.01.067

Pramitha VS, Lipton AP (2013) Antibiotic potentials of red macroalgae *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux and Hypnea valentiae (Turner) Montagne.

Prasad K, Das AK, Oza MD, Brahmbhatt H, Siddhanta AK, Meena R, Eswaran K, Rajyaguru MR, Ghosh PK (2010) Detection and Quantification of Some Plant Growth Regulators in a Seaweed-Based Foliar Spray Employing a Mass Spectrometric Technique sans Chromatographic Separation. J Agric Food Chem **58**: 4594–4601

Prasad P V. (1986) A seasonal study of the red seaweeds *Solieria tenera* and three species of Gracilaria from Jamaica. Hydrobiologia 140:167–171. doi: 10.1007/BF00007571

Previmer [document cartographique] 2016. http://www.previmer.org/

Prosselkov PV, Gross W, Igamberdiev AU, Schnarrenberger C (1996) Purification and characterization of UDP-D-galactose 4-epimerase from the red alga *Galdieria sulphuraria.* Physiologia Plantarum **98**: 753–758

Pseudomonas Genome DB (en ligne, consulté en 2016) URL: http://pseudomonas.com/

R

R, logiciel de statistique issu d'un projet GNU-GPL, développé depuis 1993. https://www.r-project.org/

Rafiquzzaman SM, Ahmed R, Lee JM, et al (2016) Improved methods for isolation of carrageenan from *Hypnea musciformis* and its antioxidant activity. J Appl Phycol 28:1265–1274. doi: 10.1007/s10811-015-0605-6

Raimundo, S. C., Avci, U., Hopper, C., Pattathil, S., Hahn, M. G., Popper, Z. A. (2016b). Immunolocalization of cell wall carbohydrate epitopes in seaweeds: presence of land plant epitopes in *Fucus vesiculosus* L. (Phaeophyceae). *Planta*, *243*(2), 337–354. doi:10.1007/s00425-015-2412-3

Raimundo, S. C., Pattathil, S., Eberhard, S., Hahn, M. G., Popper, Z. A. (2016a). β-1,3-Glucans are components of brown seaweed (Phaeophyceae) cell walls. *Protoplasma*, 1–20. doi:10.1007/s00709-016-1007-6

Rajasulochana P, Krishnamoorthy P, Dhamotharan D (2010) Amino acids, fatty acids and minerals in Kappaphycus sps. Journal of agricultural and biological science

Ramus J, Meer JP (1983) A physiological test of the theory of complementary chromatic adaptation. . color mutants of a red seaweed1. Journal of Phycology **19**: 86–91

Rastegar Lari A, Bahrami Honar H, Alaghehbandan R (1998) *Pseudomonas* infections in Tohid Burn Center, Iran. Burns 24:637–641. doi: 10.1016/S0305-4179(98)00090-4

Raude A (2016) Rapport sur les règles relatives à l'implantation des fermes algocoles et à la labellisation "bio" des algues. Rapport de stage de Master 1. Université de Bretagne Sud.

Ravanel S, Gakière B, Job D, Douce R (1998) The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. Proc Natl Acad Sci U S A 95:7805–12.

Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE (2000) Biologie végétale. De Boeck Supérieur

Reed LJ, Muench H (1938) A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints,. Am J Epidemiol **27**: 493–497

Reis, R. P., Yoneshigue-Valentin, Y., Pereira dos Santos, C. (2008). Spatial and temporal variation of *Hypnea musciformis* carrageenan (Rhodophyta - Gigartinales) from natural beds in Rio de Janeiro State, Brazil. *Journal of Applied Phycology*, *20*(1), 1–8. http://doi.org/10.1007/s10811-007-9173-8

Reviers B de (2003) Biologie et phylogénie des algues. Tome 2. Belin, Paris

Rhein-Knudsen, N., Ale, M., & Meyer, A. (2015). Seaweed Hydrocolloid Production: An Update on Enzyme Assisted Extraction and Modification Technologies. *Marine Drugs*, *13*(6), 3340–3359. doi:10.3390/md13063340

Rhimou B, Hassane R, José M, Nathalie B (2010) The antibacterial potential of the seaweeds (*Rhodophyceae*) of the Strait of Gibraltar and the Mediterranean Coast of Morocco. African J Biotechnol 9:6365–6372. doi: 10.4314/AJB.V9I38.

Robic A, Rondeau-Mouro C, Sassi J-F, et al (2009) Structure and interactions of ulvan in the cell wall of the marine green algae *Ulva rotundata* (Ulvales, Chlorophyceae). Carbohydr Polym 77:206–216. doi: 10.1016/j.carbpol.2008.12.023

Robledo DR, García-Reina G (1993) Apical callus formation in *Solieria filiformis* (Gigartinales, Rhodophyta) cultured in tanks. *In* ARO Chapman, MT Brown, M Lahaye, eds, Fourteenth International Seaweed Symposium. Springer Netherlands, pp 401–406

Roche A. (2015) Response surface methodologiy for functional data with application to nuclear safety. Rapport.

Rodríguez MC, Merino ER, Pujol CA, et al (2005) Galactans from cystocarpic plants of the red seaweed *Callophyllis variegata* (Kallymeniaceae, Gigartinales). Carbohydr Res 340:2742–2751. doi: 10.1016/j.carres.2005.10.001

Roeder, T., Stanisak, M., Gelhaus, C., Bruchhaus, I., Grötzinger, J., & Leippe, M. (2010). Caenopores are antimicrobial peptides in the nematode *Caenorhabditis elegans* instrumental in nutrition and immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, *34*(2), 203–209. http://doi.org/10.1016/j.dci.2009.09.010

Rogers, D. J., Topliss, J. A. (1983). Purification and Characterisation of an Anti-Sialic Acid Agglutinin from the Red Alga *Solieria chordalis* (C. Ag.) J. Ag. *Botanica Marina*, *26*(6), 301–306. http://doi.org/10.1515/botm.1983.26.6.301

Romero, J. B., Villanueva, R. D., & Montaño, M. N. E. (2008). Stability of agar in the seaweed *Gracilaria eucheumatoides* (Gracilariales, Rhodophyta) during postharvest storage. *Bioresource Technology*, *99*(17), 8151–8155. doi:10.1016/j.biortech.2008.03.017

Rupérez P (2002) Mineral content of edible marine seaweeds. Food Chemistry **79**: 23–26

Russell, J., Vidal-Gadea, A. G., Makay, A., Lanam, C., & Pierce-Shimomura, J. T. (2014). Humidity sensation requires both mechanosensory and thermosensory pathways in *Caenorhabditis elegans. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(22), 8269–74. http://doi.org/10.1073/pnas.1322512111

S

Samarakoon K, Jeon Y-J (2012) Bio-functionalities of proteins derived from marine algae — A review. Food Research International **48**: 948–960

Sánchez-Machado DI, López-Cervantes J, López-Hernández J, Paseiro-Losada P (2004) Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. Food Chemistry **85**: 439–444

Sangha, J. S., Kelloway, S., Critchley, A. T., Prithiviraj, B. (2014). Seaweeds (Macroalgae) and Their Extracts as Contributors of Plant Productivity and Quality (pp. 189–219). http://doi.org/10.1016/B978-0-12-408062-1.00007-X

Santelices B (1991) Production ecology of *Gelidium.* Hydrobiologia **221**: 31–44

Saunders GW, Hommersand MH (2004) Assessing red algal supraordinal diversity and taxonomy in the context of contemporary systematic data. Am J Bot **91**: 1494–1507

Schemper M (2003) Predictive accuracy and explained variation. Stat Med 22:2299–308. doi: 10.1002/sim.1486

Schönknecht G, Chen W-H, Ternes CM, Barbier GG, Shrestha RP, Stanke M, Bräutigam A, Baker BJ, Banfield JF, Garavito RM, et al (2013) Gene Transfer from Bacteria and Archaea Facilitated Evolution of an Extremophilic Eukaryote. Science **339**: 1207–1210

Sedrati M. et Cochet J. (2015) AlgoBox® : Un outil écologique pour la régénération des pieds de dunes grâce aux échouages de macro-algues. Conférence méditerranéenne Côtière et Maritime. Edition 3, Ferrara, Italie

Sekar S, Chandramohan M (2007) Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. J Appl Phycol **20**: 113–136

Selvin J, Lipton AP (2004) Biopotentials of *Ulva fasciata* and *Hypnea musciformis* collected from the Peninsular Coast of India. J Mar Sci Technol 12:1–6

Senthilkumar N, Kurinjimalar C, Thangam R, Suresh V, Kavitha G, Gunasekaran P, Rengasamy R (2013) Further studies and biological activities of macromolecular protein R-Phycoerythrin from *Portieria hornemannii.* Int J Biol Macromol **62**: 107–116

Shaye DD, Greenwald I (2011) Ortholist: A compendium of C. elegans genes with human orthologs. PLoS One 6:e20085. doi: 10.1371/journal.pone.0020085

Shen L, Wang X, Wang Z, et al (2008) Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. Food Chem 107:929–938. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.08.047

Shivers, R. P., Youngman, M. J., & Kim, D. H. (2008). Transcriptional responses to pathogens in *Caenorhabditis elegans. Current Opinion in Microbiology*, *11*(3), 251–6. http://doi.org/10.1016/j.mib.2008.05.014

Shutterstock (consulté en avril 2016) illustration vectorielle libre de droits : Diagram of Herpes simplex virus particule structure. Lien URL : http://www.shutterstock.com/pic-173578478/stock-vector-diagram-of-herpes-simplex-virus particle-structure.html

Sigma –aldrich (en ligne, consulté en 2016) URL : http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h1145?lang=fr&region=FR

Silva P C (1993). Report of the committee for algae: 1. Taxon 42:699–710.

Siryaporn A, Kuchma SL, O'Toole GA, Gitai Z (2014) Surface attachment induces *Pseudomonas aeruginosa* virulence. Proc Natl Acad Sci 111:16860–16865. doi: 10.1073/pnas.1415712111

Skoler-Karpoff S, Ramjee G, Ahmed K, et al (2008) Efficacy of Carraguard for prevention of HIV infection in women in South Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet 372:1977–1987. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61842-5

Škrovánková S (2011) Seaweed vitamins as nutraceuticals. Adv Food Nutr Res **64**: 357–369

Smetacek V, Zingone A (2013) Green and golden seaweed tides on the rise. Nature **504**: 84–88

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., … Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, *150*(1), 76–85.

Soares F, Chopin T, Pereira L (2016) Review of the Chemotaxonomic Significance of some Phycocolloids Present in Economically Important Algae (Gigartinales, Rhodophyta). Chapter 8 In. Carrageenans: Sources and Extraction Methods, Molecular Structure, Bioactive Properties and Health Effects. pp 160–188

Soufi-Kechaou E, Jaouen P, Ben Amar R, Bergé JP (2012) Influence of hydrolysis time on protein recovery and amino acid composition of hydrolysates from *Sepia officinalis viscera*. Sci Res Reporter 2: 115-129.

Stewart PS, William Costerton J (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet 358:135–138. doi: 10.1016/S0140-6736(01)05321-1

Stewart WDP (1974) Algal Physiology and Biochemistry. University of California Press

Stirk WA, Novák O, Strnad M, van Staden J (2003) Cytokinins in macroalgae. Plant Growth Regulation **41**: 13–24

Stirk WA, Van Staden J (2014) Chapter Five - Plant Growth Regulators in Seaweeds: Occurrence, Regulation and Functions. *In* N Bourgougnon, ed, Advances in Botanical Research. Academic Press, pp 125–159

Sudhakar M.P., Jagatheesan A., Perumal K., Arunkumar K (2014) Methods of phycobiliprotein extraction from *Gracilaria crassa* and its applications in food colourants, Algal Research, Volume 8, March 2015, Pages 115-120, ISSN 2211-9264, http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.01.011.

Sun, J., Aballay, A., & Singh, V. (2015). Intracellular infectiology : Cell processes. In *Encyclopedia of Cell Biology*.

Syad AN, Shunmugiah KP, Kasi PD (2013) Seaweeds as nutritional supplements: Analysis of nutritional profile, physicochemical properties and proximate composition of *G. acerosa* and *S. wightii*. Biomedicine & Preventive Nutrition **3**: 139–144

Synowiecki, J. (2007). The Use of Starch Processing Enzymes in the Food Industry. In *Industrial Enzymes* (pp. 19–34). Dordrecht: Springer Netherlands. doi:10.1007/1-4020-5377-0_2

T

Talarico LB, Zibetti RG., Faria PC., et al (2004) Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. Int J Biol Macromol 34:63–71. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2004.03.002

Tan MW, Rahme LG, Sternberg JA, et al (1999) *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify P. aeruginosa virulence factors. Proc Natl Acad Sci U S A 96:2408–13. doi: 10.1073/pnas.96.5.2408

Tarakhovskaya ER, Maslov YI, Shishova MF (2007) Phytohormones in algae. Russ J Plant Physiol **54**: 163–170

Tavennec M (2009) La gestion d'une problèmatique algale dans un secteur hautement touristique la presqu'île de Rhuys. Rapport de Stage Master réalisé à la Communauté de Commune de la presqu'île de Rhuys.

Taylor PK, Yeung ATY, Hancock REW (2014) Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Towards the development of novel anti-biofilm therapies. J Biotechnol 191:121–130. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.09.003

Therkelsen G (2002) A method for manufacturing and fractionating gelling and non-gelling carrageenans from bi-component seaweed. Brevet WO2003059955 A1.

Thouvenot D, Billaud G, Morfin F (2004) Actualité de la culture cellulaire et de son application au diagnostic des infections virales. Virologie 8:297–309.

Tielen P, Kuhn H, Rosenau F, et al (2013) Interaction between extracellular lipase LipA and the polysaccharide alginate of *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Microbiol 13:159. doi: 10.1186/1471-2180-13-159

Tito O, Tito O, Liao L (2007) Ethnobotany of *Solieria robusta* (Gigartinales, Rhodophyta) in Zamboanga, Philippines.

Tiwari, B. K., Troy, D. J. (2015). Seaweed sustainability : food and non-food applications. by Brijesh K. Tiwari, Declan Troy.

Trevor R, Pettitt A, Jones L, Harwood JL (1989) Lipids of the marine red algae, *Chondrus crispus* and *Polysiphonia lanosa*, Phytochemistry, Volume 28, Issue 2, 1989, Pages 399-405

Tripoteau L (2015) Valoraisation des coproduits de l'holothurie *Cucumaria frondosa* par l'étude d'extraits bioactifs et approche écotoxicologique des métabolite secondaires relargués en situation de stress. Thèse. Université de Bretagne Sud

Troemel, E. R., Chu, S. W., Reinke, V., Lee, S. S., Ausubel, F. M., & Kim, D. H. (2006). p38 MAPK Regulates Expression of Immune Response Genes and Contributes to Longevity in *C. elegans*. *PLoS Genetics*, *2*(11), e183. http://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020183

Trybala E, Liljeqvist JA, Svennerholm B, Bergström T (2000) Herpes simplex virus types 1 and 2 differ in their interaction with heparan sulfate. J Virol 74:9106–14.

Tsang KW, Shum DK, Chan S, et al (2003) *Pseudomonas aeruginosa* adherence to human basement membrane collagen in vitro. Eur Respir J 21:932–8. doi: 10.1183/09031936.03.00097302

Tsujino, I., Yabe, K., Sekikawa, I., Hamanaka, N. (1978). Isolation and structure of a mycosporine from the red alga. *Tetrahedron Letters*, *19*(16), 1401–1402. http://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)94556-3

U

UEB-Idéalg. (2016). L'utilisation des algues dans le monde. Retrieved from http://www.idealg.ueb.eu/macroAlgues/utilisation/

V

Vairappan CS (2006) Seasonal occurrences of epiphytic algae on the commercially cultivated red alga *Kappaphycus alvarezii* (*Solieriaceae*, Gigartinales, Rhodophyta). In: Eighteenth International Seaweed Symposium. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 385–391

Valentini F (2005) L'indispensable en Biochimie. Bréal, Rosny-sous-Bois (Seine-Saint-Denis)

Vasil ML (1986) *Pseudomonas aeruginosa*: Biology, mechanisms of virulence, epidemiology. J Pediatr 108:800–805. doi: 10.1016/S0022-3476(86)80748-X

Vasil ML, Ochsner UA (1999) The response of Pseudomonas aeruginosa to iron: genetics, biochemistry and virulence. Mol Microbiol 34:399–413.

Vásquez JA, Alonso Vega JM (2001*) Chondracanthus chamissoi* (Rhodophyta, Gigartinales) in northern Chile: ecological aspects for management of wild populations. J Appl Phycol 13:267–277. doi: 10.1023/A:1011152922832

Vázquez-Delfín E, Robledo D, Freile-Pelegrín Y (2014) Microwave-assisted extraction of the Carrageenan from *Hypnea musciformis* (Cystocloniaceae, Rhodophyta). J Appl Phycol 26:901–907. doi: 10.1007/s10811-013-0090-8

Verhaeghe P (2007) Synthèse, réactivité et potentiel pharmacologique d'hétérocycles azotés N-alpha-trichlorométhylés.

Vinatoru M (2001) An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. Ultrasonics Sonochemistry **8**: 303–313.

Viola, R., Nyvall, P., & Pedersén, M. (2001). The unique features of starch metabolism in red algae. *Proceedings. Biological Sciences*, *268*(1474), 1417–22. http://doi.org/10.1098/rspb.2001.1644

W

Wang, T., Jónsdóttir, R., Kristinsson, H. G., Hreggvidsson, G. O., Jónsson, J. Ó., Thorkelsson, G., & Ólafsdóttir, G. (2010). Enzyme-enhanced extraction of antioxidant ingredients from red

algae *Palmaria palmata*. *LWT - Food Science and Technology*, *43*(9), 1387–1393. doi:10.1016/j.lwt.2010.05.010

Watanabe F, Yabuta Y, Bito T, Teng F (2014) Vitamin B12-Containing Plant Food Sources for Vegetarians. Nutrients **6**: 1861–1873

Wei T et Simko V (2016) cCorrplot: Visualization of a Correlation Matrix. Cran-r-project.org

Werner, G. H. (1977). Laboratory models of herpes virus infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *3*(suppl A), 71–72. http://doi.org/10.1093/jac/3.suppl_A.71

Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nat Protoc 3:163–75. doi: 10.1038/nprot.2007.521

Wiencke C, Bischof K (2012) Seaweed biology : novel insights into ecophysiology, ecology and utilization.

Wijesekara I, Pangestuti R, Kim S-K (2011) Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. Carbohydr Polym 84:14–21. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.10.062

Wijesinghe WAJP, Athukorala Y, Jeon Y-J (2011) Effect of anticoagulative sulfated polysaccharide purified from enzyme-assistant extract of a brown seaweed *Ecklonia cava* on Wistar rats. Carbohydr Polym 86:917–921. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.05.047

Wijesinghe, W. A. J. P., Jeon, Y.-J. (2012). Enzyme-assistant extraction (EAE) of bioactive components: a useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: a review. *Fitoterapia*, *83*(1), 6–12. doi:10.1016/j.fitote.2011.10.016

Williamson CJ, Brodie J, Goss B, Yallop M, Lee S, Perkins R (2014) *Corallina* and *Ellisolandia* (Corallinales, Rhodophyta) photophysiology over daylight tidal emersion: interactions with irradiance, temperature and carbonate chemistry. Mar Biol **161**: 2051–2068

Winberg PC, Fitton HJ, Stringer D, et al (2014) Controlling Seaweed Biology, Physiology and Metabolic Traits in Production for Commercially Relevant Bioactives in Glycobiology. In: Faculty of Science, Medicine and Health - Papers. Elsevier, pp 221–252

Witvrouw M, De Clercq E (1997) Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. Gen Pharmacol 29:497–511.

Wong KF, Craigie JS (1978) Sulfohydrolase Activity and Carrageenan Biosynthesis in *Chondrus crispus* (Rhodophyceae). Plant Physiol 61:663–6.

Wormatlas (en ligne, consulté en 2016) A database featuring behavioral and structural anatomy of *Caenorhabditis elegans*. URL: wormatlas.org

Wormbook (en ligne, consulté en 2015) The online review of C. elegans biology. URL: wormbook.org

X

Xia, E. & Zhang, J. (1984). A new species of Solieria from China. Chinese Journal of Oceanology and Limnology 2: 119-124

Y

Yaich H, Garna H, Besbes S, et al (2011) Chemical composition and functional properties of Ulva lactuca seaweed collected in Tunisia. Food Chem 128:895–901. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.03.114

Yang B, Jiang Y, Shi J, et al (2011) Extraction and pharmacological properties of bioactive compounds from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit — A review. Food Res Int 44:1837–1842. doi: 10.1016/j.foodres.2010.10.019

Yaphe, W., Arsenault, G.P., (1965) Improved resorcinol reagent for the determination of fructose, and of 3, 6-anhydrogalactose in polysaccharides. Analyt. Biochem. 13, 143–148.

Ye, D., Jiang, Z., Zheng, F., Wang, H., Zhang, Y., Gao, F., Shi, G. (2015). Optimized Extraction of Polysaccharides from *Grateloupia livida* (Harv.) Yamada and Biological Activities. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *20*(9), 16817–32. doi:10.3390/molecules200916817

Yong, W. T. L., Chin, J. Y. Y., Thien, V. Y., Yasir, S. (2014b). Evaluation of growth rate and semi-refined carrageenan properties of tissue-cultured *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales). *Phycological Research*, *62*(4), 316–321. http://doi.org/10.1111/pre.12067

Yong, W. T. L., Ting, S. H., Yong, Y. S., Thien, V. Y., Wong, S. H., Chin, W. L., Anton, A. (2014a). Optimization of culture conditions for the direct regeneration of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae). *Journal of Applied Phycology*, *26*(3), 1597–1606. http://doi.org/10.1007/s10811-013-0191-4

Yu H, He X, Xie W, et al (2014) Elastase LasB of *Pseudomonas aeruginosa* promotes biofilm formation partly through rhamnolipid-mediated regulation. Can J Microbiol 60:227–35. doi: 10.1139/cjm-2013-0667

Z

Zainal Ariffin SH, Yeen WW, Zainol Abidin IZ, et al (2014) Cytotoxicity effect of degraded and undegraded kappa and iota carrageenan in human intestine and liver cell lines. BMC Complement Altern Med 14:508. doi: 10.1186/1472-6882-14-508

Zemke-White WL, Ohno M (1999) World seaweed utilisation: An end-of-century summary. J Appl Phycol 11:369–376. doi: 10.1023/A:1008197610793

Zubia, M., Fabre, M.-S., Kerjean, V., & Deslandes, E. (2009). Antioxidant and cytotoxic activities of some red algae (Rhodophyta) from Brittany coasts (France). *Botanica Marina*, *52*(3), 268–277. doi:10.1515/BOT.2009.037

Enzyme Engineering
ISSN: 2329-6674

Burlot et al., Enz Eng 2016, 5:2
DOI: 10.4172/2329-6674.1000148

Research Article Open Access

Response Surface Methodology for Enzyme-Assisted Extraction of Water-Soluble Antiviral Compounds from the Proliferative Macroalga *Solieria chordalis*

Burlot Anne-Sophie*, Bedoux Gilles and Bourgougnon Nathalie

Université de Bretagne Sud, Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, Campus de Tohannic – BP 573 56 017 Vannes, Cedex, France

Abstract

Macroalgal blooms frequently occur in France. On a part of the coastline, these algal blooms are mainly composed of red seaweeds like *Solieria chordalis* and constitute an unexploited significant natural biomass. In this study, active compounds from *Solieria chordalis* were extracted and evaluated as a potential source of natural antivirals, coupling biotechnological development with economic and ecological benefits. In order to extract in water the highest quantity of potential active compounds, a sustainable process was developed, namely the enzyme-assisted extraction. The quantity of water-soluble compounds increased by 30% after the addition of enzymes, in comparison with an aqueous extraction. The optimization of conditions using a response surface methodology improved the yield and allowed to study the influence of different extraction parameters simultaneously, notably the nature and the quantity of enzymes, the temperature and the time of extraction. This latter parameter was the most influent on extraction yield with the nature of the enzyme. The best antiherpetic activity was obtained with the extract after the action of a type of proteases with an EC_{50} of 86.0 µg.mL^{-1}. Moreover, a positive correlation between sulfated polysaccharides and the antiviral activity of extracts was demonstrated. For the first time, soft biotechnology with enzymes using surface response methodology has been performed in order to obtain water-soluble antiviral extracts from the red proliferative seaweed *Solieria chordalis*.

Keywords: Antiherpetic activity, Box-Behnken design, Enzyme-assisted extraction, Harmful algal bloom, Red seaweed

Abbreviations: EAE: Enzyme-Assisted Extraction; HSV-1: *Herpes Simplex* Virus Type 1; WSE: Water-Soluble Extract.

Introduction

Excessive growths reported for some species of green, brown and red seaweeds are responsible for the recent formation of harmful marine macroalgal blooms worldwide. Local wind and tides drive seaweeds to the shore, causing the destruction of coastal marine habitats and economical losses. Each year, in South Brittany, in France, over 2,000 tons of red seaweeds, mainly composed of *Solieria chordalis*, have to be removed [1].

Largely unexploited, *S. chordalis* holds considerable potential for biotechnological development, since some of its polymers have already been shown to possess immunological, haemagglutinic, and antiviral activities with practical application in biomedicine [2,3].

In addition to the compounds inside seaweed cells, there are other potential active components associated with the cell walls [4]. To isolate these metabolites of interest, the cell wall must be cleaved, but the presence of large quantities of various interconnected polysaccharides and their bonding with proteins reduces the efficiency of the standard extraction methods used to date (e.g. organic and water extractions) [5]. Enzyme-assisted extraction (EAE) is an environmentally friendly extraction method known by its high efficiency and reduced solvent consumption and time [4]. In this regard, proteins, especially enzymes from marine and terrestrial microorganisms, are used to release in water the maximum number of compounds from seaweeds, thus improving their availability and their digestibility for animals, humans, or plants [5,6].

Numerous studies have shown the benefits of using enzymes to add value to seaweed extracts or compounds [3,4,7], but only a few deal with the optimization of hydrolysis conditions on algal material [5]. Parameters such as the time needed for the enzymatic hydrolysis, temperature, nature and concentration of enzymes, pH, and raw material pretreatment have shown their impact on the extraction [8]. Response surface methodology is based on the fit of statistical models to measured data obtained in relation to an experimental design. This methodology has been shown to be useful for improving, developing, and optimizing biochemical processes to extract the maximum number of compounds of interest [8]. The Box-Behnken design was chosen to investigate the influence of three parameters on the extraction yield of water-soluble compounds, notably the time of extraction, the temperature, and the enzyme quantity used on dried seaweeds.

In this study, the isolation of antiviral extracts from the red macroalga *Solieria chordalis* was performed by using enzymes. After selecting the most efficient enzyme in the release of antiviral compounds, an experimental design procedure was used to increase the extraction yield.

Materials and Methods

Algal material

About 20 kg of *S. chordalis* (Rhodophyta, Gigartinales) were collected in October 2013 from the littoral zone of Saint Gildas de Rhuys in Brittany, France. Seaweeds were washed with tap water. They

***Corresponding author:** Burlot Anne-Sophie, Université de Bretagne Sud, Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, Campus de Tohannic – BP 573 56 017 Vannes, Cedex, France, Tel: (+33) 2 97 01 72 53; E-mail: anne-sophie.burlot@univ-ubs.fr

Received June 26, 2016; **Accepted** July 26, 2016; **Published** July 29, 2016

Citation: Burlot A-S, Bedoux G, Bourgougnon N, (2016) Response Surface Methodology for Enzyme-Assisted Extraction of Water-Soluble Antiviral Compounds from the Proliferative Macroalga *Solieria chordalis*. Enz Eng 5: 148. doi:10.4172/2329-6674.1000148

Copyright: © 2016 Burlot A-S et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

were scraped and drained to remove adherent seawater, sediment and epiphytes. Cleaned and wrung out seaweeds were ground to pieces of 3 mm with a hammer mill prior to freeze drying.

Enzymes

Eight commercial enzyme solutions from Novozymes (Le Pecq, France) were separately evaluated for the extraction of *S. chordalis*: three proteases (subtilisin, neutral metallo-proteinase and exopeptidase) that are named P1 to P3 and five carbohydrases (amyloglucosidase, alpha-amylase, endo-xylanase, endo-beta-glucanase, polygalacturonase beta-glucanase) that are named C1 to C5 respectively.

Cells and virus

African green monkey kidney cells (ATCC CCL-81) were grown in Eagle's minimum essential medium (MEM, Eurobio, Courtaboeuf, France) supplemented with 8% fetal calf serum (FCS, Eurobio) and 1% of antibiotics (10,000 IU mL^{-1} penicillin, 25,000 IU mL^{-1} colimycin, 10 $mg.mL^{-1}$ streptomycin, Sigma Aldrich).

HSV-1 (*Herpes Simplex* Virus type 1, wild type strain 17) was obtained from Pr. Agut, Laboratoire de Dynamique, épidémiologie et traitement des infections virales in Pitié Salpétrière (Paris, France). Viruses are stored in infected Vero cells bathing in supplemented MEM at – 80°C before use.

Extractions

To characterize the raw matter of *S. chordalis*, 10 mg of freeze-dried matter were mixed with 5 mL HCl 1M in a sealed vial. The acid extraction was performed at 100°C for 2 h, after which 5 mL NaOH 1M were added. The final solution was used to measure the neutral sugars, uronic acids, and proteins contents. To analyze the sulfate groups linked to polysaccharides, the same conditions of extraction were performed in ultrapure water.

EAE was achieved in a final volume of 300 mL with 19.5 g of freeze-dried matter of *S. chordalis* and the rest with distilled water. Enzymes (5% dw/dw) were added to the mixture that is incubated at 50°C. Extractions were carried out for 3 hours. Enzymes were then denatured at 85°C for 15 min. The obtained water-soluble extracts (WSE) were filtered, separated from the washed residue and freeze-dried. A blank extracted in the same conditions (3h, 50°C) but without enzymes served as a control. Each extraction was performed in triplicate.

Extraction yield determination

The EAE yield represents the proportion, in percentage, of the dry weight of *S. chordalis* found in the WSE. The dry weight of WSE was determined gravimetrically after incubation at 100°C overnight.

Biochemical composition analysis

The composition of *S. chordalis* and of WSE is defined as the proportions in percentage of each chemical compound family found in the total dried weight of the raw matter or of WSEs. All the biochemical analyses were carried out in triplicate. Neutral sugars were determined by the phenol sulphuric acid method described by Dubois et al. [9]. Uronic acids were determined by using the meta-hydroxy-di-phenyl (MHDP) method [10]. Sulfated groups content was determined by the Azure A method that reacts specifically with sulfates linked to the polysaccharides [11]. Lipids were extracted with a mixture of chloroform/methanol (1:1, v/v) over 2 days under agitation. The extract was filtered and washed with distilled water. The lipid content was determined gravimetrically. Proteins were quantified by the bicinchoninic acid colorimetric method (BCA) with a Micro BC Assay Kit (Interchim, Montluçon, France) [12]. Ash values were determined gravimetrically after incineration of samples followed by 2 h at 700°C.

Cytotoxicity and antiherpetic activity

Dilutions of samples (1 µg/mL to 200 µg/mL) were prepared in Eagle's MEM supplemented with 8% FCS and distributed into a 96-well plate. One hundred microliters of cellular suspension (3.5 × 105 Vero mammalian cells/mL) in supplemented Eagle's MEM were added in each well. In half of the microplate, cells were infected by the HSV-1 (*Herpes Simplex* Virus type 1) at a multiplicity of infection of 0.001 ID_{50}/cells. The last two columns of the 96-well plate were used for the controls of the living cells and infected cells by HSV-1. The 96-well plate was incubated for 3 days at 37°C with 5% CO_2.

Cytotoxicity was tested using cell viability by the neutral red dye method. Optical density (OD) was measured at 540 nm. The 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) was defined as the concentration of seaweed extract that reduced the OD of treated cells to 50% of that of untreated cells [13].

The antiherpetic compound acyclovir was used as reference inhibitor. The 50% effective antiviral concentration (EC_{50}) was expressed as the concentration that achieved 50% protection of virus-infected cells [13].

Experimental design for the optimization

Three parameters were examined: the time of the extraction, the temperature, and the ratio of enzyme on substrate (E/S). They were varied into three levels. The measured response was the extraction yield of water soluble compounds. A total of 13 experiments were performed in triplicate (Table 1). The order of the experiments was fully randomized. To check the model predicted by the statistical analyses, experiments were conducted (Table 1).

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± standard deviation (SD). The statistical analyses were carried out with the software Minitab® 17 using one-way analysis of variance (ANOVA) according to the Fisher's Least Significant Difference (LSD) test at 5% level to evaluate the differences between extracts or extraction parameters.

Results

Biochemical composition of *S. chordalis*

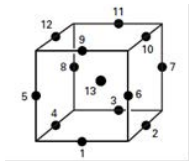
The biochemical composition of the red macroalga *S. chordalis* is given in Table 2.

S. chordalis is composed essentially of water up to 90%. The dry matter is rich in ash (43.3%) and in sulfated polysaccharides (a little less than 49.5% if the neutral sugars, sulfate groups, and uronic acids contents are gathered and taking in account interferences between compounds during the biochemical assays). Lipids represented a small percentage of the dry weight of the macroalgae (3.0%). Proteins constituted over one fifth of the dry matter (22%).

Screening of enzymes

The effect of the different enzymes on the extraction yield is shown in Figure 1.

All WSEs, after the action of enzymes, contain quantitatively more compounds than the blank. The protease P1 is significantly the most



Levels of independent variables used	Extraction time *(min)*	Temperature *(°C)*	E/S *(% DW algae)*
-1	90	25	2.5
0	180	37.5	5
1	270	50	7.5

Table 1: Box-Behnken experimental design and levels of independent variables used to optimize the enzyme-assisted extraction

Dry weight	Ash content	Proteins	Lipids	Uronic acids	Sulfate groups	Neutral sugars
(% FW)[a]	*(% DW)*[b]	*(% DW)*[b]	*(% DW)*[b]	*(% DW)*[b]	*(% DW)*[b]	*(% DW)*[b]
10.0 ± 0.6	43.3 ± 3.1	22.0 ± 2.0	3.0 ± 0.1	3.1 ± 0.1	14.7 ± 1.0	31.7 ± 0.7

[a] Percentage of dry weight (DW) in the fresh weight (FW).
[b] Calculated on the dry weight.
Values are means ± SD (n=9).

Table 2: Dry weight and biochemical composition of *S. chordalis*.

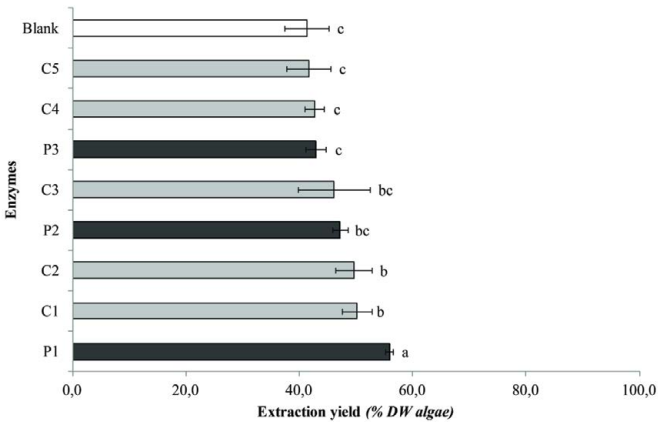


Figure 1: Extraction yield of WSEs from *S. chordalis* (180 min, 50°C, 5% enzyme). [Values are means ± SD (n=9). Values with different superscript letters are significantly different (p<0.05) according to the Fisher LSD test. WSEs after action of proteases are indicated by black bars; WSEs after action of carbohydrases by light grey bars; water extract by the white bar. The order of letters is correlated with the extraction yield].

efficient in the release of water-soluble compounds as the extraction yield reached almost 60% (55.8%). The gain of the released compounds found in the WSE due to the action of P1 is 30%, compared to an aqueous extraction in the same conditions (Blank). Extraction yields after the action of carbohydrases C1 to C3 and of the protease P2 are not significantly different and are between 46.1 and 50.1%, but only C1 and C2 increased significantly the yield compared to the blank. The others enzymes (C4, C5, and P3) and the blank obtained a similar yield between 41.3 and 43.0% of the total compounds present in *S. chordalis*.

Biochemical compositions of extracts

The proportions of water-soluble compounds composing the dry weight of WSEs are presented in Table 3. To measure the rates of the different compounds families, no acid or water extraction was performed. Only the available and free compounds of the extracts were then considered. In the last column titled *Others*, no identified compounds are found. They may correspond to agglomerates, or other compounds that are not detected by the biochemical analyses used. All enzyme-assisted extractions solubilized an important proportion of ash from 55.0 to 64.2%. Nevertheless, more organic matter was extracted due to the action of enzymes. Less than 20% organic matter was found in the blank and up to 45% after the action of enzymes. In the soluble extracts, between 9.1 and 33.3% of neutral sugars were obtained, whereas only 4.5 to 8.9% of proteins were present. Few sulfate groups (1.6 to 4.2%) as well as uronic acids (0.2 to 1.3%) were detected. The proteases P1 and P2 allowed to access to the highest proportions of proteins (8.9 and 8.8% of the dry matter) and the carbohydrase C5 to the highest proportion of neutral sugars (33.3%) followed by P1 (27.5%) (Table 3).

Cytotoxicity and antiviral activity

After 3 days of viral infection, visible alteration of normal cell morphology was observed under the microscope except for the cells in contact with seaweed extracts. No cytotoxic effect on Vero cells was detected for all the WSEs for a CC_{50} inferior to 200 µg.mL^{-1} (Table 4). The lowest EC_{50} that represents the most efficient antiviral activity was obtained with the P1 extract (86.0 µg.mL^{-1}) followed by the extracts obtained with P3 and with carbohydrases (C1, C2, C5 and C3 respectively). The P2 extract showed the least efficient antiherpetic activity with an EC_{50} of 145.9 µg.mL^{-1} and was not significantly different than those measured in the blank (170.7 µg.mL^{-1}) (Table 4).

Optimization by Box-Behnken design

The protease P1 was selected for optimizing extraction conditions in order to increase potentially the active compounds quantity. The responses that correspond to extraction yields following different conditions of enzymatic digestion are reported in (Table 5).

Three enzyme-assisted extraction conditions significantly resulted in a similar quantity of compounds in extracts (Experiments N°3, 10 and 11) with a maximum extraction yield of 59.4% (N°11). Compared to the screening conditions with P1, the yield increased by 6.5% with 7.5% enzymes on dry matter of *S. chordalis* during the same time (180 min) and at the same temperature (50°C). An extraction time from 180 min to 270 min was necessary to reach a maximum number of water soluble compounds. Moreover, 90 min were not sufficient to break down the cell walls, regardless of the other examined parameters. The highest tested temperature (50°C) enabled the extraction of a maximum number of compounds during 180 min. Nevertheless, at 25 and 37.5°C, relatively good extraction yields were measured (52.4 to 56.5%). Concerning the relation E/S, for two of the best conditions, extractions assisted with 7.5% of P1 were the most efficient.

Predicted optimal extraction conditions

According to the response obtained for each experiment (Table 5), the best explanatory model equation for the enzyme-assisted extraction yield (EAE %) with *T*, the temperature (°C), *t*, the time (min) and *E/S* the enzyme on substrate ratio (%) was:

	Neutral sugars	Sulfate groups	Uronic acids	Proteins	Ash	Others
	(%DW)	*(%DW)*	*(%DW)*	*(%DW)*	*(%DW)*	*(%DW)*
Blank	^{g} 12.8 ± 0.1	^{f} 1.6 ± 0.4	^{b} 1.0 ± 0.1	^{d} 4.5 ± 0.1	^{a} 70.9 ± 1.0	^{b} 9.2 ± 1.7
C1	^{d} 22.8 ± 0.9	^{ab} 3.7 ± 0.2	^{c} 0.6 ± 0.1	^{abc} 8.4 ± 0.6	^{b} 64.2 ± 0.4	^{c} 0.3 ± 2.1
C2	^{cd} 24.1 ± 1.3	^{cd} 2.7 ± 0.3	^{b} 1.0 ± 0.1	^{abc} 7.8 ± 0.8	^{d} 55.0 ± 0.9	^{b} 9.4 ± 3.4
C3	^{e} 19.9 ± 0.8	^{b} 3.4 ± 0.3	^{d} 0.2 ± 0.1	^{c} 7.1 ± 0.1	^{b} 64.0 ± 4.4	^{bc} 5.4 ± 5.7
C4	^{h} 9.1 ± 1.5	^{de} 2.3 ± 0.3	^{b} 1.1 ± 0.1	^{d} 5.3 ± 0.2	^{b} 64.0 ± 4.6	^{a} 18.3 ± 6.7
C5	^{a} 33.3 ± 0.8	^{b} 3.3 ± 0.1	^{d} 0.2 ± 0.1	^{ab} 8.5 ± 0.7	^{bcd} 58.9 ± 2.4	^{c} 0.1 ± 4.1
P1	^{b} 27.5 ± 0.3	^{bc} 3.2 ± 0.1	^{d} 0.3 ± 0.2	^{a} 8.9 ± 2.0	^{cd} 56.5 ± 1.6	^{bc} 3.6 ± 4.2
P2	^{f} 17.6 ± 0.8	^{ef} 1.9 ± 0.2	^{a} 1.3 ± 0.1	^{a} 8.8 ± 0.4	^{bc} 61.2 ± 6.6	^{b} 9.3 ± 8.1
P3	^{c} 25.4 ± 1.2	^{a} 4.2 ± 0.5	^{c} 0.5 ± 0.1	^{bc} 7.3 ± 0.3	^{b} 63.9 ± 0.5	^{c} 0.1 ± 2.6

Values are means ± SD (n=9).
For each column, values with different superscript letters are significantly different (p<0.05) according to the Fisher LSD test. The order of letters is correlated with the compounds contents.

Table 3: Biochemical composition of extracts after the action of different enzymes (180 min, 50°C, 5% enzyme).

	CC_{50}	EC_{50}
	(µg / mL)	*(µg / mL)*
P1	>200 ± 0.9	^{a} 86.0 ± 9.1
P3	>200 ± 0.8	^{a} 96.7 ± 4.7
C1	>200 ± 3.3	^{a} 98.6 ± 7.1
C2	>200 ± 1.0	^{ab} 109.8 ± 12.1
C5	>200 ± 2.4	^{ab} 110.0 ± 6.5
C3	>200 ± 0.1	^{ab} 113.7 ± 19.1
C4	>200 ± 2.4	^{bc} 136.2 ± 46.3
P2	>200 ± 9.6	^{cd} 145.9 ± 12.2
Blank	>200 ± 1.3	^{d} 170.7 ± 11.9
Drug (acyclovir)	>200 ± 0.2	^{d} 0.5 ± 0.4

MOI: multiplicity of infection of 0.001 ID_{50} / cells: ratio (virus titer)/ (cells numbers mL-1).
CC_{50}: the 50% cytotoxic concentration. The concentration that reduced the absorbance of mock-infected cells to 50% of that of control.
EC_{50}: the 50 % antiviral effective concentration: concentration that achieved 50% protection of virus-infected cells from the HSV-induced destruction.
Values are means ± SD (n=8).
Values with different superscript letters are significantly different (p<0.05) according to the Fisher LSD test. The order of letters is correlated with the efficiency of activity

Table 4: Evaluation of anti-HSV-1 activity on Vero cell line of WSEs from *S. chordalis*, by neutral red dye method.

Experiment	Hydrolysis conditions			Obtained response
N°	**Extraction time *(min)***	**Temperature *(°C)***	**E/S *(% dw algae)***	**EAE yield extraction *(% dw algae)***
1	180	25	2.5	^{bc} 53.9 ± 1.9
2	270	37.5	2.5	^{cde} 51.7 ± 2.5
3	180	50	2.5	^{ab} 57.5 ± 2.1
4	90	37.5	2.5	^{f} 35.6 ± 4.0
5	90	25	5	^{e} 46.1 ± 6.8
6	270	25	5	^{cde} 49.6 ± 1.6
7	90	50	5	^{de} 48.4 ± 2.9
8	270	50	5	^{de} 48.0 ± 2.8
9	180	25	7.5	^{bc} 54.0 ± 1.4
10	270	37.5	7.5	^{ab} 56.5 ± 2.5
11	180	50	7.5	^{a} 59.4 ± 1.6
12	90	37.5	7.5	^{f} 40.4 ± 1.7
13	180	37.5	5	^{bcd} 52.4 ± 3.0

Values are means ± SD (n=9).
Values with different superscript letters are significantly different (p<0.05) according to the Fisher LSD test. The order of letters is correlated with the extraction yield.

Table 5: EAE conditions and responses for the extraction yield of water-soluble compounds from *S. chordalis* after the application of experimental design with P1.

$$EAE\ \% = 34.4 - 1.202 \times T + 0.405 \times t - 1.42 \times (E/S) + 0.02 \times T^2 - 0.001 \times t^2 + 0.145 \times (E/S)^2 - 0.001 \times T \times t + 0.014 \times T \times (E/S) + 0.001 \times t \times (E/S)$$

This model was generated using the regression coefficients with statistical significance up to 5% probability level. The statistical results for the water-soluble compounds extraction showed a coefficient of determination value of $R^2 = 0.69$ that indicated that the model as fitted can explain almost 70% of the enzyme-assisted extraction yield variability. The model predicted optimal extraction conditions with the desirability of 96.6% for a maximum yield of 59.7% and for an extraction performed at 50°C, for 200 min and with 7.5 % of P1 on dry matter of *S. chordalis.*

Three-dimensional graphs showing the effect of time, ratio E/S, and temperature are illustrated in Figure 2. For each graph, one of the three optimal parameters was fixed.

After around 200 min, the extraction yield does not seem to increase anymore. According to the results in Table 5 and in Figure 2, the extraction time played a dominant role in the process to increase the number of water-soluble compounds. The influence of the relation E/S and the temperature of extraction were insignificant within the experimental range (data not shown).

Validation for a better extraction yield

The results after the EAE under optimal conditions are reported in Table 6. Under such conditions, for a 200 min extraction at 50°C with an enzyme/substrate ratio of 7.5%, the extraction yield reached 57.9%, which is among the highest values compared to those obtained with the experimental design (Table 5). Moreover, this extraction yield is between the lower and upper limits (54.8-64.6%). Thus, the statistical model was checked and validated.

The optimization of extraction conditions allowed an insignificant gain of 4%. The values obtained throughout the whole study for focused responses, i.e., the extraction yield, the biochemical composition of extracts, and their antiviral activity, are summarized in Table 7.

Concerning the quality of extracts obtained, namely their biochemical composition, the extract after the action of P1 and after the optimization of extraction conditions is richer in organic matter especially in proteins (14.7 %) and less in mineral matter (ash). Furthermore, the antiviral activity is kept.

Discussion

Composition of *S. chordalis*

The composition of the dry weight of *S. chordalis* is in agreement with previous studies, but only little information is known. Bondu et al. find a dry matter rate of 14.6% and Hardouin et al. 11.6% for the same species [2,3]. Compared to this previous study, ash content was higher in our study (43.3%). Fast-growing algae, responsible for seaweed blooms, such as *Ulva sp., Gracilaria sp.* and *S. chordalis,* reflect the abundance of nitrogen and other non-organic elements [14]. These chemical elements are naturally abundant and can be found more readily on eutrophic coasts, depending on fluctuating environmental factors and human activities. Polysaccharides represent a high proportion of the dry weight of many macroalgae. In *Porphyra sp*., about 46% of the dry matter is constituted by carbohydrates, as well as in *Palmaria palmata* (45 to 74% of the dry weight) [15,16]. The percentage concentrations of neutral sugars, uronic acids, sulfate groups, and protein contents in the dry weight of *Solieria chordalis* were in line with results of the previous study on the same seaweed [3] and with the study of Khanzada et al. [17], who find a percentage between 25 and 32% of proteins in *Solieria robusta* collected in Pakistan. The presence of uronic acids in polysaccharides isolated from Rhodophyta has been reported in a few cases [18].

Solubilization of algal compounds

Enzymes produced from microorganisms can be used to digest seaweeds by breaking down cell walls that release the cell content in water [4,6]. The strategy employed in this study was first to screen different commercial solutions of enzymes with different activities on the same substrate and in identical conditions (50°C, 180 min and 5% E/S). To compare the effect of these enzymes, expected responses were focused on the extraction yield, the biochemical composition of extracts, and their antiviral activity.

Similar conditions (50°C, 300 min and 5% E/S) were applied to *S. chordalis* in a previous study [3]. In our study, the extraction yield of the blank reaches 40% while Hardouin et al. [3] found around 15%. They tested six enzymes, two proteases, and four carbohydrases, and their extraction yields ranged between 15 and 25% of dry matter. Only two parameters varied between the two studies: the time of extraction and the month of the seaweed collection. Shen et al. conducted studies on tea protein extraction using enzyme methods, and they optimized extraction conditions, notably by testing the time. They showed that this parameter has a positive role. Nevertheless, after 4–8 hours, the effect of extraction time became less significant [19]. Moreover, the biochemical composition of raw material is an important parameter to

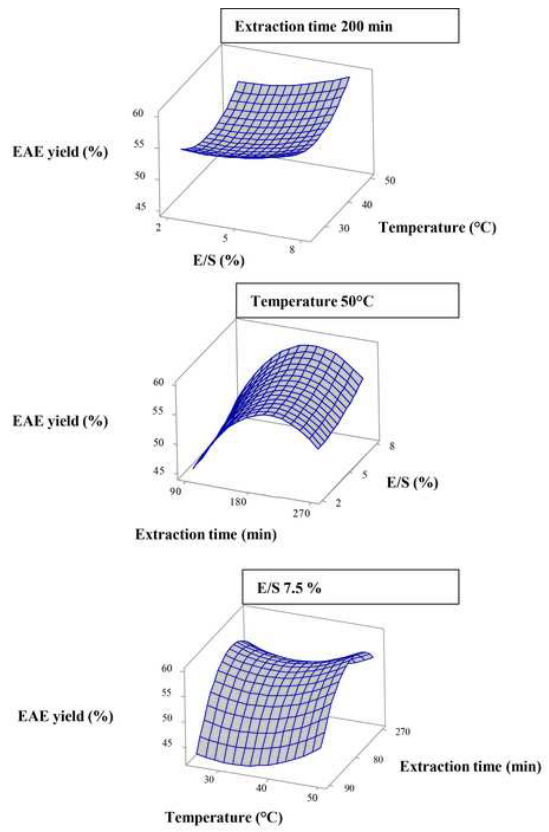


Figure 2: Estimated response surfaces according to the time, to the enzyme/substrate ratio and to the temperature of extraction in presence of P1.

Response	Prediction	Lower limit (95 %)	Upper limit (95 %)	Value obtained after experiment
EAE yield *(% dw)*	59.7	54.8	64.6	57.9 ± 2.0

Table 6: Values predicted statically according to optimal conditions and values obtained after experiments.

		Control	Enzyme-assisted extraction	
		Blank	Without optimization	After optimization
Temperature (°C)		50	50	50
Hydrolysis time (min)		180	180	200
E/S ratio (%)		0	5	7.5
Extraction yield (% dw of algae in soluble extract)		^{b}43.1 ± 4.5	^{a}55.8 ± 0.8	^{a}57.9 ± 2
Biochemical composition (% dw of soluble extract)	Neutral sugars	^{b}12.8 ± 0.1	^{a}27.5 ± 0.3	^{b}13.1 ± 0.8
	Uronic acids	^{a}1.1 ± 0.1	^{b}0.3 ± 0.2	^{a}1.3 ± 0.1
	Sulfate groups	^{b}1.6 ± 0.4	^{a}3.2 ± 0.1	^{b}1.7 ± 0.3
	Proteins	^{c}4.5 ± 0.4	^{b}8.9 ± 2.0	^{a}14.7 ± 2.8
	Ash	^{a}70.9 ± 1.0	^{b}56.5 ± 1.6	^{c}51.3 ± 2.2
	Others	^{b}9.2 ± 1.7	^{b}3.6 ± 4.2	^{a}17.9 ± 6.2
Anti-HSV activity (EC_{50} in µg/mL)		^{b}170.7 ± 11.9	^{a}86.0 ± 9.1	^{b}163.9 ± 2.8
For each line, values with different superscript letters are significantly different (p<0.05) according to the Fisher LSD test. The order of letters is correlated with the quantity of compounds or with the efficiency of antiviral activity.				

Table 7: Summary of EAE conditions and results for water-soluble compounds extraction yield, biochemical composition of extracts and their antiviral activity throughout the optimization process with P1.

consider for extraction. Hardouin et al. [3] found more neutral sugars (around 10% more) than in the present study. Various polysaccharides are found in large quantities, and their bonding with glycoproteins in the cell wall reduces the efficiency of water extractions [5]. The quantity of neutral sugars contributing to the base of polysaccharides slows down the extraction and the action of enzymes.

The nature of components of the seaweed cell wall is well known, contrary to their organization in three dimensions. Proteases seem to be the most efficient in the release of compounds. In our study, the maximum extraction yield reached up to 60% with the protease P1 (Figure 2). P1 is a subtilisin protease. Cleavage by subtilases or serine proteases may be an essential step in breaking down the cell wall of seaweeds by a selective degradation of structural proteins. The red macroalgae possess the most important protein content compared to the other groups (green and brown seaweeds). In *Palmaria palmata* and *Porphyra tenera*, 8 to 47% of proteins are found in the dry matter. Among these proteins, between 2.9 and 6.2% of total amino acids are represented by serine [20]. Serine and threonine may participate in a peptide-O-glycosidic linkage of the extracellular mucilage of red seaweeds. The serine protease P1 probably attacks the serine-glycoproteins of the cell wall. Glycoproteins with serine residue would play a fundamental role in the structure and in the organization in three-dimensions of the red seaweed cell wall. More studies on the red seaweed cell wall need to be conducted to understand and to improve the action of applied enzymes.

Compounds of the cell wall and of the intracellular medium are then released. Soluble, free and active compounds in water are an advantage for applications of the extracts obtained. The use of enzymes improves the availability and the digestibility of seaweed compounds in a water-soluble extract [5]. According to the nature, the specificity, and the selectivity of enzymes, the biochemical compositions of extracts are different. In line with previous studies, the use of enzymatic liquefaction of red seaweeds could be a useful alternative to enhance the sulfated saccharides and the protein solubilization in mild conditions that are useful for diverse applications [4,6,21].

Release of antiviral compounds

A *Herpes Simplex* Virus type 1 (HSV-1), a DNA enveloped virus, is widely spread in the world. It infects between 60 and up to 95% of certain populations and may cause various illnesses and life-threatening diseases mainly in immune-suppressed individuals such as transplant recipients and cancer and AIDS patients [22]. Sulfated polysaccharides like carrageenans are known to exhibit a viral inhibitory activity [21]. Our results (Table 4) support this affirmation. A positive correlation between the neutral sugar content and the antiviral activity is perceptible. Soluble extracts obtained with P1, P3, C1, C2, C3, and C5 were anti-HSV active with no significant difference in their EC_{50} (86 to 113.7 µg/mL). These extracts contain more than 23% of sulfated polysaccharides in their dry matter, contrary to the blank and to the extracts after the actions of P2 and C4. Additionally, before the evaluation of antiviral activity, the cytotoxicity of extracts on Vero cells was examined, using the neutral red incorporation with a view to detecting lysosomal functionality. All extracts were well tolerated by Vero mammalian cells. Kulshreshtha et al. [7] have shown an antiviral activity with an enzymatic extract of *Chondrus crispus* with an EC_{50} of 161.1 µg/mL, and Hardouin et al. [3] found a EC_{50} between 23 to 101.1 µg/mL with soluble extracts of *S. chordalis*. All these antiherpetic activities obtained with red seaweed extracts are less efficient than the reference molecule Acyclovir (ACV). However, the occurrence of ACV-resistant mutants highlights the necessity to research for new antiviral compounds [22]. The anti-HSV-1 activity of extracts can be enhanced by purifying water-soluble sulfated polysaccharides [23].

Influence of extraction parameters

An experimental design was used to study the influence of different parameters on the water-soluble components extraction conditions. Experiments were realized with the same sample of *S. chordalis* and with the protease P1 with respect to the previous results, e.g. best extraction yield, a biochemical composition rich in organic matter, and an effective antiviral activity.

As observed in Figure 2, an increase in the release of the total water-soluble compounds number was obtained when the extraction

time was increased up to 200 min, whereas at a longer time (270 min), the extraction yield remained practically the same. Nevertheless, many studies have carried out extraction with enzymes for 12-48 hours [6]. Time plays an important role in the quantity of released compounds in the short term and in the quality of these compounds in the long term. Enzymes attack first the algal biomass to release simple compounds, and with time, they access to solubilized compounds and transform them into lower molecular weight compounds.

However, the proportion of neutral sugars after optimization decreased in the present study, while the proportion of non-detected compounds increased (Table 7). This result may be explained by the solubilization of non-quantified sugars from sulfated polysaccharides. In the optimized conditions, the time of extraction is longer and the ratio E/S more important. In the opposite, the protein level increased when optimized parameters were applied. A hypothesis consisting in the formation of agglomerates between proteins and sulfate polysaccharides may explain the lower level of sulfate groups and neutral sugar contents in the WSE after optimization with P1.

Furthermore, more soluble compounds were extracted at 50°C. Nevertheless, working at 25°C seems to be as effective as at 50°C. This observation was also made by Dumay et al. [5].

Concerning the ratio E/S, results have shown that the more enzymes are added, the more important is the extraction yield, whereas no significant difference was perceptible with a ratio of 2.5 and 7.5% (samples N°3 and 11 in Table 5).

Algal material is not the appropriate and specific substrate for enzymatic activity. In our study, the enzymes facilitate the liquefaction and the solubilization of water-soluble organic compounds. This type of RSM required fewer experiments and facilitated the arrangement and the interpretation of the effects of the parameters tested. Some unexpected results for certain extraction conditions were found, and they would be worth testing to anticipate the industrial scale for lower costs in energy and in enzymes.

Environmentally-friendly alternative

The statistical model for predicting the optimization response values was checked by using the selected optimal conditions (Table 6). The quantity of available water soluble compounds from *S. chordalis* increased significantly by 30% after the action of the enzyme P1 and non-significantly by 4% after optimization (Table 7). However, the extraction conditions for enzyme screening were already close to the optimal conditions. The optimization of extraction conditions confirmed the efficiency of the enzyme-assisted extraction by the repeatability of extraction yields. The antiviral activity is kept after the optimization, but it is significantly less important, which can be explained by the smaller proportion of available sulfated saccharides in extracts.

In conclusion, our study confirms that enzyme-assisted extraction can be used as a promising alternative and sustainable technique to recover active compounds. Compared to an aqueous extract in the same conditions, all the commercial enzyme solutions were more effective in the release of water-soluble compounds. The choices of the nature and of the concentration of enzymes are important as well as the conditions of extraction and the biochemical composition of the raw material. The response surface is a useful and powerful methodology to analyze the influence of different parameters simultaneously on the same algal material that impact directly on the quality and on the quantity of extracted active compounds. Obtained extracts have shown antiherpetic activities with EC_{50} between 86.0 and 163.9 $\mu g.mL^{-1}$. This activity would be enhanced by investigating the benefit that the parameters of extraction can bring to the target sulfated saccharides. This study could serve as a base for increasing the quantity of active water-soluble compounds extracted from proliferative seaweeds. Further research focusing on the scale-up of the process design and on the optimal conditions for specific active compounds extraction is highly recommended.

Acknowledgments

This work has received financial support from the single Inter-Ministry Fund (FUI) within the VB2 project (Valorization of Breton Biomass). The authors thank the members of LBCM and of the project VB2 for their help in collecting seaweeds, especially Christel Marty for the maintenance of the cell line and of the virus, Declan Bennett, an undergraduate student from the National University of Ireland, Galway, for helping in the analyses of the biochemical composition of seaweed extracts and Nicole Geslin for proof-reading. The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Bourgougnon N, Stiger-Pouvreau V (2011) Chemodiversity and bioactivity within red and brown macroalgae along the French coasts, Metropole and Overseas Departements and Territories. In: Kim SK (ed) Handbook of Marine Macroalgae. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
2. Bondu S, Deslandes E, Fabre MS, Berthou C, Li YG (2010) Carrageenan from *Solieria chordalis* (Gigartinales) Structural analysis and immunological activities of the low molecular weight fractions. Carbohyd Polym 81: 448–460.
3. Hardouin K, Burlot AS, Umami A, Tanniou A, Stiger-Pouvreau V et al. (2014) Biochemical and antiviral activities of enzymatic hydrolysates from different invasive French seaweeds. J Appl Phycol 26: 1029–1042.
4. Wijesinghe WAJP, Jeon YJ (2012) Enzyme-assistant extraction (EAE) of bioactive components: A useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds. A review Fitoterapia 83: 6–12.
5. Dumay J, Clément N, Morançais M, Fleurence J (2013) Optimization of hydrolysis conditions of *Palmaria palmata* to enhance R-phycoerythrin extraction. Bioresource Technol 131: 21–27.
6. Hardouin K, Bedoux G, Burlot AS, Nyvall Collén P, Bourgougnon N (2014) Enzymatic recovery of metabolites from seaweeds: potential applications. In: Bourgougnon N (ed) Sea Plants. Academic Press, Elsevier Ltd., Oxford, UK.
7. Kulshreshtha G, Burlot AS, Marty C, Critchley A, Hafting J et al. (2015) Enzyme-assisted extraction of bioactive material from *Chondrus crispus* and *Codium fragile* and its effect on *Herpes simplex virus* (HSV-1). Mar Drugs 13: 558–580.
8. Zhu Y, Li Q, Mao G, Zou Y, Feng W et al. (2014) Optimization of enzyme-assisted extraction and characterization of polysaccharides from *Hericium erinaceus*. Carbohyd Polym 101: 606–613.
9. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem 28: 350–356.
10. Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G (1973) New method for quantitative determination of uronic acids. Anal Biochem 54: 484-489.
11. Jaques LB, Ballieux RE, Dietrich CP, Kavanagh LW (1967) A microelectrophoresis method for heparin. Can J Physiol Pharm 46: 351-360.
12. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 150: 76–85
13. Langlois M, Allard JP, Nugier F, Aymard M (1986) A rapid and automated colorimetric assay for evaluating in the sensitivity of Herpes simplex strains to antiviral drugs. J Biol Stand 14: 201–211.
14. Teichberg M, Fox SE, Olsen YS, Valiela I, Martinetto P et al (2010) Eutrophication and macroalgal blooms in temperate and tropical coastal waters: nutrient enrichment experiments with *Ulva spp.* Glob Change Biol 16: 2624–2637.
15. Morgan KC, Wright JLC, Simpson FJ (1980) Review of chemical constituents of the red alga *Palmaria palmata* (dulse). Econ Bot 34: 27–50.
16. Nisizawa K, Noda H, Kikuchi R, Watanabe T (1987) The main seaweed foods in Japan. Hydrobiologia 41: 5–29.

17. Khanzada AK, Kazi WSTG, Kabir S, Soofia S (2007) Antifungal activity, elemental analysis and determination of total protein of seaweed, *Solieria robusta* (Greville) Kylin from the coast of Karachi. Pak J Bot 39: 931–937

18. Bourgougnon N, Lahaye M, Chermann JC, Kornprobst JM (1993). Composition and antiviral activities of sulfated polysaccharide from *Schizymenia dubyi* (Rhodophyta, Gigartinales), Bioorg Med Chem Lett 3: 1141-1146

19. Shen L, Wang X, Wang Z, Wu Y, Chen J (2008) Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. Food Chem 107: 929–938

20. Lourenço SO, Barbarino E, De-Paula JC, Pereira LO da S, Marquez UML (2002) Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. Phycol Res 50: 233–241

21. Prajapati VD, Maheriya PM, Jani GK, Solanki HK (2014) Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications. Carbohyd Polym 105: 97–112.

22. Santos MGM, Lagrota MHC, Miranda MMFS, Yoneshigue-Valentin Y, Wigg MD (1999) A screening for the antiviral effect of extracts from Brazilian marine algae against acyclovir resistant *Herpes Simplex Virus* Type 1. Bot Mar 42: 227–230

23. Bouhlal R, Haslin C, Chermann JC, Colliec-Jouault S, Sinquin C et al. (2011) Antiviral activities of sulfated polysaccharides isolated from *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophytha, Gigartinales) and *Boergeseniella thuyoides* (Rhodophyta, Ceramiales). Mar Drugs 9: 1187–1209

Citation: Burlot A-S, Bedoux G, Bourgougnon N (2016) Response Surface Methodology for Enzyme-Assisted Extraction of Water-Soluble Antiviral Compounds from the Proliferative Macroalga *Solieria chordalis*. Enz Eng 5: 148. doi:10.4172/2329-6674.1000148

OMICS International: Publication Benefits & Features

Unique features:

- Increased global visibility of articles through worldwide distribution and indexing
- Showcasing recent research output in a timely and updated manner
- Special issues on the current trends of scientific research

Special features:

- 700+ Open Access Journals
- 50,000+ editorial team
- Rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at major indexing services
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: **http://www.omicsgroup.org/journals/submission/**

Lettre ouverte à *Caenorhabditis elegans*

Truro, Lundi 2 novembre 2015, 20h26

Ô *C. elegans*,

Je me permets de consacrer ce temps d'un lundi soir après une intense journée de travail pour exprimer par des mots écrits noir sur blanc ma source d'inspiration. Cette dernière est tellement puissante qu'elle me force à écrire ce que je ressens pour toi Ô *C. elegans*, mon inspirateur du moment. Qui sait, ai-je cette chance de connaître ce sentiment qu'a l'écrivain commençant la rédaction de son livre ? Peut-être, mais je n'ai pas ce talent ni cette intention d'en écrire un, juste un ensemble de quelques pages pour une thèse. Mais toi Ô *C. elegans*, du haut de ton millimètre, tu me parais bien trop grand au travers de ma loupe binoculaire dotée d'une lumière qui t'éblouit, Ô *C. elegans*.

Toi et moi, ça a commencé il y a un an à Truro, au milieu de nulle part dans le froid boréal canadien. De là, notre histoire est née. Une histoire de tendresse, de dégoût, d'humour, de cruauté, d'admiration, de partage et de réflexion. Tu m'étais si étrange et en même temps si fascinant. Aux premiers abords, je t'ai considéré comme un banal animal que l'on manipule sans grande émotion. Aujourd'hui, quand je pense fort à toi, mes voies métaboliques s'emballent et sont responsables de mon corps frissonnant et de mes poils de bras se hérissant. Quel effet, Ô. *C. elegans.*

Tu luis et tu zigzagues sur une gélose que je confectionne soigneusement pour ton plus grand bien. Dans un monde riche d'une nourriture fleurissante, tu traces lentement et sinueusement ton chemin. Au paradis des goinfres, tu t'engouffres dans ce tapis bactérien que tu adores et que tu manges à grandes bouchées. Je vois ta minuscule tête bouger de droite à gauche et cet énorme corps translucide immobile se remplir. Fidèle compagnon de cinq à sept, seuls tous les deux, nous nous retrouvons toutes les fins

d'après-midi en salle 216, comme si nous ne pouvions pas nous passer l'un de l'autre. Un devoir, un besoin, une nécessité. Pendant ces nombreuses heures pendant lesquelles je te sculptais du regard, j'avais l'impression d'être le thanatonaute Micheal Pinson de mes livres d'époque estudiantine. Le cycle des anges et celui des dieux de Werber étaient en moi. Sans aucune prétention, il m'arrivait de m'imaginer déesse de ton univers. La déesse des vers, d'un peuple pour le moins intéressant et original sans discrimination sexuelle et avec un extraordinaire cycle de vie. Toi, Ô *C. elegans* et tes congénères êtes pour la plus grande majorité hermaphrodites et pondez des œufs. Instinctivement, David Wells et sa troisième humanité apparurent, surgissant d'un autre de mes tiroirs d'imagination étiqueté Werber de ma cavité cérébrale. J'aime ce concept. C'est d'ailleurs au moment où tu as largué un de tes œufs que j'ai dû laisser échapper un « hoo » quasiment inaudible par les autres individus de mon espèce mais bien perceptible par mes neurones qui se sont sensiblement agités dans tous les sens pour me donner cette source d'inspiration à ton sujet, Ô *C. elegans.*

Puissante et sans scrupule je te manipule à l'œil, au doigt et à la baguette. Cependant, j'aime prendre soin de toi en utilisant un fil d'un métal précieux bien plus cher que l'or pour te déplacer. Le platine. Je te veux pur, sans aucune autre espèce pour te salir. Pour cela, je chauffe le platine pour tuer tous les potentiels intrus. Le spectacle de couleurs est à voir. Le précieux métal passe du rouge au jaune dans les flammes bleues du bec Bunsen. Son pouvoir enfin retentit. Il se refroidit en un rien de temps afin de t'emmener dans les airs sans te brûler pour te déposer dans un nouveau jardin d'Eden, Ô *C. elegans.*

Par moment, j'avoue que je fus d'une cruauté intraitable. Néanmoins, en tant qu'espèce vivante dominante, je ne ressens aucun remord. Sélection naturelle ? Je ne pense pas, disons que toi Ô *C. elegans*, tu es au service de la recherche scientifique de l'espèce humaine. Dois-tu t'en réjouir ? Je ne sais pas, à toi de voir. Me pardonneras-tu de t'avoir lavé et centrifugé ? Sache qu'avec un de mes congénères d'une contrée lointaine, nous avons d'abord compati, puis ri comme des cyclopes. Demande encore à Werber, il t'expliquera. En effet, pour ma part, pendant cette torture que tu as endurée, je

t'imaginais avec ton corps raide et avec tes yeux qui grossissaient et sortaient de leurs orbites comme dans les dessins animés que je regardais lors de mon stade juvénile. Ensuite est venu le moment tant redoutable, celui de la synchronisation de ta population. Tu ne m'as pas forcément aidée. Des jeunes de ton espèce ont dû subir les tragiques conséquences : la mort, brulés vifs servis par le précieux métal. Je m'en voulais. A vrai dire, c'était soit cette mort rapide soit une mort plus longue à base d'une maladie infectieuse. Le triste destin d'un ver en salle 216. En contrepartie, tu m'en as fait voir des vertes et des pas mûres en m'hypnotisant et en zigzaguant dans l'espace de mon esprit, ce qui m'éloignait bien souvent des bras de Morphée. Comme quoi, toi aussi, tu as le pouvoir de contrôler une espèce du monde des vivants, Ô *C. elegans.*

Il est tard, ma source d'inspiration est épuisée. En ce moment même, j'aurais aimé que la recherche scientifique internationale humaine ait mis en place des moyens de communication et de compréhension entre tous les organismes vivants. Si un jour, il s'avère que tu me comprennes, je voudrais que tu saches que je t'adresse ma plus grande gratitude. Ô *C. elegans*, merci d'avoir contribué à mes recherches scientifiques. Tu m'as montré que tout comme moi, tu apprécies *Solieria chordalis*, une autre espèce vivante qui me fascine. Je m'en réjouis. C'est vrai, je t'ai forcé à émigrer et te voilà maintenant en partie sur le Campus de Tohannic. Bienvenue en territoire breton en espérant que tes zigzags ne finissent jamais Ô *C. elegans*.

Il est grand temps que je termine d'écrire ma thèse, tu me fais bien tourner la tête Ô *C. elegans*.

Une thésarde *Homo sapiens sapiens* dont
le génome a entre 60 et 80 %
d'orthologies avec le tien Ô *C. elegans,*
mon cousin à l'élégance suprême.

ASB

N°428