



Application de procédés éco-responsables pour l'extraction de molécules de la macroalgue *Solieria chordalis*, caractérisations chimiques et étude d'activités biologiques

Romain Boulho

► To cite this version:

Romain Boulho. Application de procédés éco-responsables pour l'extraction de molécules de la macroalgue *Solieria chordalis*, caractérisations chimiques et étude d'activités biologiques. Biotechnologie. Université de Bretagne Sud, 2017. Français. NNT : 2017LORIS465 . tel-01823710

HAL Id: tel-01823710

<https://theses.hal.science/tel-01823710>

Submitted on 26 Jun 2018

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

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



(Photo : *Solieria chordalis* (Biogenouest.org))



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 : *Biotechnologie Marine*
Ecole Doctorale des Sciences de la Mer:

Présentée par **BOULHO Romain**

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

Application de procédés éco-
responsables pour l'extraction
de molécules de la
macroalgue *Solieria chordalis*,
caractérisations chimiques et
étude d'activités biologiques.

Thèse soutenue le 19 octobre 2017 devant le jury composé de :

LAROCHE Céline

Maître de conférences - HDR, Institut Blaise Pascal, CNRS / rapportrice

GOUAULT Nicolas

Maître de conférences – HDR, Université de Rennes 1 Faculté des
Sciences Pharmaceutiques et Biologiques / rapporteur

CONNAN Solène

Maître de conférences, Institut Universitaire Européen de la Mer LEMAR
/ examinatrice

ROBLEDO Daniel

Directeur de Recherches, CINVESTAV Mexique / examinateur

BOURGOUGNON Nathalie

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

BEDOUX Gilles

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

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier le Dr. Céline Laroche, maitre de conférences de l'unité de recherche Génie des Procédés, Énergétique et Biosystèmes (GePEB) à l'Institut Pascal de Clermont Ferret et le Dr. Nicolas Gouault, maitre de conférences à l'Institut des Sciences Chimiques de Rennes, qui me font l'honneur d'être rapporteurs et d'examiner mes travaux. Je souhaite également remercier les autres membres du jury, le Dr. Solène Connan, Maitre de conférences du Laboratoire des Sciences de l'Environnement MARin et le Pr. Daniel Robledo directeur de recherches du CINVESTAV qui participeront à l'examination de mon travail.

J'en profite également pour remercier Le Dr. Hélène Regniaux responsable de l'unité de recherche Biopolymères Interactions Assemblages de l'INRA et le Dr. William Helbert directeur du CERMAV, Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales.

Je remercie l'Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM) et l'Ecole Doctorale de Sciences de la Mer (EDSM), la Région Bretagne et le Département du Morbihan d'avoir financé, encadré et supporté ce projet de thèse.

Même si une thèse est d'abord un aboutissement personnel, c'est avant tout une aventure humaine avec beaucoup de personnes qui ont contribué à la réussite de ce projet.

Je transmets mes sincères remerciements à mes directeurs de thèse la Pr. Nathalie Bourgougnon et le Dr. Gilles Bedoux qui m'ont donné l'opportunité de réaliser cette thèse et toutes les expériences qui l'ont accompagné. Je les remercie pour toute l'expérience et le soutien qu'ils m'ont apporté. Je tiens à souligner les qualités de Nathalie et Gilles qui sont toujours prêts et disponibles pour leurs étudiants, leur joie de vivre et leur dynamique naturelle contribuent à la bonne ambiance, la motivation et l'entraide de toute l'équipe. Ils sont pour moi des exemples, par leurs qualités professionnelles et humaines, ils ont rendu ces trois années de collaboration très agréables. Je les remercie encore pour toutes ces belles expériences en France, au Mexique et au Danemark.

Je souhaite également remercier toute l'équipe du Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines. Un grand merci à Ludovic qui a toujours été plein de conseils et à mes deux autres compères Marin-Pierre et Kévin. Merci à toutes les filles Anne-Sophie, Marie, Maya, Nolwenn et Christel pour toute l'aide et le soutien au cours de ces trois années. Je remercie toutes ces personnes pour leur joie de vivre et les moments de rigolades qui permettent d'avoir une dynamique d'équipe soudée au laboratoire. Je remercie également Philippe, Laure, Izuru et mes stagiaires qui ont participé à ses travaux.

Je souhaite également remercier les deux entreprises collaboratrices de ce projet. Merci à Armen Instrument, plus particulièrement à Mme Cécile Estevez et M. Grégoire Audo qui ont permis la réalisation de cette collaboration. Je remercie toute l'équipe du laboratoire, en premier Céline qui m'a transmis toute son expérience et avec qui j'ai eu le plaisir de travailler pendant ces trois ans. Je remercie également Julie, Aurore et Laura pour leurs aides. Je tiens à remercier également tout le reste de l'équipe, Rafa, Mark (et ses petits solos de guitare), François, Fred, Quentin (l'éternel 1^{er} sur quatre roues), Corentin, Aurélie, Lénai (l'éternel 4^{ème} !!! :-)), Nathan, Catherine, Maxime, Charles, Pierrick et Anthony. Merci à tous pour la joie de vivre et l'ambiance de l'équipe, vos conseils et votre disponibilité, merci pour tous ces moments partagés ensemble à l'entreprise comme en dehors. Ne changez rien.

Je tiens à remercier également l'entreprise Newonat et plus particulièrement M. Jean-Philippe Kucma. Merci pour ta disponibilité et tes conseils pendant cette collaboration.

Je pense également à remercier toute l'équipe Mexicaine avec qui j'ai partagé 5 mois de ce doctorat. Merci tout d'abord aux Pr. Daniel Robledo, Dr. Yolanda Freile-Pelegrin et leur fils Daniel Jr., je vous remercie pour l'accueil dans votre très beau pays, merci de m'avoir ouvert les portes de votre maison. Merci également à toute l'équipe du laboratoire Crescencia en particulier qui m'a formé et aidé ; à Alberto, Ana, Itzel, Kevin, Edgar, Dyanela, Luis, Carlos (qui a sauvé mon ordinateur l'année dernière) et toutes les personnes du centre de recherche. Merci à Hugo, pour tous les moments qu'on a passé au laboratoire en France et au Mexique et à sa famille, Paola, Emiliano et Rebecca, bon courage pour ta soutenance. Merci également

à la famille « Ewok » du nord du Mexique, Nayem, Dyanela, Kadir et Naylah qui m'ont accueilli le temps d'un weekend.

Dans tout ce monde, je n'oublie pas mon entourage qui a joué un rôle très important. Merci à mes parents pour leur aide, leur soutien moral et leur petite attention, merci de m'avoir donné la chance d'arriver jusque là. Merci à mon frère, ma sœur, Gregory et ma grand-mère pour leur soutien également. Un très grand merci à Mercedes, qui a joué un rôle très important, qui m'a soutenu tout au long de la thèse et qui m'a apporté beaucoup de force mentale dans les bons et mauvais moments.

Je remercie tous mes amis, Antoine pour toutes nos sorties vtt dominicales, Roch pour les sessions de surf et kitesurf après les journées difficiles (j'espère que ton talent de surfeur sera un jour reconnu à sa juste valeur) mais également Thibaud, Loïc, Tania, Clément, Carole, Thierry Anthony, Aurélie (une deuxième fois), Ombeline, Aurélia, Félicie, Quentin, Anne-So, Lucie, Romain, Charles, Gauthier. Merci pour tout votre soutien.

Encore un grand merci à vous tous,

Romain

Application de procédés éco-responsables pour l'extraction de molécules de la macroalgue *Solieria chordalis* (Rhodophyta, Gigartinales), caractérisations chimiques et étude d'activités biologiques.

Thèse de doctorat, Biotechnologie Marine, Université Bretagne Sud, 2017

Ce projet de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines. Ce travail est le fruit d'une collaboration au niveau régional avec deux entreprises morbihannaises Armen Instruments et Newonat et au niveau international avec l'institut de recherche CINVESTAV au Mexique.

Solieria chordalis (Rhodophyta, Gigartinales) est une algue proliférante de la côte de Bretagne sud. Cette algue s'échoue chaque année sur la presqu'île de Rhuys dans le Morbihan, et représente une biomasse importante encore sous exploitée. Les objectifs de cette thèse portent sur l'application de différents procédés éco-responsables (CO₂ supercritique, Extraction Assistée par Enzyme et Extraction Assistée par Microondes) utilisés pour l'extraction de molécules à partir de *S. chordalis*.

Dans le cadre de la première partie, l'extraction assistée par microondes a permis la production d'extraits polysaccharidiques de faibles poids moléculaires non cytotoxiques dont l'efficacité antivirale est supérieure à celle observée pour les fractions obtenues après extraction aqueuse à haute température.

La deuxième partie concerne le couplage de différents procédés : Extraction Assistée par Enzymes (EAE), CO₂ supercritique et Extraction Assistée par Microondes (EAM). En fonction des procédés utilisés, différentes familles de molécules ont pu être caractérisées. Le couplage de procédés permet de proposer un schéma de bioraffinage.

La dernière partie porte sur l'optimisation d'une méthode de fractionnement par Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC). Ce système de purification innovant a conduit à l'isolement de composés naturels dont des Mycosporines-like Amino Acids ayant différentes propriétés valorisables dans le domaine de la cosmétique.

Ces travaux enrichissent les connaissances sur l'algue *S. chordalis* et ouvrent la voie à la valorisation de cette biomasse proliférante sur les côtes bretonnes.

Mots clés : *Solieria chordalis*, extraction assistée par microondes, extraction par CO₂ supercritique, extraction assistée par enzymes, chromatographie partage centrifuge, acides aminés mycosporines-like, lipides, carraghénanes, virus herpès simplex type I, activité anti-UV, activité antioxydante, activité anti-âge.

Application of ecofriendly processes to extract biocompounds from *Solieria chordalis* (Rhodophyta, Gigartinales), chemical characterization and bioactivity evaluation

This thesis has been carried out within the Laboratoire de biotechnologie et Chimie Marines. The project is an outcome of the collaboration of two regional companies, Armen Instruments and Newonat with an international research institute, CINVESTAV, Mexico.

The red algae, *Solieria chordalis* (Rhodophyta, Gigartinales) is a proliferative seaweed native in the southern coast of Brittany. Every year, on the Rhuys peninsula in Morbihan, *S. chordalis* grows abundantly which represents a large amount of biomass, being still unused. The aim of this project, focused on the application of different ecofriendly processes (Supercritical carbon dioxide, Enzymatic Assisted Extraction and Microwave Assisted Extraction) used for the extraction of biocompounds from *S. chordalis*.

Under the first part, the Microwave Assisted Extraction allowed to produce low molecular weight polysaccharide extracts with no cytotoxicity. These extracts showed an improved antiviral efficiency compared to those obtained by the conventional method.

The second part focused on the interaction between different processes: Supercritical CO₂, Enzymatic Assisted Extraction (EAE) and Microwave Assisted Extraction (MAE). The sequences of the processes allowed to propose a biorefinery perspective.

The last part dealt with the optimization of fractionating method by Centrifugal Partition Chromatography (CPC). This innovative purification system led to isolate natural compounds such as Mycosporine-like Amino Acids with different properties, which can be valorized in the cosmetic field.

This work enriches the knowledge of the seaweed *S. chordalis* and open a way of upgrading the proliferative biomass on the Brittany coasts.

Tables des matières

Introduction générale	37
Contexte d'étude.....	37
Chapitre I :	47
Étude bibliographique	47
1. Les macroalgues.....	50
2. Les Rhodophycées et Solieriacées	51
3. L'espèce <i>Solieria chordalis</i>	53
(J.Agardh) M.J.Wynne & W.R.Taylor	56
3.1. Morphologie	57
3.1.1. Morphologie macroscopique	57
3.1.2. Morphologie microscopique	59
3.2. Reproduction des Solieriacées :.....	59
3.2.1. Mécanisme de la reproduction sexuée	61
3.2.2. Mécanisme de la reproduction asexuée	61
4. Métabolisme des algues	63
4.1. Les métabolites primaires.....	63
4.1.1. Minéraux	64
4.1.2. Protéines et acides aminés.....	65
4.1.3. Lipides.....	67
4.1.4. Vitamines.....	69
4.1.5. Les polysaccharides pariétaux.....	71
4.1.5.1. La phase matricielle	73
4.1.5.1.1. Les carraghénanes.....	73
4.1.5.1.1.1. La nomenclature des carraghénanes.....	73
4.1.5.1.1.2. Les mécanismes de biosynthèse des carraghénanes.....	77
4.1.5.1.1.3. Propriétés et applications des carraghénanes	78
4.1.5.1.2. Agar	81
4.1.5.2. La phase fibrillaire	81
4.1.5.2.1. La cellulose.....	81

4.1.5.2.2. Autres glycanes structuraux	83
4.2. Les métabolites secondaires	83
4.2.1. Pigments.....	85
4.2.1.1. Les caroténoïdes	85
4.2.1.2. Les chlorophylles.....	87
4.2.1.3. Les phycobiliprotéines.....	88
4.2.2. Terpènes.....	90
4.2.3. Acides aminés mycosporine-like	90
4.2.3.1. Les précurseurs de MAAs :	92
4.2.3.2. Les acides aminés mycosporine-like :	93
Phaeocystis antarctica (Haptophyta, Phaeocystales).....	98
Pocillopora eydouxi.....	98
(Cnidaria, Sceractinia)	98
5. Marché économique des macroalgues.....	99
5.1. Marché des fertilisants	99
5.2. Marché de la médecine.....	100
5.3. Le marché des cosmétiques.....	103
6. Les technologies appliquées à l'extraction de molécules naturelles.....	105
6.1. L'orientation vers la chimie « verte »	105
6.2. Les technologies conventionnelles.....	106
6.3. Les technologies innovantes	107
6.3.1. L'extraction par fluide supercritique	107
6.3.2. L'Extraction Assistée par Micro-ondes (EAM)	112
6.3.3. Extraction Assistée par Enzyme (EAE).....	115
1.1.1. Extraction Assistée par Ultrasons.....	118
1.1.2. Extraction par Fluide Pressurisé	121
2. Purification des extraits	123
2.1. Les principes de la chromatographie préparative	123
2.2. La chromatographie préparative avec phase stationnaire solide	125
2.2.1. Chromatographie sur couche mince (Thin Layer Chromatography (TLC))	126
2.2.2. Chromatographie basse pression	126
2.2.3. Chromatographie haute pression	127
2.2.4. La chromatographie par fluide supercritique (SFC = Supercritical-Fluid Chromatography) :	127
2.3. La Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)	127

2.3.1.	Historique du développement de la Chromatographie Partage Centrifuge	129
2.3.2.	Principe général de la chromatographie à contre-courant.....	129
2.3.3.	Chromatographie Contre-courant (CCC) : Appareil hydrodynamique :	131
2.3.4.	Chromatographie Partage Centrifuge (CPC) : Appareils hydrostatiques	131
2.3.5.	Détermination du coefficient de partage K_D du composé ciblé	133
Chapitre II : Matériels et méthodes.....		137
1.	Matériel d'étude	139
2.	Protocole d'extraction	139
2.1.	Procédé d'extraction par solvant organique.....	139
2.1.1.	Méthode d'extraction apolaire	139
2.1.1.1.	Extraction solide liquide	139
2.1.1.2.	Procédé de séparation liquide/liquide L/L.....	139
2.1.2.	Méthode d'extraction polaire	140
2.2.	Extraction des carraghénanes.....	140
2.2.1.	Méthode conventionnelle	140
2.2.2.	Extraction Assistée par Microondes (EAM).....	141
2.3.	Extraction Assistée par Enzymes (EAE)	141
2.3.1.	Liste des enzymes et leurs caractéristiques.....	141
2.3.1.1.	Les protéases	142
2.3.1.2.	Les carbohydrases.....	142
2.3.1.3.	Analyse de l'activité des cocktails enzymatiques	143
2.3.1.3.1.	Analyse de l'activité protéolytique.....	143
2.3.1.3.2.	Analyse de l'activité cellulase.....	145
2.3.1.3.3.	Analyse de l'activité β -glucanase	147
2.3.2.	Protocole d'extraction	150
2.4.	Extractions au CO_2 supercritique (scCO_2).....	150
3.	Purification des molécules par chromatographie préparative.....	151
3.1.	Caractérisation des différentes classes de lipides.....	151
3.2.	Purification par Chromatographie Partage Centrifuge	152
3.2.1.	Détermination, composition et préparation du système solvant	152
3.2.2.	Méthode de fractionnement par Chromatographie Partage Centrifuge (CPC) ...	152
3.2.3.	Méthode de purification par Chromatographie liquide préparative.	153
4.	Méthode d'analyse de la composition biochimique	155
4.1.	Détermination du taux de matière sèche de la matière première.	155
4.2.	Analyse de la composition biochimique des extraits.	155

4.2.1.	Détermination du taux de matière minérale de la matière sèche.	157
4.2.2.	Dosage colorimétrique du 3,6-anhydrogalactose.....	157
4.2.3.	Dosage colorimétrique des groupements sulfates.....	159
4.2.3.1.	Dosage colorimétrique par la méthode Jackson et McCandless (1978)	159
4.2.3.2.	Dosage colorimétrique par la méthode Jaques et al. (1968).....	162
4.2.4.	Dosage colorimétrique des sucres totaux	164
4.2.5.	Dosage colorimétrique des protéines	166
4.2.6.	Dosage colorimétrique des acides uroniques.....	168
5.	Analyses par système chromatographique :	170
5.1.	Composition moléculaire	170
5.1.1.	Méthode d'analyse des fractions par HPLC-DAD	170
5.1.2.	Profil des monosaccharides par Chromatographie Haute performance Échangeuses d'Anions HPAEC-PAD couplé à une Détecteur par Ampérométrie Pulsée (HPAEC-PAD).....	171
5.1.3.	Détermination du profil de poids moléculaire des polysaccharides par Chromatographie d'Exclusion Stérique Haute Performance (HPSEC).....	177
5.2.	Analyses structurales	179
5.2.1.	Analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance couplé à un détecteur de Spectrométrie de Masse (q-TOF)	179
5.2.2.	Analyse Infrarouge par Transformée de Fourier (FTIR)	181
5.2.3.	Analyse spectrale par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du carbone (¹³ C) 181	
6.	Évaluation des activités biologiques des extraits :	181
6.1.	Évaluation des activités biologiques.....	181
6.1.1.	Activité anti-radicalaire	181
6.1.2.	Évaluation de l'activité anti-âge	185
6.1.3.	Évaluation de l'activité anti-tyrosinase	189
6.1.4.	Évaluation de l'activité photoprotectrice et de la photosensibilité des extraits ...	191
6.2.	Évaluation de l'activité cytotoxique et antivirale des extraits de carraghénanes sur le modèle du virus de l'herpès de type 1 (VHS-1).....	195
6.2.1.	Culture cellulaire	195
6.2.2.	Évaluation de l'activité cytotoxique et de la cinétique de l'activité antivirale par viabilité cellulaire.....	197
6.2.3.	Détermination des mécanismes d'action des extraits sur le modèle virus VHS-1	199
6.2.3.1.	Inhibition de la fixation virale : Évaluation de l'effet du traitement par l'extrait en pré-infection.....	199
6.2.3.2.	Effet direct sur le virus : Évaluation de l'activité virucide de l'extrait	200

6.2.3.3.	Effet du temps d'addition : Évaluation de l'effet du traitement post-infection .	201
6.2.3.4.	Inactivation virale : Évaluation de l'effet sur l'adsorption virale	202
6.2.4.	Méthode d'analyse des résultats pour l'évaluation de la cytotoxicité par viabilité cellulaire et de l'activité antivirale	203
7.	Analyse statistique	204
Chapitre III : Résultats et discussions		205
Partie I : Étude de l'activité antiherpétique (HSV-1) de carraghénanes extraits de la macroalgue rouge Solieria chordalis (Rhodophycée, Gigartinales) par l'application de l'Extraction Assistée par Microondes (EAM).		207
1.	Introduction :	207
1.1.	L'application des micro-ondes au domaine des macroalgues	207
1.2.	Le virus de l'Herpès, modèle de pathogénicité du corps humain.	212
1.3.	Objectifs de l'étude :	221
2.	Résultats	222
2.1.	Présentation de la publication.....	222
2.2.	Conclusion de la publication	234
2.3.	Analyses des profils de sucres par Chromatographie Haute Performance Échangeuse d'Anions (HPAEC-DAD).....	234
2.4.	Analyse du profil de poids moléculaire par Chromatographie d'Exclusion Stérique Haute Performance (HPSEC).	238
2.5.	Détermination des mécanismes d'action de l'extrait de carraghénane MAE6/1 sur le virus Herpès simplex de type 1	241
2.5.1.	Inhibition de la fixation virale : Évaluation de l'effet du traitement par l'extrait en pré-infection.....	241
2.5.2.	Effet direct sur le virus : Évaluation de l'activité virucide de l'extrait.	243
2.5.3.	Effet du temps d'addition : Évaluation de l'effet du traitement post-infection.	245
2.5.4.	Inactivation virale : Évaluation de l'effet sur l'adsorption virale.	247
3.	Discussion	248
3.1.1.	L'effet du traitement aux microondes sur le profil des monosaccharides.....	248
3.1.2.	L'effet du traitement des microondes sur le poids moléculaire des carraghénanes.	249
3.1.3.	Les mécanismes d'actions de l'extrait de carraghénane sur la réplication du virus de l'Herpès simplex de type 1	249
4.	Conclusion	251
Partie II : Étude d'un concept de bioraffinerie par couplage des procédés d'extractions (Extraction Assistée par Enzyme, Extraction au CO₂		

supercritique et Extraction Assistée par Microondes) afin d'extraire les composés hydrosolubles, lipidiques et polysaccharidiques de *Solieria chordalis* (Rhodophycées, Gigartinales).....254

1. Introduction :	254
1.1. Concept de bioraffinerie	254
1.2. Objectifs de l'étude	259
2. Résultats	261
2.1. Extraction Assistée par Enzyme	261
2.1.1. Évaluation de l'activité standardisé des cocktails enzymatiques :	261
2.1.2. Rendements d'extraction des composés de <i>S. chordalis</i> après l'Extraction Assistée par Enzyme.	263
2.1.3. Analyse de la composition biochimique des extraits obtenus par l'Extraction Assistée par Enzyme :	263
2.2. Extraction par dioxyde de carbone (CO ₂) supercritique.....	265
2.2.1. Rendement d'extraction par CO ₂ supercritique	265
2.2.2. Détermination de la distribution des classes de lipides dans les extraits bruts.....	267
2.3. Extraction Assistée par Microondes appliquée à l'extraction des carraghénanes à partir de résidus de <i>S. chordalis</i>	269
2.3.1. Évaluation de l'effet des prétraitements sur le rendement d'extraction en carraghénane.	269
2.3.2. Effet des prétraitements sur la composition biochimique des carraghénanes.....	272
2.3.3. Évaluation de l'activité antiradicalaire des extraits hydrosolubles de <i>S. chordalis</i>	274
3. Discussion	274
3.1.1. L'étude de l'Extraction Assistée par Enzyme	274
3.1.2. L'étude de l'Extraction par CO ₂ supercritique.	280
3.1.3. Effet du prétraitement sur la composition des carraghénanes.....	282
3.1.4. L'activité antiradicalaire des extraits hydrosolubles de l'EAE.	283
4. Conclusion	285

Partie III : Recherche de molécules anti-UV, isolement et purification par Chromatographie de Partage Centrifuge.....287

1. Introduction :	287
1.1. Les Acides Aminés Mycosporine-like	287
1.2. Les réactions oxydantes et le rayonnement UV, facteurs de vieillissement de la peau.	293
1.3. Les objectifs de l'étude	294
2. Résultats	296

2.1.	Rendements d'extraction	296
2.2.	Fractionnement et caractérisation de l'extrait apolaire.	296
2.2.1.	Fractionnement par Chromatographie de Partage Centrifuge.....	296
2.2.2.	Purification des fractions CPC par Chromatographie Liquide Préparative.....	302
2.2.3.	Caractérisation des fractions purifiées A, B, C et D.	302
2.3.	Caractérisation de l'extrait polaire	308
2.4.	Évaluation des activités biologiques.....	310
2.4.1.	Analyse des fractions de l'extrait apolaire.....	310
2.4.1.1.	Fractions obtenues par Chromatographie Partage Centrifuge.....	310
2.4.1.1.1.	Évaluation de l'activité antiradicalaire.....	310
2.4.1.1.2.	Évaluation de l'activité anti-tyrosinase	311
2.4.1.1.3.	Évaluation de l'activité anti-âge	312
2.4.1.2.	Fractions purifiées par Chromatographie Liquide Préparative.....	312
2.4.1.2.1.	Évaluation de l'activité antiradicalaire.....	312
2.4.1.2.2.	Évaluation de l'activité photoprotectrice	314
2.4.2.	Analyse de l'extrait polaire.....	318
2.4.2.1.	Évaluation de l'activité antiradicalaire.....	318
2.4.2.2.	Évaluation de l'activité photoprotectrice	318
3.	Discussion	319
3.1.	Caractérisation des composés isolés dans les fractions apolaires (A, B, C et D) et l'extrait polaire.	319
3.2.	Comparaison des activités biologiques et physico-chimiques	320
3.2.1.	Comparaison des fractions CPC et des fractions purifiées par LC-Prep (fractions a, B, C et D).....	320
3.2.2.	Comparaison des fractions apolaires A, B, C et D avec la fraction polaire.	322
4.	Conclusion	324
	Conclusion Générale	327
	Bibliographie	333
	Annexes.....	395

La communication scientifique

Communication dans les journaux scientifiques :

Boulho, R., Le Roux, J., Le Quémener, C., Audo, G., Bourgougnon, N., & Bedoux, G. (2017). Fractionation of UV-B absorbing molecules et of free radical scavenging compounds from *Solieria chordalis* by using centrifugal partition chromatography. *Phytochemistry Letters*.

Boulho, R., Marty, C., Freile-Pelegrín, Y., Robledo, D., Bourgougnon, N., & Bedoux, G. (2017). Antiherpetic (HSV-1) activity of carrageenans from the red seaweed *Solieria chordalis* (Rhodophyta, Gigartinales) extracted by microwave-assisted extraction (MAE). *Journal of Applied Phycology*, 1-10.

Terme, N., Boulho, R., Kendel, M., Kucma, J. P., Wielgosz-Collin, G., Bourgougnon, N., & Bedoux, G. (2017). Selective extraction of lipid classes from *Solieria chordalis* et *Sargassum muticum* using supercritical carbon dioxide et conventional solid-liquid methods. *Journal of Applied Phycology*, 1-7.

Bedoux, G., Caamal-Fuentes, E., Boulho, R., Marty, C., Bourgougnon, N., Freile-Pelegrin, Y., & Robledo, D. (2017). Antiviral et Cytotoxic Activities of Polysaccharides Extracted from Four Tropical Seaweed Species. *NATURAL PRODUCT COMMUNICATIONS*, 12(6), 807-811.

Wijesekara, I., Lang, M., Marty, C., Gemin, M. P., Boulho, R., Douzenel, P., Wickramasinghe, I., Bedoux, G. et Bourgougnon, N. (2017). Different extraction procedures et analysis of protein from *Ulva* sp. in Brittany, France. *Journal of Applied Phycology*, 1-9.

Chapitre d'ouvrage

Terme, N., Boulho, R., Bourgougnon, N., et Bedoux, G., lipid et fatty acid profile of major seaweeds, (soumis)

Communications orales aux congrès internationaux

Romain Boulho, Yoleta Freile-Pelegrin, Christel Marty, Daniel Robledo, Nathalie Bourgougnon, Gilles Bedoux. Antiherpetic (HSV-1) activity of carrageenans from the red seaweed *Solieria chordalis* (Rhodophyta, Gigartinales) extracted by Microwave Assisted Extraction (MAE), *ISAP - International Symposium of Applied Phycology 2017*, 18th to 23th June 2017, Nantes, France

Romain Boulho, Julie Le Roux, Céline Le Quémener, Grégoire Audo, Jean-Philippe Kucma, Nathalie Bourgougnon, Gilles Bedoux. Red seaweed bioactive compounds extraction by innovative technology combination- ISS - *International Seaweed Symposium 2016*, Copenhagen, Denmark

Céline Le Quémener, Romain Boulho, Julie Le Roux, Grégoire Audo, Jean-Philippe Kucma, Nathalie Bourgougnon, Gilles Bedoux. Red seaweed bioactive compounds extraction by innovative technology combination *10th International Symposium on Chromatography of Natural Products*, Lublin, Pologne, June 6th-9th, 2016.

Grégoire Audo, Romain Boulho, Julie Le Roux, Céline Le Quémener, Jean-Philippe Kucma, Nathalie Bourgougnon, Gilles Bedoux. Red seaweed bioactive compounds extraction by innovative technology combination CCC 2016 Chicago - *The 9th International Countercurrent Chromatography Conference* – July 30th to August 3rd 2016

Communication orale aux congrès nationaux

Romain Boulho, Etrew Hurney, Céline Le Quémener, Grégoire Audo, Jean-Philippe Kucma, Nathalie Bourgougnon, Gilles Bedoux, Red seaweed conversion into bioactive compounds by ecofriendly extraction et Centrifugal Partition Chromatography, *Société Française de Phycologie*, 23-25 septembre 2015, Vannes

Posters

Romain Boulho, Julie Le Roux, Céline Le Quémener, Grégoire Audo, Jean-Philippe Kucma, Nathalie Bourgougnon, Gilles Bedoux Preparative separation of marine bioactive compounds by centrifugal partition chromatography – 9th Joint Natural Product Conference 2016 – Copenhagen. July 24th – 27th, 2016.

Romain Boulho, Julie Le Roux, Céline Le Quémener, Grégoire Audo, Jean-Philippe Kucma, Nathalie Bourgougnon, Gilles Bedoux, Centrifugal Partition Chromatography for Preparative Separation of Marine Bioactive Compounds – International Symposium of Green Chemistry – 3rd to 7th May 2015

Organisation de colloque

Société phycologique de France – 23 au 25 septembre 2015

Liste des figures

Figure 1: Schéma présentant le plan d'étude du projet.....	44
Figure 2: Carte représentant les acteurs de la filière cosmétique en Bretagne (site Bretagne Développement Innovation, Émilie FAUCHEUX).....	50
Figure 3 Observation microscopique de coupe transversale de thalle de <i>Solieria chordalis</i> (A), grossissement plus important de la Médulla (B), des cellules de Parenchyme (C) et des cellules corticales (D) par R. Boulho, E. Vázquez-Delfín (2015).	58
Figure 4: Observation microscopique de différentes formes de tétraspoires présent chez les Rhodophycées. (a) Tétraspoires tétrahédrales observés chez <i>Polysiphonia</i> sp. (b) Tétraspoires cruciés observés chez <i>Gracilaria</i> sp. ; (c) et (d) Tétraspoires zonés observés chez <i>Kappaphycus alvarezii</i> et <i>Coelarthrum opunita</i> (Mayanglambam et Sahoo, 2015).	60
Figure 5: Structure d'acide aminés, acide glutamique (A) et acide aspartique (B).	66
Figure 6: Structure moléculaire de lipides, l'acide arachidonique (AA, C20 : 4 / n-6) (A) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20 : 5 / n-3) (B).	68
Figure 7: Structure de vitamines, la vitamines B12 (A), la vitamine A (B), la vitamine C (C) et la vitamine B2 (D).....	70
Figure 8: Schéma général de l'organisation structurelle de la paroi des algues rouges (Lechat, 1997) 72	
Figure 9: Structure chimique de l'unité agarobiose.	80
Figure 10: Structure moléculaire de l'amidon floridéen 82	
Figure 11: Structure chimique des molécules de α et β -carotène..... 84	
Figure 12: Schéma de la structure moléculaire de la chlorophylle a 86	
Figure 13: Structure chimique de phycobiliprotéine, la R-phycoérythrine..... 89	
Figure 14: Structure chimique de terpène, la structure présentée correspondant à la molécule de myrcène..... 89	
Figure 15: Schéma présentant les réactions engendrant la différenciation structurelle des acides aminés mycosporine-like. (traduit de Wada, Sakamoto et Matsugo, 2015). 94	
Figure 16: Schémas présentant la structure moléculaire du gadusol (A) et du 4-deoxygadusol (B) les précurseurs d'acides aminés mycosporine-like (MAAs)..... 94	
Figure 17 : Schéma représentant le diagramme de phases du dioxyde de carbone (http://planet-terre.ens-lyon.fr/article/fluide-supercritique.xml) 108	
Figure 18 : Schéma représentant l'appareillage du procédé d'extraction au CO ₂ supercritique. (UTC Compiègne ; http://www.tai-team.fr/fr/equipement/co2-supercritique) 108	
Figure 19 : Influence de la qualité de séparation sur la pureté et le taux de récupération des composés C ₁ et C ₂ 124	
Figure 20: Schéma présentant les différentes techniques de chromatographie préparatives. La chromatographie gaz-solide (GSC), gaz-liquide (GLC), d'exclusion stérique (SEC), liquide-solide (LSC), liquide-liquide (LLC), échangeuse d'ions (IC), chromatographie sur couche mince (TLC) ou papier (PC) et la chromatographie par fluide supercritique (SFC). 124	
Figure 21: Illustration du système de distribution à contre-courant « machine de Craig » (www.theliquidphase.org) (A) ; Schéma du principe de fonctionnement du système de distribution à contre-courant, modifié d'après (G. Guidotti, 2015 ; https://chsi.harvard.edu/ccdm) (B). 128	

Figure 22: Schéma représentant le fonctionnement de la colonne de Chromatographie à Contre-Courant (CCC) (A) et le schéma représentant les phénomènes physiques se déroulant au sein de la colonne soumis à la force centrifuge (B), (modifié de Berthod et al., 2009 et Berthod et al., 2002).	132
Figure 23: Structure interne formée de canaux et de cellules (A) formant la colonne (B) par jonction des disques entre eux usités. La colonne fait partie d'un module du système CPC (Armen Instruments) (3).	132
Figure 24 : Schéma représentant le principe de l'élution au sein de la colonne CPC et présente les deux sens d'élution possible en mode ascendant ou descendant. (figure originale modifiée du site http://www.kromaton.com/fr/la-cpc/technologies).	134
Figure 25: Schéma du protocole d'Extraction Assistée par Enzymes.	149
Figure 26: Schéma de la réaction d'hydrolyse des carraghénanes et de la formation du complexe chromophore permettant le dosage des 3,6 anhydrogalactose suivant la méthode décrite par Matsuhira et Zanlungo, (1983).	156
Figure 27: Principe et réaction du dosage des groupements sulfates liés aux polysaccharides par la méthode de Jaques et al. (1968).	161
Figure 28: Schéma de la réaction d'hydrolyse entraînant la formation de furfural et la formation du chromophore permettant le dosage des sucres totaux par la méthode de Dubois et al. 1956.	163
Figure 29: Schéma de la réaction de Biuret et de complexation permettant le dosage des protéines suivant la méthode décrite par Smith et al. (1985).	165
Figure 30: Principe et réaction du dosage des acides uroniques par la méthode de Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973) modifiée par Filisetti-Cozzi et al. (1991).	167
Figure 31: Colonne CarboPac PA1. Les fonctions amines quaternaires des microbilles de latex se fixent aux groupements SO ₃ ⁻ du substrat de la colonne (Dionex, 2013).	172
Figure 32: Chromatogramme des standards de monosaccharides et paramètres de calibration du dosage.	174
Figure 33: Schéma représentant le programme d'élution appliquée pour l'analyse du profil de monosaccharide.	176
Figure 34 : Courbe de calibration des temps de rétention des standards de pullulans en fonction de leur poids moléculaire. Équation de la forme $\log_{10} (PM) = f(\text{temps})$.	178
Figure 35: Réaction de formation des radicaux libres par méthode DPPH.	182
Figure 36: Courbe étalon de l'activité antiradicalaire des standards hydroxyanisole butylé (BHA) et hydroxytoluène butylé (BHT).	182
Figure 37: Schéma de réaction de l'hydrolyse du substrat N-méthoxysuccinyl-ala-ala-pro-val-p-nitroanilide par l'enzyme élastase formant le produit p-nitroaniline.	184
Figure 38 : Courbe étalon de l'activité inhibitrice du standard trypsine sur l'enzyme elastase.	186
Figure 39: Schéma de formation de la Dopaquinone par la réaction d'hydrolyse du substrat L-DOPA par l'enzyme tyrosinase.	188
Figure 40: Schéma de préparation de la microplaque pour la réalisation du test d'inhibition de l'activité tyrosinase. La colonne (C) correspond au contrôle positif sans inhibiteur. La ligne (C _{std} ⁻) correspond au contrôle négatif sans enzyme et les lignes (C _{std} ⁺) correspondent au puits permettant le suivi de la cinétique enzymatique en présence ou absence d'inhibiteur.	190
Figure 41: Courbe étalon de l'activité inhibitrice des standards Acide Kojic et Quercétine vis-à-vis de la tyrosinase.	190
Figure 42: Schéma de la méthode de l'analyse de l'activité anti-UV des extraits présentant la répartition dans les puits de la chlorophylle, du contrôle (C+) avec les puits vide, du blanc solvant (S) et des échantillons (E).	192

Figure 43: Courbe de dénaturation de la chlorophylle lors de l'exposition aux UV-A et UV-B.....	194
Figure 44: Schéma de l'organisation du test d'activité cytotoxique et du test de l'activité antivirale sur une microplaque 96 puits, sont présentés les gammes de dilution pour l'analyse des carraghénanes et du standard l'Acyclovir « Zovirax », le contrôle de mortalité cellulaire par infection virale (C-) et le contrôle de viabilité cellulaire (C+).....	198
Figure 45 : Schéma représentant les étapes du traitement permettant d'évaluer l'effet de l'extrait sur la fixation virale.	198
Figure 46 : Schéma représentant les étapes du traitement permettant d'évaluer l'activité virucide de l'extrait	200
Figure 47 : Schéma représentant les étapes du traitement par addition pour évaluer l'effet de l'extrait post-infection.	201
Figure 48 : Schéma représentant les différentes étapes du test afin d'évaluer l'effet d'inactivation virale de l'extrait.....	202
Figure 49 : Structure du virus Herpès simplex de type 1 (VHS-1).	211
Figure 50 : Représentation schématisée du cycle de réplication du Virus de l'Herpès simplex de type 1 (Schéma modifié d'après Fleury, 2009).....	211
Figure 51: Plan d'étude de l'activité antiherpétique (HSV-1) de carraghénanes extraits de la macroalgues rouge <i>Solieria chordalis</i> (Rhodophycée, Gigartinales) par l'application de l'Extraction Assistée par Microondes (EAM).	220
Figure 52: Chromatogramme des profils en monosaccharide des extraits de carraghénanes obtenu par Extraction Assistée par Microondes. La codification correspond aux conditions d'extractions (publication, p274) : MAE1 (90°C, 10 min) ; MAE3 (90°C, 25 min) ; MAE4 (105°C, 10 min) et MAE6 (105°C, 25min). Les valeurs MAE1/X, X correspondant à la concentration en KOH du milieu (0%, 0,5% ou 1%).....	233
Figure 53: Figure présentant le profil des poids moléculaires des différents extraits de carraghénanes obtenu par Extraction Assistée aux Microondes. Codification : MAE1 (90°C, 10 min) ; MAE3 (90°C, 25 min) ; MAE4 (105°C, 10 min) et MAE6 (105°C, 25min). Les valeurs MAE1/X, X correspondant à la concentration en KOH du milieu (0%, 0,5% ou 1%). (1/2)	237
Figure 54: Figure présentant le profil des poids moléculaires des différents extraits de carraghénanes obtenu par Extraction Assistée aux Microondes. Codification : MAE1 (90°C, 10 min) ; MAE3 (90°C, 25 min) ; MAE4 (105°C, 10 min) et MAE6 (105°C, 25min). Les valeurs MAE1/X, X correspondant à la concentration en KOH du milieu (0%, 0,5% ou 1%) (2/2).	239
Figure 55: Schéma du plan d'étude de la partie II intitulée « Étude d'un concept de bioraffinerie par couplage des procédés d'extractions (Extraction Assistée par Enzyme, Extraction au CO ₂ supercritique et Extraction Assistée par Microondes) afin d'extraire les composés hydrosolubles, lipidiques et polysaccharides de <i>Solieria chordalis</i> (Rhodophycées, Gigartinales) » présentant le schéma de procédés en cascade appliqué à l'algue <i>S. chordalis</i> afin d'en extraire les composés. (E) correspond au produit extrait ; (R) correspond au résidu ; (W) correspond à la fraction de déchet.	258
Figure 56 : Diagramme représentant les rendements d'extraction obtenu par le procédé d'Extraction Assistée par Enzymes sur <i>S. chordalis</i> (Rhodophycées). Codification : CEL : Cellulase ; VIN : Vino Taste Pro ; PRO : Protamex ; ALC : Alcalase ; GLU : Glucanex ; AMG : AMG 500 L ; VIS : Visczyme. Les mélanges E/E (1/1, m/m) et E/E/E (1/1/1, m/m).	262
Figure 57: Histogramme présentant les activités antiradicalaire des extraits obtenus par Extraction Assistée par Enzymes. Les résultats sont exprimés en Cl ₅₀ équivalent à la concentration nécessaire pour réduire de 50% la formation de radicaux libres. Les concentrations sont en mg/mL.....	273

Figure 58 : Représentation des dommages cellulaires induits par les réactions en chaîne induit par les Dérivés Réactifs à l'Oxygène (DRO , de l'anglais Reactive Oxygen Species (ROS)). Les cellules de la peau sont continuellement exposées aux sources endogènes et exogènes intervenant dans la formation de DRO . Les cellules possèdent également des sources de DRO endogènes au travers de mitochondries et de certaines enzymes (NADPH oxydase et xanthine oxydase) mais possède également des mécanismes permettant de bloquer les DRO par la SOD qui catalyse la dismutation de superoxyde en peroxyde d'hydrogène. La catalyse du peroxyde d'hydrogène formant de l'eau et de l'oxygène. La glutathion peroxydase (GPx) qui réduit le peroxyde d'hydrogène et la GSH réduit qui est converti pour oxydé le glutathionne (GSSG) convertissant l' H₂O₂ et H₂O . Les mitochondries endommagées produisent plus de DRO formant un cercle vicieux. SSBs ; DSBs : Rupture de simple ou doubles brins ; 8-oxoGua : 8-oxo-7,8-dihydroguanine ; MDA : Malondialdéhyde ; 4-HNE : 4-hydroxi-2-nonenale (modifiée à partir de Berthon et al. 2017)	292
Figure 59: Plan d'étude de la partie 3 : Recherche de molécules anti-UV, isolement et purification par Chromatographie de Partage Centrifuge.	295
Figure 60: Schéma présentant le chromatogramme A de fractionnement par CPC (rose et orange) complété par une étape de purification par chromatographie liquide préparative (chromatogramme B) afin d'aboutir à l'obtention des fractions nommés A, B, C et D. Le spectre UV commun aux quatre fractions est intégré à la figure.	301
Figure 61 : (a) Chromatogramme de la fraction A avec détection à $\lambda_{\text{max}} = 310$ nm (rose). En bleue, apparaît le TIC (Total Ion Current). (b) Le spectre de masse du composé 1 ; (c) Le spectre de masse du composé 2.	303
Figure 62 : (a) Chromatogramme de la fraction B avec détection à $\lambda_{\text{max}} = 310$ nm (rouge). En violet, apparaît le TIC (Total Ion Current). (b) Le spectre de masse du composé 1 ; (c) Le spectre de masse du composé 2.	305
Figure 63: (a) Chromatogramme de la fraction C avec détection à $\lambda_{\text{max}} = 310$ nm (bleu). En orange, apparaît le TIC (Total Ion Current). (b) Le spectre de masse du composé 1 ; (c) Le spectre de masse du composé 2.	306
Figure 64: (a) Chromatogramme de la fraction D avec détection à $\lambda_{\text{max}} = 310$ nm (violet). En vert, apparaît le TIC (Total Ion Current). (b) Le spectre de masse du composé 1.	307
Figure 65: Spectre de masse de l'extrait polaire issu de l'algues <i>S. chordalis</i> . (a) Chromatogramme UV à 334 nm (vert) et le TIC (bleu) ; (b) spectre de masse du composé à 8,0 min ; (c) spectre de masse du composé à 9,7 min ; (d) spectre de masse du composé à 10,3 min ; (e) spectre de masse du composé à 13,8 min et (f) spectre de masse du composé à 14,3 min.....	308
Figure 66: Histogramme présentant l'activité anti-tyrosinase de 6 fractions CPC (Partie III.2.2.1.). Les résultats exprimés en équivalent de l'activité des composés standard Acide Kojique (bleu) et Quercétine (orange). La concentration des fractions est de 10 g/L.....	309
Figure 67: Histogramme présentant l'activité anti-âge des fractions obtenues par fractionnement de l'extrait méthanolique brut issu de la macroalgues <i>S. chordalis</i> . Les résultats sont exprimés en équivalent de trypsine, standard inhibiteur. La concentration des fractions est de 10 mg/mL.....	311
Figure 68 : Histogramme présentant l'activité antiradicalaire des fractions purifiées d'acide aminés mycosporines-like extraite de <i>S. chordalis</i> . Les résultats sont exprimés en CI_{50} qui correspond à la concentration permettant de réduire de 50% la formation de radicaux libre, cette concentration est exprimées en mg/mL.....	313
Figure 69 : Courbes de dégradation des fractions purifiées A, B, C et D des composés anti-UV soumis à l'exposition des UV-A (bleue) et des UV-B (orange).....	315

Figure 70: Droites de dégradation de la chlorophylle b soumis aux rayonnement UV-A (bleue) et UV-B (orange) en présence des fractions purifiées jouant le rôle de filtre photoprotecteur.....	315
Figure 71: Schéma de synthèse de l'extraction de composés actifs de <i>Solieria chordalis</i> par l'application de différents procédés.....	326

Liste des tableaux

Tableau I: Caractères différenciants les algues en différentes classes. Avec α 1-4: amidons ; β 1-3 : laminarane , PE : Phycoérythrine, PC : Phycocyanine, APC : Allophycocyanine, Chl. : Chlorophylle (de Reviers, tome 1).	52
Tableau II: Classification des sous-ordres composants les Floridées (Rhodopycées) et leurs caractères différenciés (Mayanglambam et Sahoo, 2015)	55
Tableau III: Présentation des différentes espèces de <i>Solieria</i> répertoriées avec le nom du botaniste à l'origine de leur découverte et l'année (www.algaebase.org)	56
Tableau IV: Tableau présentant les différentes structures des carraghénanes et de leurs précurseurs (1/2).	75
Tableau V: Tableau présentant les différentes structures des carraghénanes et de leurs précurseurs (2/2).	76
Tableau VI: Tableau citant les MAAs de type Aminocyclohexenone décrivent dans la littérature.....	95
Tableau VII: Tableau citant les MAAs de type Aminocyclohexenimine décrivent dans la littérature.	97
Tableau VIII: Tableau présentant les composés des Rhodophycées démontrant des activités dans le domaine de pharmaceutique.	101
Tableau IX: Les principes du concept de la chimie verte définis par Paul Anastas et John C. Warner.	104
Tableau X: Tableau présentant les applications sur les macroalgues utilisant l'Extraction par CO ₂ supercritique pour l'extraction de composés d'intérêt, les avantages et les inconvénients de ce procédé.....	111
Tableau XI: Tableau présentant les applications sur les macroalgues utilisant l'Extraction Assistée par Microondes pour l'extraction de composés d'intérêt, les avantages et les inconvénients de ce procédé.....	114
Tableau XII : Listing des enzymes décrites pour l'application de l'Extraction Assistée par Enzymes.	117
Tableau XIII : Tableau présentant les applications sur les macroalgues utilisant l'Extraction Assistée par Enzymes pour l'extraction de composés d'intérêt, les avantages et les inconvénients de ce procédé.	119
Tableau XIV : Tableau présentant les applications sur les macroalgues utilisant l'Extraction Assistée par Ultrasons pour l'extraction de composés d'intérêt, les avantages et les inconvénients de ce procédé.	120

Tableau XV : Tableau présentant les applications sur les macroalgues utilisant l'Extraction par Fluide Pressurisé pour l'extraction de composés d'intérêt, les avantages et les inconvénients de ce procédé.	122
Tableau XVI: Tableau présentant les caractéristiques techniques des protéases utilisées pour l'étude de l'Extraction Assistée par Enzyme.....	142
Tableau XVII: Tableau présentant les caractéristiques techniques des carbohydrases utilisées pour l'Extraction Assistée par Enzyme de <i>S. chordalis</i> :	144
Tableau XVIII: Gamme de dilution pour l'évaluation de l'activité protéase des enzymes :.....	145
Tableau XIX: Gamme de dilution pour l'évaluation de l'activité cellulase des enzymes	147
Tableau XX : Gamme de dilution pour l'évaluation de l'activité β -glucanase des enzymes:.....	148
Tableau XXI : Gamme de dilution pour la réalisation du test de l'inhibition de l'élastase	187
Tableau XXII : Tableau présentant les trois traitements appliqués aux cellules pour évaluer l'effet de l'inactivation virale de l'extrait.	201
Tableau XXIII: Tableau présentant les études appliquants l'Extraction Assistée aux Microondes pour l'obtention d'extraits de macroalgues (Rhodophycées, Chlorophycées et Phéophycées)	208
Tableau XXIV: Tableau présentant les études réalisées sur l'activité antivirale de polysaccharides sulfatés extraits de macroalgues rouges.....	214
Tableau XXV : Tableau présentant la distribution des monosaccharide composants les extraits de carraghénanes exprimer en % de sucres totaux :	235
Tableau XXVI : Tableau présentant les CC_{50} et CE_{50} obtenus pour l'extrait de carraghénane MAE6/1 et l'Acyclovir (Zovirax) pour le test de protection cellulaire en pré-infection par le virus Herpès simplex de type 1.....	240
Tableau XXVII: Tableau présentant les CC_{50} et CE_{50} obtenus pour l'extrait de carraghénane MAE6/1 et l'Acyclovir (Zovirax) pour le test de protection cellulaire afin de déterminer l'effet virucide vis-à-vis du virus Herpès simplex de type 1.	242
Tableau XXVIII: Tableau présentant les CC_{50} et CE_{50} obtenus pour l'extrait de carraghénane MAE6/1 et l'Acyclovir (Zovirax) pour le test de protection cellulaire afin de déterminer l'effet de l'ajout post-infection des drogues sur la protection des cellules vis-à-vis du virus Herpès simplex de type 1.....	244
Tableau XXIX: Tableau présentant les CC_{50} et CE_{50} obtenus pour l'extrait de carraghénane MAE6/1 et l'Acyclovir (Zovirax) pour le test servant à déterminer l'effet des drogues sur l'adsorption virale par les cellules.	246
Tableau XXX : Résultats du contrôle de l'activité enzymatique (protéase et β -glucanase) des cocktails commerciaux utilisés pour l'Extraction Assistée par Enzyme.	260
Tableau XXXI: Composition biochimique des extraits hydrosolubles obtenus par l'Extraction Assistée par Enzymes.	264

Tableau XXXII: Rendement d'extraction en extraits bruts et en lipides obtenus par traitement de <i>S. chordalis</i> par le procédé CO ₂ supercritique dans différentes conditions.	266
Tableau XXXIII: Distribution des différentes classes de lipides contenus dans les extraits par CO ₂ supercritique issus de l'algue rouge <i>S.chordalis</i>	266
Tableau XXXIV: Rendement d'extraction en carraghénanes obtenus par traitement des résidus de <i>S. chordalis</i> prétraités par les procédés d'Extraction Assistée par Enzyme (EAE ; ALC, PRO, VIN) ou par CO ₂ supercritique (ScCO ₂).	268
Tableau XXXV: Composition biochimique des extraits de carraghénane issus des résidus prétraités de <i>S. chordalis</i> par traitement aux microondes. Les prétraitements correspondent à l'hydrolyse aqueuse (TEMOIN) ; des Extractions Assistées par Enzyme (Alcalase: ALC ; Protamex : PRO ; Vino Taste Pro : VIN) et par CO ₂ supercritique (ScCO ₂).	271
Tableau XXXVI : Présentation d'application de l'Extraction Assistée par Enzyme pour l'obtention d'extraits de Rhodophycées.	275
Tableau XXXVII: Liste non exhaustive des travaux réalisés sur l'extraction et la détermination de la composition en Acides Aminés Mycosporine-likes chez les Rhodophycées (1/2).....	288
Tableau XXXVIII: Tableau présentant une liste non exhaustive des travaux réalisés sur l'extraction et la détermination de la composition en Acides Aminés Mycosporine-likes chez les Rhodophycées (2/2).....	290
Tableau XXXIX: Résultats déterminés à partir des courbes de dénaturations présentées dans les Figure 69 et Figure 70. Les valeurs représentent le pourcentage de dénaturation des fractions purifiées au bout de 120 minutes d'exposition aux UV-A et aux UV-B. Les valeurs expriment également l'effet photoprotecteur de ces fractions (A,B,C et D) en déterminant le temps de demi-vie de la chlorophylle b.	316
Tableau XL : Evaluation de l'activité photoprotectrice de l'extrait polaire de <i>S. chordalis</i> . Les résultats présentent la demi-vie de la chlorophylle b exposée aux rayonnements UV-A et UV-B en présence ou non de l'extrait polaire comme filtre photoprotecteur.	317

Liste des abréviations

AA : Acide Aminé

CC₅₀ : Concentration Cytotoxique 50 %

CE₅₀ : Concentration Efficace 50 %

CEVA Centre d'Études et de Valorisation des Algues

CI₅₀ : Concentration inhibant la réaction de 50%

CN : Conditions d'extraction conventionnelles natives

CPC : Chromatographie de Partage Centrifuge

CT : Conditions d'extraction conventionnelles alcalines

DO : Densité Optique

EAE : Extraction Assistée par Enzymes

EH : Extrait Hydrosoluble

E/S : ratio Enzyme / Substrat

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

HCl : acide chlorhydrique

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

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

MAA : Mycosporine-like Amino Acide

MAE ou EAM : Extraction Assistée par Micro-ondes

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

MP : Matière Première

MS : Matière Sèche

-OH : groupement hydroxyle

PLS : Polysaccharide

Prep-LC : Chromatographie Liquide Préparative

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

ScCO₂ : Extraction au CO₂ supercritique

TN : Témoin Négatif

UBS : Université Bretagne Sud

UV : rayonnement Ultra Violet

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VSH : Virus de l'*Herpes Simplex*

W : Déchets



Photo 1 : Photo des échouages d'algues rouges majoritairement composés de Solieria chordalis sur la plage de Saint-Gildas de Rhuys (Morbihan, France) en octobre 2014. (photo : R. Boulho)

Introduction générale

Contexte d'étude

Les côtes bretonnes possèdent le plus grand champ d'algues d'Europe représentant un gisement naturel important entraînant parfois des échouages massifs de certaines espèces. En 2016, cette biomasse représente environ 80 000 tonnes d'algues vertes (principalement *Ulva* sp.), 70 000 tonnes d'algues brunes (parmi lesquels les genres *Laminaires*, *Ascophyllum*, *Fucus*, *Sargassum*) et également 10 000 tonnes d'algues rouges (tels que les genres *Chondrus*, *Mastocarpus*, *Solieria*) (Neveu, 2016). La prolifération de ces espèces est due en partie à leur capacité à se développer rapidement en lien avec des paramètres abiotiques favorables (la température du milieu, la luminosité, la salinité, la structure et la nature des substrats) mais également en réponse à un bloom de nutriments (parmi lesquels l'azote, le phosphate et le carbone). Cette prolifération importante accompagnée d'un échouage massif de certaines espèces au cours de l'année occasionne des problématiques à différents niveaux. L'eutrophisation du milieu engendré par la prolifération conduit, en effet, à un bouleversement de l'écosystème aquatique. Les échouages massifs (**Photo 1**) entraînent des risques écologiques et sanitaires dus à la fermentation des algues et à l'émanation d'hydrogène sulfuré toxique ; cela conduit à un investissement conséquent pour leur évacuation et leur élimination (Bourgougnon et Stiger-Pouvreau 2011).

Parmi les espèces prolifératives, *S. chordalis* (Rhodophycée, Gigartinales) apparaît chaque année sur les côtes. Son cycle de croissance et la périodicité de ses échouages correspondent au période de pic touristique de la région Sud Bretagne (Burlot, 2016). L'élimination par les collectivités est indispensable malgré le coût qui n'est, actuellement, pas équilibré par une valorisation industrielle. Si on se réfère à l'étude portant sur *S. chordalis* réalisée auprès des collectivités territoriales, A-S Burlot parle d'un référencement d'échouages massifs sur la période estivale depuis plus d'une dizaine d'années sur les côtes de Bretagne Sud avec des quantités évacuées pouvant atteindre les 9000 tonnes (Tavenec, 2009 ; Burlot, 2016 ; Neveu, 2016). Malgré quelques études réalisées par différents laboratoires de recherche sur *S. chordalis*, qui ont notamment démontré la présence de composés ayant des activités antivirale, immunostimulante et photoprotectrice (Bondu, 2010 ; Bedoux, 2014 ; Berthou, 2015 (brevet WO/2015/197652) ; Burlot 2016), *Solieria chordalis* est aujourd'hui une

ressource économique encore sous exploitée et peu connue (Bourgougnon et Stiger-Pouvreau 2011,



*Photo 2 : Algobox disposés sur la plage de Penvins (Morbihan, France) (Conseil général du Morbihan).
Projet de l'équipe vannetaise du Laboratoire Géosciences Océan.*

Smetacek et Zingone. 2013). Actuellement, les algues collectées de manière indifférenciée par la communauté de communes dont dépend Saint-Gildas de Rhuys sont éliminées principalement au travers de la filière agricole par la production de compost.

Un intérêt croissant pour cette ressource se développe à travers l'émergence de projets gravitants autour de la récolte et de l'exploitation de cette matière première. Par exemple, le projet LITTORALG financé par l'Université Bretagne Sud et coordonné par le LBCM a permis la création d'"algobox", il vise à la réhabilitation des espaces naturels du littoral par l'utilisation de ces algues au sein de ces boxs construits en amont de la plage (**Photo 2**).

Ce projet fédère 6 laboratoires (3 laboratoires scientifiques le Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, le Laboratoire Géosciences Océan, l'Institut de Recherche en Informatique et Systèmes Aléatoires et 3 laboratoires en Sciences Humaines et Sociales, Géoarchitecture, le laboratoire de droit Lab-LEX, le Laboratoire de Psychologie : Cognition, Comportement, Communication) sur le thème de l'algue rouge *Solieria chordalis*. De nombreuses actions de recherche ont été abordées durant ces quatre dernières années : l'évaluation de la biomasse de *S. chordalis* du large à l'échouage, l'effet des échouages sur l'avifaune, le monitoring haute résolution de la mise en place, de l'évolution, de la mobilité spatio-temporelle et de l'impact d'un banc d'algues sur l'hydrodynamisme et la morphodynamique d'une plage: estimations de surfaces et/ou de volumes, l'étude de la dimension sociétale par la compréhension des conflits d'usage, des impacts socio-économiques, le regard des usagers, des touristes, la mise en valeur du littoral face aux marées rouges et au développement de l'algoculture et enfin l'étude des voies de valorisation de la ressource algale pour une gestion durable sur le littoral.

Pour cela, une connaissance des constituants de l'algue et des voies de valorisation seraient un atout pour le développement d'une économie autour de cette espèce.

L'industrie des composés naturels de par l'intensification de sa production se tourne, de plus en plus, vers des procédés de fabrication répondant aux critères de la chimie verte. Les objectifs recherchés sont de minimiser l'utilisation de solvants, de réduire les coûts effectifs de production et d'améliorer la qualité des extraits obtenus. Ces objectifs d'innovation sont motivés par la compétitivité du marché et par la réduction de l'empreinte écologique des technologies (Chemat *et al.*, 2012). De plus, les industriels sont aujourd'hui poussés vers

l'innovation par la mise en place de réglementation et de contrôle avec un cahier des charges strict. La directive REACH (Registration, Evaluation, Autorisation et Restriction of Chemicals) intervient dans ce sens au niveau européen de manière à cadrer l'utilisation des produits chimiques. Tout ceci oriente le développement de l'industrie vers la « chimie verte » définie comme « l'utilisation de technologies et de procédés verts basés sur la découverte et le développement de procédés d'extraction qui vont diminuer leur consommation en énergie, permettre l'application de solvants alternatifs et de produits naturels renouvelables ; mais également de garantir une production d'extrait de haute qualité et leur innocuité ». La chimie verte est théoriquement basée sur douze principes (Anastas et Eghbali, 2010 ; Sheldon, 2017). Chemat *et al.* (2012) ont réduit ces principes au nombre de six pour l'application à l'extraction des produits naturels. Ils sont les suivants, 1) l'innovation par la sélection de variétés de plantes et l'utilisation des ressources renouvelables issues de celles-ci. 2) L'utilisation de solvants alternatifs dont principalement l'eau et des agro solvants, 3) La réduction de la consommation en énergie par sa récupération ou par l'utilisation de technologies innovantes 4) Réduire la production de déchets par le développement de l'industrie bio- et agro raffinée de manière à valoriser les co-produits, 5) Réduire les opérations uniques et favoriser des procédés contrôlés, robustes et sécurisants, 6) L'objectif de produire des extraits non dénaturés et biodégradables qui ne doivent pas présenter de contaminations.

Pour cela, une dynamique de recherche s'oriente vers des alternatives aux procédés conventionnels se développant autour des technologies impliquant l'Extraction Assistée par Ultrasons ou par Enzymes, l'Extraction par Fluide Supercritique, l'application Détente Instantanée Contrôlée, les procédés par micro-ondes et par champ électrique pulsé (Michalak et Chojnacka, 2015 ; Chemat *et al.*, 2017). Ces procédés permettent de préserver ou d'augmenter le rendement d'extraction, de préserver l'environnement par la diminution de la consommation en eau, en solvants et en énergie fossile ; mais également la réduction de la production de déchets toxiques et d'effluents à recycler. Pour répondre à ces objectifs, la recherche se concentre sur trois solutions majeures identifiées par Chemat *et al.* (2012) : l'amélioration et l'optimisation des procédés existants par l'application de procédés innovants et la recherche de solvant alternatifs.

Les travaux de thèse réalisés au travers du projet "PROCESSALG: Valorisation de macroalgues par couplage des biotechnologies et de procédés innovants" (2014-2017 financé

par la Région Bretagne et le conseil général du Morbihan) et du projet ECOS Nord "Up grading of macroalgae by combining innovative biotechnologies et process for human health" et menés entre la France et le Mexique (2015-2018 Centro de INvestigación y de ESTudios AVanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN), Laboratorio de Ficología Aplicada (LFA), Departamento de Recursos del Mar, Unidad Mérida) étudient ces sujets communs de valorisation de la biomasse algale. Ces deux projets s'intègrent parfaitement dans l'étude des procédés innovants pouvant répondre à la problématique de la chimie verte pour le traitement des macroalgues.

Le projet PROCESSALG permet également à des partenaires privés (Armen Instruments et Newonat) et publics locaux de collaborer afin de répondre à une problématique locale d'étudier des voies de valorisation de la biomasse algale, plus particulièrement l'algue rouge *Solieria chordalis*. L'objectif est d'extraire, de caractériser les composés et d'évaluer leur bioactivité pour des applications dans les secteurs de la cosmétique, pharmaceutique ou de l'agroalimentaire. Pour cela, différents procédés ont été proposés dans la deuxième partie de l'étude à travers des procédés d'extraction tels que l'Extraction Assistée par Enzyme, l'extraction par CO₂ supercritique. Le projet vise également à purifier et caractériser les molécules extraites puis fractionner par l'application de la Chromatographie Partage Centrifuge (CPC), système innovant permettant la séparation de composés naturels.

Partenaires privés du projet :



L'entreprise Newonat située sur la commune d'Arzal (Morbihan, France) est spécialisée dans le domaine de l'extraction des plantes. Elle possède une expertise dans l'application des procédés d'extraction permettant de traiter tout type de matière première afin d'en extraire des composés d'intérêt. Newonat est notamment spécialisé dans l'extraction par CO₂ supercritique. L'activité de l'entreprise est d'une part orientée vers le conseil par le développement de méthodes d'extraction mais également de répondre à la demande du marché par la production de certains composés. L'entreprise s'oriente principalement vers le marché des cosmétiques, des pharmaceutiques et des nutraceutiques.



La société Armen Instrument récemment renommée Gilson Purification S.A.S située à Saint-Avé (Morbihan, France) est une entreprise spécialisée dans la conception, la fabrication et la commercialisation de systèmes innovants destinés à la chromatographie liquide préparative - notamment la Chromatographie de Partage Centrifuge- et la purification de composés naturels. Cette entreprise détient une expertise sur la purification des composés par le développement de méthodes à l'échelle laboratoire et industrielle, et par la réalisation de prestations au service du client (formations et conseils).

Partenaire public du projet :

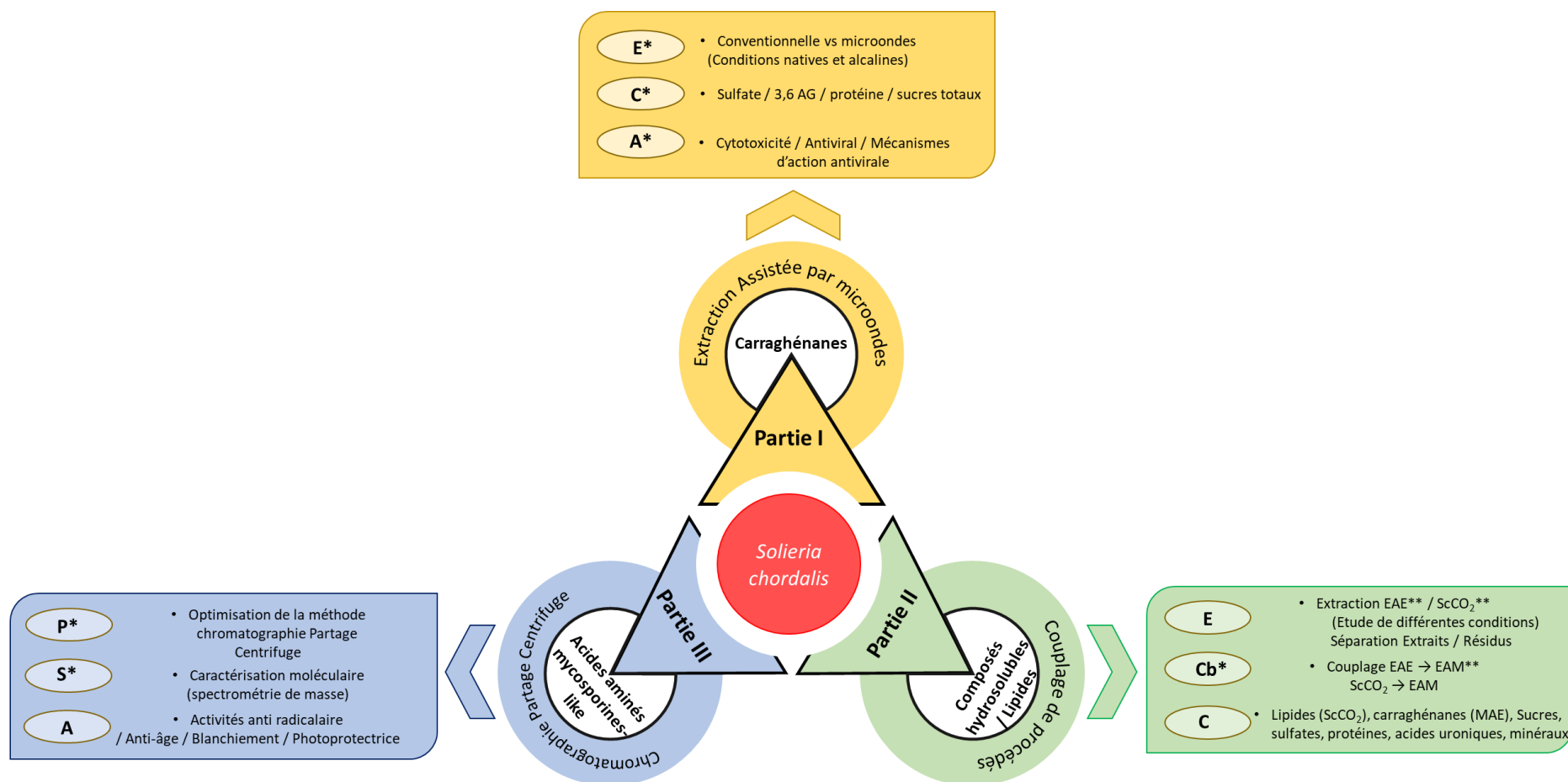


Le LBCM, créé en 1998 est basé sur trois sites (Quimper, Vannes et Lorient), est un laboratoire de l'Université Bretagne Sud. La thématique de recherche du LBCM est centrée sur les biotechnologies bleues, les biofilms et microbiomes marins. Mon projet de doctorat se positionne dans l'axe Biotechnologies bleues au sein de l'équipe de Vannes qui s'attache au développement de projets autour de la valorisation des ressources biologiques marines et celui de technologies durables en évaluant les voies de valorisations disponibles.

Le Projet ECOS Nord

Le projet Ecos Nord est un projet de coopération scientifique international entre la France et le Mexique. Ce projet met en relation le laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines de l'Université Bretagne Sud et l'équipe de recherche du département de Recursos del Mar intégrée au centre de recherche CINVESTAV (Centro de INvestigacion y de ESTudios AVanzados) dépendant de l'IPN (Instituto Politécnico Nacional). Les thématiques de recherche portées par ce projet s'articulent autour de problématiques communes rencontrées en Bretagne, France et dans le Yucatan au Mexique. L'objectif de ce projet est de comparer différents processus écologiques et économiques pour l'extraction et la purification de

molécules actives issues de diverses espèces de *Solieriaceae* et de *Sargassaceae* françaises et mexicaines des familles. Nous proposons l'utilisation de l'Extraction Assistée par Enzymes (EAE), du CO₂ supercritique et de l'Extraction Assistée par Micro-ondes (EAM) comme outils pour améliorer l'efficacité de l'extraction de composés bioactifs à partir d'algue en utilisant une approche de bioraffinerie et de chimie verte. Il s'agit de caractériser les extraits et de mettre au point différents tests pour évaluer la cytotoxicité, les activités antioxydante, anti-radicalaire, anti-UV, antivirale des différents principes actifs et extraits obtenus. La Chromatographie de Partage Centrifuge est appliquée dans le but d'isoler les molécules d'intérêt.



*E = Procédés d'extraction ; Cb = Couplage de procédés ; P = Purification / Fractionnement ; A = Activités des extraits ; S = Caractérisation moléculaire ; C = Compositions biochimiques.

**EAE = Extraction Assistée par Enzymes ; EAM = Extraction Assistée par Microondes ; ScCO₂ = Extraction par CO₂ supercritique ; 3,6 AG: 3,6 anhydrogalactose

Figure 1: Schéma présentant le plan d'étude du projet.

Le plan de l'étude

L'objectif de cette étude est de démontrer l'efficacité de ces procédés pour la production de d'extraits d'algues riches en molécules actives. Les extraits produits ont été analysés de manière à déterminer leurs compositions biochimiques mais également d'identifier certains composés non décrits chez *S. chordalis* présentant un intérêt dans les domaines de l'alimentaire et des cosmétiques. Pour répondre aux problématiques, le travail produit est scindé en trois parties comme schématisé dans la **Figure 1**. Ce travail met en lien les deux premières parties qui ont pour objectifs d'étudier des procédés d'extraction, d'analyser leur capacité à produire un type d'extraits et d'évaluer la composition et l'activité de ces extraits. La deuxième partie vient compléter la première en étudiant les possibilités d'extractions successives afin de pouvoir maximiser la valorisation du contenu algal. Une troisième partie a été développée de manière indépendante des deux autres. Elle concerne la purification de composés par l'application du système de Chromatographie de Partage Centrifuge permettant l'isolement de composés anti-UV extrait de *S. chordalis*.

Le premier chapitre (Partie III-1) présente l'étude de l'activité antiherpétique (VHS-1) des carraghénanes extraits de l'algue *Solieria chordalis* (Rhodophycée, Gigartinales) par l'application d'un procédé d'Extraction Assistée par Microondes (EAM). Ce procédé innovant est étudié en faisant varier les conditions d'extraction (temps, température, alcalinité du milieu). En parallèle, l'extraction est réalisée suivant la méthode d'extraction conventionnellement utilisée au niveau industriel. Les extraits de carraghénanes obtenus ont ensuite été analysés afin de déterminer leur composition biochimique. Une première analyse structurale de ces extraits a été menée afin de déterminer le type de carraghénane majoritairement extrait. L'évaluation de l'activité antivirale par le modèle virus de l'Herpès *simplex* de type I / cellules Véro a été réalisée. Cette étude a été complétée par une approche du temps d'action d'un extrait efficace.

Le deuxième chapitre (Partie III-2) est une étude complémentaire à celle présentée dans le premier chapitre. Elle porte sur l'étude de l'extraction de composés par deux méthodes, l'Extraction Assistée par Enzyme et l'extraction CO₂ supercritique. La première méthode vise à extraire les composés hydrosolubles contenus dans l'algue. L'application de l'extraction par CO₂ supercritique cible davantage les composés apolaires et plus spécifiquement la fraction

lipidique de l'algue. Ces deux procédés sont appliqués de manière indépendante dans différentes conditions. La composition chimique des extraits obtenus a été ensuite étudiée. Les résidus d'extraction ont ensuite été traités par le procédé aux microondes EAM présenté dans le chapitre I, afin d'étudier les couplages potentiels entre les différents procédés. La composition biochimique et le rendement d'extraction des extraits de carraghénanes obtenus à partir des résidus ont été analysés de manière à établir des hypothèses de voies de traitement de l'algue afin de maximiser sa valorisation.

Enfin, le troisième et dernier chapitre de ce mémoire (partie III-3) porte sur la recherche de molécules anti-UV dont les Acides Aminés Mycosporines-like (MAAs). Cette étude présente l'optimisation de la production d'extrait enrichis en MAAs par l'application d'une extraction par solvant organique avant d'envisager leur fractionnement par Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) et la production de fractions concentrées. Ces différentes fractions ont ensuite été analysées de manière à déterminer la composition moléculaire en composés absorbant dans la région UV-B (280 - 320 nm) par l'application du couplage LC-MS (Chromatographie avec détection par spectrométrie de masse). Ces composés enrichis ont ensuite été analysés afin d'évaluer leur potentiel d'activité photoprotectrice, antioxydante, anti-âge et blanchissante.

Chapitre I :

Étude bibliographique

La production de macroalgues au niveau mondial est en pleine croissance depuis le début du XXI^{ème} siècle. Le développement de la production enregistrée ces dernières années oscille de 5 à 15%/an avec notamment une hausse de 12% entre 2010 et 2012 représentant 16 Mt soit un marché de plus de 5 milliards d'euros (Agence Nationale de la Recherche, 2012 ; Bretagne Développement Innovation, 2013). Cependant, cette production est très inégale géographiquement car 93% de la production mondiale est issue de l'aquaculture présente en Chine et dans les autres pays d'Asie. L'Indonésie s'est positionnée comme acteur majeur de la production de macroalgues représentant 36,9% de la production mondiale en 2014. Ce pays présente un taux de production croissante (> 10%/an) depuis les dix dernières années. En comparaison, l'Europe et l'Amérique du Sud ne se partagent que 5% de la production mondiale.

En 2014, l'ensemble du secteur, des cultivateurs aux ramasseurs d'algue, ne s'intéressait principalement qu'à neuf espèces *Eucheuma spp.* et *Kappaphycus alvarezii* (40 % de la production mondiale), *Laminaria japonica* (28%), *Undaria pinnatifida* (8%), la *Gracilaire commune* (14%), *Porphyra sp.* (7%), *Gracilaria verrucosa* (3%), *Eucheuma denticulatum* (2%) et *Porphyra tenera* (2%) [FAO 2016].

Sur le marché des macroalgues, la France se place comme le 10^{ème} producteur mondial (0,6% de la production) et au deuxième rang en Europe secondant la Norvège. Contrairement aux pays d'Asie qui ont une production issue principalement de l'algoculture, la France récolte 95% des algues dans le milieu naturel. Cette récolte s'organise de deux manières, la majorité des algues est collectée par le biais de navires goémoniers sur les champs d'algues submergés (90%) et la seconde partie est ramassée sur les plages ou estrans rocheux. Les espèces d'algues exploitées en France sont principalement les Phaeophyceae du genre *Laminaria* (*Laminaria digitata* et *Laminaria hyperborea* représentant 75% du total des récoltes) et le genre *Fucus* (*Fucus spp.*) et *Ascophyllum nodosum* représentant 15% du total. Les autres espèces plus minoritaires comprennent les Rhodophyceae (*Mastocarpus stellatus* et *Palmaria palmata*) et les Chlorophyceae (*Ulva sp.*).

La répartition des récoltes d'algue en France est très hétérogène ; 90% des algues actuellement exploitées proviennent de la Bretagne. La filière algue en Bretagne existe depuis des générations, traditionnellement les algues brunes étaient récoltées par les goémoniers puis ensuite exploitées en tant que fertilisants sur les terres arables (Bourgougnon et Stiger-

Pouvreau 2011). Aujourd'hui, cette filière a évolué et représente une collecte de plus de 60 000 T/an. Il

s'agit principalement d'algues brunes (99%), d'algues rouges (0,9%) et d'algues vertes (0,1%). Cette région possède notamment neuf sites d'exploitation sur les dix référencés. Ceux-ci sont localisés sur les champs d'algues les plus développés d'Europe présents en Finistère et en Côtes-d'Armor. Cependant, toutes ces données tiennent compte des quantités d'algues récoltées et exploitées à des fins commerciales et industrielles. La Région Bretagne se positionne comme un acteur majeur du développement de l'économie de la filière algues en soutenant de nombreux projets comme Breihz' Alg, ALGOLIFE (24,7 M€), VB2 (3,4 M€), ULVANS (22,7 M€). La **Figure 2** présente les nombreux acteurs intervenant dans la filières algues en Bretagne.

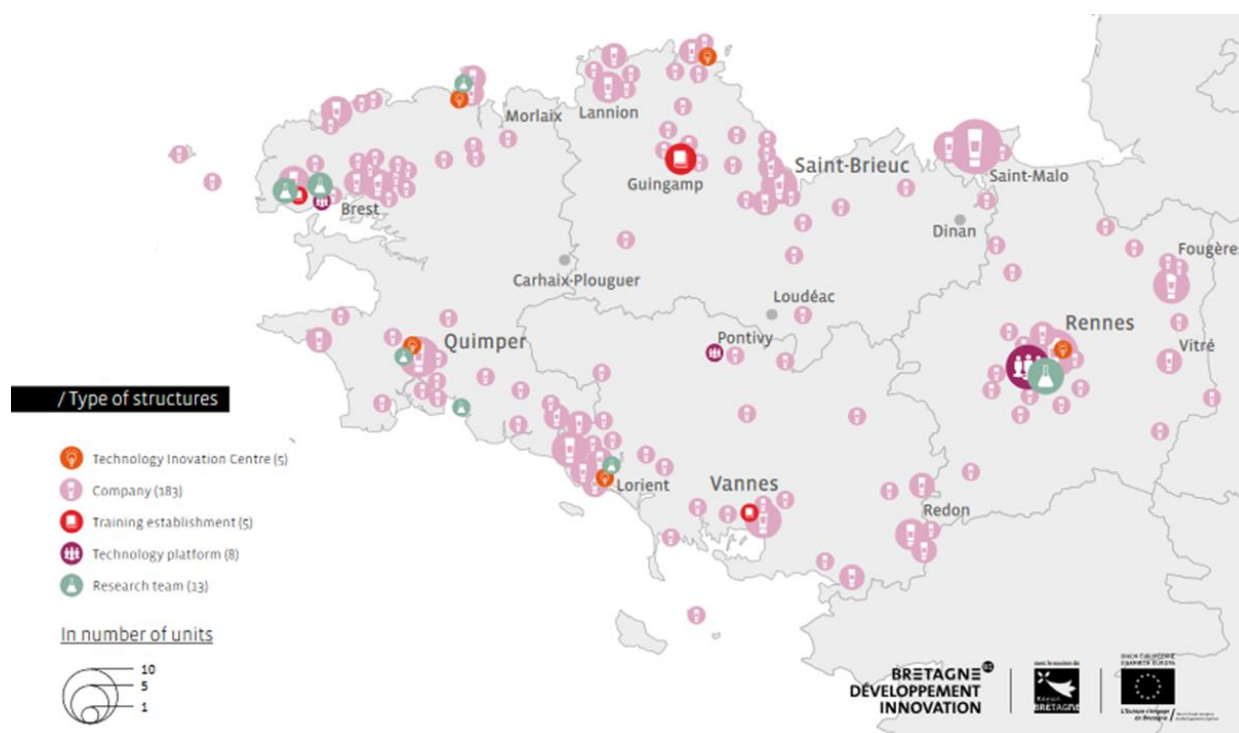


Figure 2: Carte représentant les acteurs de la filière cosmétique en Bretagne (site Bretagne Développement Innovation, Émilie FAUCHEUX).

1. Les macroalgues

Selon De Reviere (2003a), les algues peuvent être définies comme des organismes généralement photosynthétiques, inféodés à un substrat, se développant en zone humide. Le terme algue regroupe cependant les macroalgues (benthiques, marines et d'eau douce) et les microalgues (planctoniques, benthiques, marines ou d'eau douce). La classification des algues permet de différencier onze groupes différents dont dix appartiennent au règne des eucaryotes et un au règne des procaryotes. Les algues représentent une grande diversité au niveau de la composition pigmentaire et de la nature des polysaccharides de réserve, mais également au niveau structural par l'emplacement de thylacoïdes, la forme des mitochondries, le nombre de membranes plastidiales et la nature de l'appareil flagellaire (De Reviere, 2003a). Toutes ces données sont présentées dans le **Tableau I**.

2. Les Rhodophycées et Solieriacées

Les Rhodophycées ou algues rouges sont des organismes eucaryotes du royaume des végétaux et font partie du phylum des Rhodophycées. Elles représentent environ 4000 espèces réparties sous 70 genres différents. Ces espèces se différencient par des caractères distincts au niveau de la paroi cellulaire et de la composition en pigments. La paroi est composée de cellulose, manannes et/ou de xylanes structurant la partie fibrillaire et de galactanes sulfatés pour la mucilagineuse (de Reviere, 2003b). La composition pigmentaire est également caractéristique car il a été répertorié différents types de pigments tels que les phycobiliprotéines (la phycoérythrine, la phycocyanine et la allophycocyanine), les caroténoïdes (le ϵ -carotène et le β -carotène) et des xanthophylles (la lutéine et la zéaxanthine).

Ce phylum est divisé en huit classes selon les données d'Algaebase, dont deux qui se démarquent par la quantité d'espèces qu'elles renferment. La classe des Bangiacea regroupent 164 espèces et celle des Florideophyceae 6 281. Cette dernière englobe 29 ordres dont celui des Gigartinales qui comprend 820 espèces dont *Solieria chordalis*. Il s'agit du deuxième ordre le plus important après celui des Cérariales (2 493 espèces). Ce phylum se distingue par certains caractères cytologiques, morphologiques et biochimiques. Malgré un ensemble de caractères communs entre les classes de Rhodophycées, ceux-ci présentent une très grande diversité les divisant et laissant penser à une évolution indépendante au niveau de leur structure, de l'appareil végétatif et de leurs mécanismes de reproduction. Selon la

littérature, la reproduction sexuée est décrite chez les algues rouges comme trigénétique haplodiplontique (De Reviere, 2003 ; Burlet 2017). Elle est régie par trois générations cellulaires qualifiées de gamétophytes, carposporophytes et tétrasporophytes.

Les Bangiophycées comprennent trois ordres. Les Porphyridiales présentent une morphologie unicellulaire ou pluricellulaire due au regroupement de cellules sous forme de colonies formant

*Tableau 1: Caractères différenciant les algues en différentes classes. Avec α 1-4: amidons ; β 1-3 : laminarane , **PE** : Phycoérythrine, **PC** : Phycocyanine, **APC** : Allophycocyanine, **Chl.** : Chlorophylle (de Reviere, tome 1).*

Embranchement		Pigments	Glucanes réserve	de	Nbr de membranes plastidiales	Thylacoïdes
Cyanophyta	« Prochlorophytes »	Chl. a et b	α -1-4 Cytoplasmique		Sans objet	2 ou plus
	Sauf « Prochlorophytes »	PE, PC, APC, Chl. a	α -1-4 Cytoplasmique		Sans objet	Non regroupés, Epars, Phycobilisomes
Glaucophyta		PC, APC, Chl. a	α -1-4 Cytoplasmique	2	et peptidoglycane	Non regroupés, concentriques, Phycobilisomes
Rhodophyta		PE, PC, APC, Chl. a (et d)	α -1-4 Cytoplasmique	2		Non regroupés, Phycobilisomes
Chlorophyta		Chl. a et b	α -1-4 Intrastidiale	2		2 et 6
Streptophyta	Streptophycophytes	Chl. a et b	α -1-4 Intrastidiale	2		2 et 6
	Embryophyta	Chl. a et b	α -1-4 Intrastidiale	2		Empilés
Chrytophyta		PE, Chl. a et c	α -1-4 Périplastidiale	4		2, Phycobiline dans la lumière des thylakoïdes
Euglénophyta		Chl. a et b	β Cytoplasmique	1-3	3	3

Haptophyta	Prymnesiophyceae	Chl. a et c	β Cytoplasmique	1-3 4	3, sans lamelle périphérique
	Pavlophyceae	Chl. a et c	β 1-3 Vacuolaire	4	3, sans lamelle périphérique
Ochromphyta (Heterokontophyta)		Chl. a et c	β 1-3 Vacuolaire	4	3, avec lamelle périphérique
Dinophyta		Chl. a et c	α -1-4 Cytoplasmique	3	3, espacés, sans lamelle périphérique

une structure filamenteuse. Cet ordre ne possède pas de reproduction sexuée. Les Bangiales présentent une structure semblable mais se différencient par le caractère de reproduction sexuée. Enfin, les Compsopogonales présentent une croissance en position terminale et la présence de nombreux plastes sans pyrénoides.

L'ordre des Floridées comprend la majeure partie des algues rouges et avec huit sous-ordres dont les Gigartinales dont découle le genre *Solieria*. Les caractères différenciants sont présentés dans le **Tableau II**. Les Floridées se caractérisent par une morphologie possédant des cladomes et une croissance au niveau apicale. Cet ordre se distingue également par un cycle de reproduction trigénétique avec formation de carposporophyte et la présence de carpogone. L'ensemble des familles de *Rhodophyceae* possèdent des cystocarpes contenant des cellules à proximité des carpogonium, cette caractéristique est différenciée chez deux familles, les *Furcellariaceae* et les *Solieriaceae*, qui présentent des cellules auxiliaires formant un système tubulaire appelé également "filaments connectant" permettant le transport de la cellule diploïde.

3. L'espèce *Solieria chordalis*

Le genre *Solieria* a été identifié en 1842 par Jakob Georg Agardh, célèbre botaniste suédois, en découvrant l'espèce *Solieria chordalis* sur les côtes Sud de l'Espagne. L'espèce *Solieria chordalis* fut ensuite identifiée en 1976 sur les côtes britanniques lors de l'inventaire des botanistes Farnham et Jephson (Farnham et Jephson 1976). Cependant, ce nouveau nom d'espèce fut définitivement accepté qu'à partir de 1993 (Fredericq *et al.*, 1999). Les études menées durant une trentaine d'années sur le genre *Solieria* ont permis d'identifier six

nouvelles espèces (*S. anastomosa*, *S. dichotoma*, *S. filiformis*, *S. jaasundii*, *S. tenuis* et *S. pacifica*) qui s'ajoutent au référencement de 1982 qui comptait déjà quatre espèces : *S. robusta*, *S. tenera*, *S. chordalis* et *S. dura* présentées dans le **Tableau III** (Algaebase 2015).

L'environnement favorisant le développement des *Solieriaceae* a été décrit comme étant un milieu situé dans les zones tempérées ou subtropicales chaudes. Ces zones sont caractérisées par des périodes de chaleurs élevées interrompues par des périodes de températures qualifiées de douces. Ces zones météorologiques sont aussi caractérisées par des périodes de fortes précipitations entraînant une grande variation de salinité (26 à 35 g/L) et d'apports en nutriments dans le milieu par la lixiviation (Floc'h *et al.*, 1987).

Tableau II: Classification des sous-ordres composants les Floridées (Rhodophycées) et leurs caractères différenciés (Mayanglambam et Sahoo, 2015)

Sous-ordre	Structure différenciée
<i>Acrochaetiales</i>	- Absence de cladome - Un seul plaste pyrénôïde - Absence de rameaux et de cellules auxiliaires
<i>Némationales</i>	- Gamétophyte présentant un cladome uni ou multiaxiaux - Tétrasporytes hétérotryches - Un ou plusieurs plastes pyrénôïdes - Présence de carpogone différencié
<i>Gélidiales</i>	- Possède une fronde cladomienne - Présence de cellules nourricières - Espèces agarophytes
<i>Gigartinales</i>	- Cellules auxiliaires intercalaires des pleuridies ou filaments corticaux
<i>Rhodyméniales</i>	- Présence de cellules auxiliaires terminales
<i>Cryptonémiales</i>	- Présence de gonophores carpogoniaux
<i>Bonnemaisoniales</i>	- Possède des cladomes uniaxiaux - Cycle de reproduction hétéromorphe
<i>Céramiales</i>	- Possède cladomes uniaxiaux sous forme complexe, de lame ou filamenteux - Présence de floridorubine

Tableau III: Présentation des différentes espèces de *Solieria* répertoriées avec le nom du botaniste à l'origine de leur découverte et l'année (www.algaebase.org)

Espèce	Botaniste	Année de découverte	Références
<i>Solieria anastomosa</i>	P.W.Gabrielson & Kraft	1985	Gabrielson, P.W. & Kraft, G.T. (1985)
<i>Solieria chordalis</i>	(C.Agardh) J.Agardh	1842	Agardh, J.G. (1842)
<i>Solieria dichotoma</i>	Yoshida	1980	Yoshida, T. (1980)
<i>Solieria dura</i>	(Zanardini) F.Schmitz	1895	Schmitz, F. (1895)
<i>Solieria filiformis</i>	(Kützinger) P.W.Gabrielson	1985	Gabrielson, P.W. (1985)
<i>Solieria jaasundii</i>	Mshigeni & Papenfuss	1981	Mshigeni, K.E. & Papenfuss, G.F. (1981)
<i>Solieria pacifica</i>	(Yamada) Yoshida	1989	Yoshida, T. (1989)
<i>Solieria robusta</i>	(Greville) Kylin	1932	Kylin, H. (1932)
<i>Solieria tenera</i>	(J.Agardh) M.J.Wynne & W.R.Taylor	1973	Wynne, M.J. & Taylor, W.R. (1973)
<i>Solieria tenuis</i>	J.Zhang & E.Xia	1984	Xia, E. & Zhang, J. (1984)

3.1. Morphologie

3.1.1. Morphologie macroscopique

Solieria chordalis (C. Agardh) J. Agardh est connue pour présenter une pigmentation rouge vive pouvant évoluer jusqu'au pourpre en fonction de son stade de croissance. Sa morphologie est reconnaissable par la présence d'une succession d'axes principaux de quelques mm (1 à 3) de diamètre présentant une extrémité pointue et pouvant atteindre les 15 à 20 cm de longueur à leur stade le plus développé (**Photo 3**). La taille et la morphologie de cette algue est cependant variable au cours de sa croissance. La partie basale du thalle, également nommée haptère est composée d'un enchevêtrement d'axes. Cette partie basale se forme autour du crampon du thalle, permettant à l'algue de se fixer sur son substrat. La croissance de l'algue la rendant plus fragile vis-à-vis des phénomènes naturels, la formation de l'haptère joue le rôle de protection et de solidification du point de fixation. De cette partie basale, se développent différents axes principaux qui croissent au cours du cycle de vie. La morphologie de l'algue est aussi caractérisée par la présence de ramification le long des axes principaux. L'organisation de ces ramules est hétérogène avec un arrangement des jonctions en quinconce. Au cours du cycle de vie, la taille des ramules croît et peut atteindre plusieurs centimètres. La morphologie macroscopique étant évolutive, celle-ci se confond à certains stades de son développement avec d'autres espèces de l'ordre des Gigartinales.



Photo 3: Photo de la macroalgue rouge *Solieria chordalis* (Rhodophycée, Gigartinales) récoltée sur la plage de Saint-Gildas de Rhuys, Morbihan, France le 23 septembre 2014 (R. Boulho)

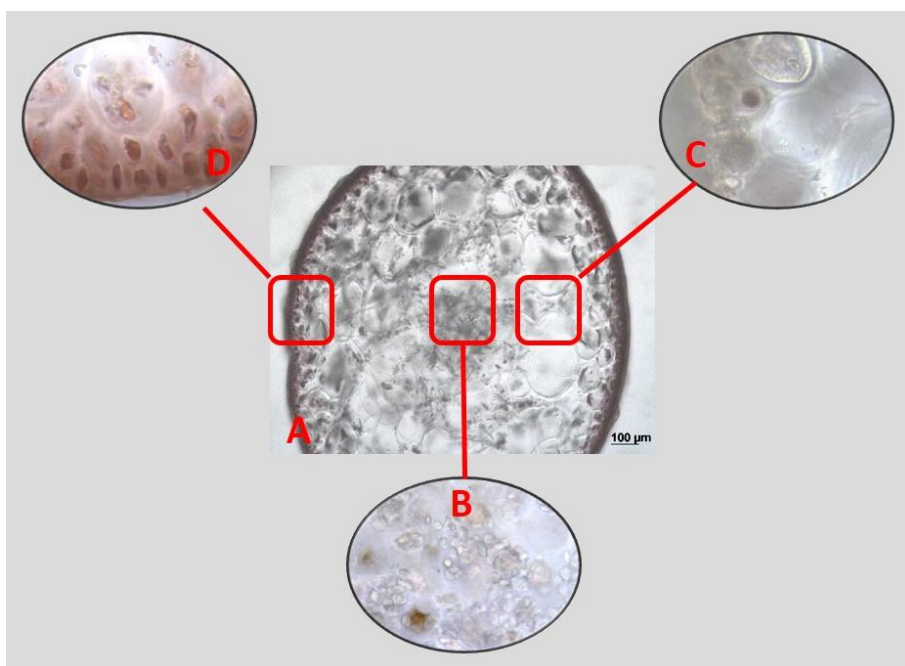


Figure 3 Observation microscopique de coupe transversale de thalle de *Solieria chordalis* (A), grossissement plus important de la Médulla (B), des cellules de Parenchyme (C) et des cellules corticales (D) par R. Boulho, E. Vázquez-Delfín (2015).

3.1.2. Morphologie microscopique

La description de la morphologie microscopique de *S. chordalis* est importante pour sa différenciation. L'observation d'une coupe transversale de l'axe du thalle permet d'observer une organisation structurale différenciée. Un thalle par sa coupe transversale va présenter une structure cylindrique remplie. L'appareil végétatif de *Solieria* s'organise autour de la médulla, partie centrale, présentant une structure filamenteuse imbriquée. Autour de la médulla, de nombreuses cellules de structures grossières et incolores semblent graviter. Celles-ci sont reconnues comme étant les cellules du parenchyme. Cette organisation se termine à l'extérieur par la présence d'une couche fine de cellules corticales reconnaissables du fait de la présence de plastides leur donnant cette coloration pourpre **Figure 3**.

3.2. Reproduction des Solériacées :

Selon de Reviers (2003), le cycle de vie de l'algue fait intervenir l'ensemble des étapes intervenant dans le développement d'une espèce. Parmi celles-ci, l'étape de reproduction est importante du fait qu'elle permet de pérenniser l'espèce. Chez les Rhodophycées, cette étape a été très décrite. Il a été observé deux mécanismes de reproduction variant d'une espèce à une autre : la reproduction sexuée et la reproduction asexuée. Ces deux mécanismes sont présents conjointement chez les Solériacées.

La présence de ces deux mécanismes chez *Solieria chordalis* a été confirmé au travers des études menées par Gabrielson et Hommerset (1982) et Floc'h *et al.* (1987). Les premiers auteurs ont notamment observé la présence de système reproducteur au niveau de la paroi externe de l'algue, à partir des cellules corticales, témoin du développement de mécanismes sexués. Floc'h *et al.* (1987) ont observé par culture *in-vivo*, une multiplication de l'espèce dans le milieu au travers du développement de ramules et de la division des thalles. Ces observations signifient la présence d'un second mécanisme qualifié d'asexué.

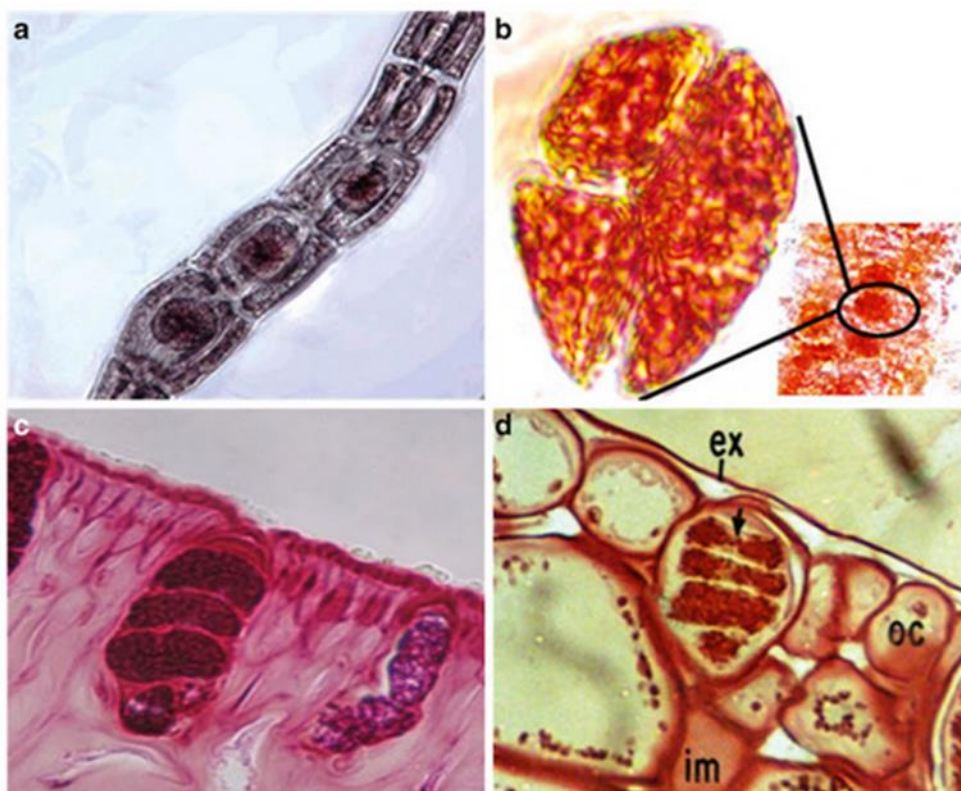


Figure 4: Observation microscopique de différentes formes de tétraspores présent chez les Rhodophycées. (a) Tétraspores tétrahédrales observés chez *Polysiphonia* sp. (b) Tétraspores cruciés observés chez *Gracilaria* sp. ; (c) et (d) Tétraspores zonés observés chez *Kappaphycus alvarezii* et *Coelarthrum opunita* (Mayanglambam et Sahoo, 2015).

3.2.1. Mécanisme de la reproduction sexuée

En période de reproduction, les thalles de *Solieria chordalis* « mâles » libèrent des gamètes haploïdes (n chromosomes) appelés spermaties. Les spécimens femelles présentent des gamètes également haploïdes, nommés oosphères, contenus au sein du carpogone présentant une structure allongée formant le trichogyne. Lors de la fécondation et de la rencontre des deux gamètes haploïdes, il y a formation d'un carposporophyte diploïde ($2n$ chromosomes). Le carposporophyte formé va par la suite libérer des carpospores diploïdes dans le milieu environnant. Ceux-ci en se déposant sur le substrat vont germer et former un individu diploïde qualifié de tétrasporophyte. Les tétrasporophytes possèdent des organes reproducteurs divisés, les tétrasporocystes, ceux-ci par méiose vont expulsés des tétraspores (haploïdes), **Figure 4**. De la même manière que les carpospores, les tétraspores libérés vont germer et entraîner le développement de nouveaux individus haploïdes mâles ou femelles (de Reviers, 2003). Les gamètes mâles n'étant pas flagellés, leur transport vers les gamètes femelles est limité. Leur déplacement est dépendant des courants marins principalement. De ce fait, certaines espèces ont développé d'autres mécanismes de reproduction afin de compenser la reproduction sexuée.

3.2.2. Mécanisme de la reproduction asexuée

Au cours du développement, les ramules formés par les tétrasporophytes se séparent du thalle adulte. Ceux-ci sont transportés dans le milieu et se retrouvent parfois déposer sur leur substrat leur permettant de se développer et former un thalle juvénile. Cette capacité de multiplication cellulaire est très étudiée en algoculture car elle permet de développer une matière première à partir de fragments sur des supports permettant leur croissance.

Il a été également observé chez *S. chordalis* la formation de protubérances cellulaires au niveau des filaments. Celles-ci se détachent du thalle adulte et se développent formant un thalle juvénile. Contrairement à la reproduction sexuée qui permet une reproduction très localisée, la multiplication végétative permet à l'espèce de pouvoir étendre son développement sur des surfaces plus importantes lui conférant un avantage pour son évolution.

4. Métabolisme des algues

Le fonctionnement des végétaux est régi par le métabolisme primaire. Le bon fonctionnement de ce métabolisme est dépendant d'un certain nombre de molécules dites « primaires » jouant un rôle au niveau du développement cellulaire, de la structure, du transfert d'énergie et de la reproduction (Masheck et Baker, 2008). En parallèle, les végétaux produisent également des molécules dites « secondaires » associées à de nombreuses interactions entre les organismes qui les élaborent, les autres organismes dans l'environnement et les paramètres environnementaux. Ils sont les outils principaux de la coévolution des plantes avec les êtres vivants et on les retrouve à tous les niveaux du vivant. Deux axes de coévolution sont privilégiés : celui de la coopération se traduisant par un partenariat entre plantes et animaux ; le second axe d'opposition considéré comme arme chimique vis-à-vis de prédateurs ou de parasites (Guignard, 2000). Gerwick *et al.* (1989) définissent les « métabolites secondaires » comme des composés qui n'interviennent pas dans le développement ou la maintenance de l'organisme. Ces composés ont un effet allélopathique défini comme ayant « tout effet direct ou indirect, positif ou négatif, d'une plante sur une autre par le biais de composés libérés dans l'environnement » (Rice, 1984). Cependant, certaines molécules tels que les phytostérols appartenant au groupe des métabolites secondaires peuvent également avoir un rôle dans le développement cellulaire.

L'Encyclopédie des gènes et génomes de Kyoto est une importante ressource bio-informatique. Celle-ci a servi de base de données pour réaliser une représentation des différentes voies métaboliques présentant les interactions inter-organismes, les relations et les réactions intermoléculaires ainsi que les structures des métabolites primaires et secondaires. Les mécanismes de biosynthèse des métabolites secondaires sont souvent régis par l'addition de groupements fonctionnels (groupement alcool) ou de modifications structurales tel que l'halogénéation, l'oxydo-réduction et la modification stéréochimique.

4.1. *Les métabolites primaires*

Les macroalgues présentent une composition minérale diversifiée avec la présence de 56 minéraux ou traces d'éléments différents qui jouent un rôle dans le développement physiologique de l'organisme (Philpott et Bradford, 2006). Elles sont notamment riches en

fer, calcium, iode, vitamines, protéines (environ 48%) et composés naturels antioxydants (Ismail et Hong, 2002, Mendis et Kim, 2011). Les algues sont également connues pour être majoritairement composées de polysaccharides (50 à 60%) impliqués dans la structure cellulaire de l'organisme. Ces polysaccharides du fait de leur non digestibilité ont des propriétés intéressantes au niveau nutritionnel comparable aux fibres présentes chez les végétaux (Lahaye 2001, Burtin, 2003, Mendis et Kim, 2011). Les macroalgues présentent également un contenu en acides gras polyinsaturés intéressants, notamment oméga 3 (ω -3) et oméga 6 (ω -6) malgré un niveau en lipides assez faible (1 à 5%) (Philpott et Bradford, 2006).

4.1.1. Minéraux

Les algues puisent dans la mer une grande richesse d'éléments minéraux. Les trois grands embranchements d'algues (Phéophycées, Chlorophycées et Rhodophycées) sont à peu près équivalents en quantité de matières minérales totales. On peut noter, cependant, un léger avantage chez les algues brunes et les algues rouges (jusqu'à 36% de la masse sèche) devant les algues vertes (jusqu'à 30%). La fraction minérale peut représenter jusqu'à 36% de la masse sèche. La diversité des éléments présents est grande. Les algues présentent une composition plus riche en calcium, fer et cuivre par rapport aux plantes terrestres (MacArtain et al. 2007). Aux côtés des macroéléments Sodium, Calcium, Magnésium, Potassium, Chlore, Soufre, Phosphore, on trouve également une multitude d'oligo-éléments essentiels tels que l'Iode, le Fer, le Zinc, le Cuivre, le Sélénium, le Molybdène, le Fluor, le Manganèse, le Bore, le Nickel, le Cobalt, les six premiers de cette liste étant des oligo-éléments essentiels à risque de carence. 1,5 milliards de personnes dans le monde sont touchées par une carence en iode, l'intérêt de l'algue comme apport occasionnel dans l'alimentation ou comme ingrédient de supplémentation est évident (Rey-Crespo, López-Alonso et Mireta, 2014 ; Kalasariya *et al.*, 2016). Les Laminariales et les Fucales peuvent respectivement accumuler sous forme majoritaire d'iode minéral de 1500 à 8000 ppm et de 500 à 1000 ppm sur sec. Sauf exception, les teneurs dans les algues rouges et vertes sont plus modestes (100 à 300 ppm sur sec).

La biodisponibilité diffère en fonction de l'espèce, ainsi que du traitement de l'aliment. L'iode, après ingestion de *Laminaria japonica* (Phéophycées, Laminariales) est absorbé à 98% par le rat et assimilé à 100% par l'homme, ce qui prouve une biodisponibilité quasi totale. La supplémentation en iode par les algues nécessite un contrôle rigoureux de la récolte

et une gestion maîtrisée des lots d'algue en fonction de la saison pour atténuer les variations saisonnières. La carence en iode est un problème majeur par son extension dans le monde et la gravité de ses conséquences. Cette carence constitue la principale cause de retard mental dans le monde. On estime que la prévalence du goitre dans la population mondiale est estimée à 12,56 % (Valeix *et al.*, 2002).

En France, la consommation moyenne de calcium est de 900 mg/jour mais ce chiffre masque une grande variabilité individuelle qui expose des groupes importants (femmes enceintes, adolescents, personnes âgées) à un risque de carence. Les algues constituent une des sources végétales de calcium les plus importantes avec des teneurs pouvant atteindre 7% de la masse sèche chez les macroalgues. Encore plus intéressant, l'algue rouge *Lithothamnium calcareum* ou *maërl* (Rhodophycée, Corallinales) aux parois imprégnées de carbonate de calcium contient de 25 à 34% de calcium. Son utilisation principale était l'amendement calcaire des sols. Elle apparaît également sur le marché des compléments alimentaires minéraux et des cosmétiques. La biodisponibilité du Calcium du *Maërl*, liée entre autres à sa solubilisation dans les conditions gastriques (pH = 1,5) est démontrée. *Lithothamnium calcareum* a reçu un avis favorable en 1996 à son emploi dans des compléments alimentaires par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (non publié) et à son incorporation dans la fabrication de pains spéciaux (BID n° 4/99-079) mais depuis interdite à la récolte. *Palmaria palmata* (Rhodophycées) et *Undaria pinnatifida* (Phéophycées) contiennent 20 fois plus de calcium que le lait associé à de bonnes quantités de potassium et de magnésium qui aident son assimilation et qui plus est dans un terrain alcalin favorable. *Ulva lactuca* (Chlorophycées) contient 2 fois plus de fer que le germe de blé et 12 fois plus que les lentilles. Les algues contiennent 5 à 10 fois plus de magnésium que le germe de blé et cinq grammes secs couvrent 100% des besoins journaliers.

4.1.2. Protéines et acides aminés

La composition en protéines et le profil d'acides aminés contenus dans les algues sont très diversifiés en fonction du phylum. Les algues rouges présentent le taux de protéines le plus important par rapport aux algues vertes et brunes. Parmi les algues rouges dont la composition a été très étudiée, le genre *Porphyra* (Rhodophycées) présente le taux le plus élevé connu

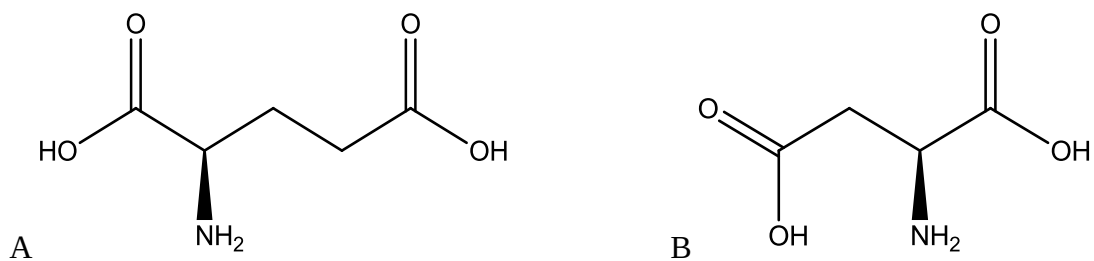


Figure 5: Structure d'acide aminés, acide glutamique (A) et acide aspartique (B).

(> 47% du poids sec total) légèrement supérieur à l'espèce *Palmaria palmata* (> 35% du poids sec total). En comparaison, le contenu protéique des espèces telles que *Ulva* (20 à 26% poids sec) et *Undaria pinnatifida* (11 à 24% poids sec) est plus faible. L'apport protéique des espèces d'algues rouges *Porphyra* et *Palmaria* sont comparables à celui du soja (Fleurence, 1999).

Les études ont montré la présence de deux acides aminés majoritaires, les acides aspartique et glutamique. D'autres acides aminés essentiels suscitent un intérêt dans le développement d'applications parmi lesquels sont également présents, mais à des taux inférieurs, la valine, la leucine et la lysine (Baweja *et al.*, 2016). De nombreuses études démontrent un potentiel de développement dans des domaines divers allant de l'agroalimentaire (humain et animal) aux domaines des cosmétiques et nutraceutiques (Neveux *et al.*, 2014). Des études se sont orientées récemment vers l'identification de groupes de peptides après l'hydrolyse de protéines de diverses macroalgues (*Solieria chordalis*, *Palmaria palmata*, *Ulva lactuca* et *Saccharina longicruris*). Ces peptides ont montré des propriétés antioxydantes et antihypertensives en fonction de leur poids moléculaire. C'est le cas des peptides isolés chez *Solieria chordalis* par Bondu *et al.* (2014). Ces peptides sont de faibles poids moléculaires (< 1000 Da) alors que des peptides de taille plus importante (1400 à 3200 Da) ne possèdent plus d'effets anti-hypertenseurs. L'analyse structurale de ces peptides a permis de déterminer leur origine. Selon cette même étude, la majorité des peptides sont issus de l'hydrolyse de la RuBiSCo* (43 à 61%), une protéine intervenant dans la fixation du carbone lors de la photosynthèse. La seconde fraction peptidique majoritaire (3 à 14%) est obtenue après hydrolyse de pigments (phycoérythrine) et de complexes protéiques intervenant dans le métabolisme cellulaire (photosystème, facteurs élongation, cytochrome oxydase).

4.1.3. Lipides

Les macroalgues ne sont pas reconnues pour accumuler une grande quantité de lipides et d'acides gras comparées aux microalgues ou aux plantes terrestres. Cependant, les acides gras composant la fraction lipidique sont majoritairement de nature polyinsaturée. Le lipidome des macroalgues est diversifié, il se compose en majeure partie de triglycérides, stérols, glycolipides et phospholipides (Terme *et al.*, 2017).

. * **RuBiSCo** : La rubisco (ou ribulose-1,5-diphosphate carboxylase/oxygénase) est une enzyme végétale impliquée dans le cycle de Calvin et plus particulièrement dans la fixation du dioxyde de carbone.

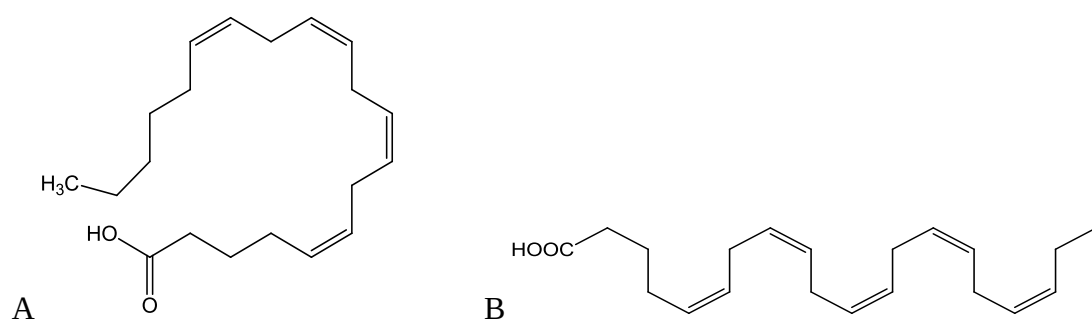


Figure 6: Structure moléculaire de lipides, l'acide arachidonique (AA, C20 : 4 / n-6) (A) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20 : 5 / n-3) (B).

La composition varie en fonction du phylum. Les macroalgues rouges sont reconnues pour contenir une vingtaine d'acides gras à chaîne carbonée tels que l'acide eicosapentaénoïque (EPA, ω -3 C20 :5) et l'acide arachidonique (AA, ω -6 C20 :4) (**Figure 6**). Les algues rouges contiennent une proportion de composés terpéniques, de tocophérols et de stérols. Ces espèces se différencient des autres phylums par la présence d'oxylipines, acides gras oxygénés, reconnus pour intervenir dans la différenciation cellulaire, la réponse immunitaire et l'homéostasie (Gerwick *et al.*, 1999). Les glycolipides sont des dérivés glycosylés de glycérols et de céramides, également nommés glyco-glycérolipides et glycosphingolipides respectivement. Ces composés jouent un rôle important dans le transfert d'énergie lors de la photosynthèse. Leur localisation au sein de la membrane participe à la stabilité structurelle de la bicouche membranaire, à la protection et à la régulation face au stress chimique et ils jouent également le rôle de marqueur dans la communication cellulaire (Boudière *et al.*, 2014). De la même manière, deux structures de phospholipides sont représentées, les glycophospholipides et les sphingophospholipides. Ces structures sont formées de deux acides gras et un groupement phosphate qui peut se lier à différents composés polaires (glycérol, serine, choline, éthanamine, inositol). Ces acides gras sont liés à un glycérol via une liaison ester, il y a formation de glycérophospholipides et cette structure se différencie en sphingophospholipides par la présence d'une structure aminoalcool de type sphingosine (Terme *et al.*, 2017). Ces composés phosphorylés sont reconnus pour leurs propriétés intéressantes en santé animale (Kullenberg *et al.*, 2012). Parmi les lipides non polaires, les phytostérols sont notamment reconnus pour leurs bienfaits en tant qu'anti-inflammatoires mais également pour des propriétés réduisant les risques de maladies cardiovasculaires (Patch *et al.*, 2006). Les acides gras polyinsaturés, notamment les omega-3 et omega-6, sont reconnus pour leur forte activité antioxydante (Mendis et Kim 2001).

4.1.4. Vitamines

L'ensemble des vitamines est représenté chez les algues malgré de grandes variations saisonnières. L'intérêt principal réside dans les teneurs en Provitamine A (algues rouges), en Vitamine C (algues brunes et vertes) et Vitamine E (brunes). Les vitamines du groupe B (B2 et B3 en particulier) sont généralement bien représentées, avec une originalité pour la vitamine B12 : les algues en contiennent une proportion non négligeable, contrairement aux plantes

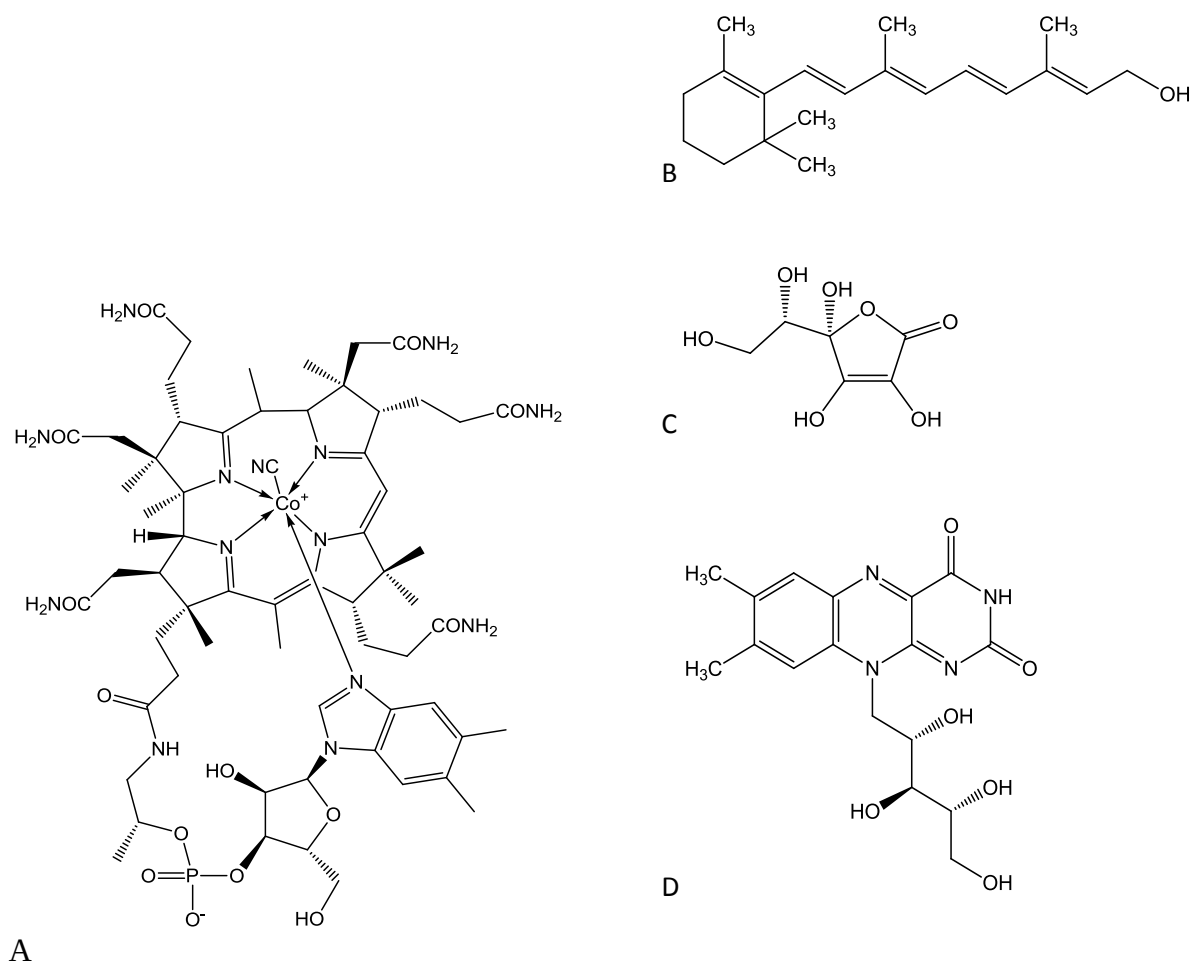


Figure 7: Structure de vitamines, la vitamines B12 (A), la vitamine A (B), la vitamine C (C) et la vitamine B2 (D)

terrestres qui en sont totalement dépourvues. Bien que certaines vitamines soient présentes en quantités notables, l'intérêt du contenu vitaminique algal se situe, au-delà de ces teneurs individuelles, dans la notion de cocktail. Ces molécules sont reconnues pour leurs propriétés et sont prescrites sous la forme de nutraceutique ou lors de régimes alimentaires adaptés pour lutter contre les troubles digestifs telle que l'anémie due aux troubles d'absorption du fer. La consommation d'une faible portion d'algues ($\approx 100\text{g}$) permet un apport suffisant en vitamines A, B12 et B2 (100% AJR*) supérieur à un apport conséquent en vitamines C (50% AJR) (Hamed *et al.*, 2015) (**Figure 7**). Les vitamines sont également très reconnues pour leurs activités antioxydantes et permettent de limiter les effets du vieillissement (Škrovánková, 2001).

4.1.5. Les polysaccharides pariétaux

Malgré de nombreuses similitudes au niveau des voies métaboliques entre les familles des algues, celles-ci présentent une organisation et une composition cellulaire différentes. De nombreuses études ont été réalisées de manière à comprendre cette structure pariétale. La paroi cellulaire, de par son rôle protecteur et structural est considérée au niveau morphologique comme un organe cellulaire (Burlot, 2017). En effet, en plus de pouvoir apporter à l'algue une certaine rigidité et flexibilité, la paroi est en interaction avec le milieu extérieur. Elle intervient notamment dans l'osmorégulation pour protéger les cellules vis-à-vis des variations de pression osmotique qui entraîneraient des phénomènes de turgescence ou de plasmolyse. Au travers d'études structurales, il a été observé de nombreux facteurs interférant sur son organisation, comme notamment la variabilité de l'environnement, le stade de reproduction et l'état physiologique du thalle.

La paroi cellulaire est constituée de deux phases : une phase cristalline, qui correspond à un squelette de microfibrilles, enveloppée d'une phase amorphe, appelée également matrice prédominante. Elle se distingue cependant de celle des plantes par l'importance de la matrice sur le squelette, et par l'abondance des polysaccharides anioniques sur les polysaccharides neutres (Kloareg & Quatrano, 1988). Par exemple, les Rhodophycées (algues rouges) ont une phase amorphe importante, qui est en fait un réseau de polysaccharides sulfatés. Ainsi, on trouve généralement des galactanes (polymères de galactose), qui permettent entre autres de résister à l'immersion. En ce qui concerne la phase cristalline des algues, essentiellement

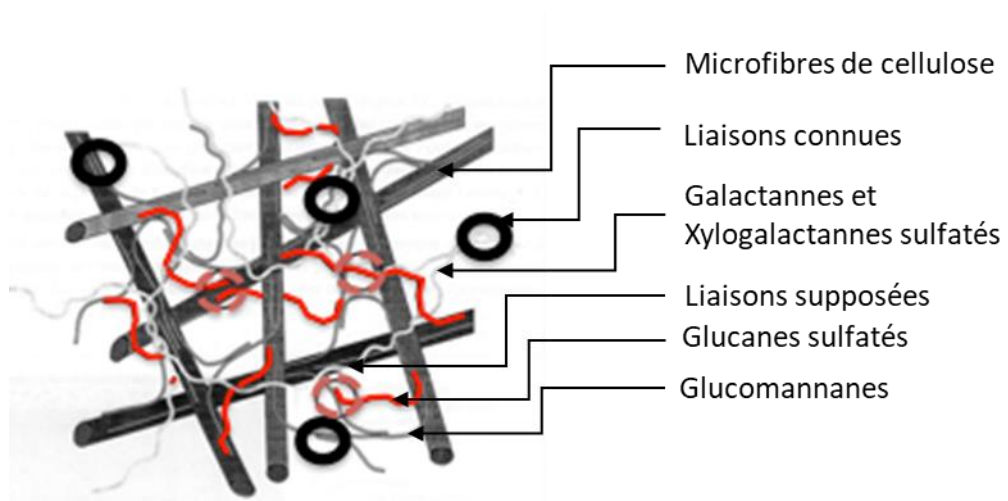


Figure 8: Schéma général de l'organisation structurale de la paroi des algues rouges (Lechat, 1997)

fibrillaire et neutre, elle est composée de molécules telles que la cellulose, les xylanes et les mannanes, avec, selon les espèces d'algues, un polymère dominant (**Figure 8**). Contrairement à la phase cristalline, la composition de la phase amorphe est caractéristique de la nature de l'algue étudiée. Cependant, des études ont démontré la présence possible de protéines, lipides et peptidoglycanes (Stiger-Pouvreau *et al.*, 2016).

4.1.5.1. La phase matricielle

4.1.5.1.1. Les carraghénanes

Les carraghénanes ont été identifiés originellement chez l'espèce d'algue rouge *Chondrus crispus*. La structure moléculaire des carraghénanes est décrite par une chaîne linéaire d'unités de D-galactose. Cette chaîne présente également des unités 3,6 anhydrogalactose (3,6 AG) liées par alternance de liaisons α (1 $\rightarrow$ 3) et β (1 $\rightarrow$ 4) formant des carraghénanes présentant une variabilité de poids moléculaires de l'ordre de 100 à 1000 kDa (Vieble *et al.*, 1995). Les propriétés physico-chimiques et biologiques des carraghénanes sont directement liées à la composition chimique et à la conformation structurale. L'habilité des carraghénanes à s'auto-organiser pour former un gel est liée à la confirmation de sa structure primaire. Cependant, des différences de structure chimique ont permis de classer ces polygalactanes en différents types. À ce jour, quinze types de carraghénanes présentant des différences structurales ont été identifiés (**Tableau IV et Tableau V**). Ces différents types de carraghénanes se différencient au niveau structural principalement par la position et le nombre de groupements sulfatés, de groupements méthyle ou pyruvate ainsi que la présence de pont 3,6 anhydrogalactose au sein de la chaîne (Lahaye, 2001). Il a également été décrit la présence de substitution de groupement glycosidique par le β -D-xylopyranose (Craigie, 1990). Parmi ceux-ci, les types κ -, ι - et λ - carraghénanes sont majoritairement cités du fait de leur intérêt industriel. Ces trois types se distinguent par un nombre de groupements ester-sulfate par unité disaccharidique différent, respectivement 1, 2 et 3 groupements/unité (Jiao *et al.*, 2011).

4.1.5.1.1.1. La nomenclature des carraghénanes

Knusten (1994) proposa une nomenclature devenue la référence pour décrire la structure des carraghénanes. Cette nomenclature est basée sur l'utilisation de lettres, **G** définie les unités liées en α (1 $\rightarrow$ 3) ; et le **D** pour les unités liées en β (1 $\rightarrow$ 4). Les unités 3,6 anhydrogalactose

(3,6 AG) sont différenciées par les lettres **DA**. Les substituants liés aux unités sont nommés par les lettres **P** pour les pyruvates, **M** pour les méthyles et **S** pour les sulfates. La lettre correspondant aux substituant est liée à un numéro correspondant à la position du carbone qui le supporte. Les substituants **M** et **S** pouvant être liés aux carbones de 1 à 6 alors que les **P** ne peuvent être liés qu'au carbone 4 et 6. Cette nomenclature a pu également être appliquée aux agars, en les différenciant des carraghénanes par la lettre **L** qui qualifie l'unité $\beta(1\rightarrow4)$ et **LA** si présence d'un pont 3,6 AG.

Si l'on étudie la composition du carraghénane de type kappa (κ -) dont la nomenclature est **G4S-DA**, la structure est décrite comme une alternance de sous unités β -D-galactose liées à l'atome de carbone en position 3 et de sous unités anhydrogalactose (AG) liées sur le carbone en position 4. Ce type de carraghénane contient des esters sulfatés (25 à 30%) et des unités 3,6 anhydrogalactose (3,6 AG) représentant 28 à 35%. Le type iota (ι -), dont la nomenclature est **G4S-DA2S**, se différencie du type κ - par la présence d'un groupement sulfate supplémentaire lié au carbone 2 de la sous unité 3,6 AG. Par la présence de deux sulfates sur chaque unité disaccharidique cela entraîne une augmentation du taux d'esters sulfatés (28 à 30%) et une diminution du taux de 3,6 AG (25 à 30%). Le type lambda (λ -), dont la nomenclature est **G2S-D2S,6S**, se différencie des deux autres par la présence de trois groupements esters sulfatés par unité disaccharidique, le groupement supplémentaire est lié au C-6, ce qui entraînant une absence de 3,6 AG et un taux d'esters sulfatés allant de 32 à 39% (Campo *et al.* 2009 ; Jiao *et al.* 2011).

Les toutes premières études décrivant les carraghénanes ont défini une classification basée sur leur solubilité dans le chlorure de potassium permettant de séparer les types λ - des types κ - (Smith, Cook et Neal, 1955). La découverte de nouvelles structures a permis de créer une autre classification formée de quatre familles Kappa ; Bêta, Delta et Oméga. Ces familles se différencient au niveau structural. Les carraghénanes présentent une sulfatation de l'unité G en position 2 (**G2S**) commun à la famille lambda. La famille Kappa se caractérise par une sulfatation en position 4 de l'unité G (**G4S**) alors que la famille Oméga présente une sulfatation en position 6 (**G6S**). Une quatrième famille, Bêta, se caractérise par l'absence de sulfatation sur l'unité G a ensuite été créé (Greer et Yaphe, 1984 ; Mollion, Moreau et Christiaen, 1986 ; Cunta et Grenha, 2016). Toutes ces structures sont présentées dans le **Tableau IV** et **Tableau V**, classées par familles avec le nom latin et la nomenclature associée suivant Knutsen, (1994).

Tableau IV: Tableau présentant les différentes structures des carraghénanes et de leurs précurseurs (1/2).

Famille Kappa	Famille Bêta	Famille Lambda
Kappa-carraghénane (κ-) : G4S-DA	Bêta-carraghénane (β-) : G-DA	Lambda-carraghénane (λ-) : G2S-D2S,6S
Iota-carraghénane (ι-) : G4S-DA2S	Gama-carraghénane (γ-) : G-D6S	Thêta-carraghénane (θ-) : G2S-DA2S
Mu-carraghénane (μ-) : G4S-D6S	Delta-carraghénane (δ-) : G-D2S,6S	Psi-carraghénane (ξ-) : G2S-D2S

Tableau V: Tableau présentant les différentes structures des carraghénanes et de leurs précurseurs (2/2).

Famille Kappa	Famille Bêta	Famille Delta
Nu-carraghénanes (ν-) : G4S D2S,6S	Alpha-carraghénane (α-) : G-DA2S	Pi-carraghénane (π-) : GP,2S-D2S ou G2S,4S-D2S,6S
	Famille Oméga	
Omicron-carraghénane (ο-) : G4S-D2S		
	Psi-carraghénane (ψ-) : G6S-D6S	Omega-carraghénane (ω-) : G6S-DA

Parmi ces quinze structures sont représentés les précurseurs biosynthétiques des carraghénanes. Le gamma-carraghénane (γ - ; **G-D6S**) précurseur du bêta-carraghénane (β - ; **G-DA**) sont présent chez *Tichocarpus crinitus* (Rhodophycée, Gigartinales) (Yemak *et al.* 1999). Le delta-carraghénane (δ - ; **G-D2S,6S**) précurseur de l'alpha-carraghénane (α - ; **G-DA2S**) a été décrit chez *Catenella nipea* (Rhodophycée, Gigartinales) (Falshaw *et al.* 1996). La famille Kappa présente également des précurseurs dont les mu-carraghénanes (μ - ; **G4S-D6S**) et les nu-carraghénanes (ν - ; **G4S-D2S,6S**) précurseurs respectifs des kappa-carraghénanes (κ - ; **G4S-DA**) et iota-carraghénanes (ι - ; **G4S-DA2S**). Les précurseurs peuvent être convertis en carraghénanes matures respectifs lors des mécanismes de biosynthèse par l'action des galactose-6-sulfurylases. Cependant, cette conversion a également été observée par Bellion *et al.* (1983) par l'application d'un traitement alcalin à chaud.

Dans la famille Oméga, deux structures de carraghénanes ont été décrites, les oméga-carraghénanes (ω - ; **G6S-DA**) et les psi-carraghénanes (ψ - ; **G6S-D6S**). L'observation de ces deux structures chez *Rissoella verruculosa* par Mollion, Moreau et Christiaen, (1986) a laissé supposer que la forme ψ - serait également le précurseur de la forme ω -.

4.1.5.1.1.2. Les mécanismes de biosynthèse des carraghénanes

Les mécanismes de biosynthèse des polysaccharides sulfatés chez les Rhodophycées est un processus peu décrit. Seule l'étude de Craigie et Wong (1978) propose un schéma de la biosynthèse des carraghénanes chez *Chondrus crispus* (Rhodophycée, Gigartinales).

La première étape intervenant dans le mécanisme de biosynthèse des carraghénanes serait la formation des galactanes neutres au sein de l'appareil de Golgi. Cette polymérisation ferait intervenir l'UDP-D-galactose formée à partir de l'UDP-glucose par l'intervention de l'enzyme UDP-glucose-4-épimérase (Goulard *et al.* 1999). La présence de l'alternance des liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$ et $\beta(1\rightarrow4)$ démontre l'intervention de deux enzymes glyco-transférases, cependant celles-ci ne sont pas caractérisées.

La sulfatation des polysaccharides intervient dans l'étape suivante par l'action des sulfo-transférases. Un suivi du mécanisme par l'incorporation de sulfate radiomarké ^{35}S chez

Chondrus crispus semble montrer que cette étape a lieu au sein de l'appareil de Golgi (Tveter-Callagher, Cheney et Mathieson, 1981).

Les galactanes sulfatés formés seraient ensuite transportés en direction de la paroi où aurait lieu la formation des ponts 3,6 AG par intervention de galactose-6-sulfurylases. Les carraghénanes non mature seraient ensuite gélifiées in-situ au sein de la paroi. Ces différentes étapes présentées par Craigie et Wong (1977) sont des hypothèses du fait que les enzymes intervenants dans les mécanismes n'ont pas encore été caractérisés.

4.1.5.1.1.3. Propriétés et applications des carraghénanes

Les carraghénanes sont des colloïdes hydrophiles, solubles dans l'eau mais insolubles dans les solvants organiques tels que les alcools, les éthers et les huiles. Cependant, la solubilité dans l'eau dépend du type de carraghénane, elle est également dépendante de plusieurs facteurs tels que le pH, la température, la présence d'autres solutés notamment les sels.

La propriété hydrophile est liée à la présence des groupements sulfates et des groupements hydroxyles alors qu'au contraire il a été démontré que la présence de résidus 3,6 AG apporte un caractère plus hydrophobe (Jiao *et al.* 2011). Ceci a été confirmé par l'étude de la solubilité des trois types de carraghénanes λ -, ι - et κ -. Les λ -carraghénanes sont très solubles dans l'eau du fait de l'absence de résidus 3,6 AG et d'une sulfatation plus importante. Au contraire, les κ -carraghénanes sont plus insolubles du fait de leur faible sulfatation et de la présence de pont 3,6 AG alors que les ι -carraghénanes présentent un caractère plus hydrophile malgré la présence de 3,6 AG. Le caractère hydrophobe apporté par le 3,6 AG serait neutralisé par la présence des deux groupements sulfatés (Cunta et Grenha, 2016). Cependant, la solubilité des carraghénanes peut également être affectée par la forme saline du groupement ester sulfate. De manière générale, la forme sodium du carraghénanes est plus soluble que la forme potassium. La forme potassium des ι - et κ -carraghénanes est insoluble en milieu aqueux à basse température et nécessite le chauffage de la solution afin d'entraîner leur solubilisation, au contraire la forme sodium reste très soluble à basse température. Les (λ -) carraghénanes ne présentent pas de limite de solubilité quelle que soit sa forme saline. Cette propriété soluble des carraghénanes peut être affectée par la présence d'autres composés en solution entraînant une altération l'état d'hydratation du polysaccharide (Necas et Bartosikova, 2013). L'augmentation de la viscosité d'un extrait de carraghénanes est corrélée

avec plusieurs paramètres dont la concentration, la sulfatation et le poids moléculaire mais également la température du produit.

Cependant, une augmentation de la température du produit va entraîner une diminution de sa viscosité. D'autre part, ces extraits de par leurs propriétés épaississantes sont difficilement dispersables en milieu aqueux ; car ils ont tendance à former un réseau sous forme de fines couches encapsulant les particules non solubilisées. De ce fait, pour favoriser la solubilisation des carraghénanes dans l'eau, il est nécessaire de réaliser une agitation importante afin de permettre aux molécules d'eau de pénétrer cette fine couche. Les méthodes restent limitées car les carraghénanes sensibles aux pH et aux réactifs oxydants entraînent leur dépolymérisation liée à une perte des propriétés physicochimiques. Ceci peut être dû à la présence d'acides dans le milieu ou d'oxygène dissous, il a également été notifié que l'application de températures trop importantes peut entraîner ce même effet (Therkelsen, 1993 ; Necas et Bartosikova, 2013).

Leurs fonctionnalités sont dépendantes de leur composition qui influent sur la rhéologie du gel formé. Les gels de carraghénanes de par leur rhéologie sont qualifiés de fluide ayant un comportement pseudo-plastique (Therkelsen, 1993). Toutefois, les propriétés viscoélastiques du gel peuvent être modifiées sous l'influence de certains paramètres tels que l'ajout de cations en solution ou la variation de la température dans une certaine gamme (Thrimawithana *et al.*, 2010). L'utilisation industrielle des carraghénanes comme texturants dans les secteurs de l'agro-alimentaire ou de la cosmétique et pharmacie ont conduit au développement et à l'industrialisation de l'extraction des carraghénanes ainsi qu'à l'étude de nombreuses espèces et au développement de l'algoculture d'espèces telles que *Eucheuma denticulatum* et *Kappaphycus alvarezii*. Ces deux espèces ont un intérêt industriel par la présence d'une mixité de kappa et iota carraghénanes qui sont séparables par les méthodes d'extraction contrairement aux κ - et λ -carraghénanes présents chez *Chondrus crispus*. L'intérêt des carraghénanes pousse l'industrie à s'orienter vers d'autres espèces carraghénophytes du genre *Furcellaria*, *Gigartina*, *Hypnea* et *Iridae* (Cunha et Grenha, 2016).

Les carraghénanes extraits présentent un profil varié, ceci est dû principalement à la variabilité de la ressource (espèce d'algue et état morphologique) mais également aux conditions d'extraction appliquées. L'ajustement de ces facteurs étant compliqué, la standardisation des extraits de carraghénanes est réalisée en fonction de leurs propriétés et fonctionnalités attendues pour une certaine application.

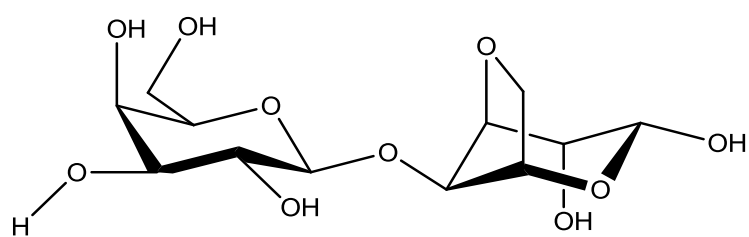


Figure 9: Structure chimique de l'unité agarobiose.

4.1.5.1.2. *Agar*

Les agars sont des polysaccharides présentant une structure de base composée d'un enchainement d'une unité L-3,6-anhydrogalactose liée à un D-galactose formant l'agarobiose (**Figure 9**). Cependant, chez les algues rouges des structures plus complexes ont été décrites. Ces agars présentent des groupements tels que des esters sulfates, des méthoxyles ou des pyruvates complétant la structure de base. De plus, au sein de certains genres, notamment les Halymeniales et les Gigartinales, des structures hybrides d'agars et de carraghénanes ont été décrites, celles-ci sont nommées « carragar » ou « DL-hybrides » (Usov, 2011). Tout comme les carraghénanes, les agars sont des polysaccharides sulfatés, seulement ceux-ci ne présentent qu'un faible taux de sulfate avec une teneur en groupement sulfate variant de 1 à 5 % (Garon-Lardiere, 2004; Kornprobst, 2005).

4.1.5.2. *La phase fibrillaire*

4.1.5.2.1. *La cellulose*

La cellulose est un polysaccharide constitué d'un enchainement d'unités de glucose (8000 à 12000 unités) liées entre elles par une liaison $\beta(1\rightarrow4)$ entre le carbone C1 et C4. Les polymères ainsi formés sont ensuite liés entre eux par des liaisons hydrogènes de faible énergie formant un ensemble de feuillets. De part cette structure très stable, les liaisons hydroxyles présentent au sein des polymères restent peu accessibles limitant leurs interactions. De ce fait, la cellulose présente des propriétés rigides et insolubles en milieu aqueux, ceci est dû principalement à son taux de cristallinité pouvant être supérieur à 70% sous sa forme native (O'Sullivan, 1997). Chez les Rhodophycées, la proportion de cellulose contenue dans la matrice algale peut atteindre 12% de la totalité des polysaccharides pariétaux (Gretz *et al.*, 1986 ; Mukai, Craigie et Brown, 1981). Cependant, ses propriétés sont différentes du fait d'un taux de cristallinité inférieur par rapport aux autres sources de polysaccharides.

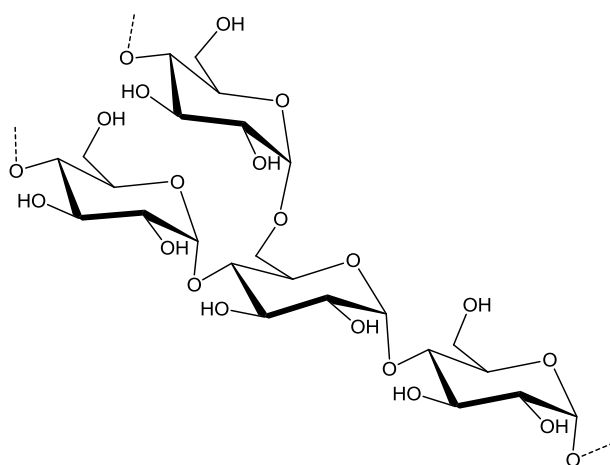


Figure 10: Structure moléculaire de l'amidon floridéen

4.1.5.2.2. *Autres glycanes structuraux*

Les xylanes ont été décrits dans la phase fibrillaire des algues rouges. Chez certaines espèces, il a été montré la présence conjointe de xylanes et de cellulose. Les xylanes squelettiques des parois cellulaires sont des polymères linéaires d'unités β -(1,3)-D-xylose ou β -(1,3)-D-xylose (Craigie, 1990). La forme β -(1,3) donne des structures de microfibrilles résultant d'un arrangement en triple hélices, stabilisé par des liaisons hydrogène intra- ou intermoléculaire (Atkins et Parker, 1969).

Ces polymères composés de trois unités xylose et reliées entre elles par des liaisons hydrogènes auraient un rôle de substitution vis-à-vis de la cellulose. Le rôle des xylanes reste, cependant, toujours peu documenté. Il semblerait qu'ils soient impliqués dans le développement de la paroi au cours du cycle de vie de l'algue, notamment sur la formation de polysaccharide et d'oligosaccharides liés aux peptides (Craigie, 1990).

Plus spécifique à l'ordre des Bangiales, les mannanes ont été décrits comme substituant la cellulose dans la composition de la paroi. Les mannanes sont des polymères d'unités mannose liées par des liaisons β (1 $\rightarrow$ 4). Ces glycanes ont été notamment identifiés chez l'espèce *Porphyra umbilicalis* au niveau de la cuticule des thalles (Jones, 1950 ; Frei et Preston 1964). Les mannanes sont des polymères linéaires formés d'unités β -(1,4)-D-mannose. Les enchainements polysaccharidiques s'associent entre eux de manière similaire à la cellulose afin de former des microfibrilles, elles-mêmes s'associant afin d'aboutir à des fibrilles (Kloareg et Quatrano, 1988).

4.2. *Les métabolites secondaires*

L'environnement intertidal marin est une zone caractérisée par un écosystème riche et défini par les limites extrêmes des marées, ce qui engendre de fortes variations des facteurs biotiques et abiotiques. Pour pouvoir survivre à ce type d'environnement, les organismes marins se dotent de mécanismes de défense et d'adaptation. Les macroalgues possèdent un métabolisme complexe qui permet de s'adapter aux variations permanentes des températures et des irradiations, mais également aux stress métaboliques dus aux pertes aqueuses et aux apports nutritionnels. Ceci oblige les macroalgues à détecter rapidement les modifications entraînant

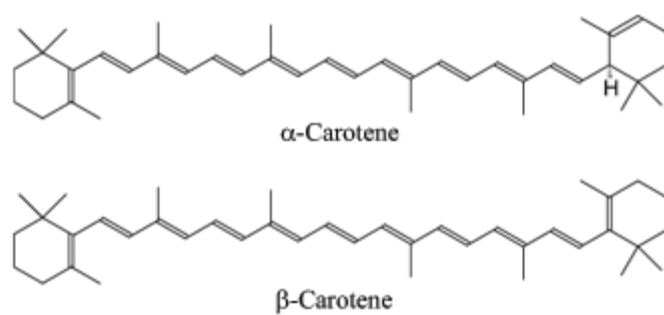


Figure 11: Structure chimique des molécules de α et β -carotène.

un stress et à s'adapter aux nouvelles conditions en mettant en place des mécanismes de régulation (Potin *et al.*, 2002 ; Bedoux *et al.* 2014). Les macroalgues sont reconnues pour posséder une grande diversité de molécules ayant une large gamme de propriétés biologiques (Ioannou et Roussis 2009 ; Bedoux *et al.* 2014). De nombreuses pistes de recherche ont été explorées ayant pour but d'identifier le rôle de ces métabolites au niveau même des algues, mais aussi dans l'environnement comme notamment leurs propriétés de défense face aux herbivores marins et comment lutter contre la fixation et le développement de microorganismes (virus, bactéries, champignons ou autres épiphytes) à leur surface.

4.2.1. Pigments

Les macroalgues se développent au sein du milieu intertidal soumises ainsi à une variation de la hauteur d'eau et à une variation de quantité et de qualité de la lumière nécessaire à l'activité photosynthétique (400 – 700 nm). En plus du rayonnement nécessaire au métabolisme, les organismes sont exposés aux rayonnements UV-A (315 – 400 nm) et UV-B (280 – 315 nm) reconnus pour entraîner des dommages au niveau de l'ADN et d'inhiber les mécanismes de la photosynthèse (Xu et Gao, 2008). De ce fait, les Rhodophycées sont reconnues pour produire différents pigments associés naturellement à la photosynthèse mais également pour répondre à ces contraintes. Les chlorophylles, les caroténoïdes et les phycobiliprotéines représentent une diversité de composés qui se différencient par leurs structures et par leurs rôles (Rapsomanikis et al 2016).

4.2.1.1. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes forment un groupement de pigments divisés en deux groupes : les carotènes et les xanthophylles. Les algues rouges synthétisent les α - et β -carotènes dans des proportions variables selon les espèces (**Figure 11**). Tout comme les algues vertes et brunes, les algues rouges synthétisent des xanthophylles. Cependant, elles produisent une xanthophylle spécifique : la taraxanthine proche de la lutéine (Kornprobst 2005).

Les caroténoïdes sont formés d'une structure tétraterpénique formant une famille de composés diversifiés. Cette diversité se traduit par la présence de presque tous les types de fonctions : alcool, éther, ester, aldéhyde, éther, cétone, époxyde, voir même des glycosides.

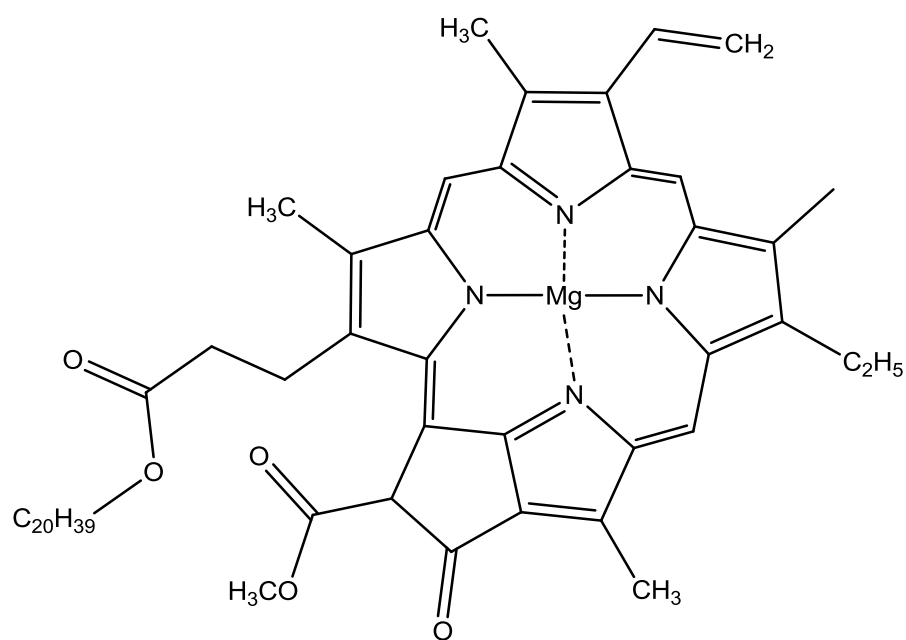


Figure 12: Schéma de la structure moléculaire de la chlorophylle a

Des études ont identifié la présence de β -carotène par l'absorbance spécifique à la longueur d'onde 472 nm chez différentes espèces d'algues rouges, parmi lesquelles *Gigartina stellata*, *Gracilaria changgi*, *Laurencia obtusa* (Rhodophycées) et deux espèces du genre *Polysiphonia* (Kornprobst 2005, Norziah et Ching, 2000, Rapsomantikis *et al.*, 2016). Des xanthophylles sont aussi présentes comme la zéaxanthine et la violaxanthine.

Les caroténoïdes et les chlorophylles sont insolubles dans l'eau, leur extraction nécessite généralement de réaliser une macération dans un solvant organique (Rapsomantikis *et al.*, 2016). Leur rôle n'est pas clairement établi. Chez la plupart des groupes algaux, ces pigments participent à la photosynthèse. Chez les Cyanophycées et les Rhodophycées, ils semblent être complètement inactifs comme pigments photosynthétiques accessoires. Ils pourraient servir de filtres pour la lumière bleue (Blinks 1963).

Les macroalgues rouges ont, en effet, la capacité de produire d'autres types de pigments qui n'interviennent pas dans le métabolisme primaire. Ces métabolites sont synthétisés en réponse à un stress vis-à-vis d'une modification du milieu environnant (luminosité, déshydratation, salinité ou nutriment). Il a été ainsi démontré que la synthèse des caroténoïdes (les carotènes et les xanthophylles) chez les macroalgues était liée à la présence d'un excès d'apport en lumière intervenant accessoirement dans le mécanisme de la photosynthèse (Karma, 2005). Ces métabolites ont un rôle de protection du système intervenant dans la photosynthèse au sein de la cellule. Ces molécules qualifiées de composés tétra-terpénoïdes ont une structure dérivée des isoprènes (formée de 5 carbones) et forment un polymère régulier de 40 carbones conjugués par réaction enzymatique. Les caroténoïdes sont souvent caractérisés par leur coloration rouge orangée, mais forment une famille de molécules présentant des structures moléculaires variées.

4.2.1.2. Les chlorophylles

Les chlorophylles, pigments verts photosynthétiques sont majoritairement représentés chez les végétaux supérieurs, les macroalgues, les microalgues, les cyanobactéries, etc. Ces molécules sont localisées dans les chloroplastes où elles participent au cycle de Krebs. Elles sont à l'origine de la captation des photons émis par la lumière naturelle permettant de transmettre ensuite cette énergie à la cellule. Il existe différents types de chlorophylles nommées par les

lettres a, b, c et d qui présentent la même structure de base d'un cycle tétrapyrrolique et d'une chaîne phytol mais qui se différencient par différents substituants (**Figure 12**).

La chlorophylle a est présente chez tous les organismes photosynthétiques. Sa structure est très proche de la chlorophylle b qui diffère par la présence d'un groupement aldéhyde substituant le groupement méthyle. Cependant, ce type de chlorophylle n'est présent que chez les Chlorophycées. La chlorophylle c est présente chez l'ensemble des algues sous trois formes différentes nommées c₁, c₂ et c₃. Ces trois formes de chlorophylles sont caractérisées par une absence de la chaîne phytol. Le quatrième type de chlorophylle est la chlorophylle d. Structuellement cette chlorophylle est proche de la chlorophylle a, hormis la présence d'un groupement vinyle substituant un aldéhyde sur l'atome de C2. Elle se différencie également par son spectre d'absorption. La présence de chlorophylle chez les algues rouges a été démontrée dans différentes études, notamment par Algarra *et al.* (1990) qui a réalisé une extraction de ces pigments chez *Grateloupia dichotoma*. Glazer *et al.* (1994) ont également démontré que la chlorophylle est présente chez *Laurencia obtusa* du fait de l'absorbance significative d'un extrait organique entre 415 et 668 nm. Cependant, lorsque l'on compare les différentes familles d'espèces, la quantité de chlorophylle est majoritairement présente chez les Chlorophycée. Les Rhodophycée et les Phéophycée possèdent ces pigments, cependant, leur couleur rouge et brune est due à la synthèse d'autres pigments jouant un rôle complémentaire.

4.2.1.3. Les phycobiliprotéines

Le troisième groupe de pigments concerne les phycobiliprotéines. Ce groupe comprend notamment la phycoérythrine, la phycoérythrocyanine, l'allophycocyanine et la phycocyanine. Ces molécules ont la particularité d'être des molécules hydrosolubles contrairement aux deux groupes de pigments précédemment cités. Cette propriété hydrophile est due à leur structure moléculaire présentant deux parties distinctes ; une partie protéique à laquelle est liée une phycobiline ayant une propriété chromophore (Glazer *et al.* 1977). La R-phycoérythrine est un oligomère de chromoprotéine caractérisée par son spectre d'absorption présentant trois épaulements significatifs à 499, 545 et 565 nm (**Figure 13**). La structure de la molécule présente trois sous-unités α , β et γ ayant chacun un poids moléculaire différent de 18, 20 et 30 à 33 kDa, respectivement. Ces sous-unités tendent à s'agglomérer pour former une unité de base pouvant présenter différents arrangements, donnant une molécule de R-phycoérythrine avec un poids moléculaire d'environ 240 kDa. La R-phycocyanine présente un

maximum d'absorption significatif à 615 nm avec un épaulement secondaire à 555 nm. Ce pigment présente une structure moléculaire présentant un poids moléculaire d'environ 110 kDa. Une troisième famille de pigment, la R-allophycocyanine, est présent minoritairement chez les algues rouges par rapport aux deux phycobiliprotéines précédemment citées. Ce composé présente une structure formée d'une sous-unité α et deux sous-unités β formant un trimère ($\alpha 2\beta$). Sa présence chez les algues rouges est caractérisée par la présence d'un maximum d'absorption à 650 nm avec un épaulement à 620 nm dans les extraits aqueux (Cian *et al.*, 2015). De nombreuses études ont montré la présence des phycoérythrine, phycocyanine et allophycocyanine chez *Gracilaria gracilis*, *Laurencia robusta*, *Grateloupia turuturu*, *Palmaria palmata* *Gracilaria crassa* (Dumay *et al.*, 2013 ; Sudhakar *et al.*, 2015 ; Francavilla *et al.*, 2015 ; Le Guillard *et al.*, 2016). De nombreuses activités sont attribuées aux pigments, notamment l'activité antioxydante (Kumar, 2005), ou anti-inflammatoire (González *et al.*, 2003 ; Lee *et al.*, 2013).

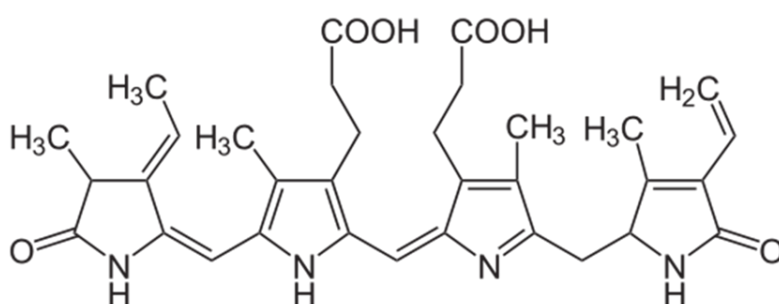


Figure 13: Structure chimique de phycobiliprotéine, la R-phycoérythrine.

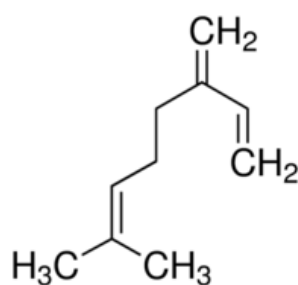


Figure 14: Structure chimique de terpène, la structure présentée correspondant à la molécule de myrcène.

4.2.2. Terpènes

La présence des terpènes a été montrée chez de nombreux organismes marins et terrestres tels que les bactéries, les champignons, les micro- et macroalgues, les plantes et également chez certains animaux. Cette famille de composés présente une grande diversité de structure classée en fonction de leur structure de base C_5H_8 (Zwenger, 2008). Les études ont permis d'identifier sept classes de terpènes nommés les hémiterpènes (qui possède 5 carbones (C_5) et présente une unité isoprène), les monoterpènes (C_{10} ; 2 unités isoprènes), les sesquiterpènes (C_{15} ; 3 unités isoprènes), les diterpènes, (C_{20} ; 4 unités isoprènes) les triterpènes (C_{30} ; 6 unités isoprènes), les tétraterpènes (C_{40} ; 8 unités isoprènes) et les polyterpènes qui regroupent les molécules plus importantes présentant un nombre d'unités isoprènes supérieur à 8 ($8 < n < 30000$) et un nombre de carbone supérieur à 40 (C_{5n}). La présence de terpènes chez les algues rouges est cependant très peu décrite. Deux études ont montré la présence de ce type de composés chez l'espèce *Ochtodes secundiramea* (Gigartinales). L'extrait obtenu présentant un mélange de cinq composés, les myrcènes (**Figure 14**), 10Z-bromomyrcène, 10E-bromo-3-chloromyrcène, l'apakaochtodène B et $C_{10}H_{14}Br_2$ acrylique (Machado *et al.*, 2014 ; Pérez-Lopez *et al.*, 2016). Les terpènes sont beaucoup plus décrits chez les macroalgues brunes, cependant une étude a démontré l'activité antifongique des terpènes extraits de *Laurencia dendroide* et *Gracilaria edulis* (Peres *et al.* 2012).

4.2.3. Acides aminés mycosporine-like

Les acides aminés mycosporine-like (de l'anglais Mycosporine-like Amino Acids, MAAs) sont une famille de composés ayant la particularité d'absorber essentiellement dans la zone UV-A (315 – 400 nm) et UV-B (280 – 315 nm). Cette famille de composés est très représentée dans la nature, notamment chez les organismes exposés à une très forte intensité lumineuse. Ainsi, ont été identifiées des MAAs chez les cyanobactéries, certains microorganismes (microalgues, champignons), les macroalgues (principalement les Rhodophycée et les Chlorophycée), les coraux et les lichens. Cependant, il a été démontré que les cyanobactéries seraient à l'origine de la biosynthèse des mycosporines (Wada, Sakamoto et Matsugo, 2015). Les MAAs auraient été ensuite transmises à d'autres organismes via l'alimentation, la symbiose et l'association bactérienne (Dunlap, 1998; Gröniger *et al.*, 2000; Shick et Dunlap, 2002; Rezanka *et al.*, 2004). De nombreuses études ont analysé les facteurs

déclenchant la production de ce type de composés au sein des organismes précédemment cités (Rai et Mallick, 1998 ; Montero et Lubián, 2003 ; Roshan *et al.* 2015 ; Ha *et al.* 2015 ; Elliott *et al.* 2015 ; Vale, 2015 ; Barcelo-Villalobos *et al.* 2017). L'hypothèse premièrement citée fut le fait que l'organisme est soumis à un stress important engendré par l'irradiation solaire au sein de son habitat. L'exposition aux rayonnements lumineux inhibe la croissance de l'algue entraînant la destruction des chloroplastes et des mitochondries présentes dans les cellules (Singh *et al.*, 2008). Depuis, d'autres facteurs comme le stress osmotique et thermique ainsi que la déshydratation (Ollson-Francis *et al.*, 2013 ; Waditee-Sirissatha *et al.*, 2014) ont été envisagés. Structuellement, il est possible de différencier deux groupes de mycosporines, formées d'un noyau cyclohexènone auquel est lié un seul résidu protéogénique ou des acides aminés modifiés. Les acides aminés mycosporine-like (MAAs) se différencient de ces premiers groupes par la présence de deux de ces substituants. Les acides aminés sont liés au noyau via des liaisons imines.

L'étude de la diversité, de la distribution et de la biologie des mycosporines est un sujet de recherche développé d'une part pour évaluer l'activité photoprotectrice de ces composés, leur rôle physiologique et d'autre part pour permettre de déterminer les voies métaboliques intervenants dans leurs synthèses. Cependant, l'élucidation précise des mécanismes biologiques intervenants est ralentie par le manque de connaissances sur la biosynthèse de ces composés. D'après plusieurs études, les MAAs seraient synthétisées par la conjugaison d'acides aminés par l'intermédiaire de voies métaboliques communes. Les études actuelles réalisées sur les différents organismes proposent deux voies de biosynthèse des MAAs possibles.

La première fait intervenir la voie du shikimate connue pour être également la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques (Favre-Bonvin *et al.*, 1987). Cette voie fait intervenir le précurseur nommé 3-déhydroquinate possédant le cycle à six atomes de carbone commun aux MAAs. Ce précurseur est ensuite transformé en gadusol et en 4-déoxygadusol. Ceci est démontré par la 3-déhydroquinate un intermédiaire de la voie de synthèse du shikimate, précurseur de six cycles carbonés communs formant la structure des mycosporines fongiques. Une étude a permis d'identifier certaines voies de biosynthèse de mycosporines chez les coraux. Il a été démontré que le traitement de *Stylophora pistillata* (famille des Pocilloporidae) par un inhibiteur d'une des étapes de biosynthèse de shikimate entraînait un blocage de la biosynthèse des mycosporines (Shick *et al.*, 1999). De ce fait, l'hypothèse de la

biosynthèse des mycosporines et les acides aminés mycosporine-like ayant une structure basée sur un cycle cyclohexénone avec comme précurseur la 3-déhydroquinone s'avère envisageable. Quelques études présentent l'origine génétique de la voie métabolique shikimate et ont permis d'identifier deux gènes candidats à la biosynthèse, l'homologue de la déhydroquinone synthase (DHQS) et la O-méthyltransférase (O-MT). La cyanobactérie *Anabaena variabilis* connue pour synthétiser une MAA, la shinorine, a démontré qu'elle possède un cluster de gènes constitué de quatre ORFs. Les deux premiers reconnus comme homologue DHQS (Ava_3858) et l'O-MT (Ava_3857) seraient à l'origine de la production du précurseur 4-déoxygadusol formant la base structurale de la mycosporine. Les deux autres ORFs intervenant dans la formation des MAAs, seraient l'homologue de l'ATP-grasp (Ava_3856) et la NRP-like enzyme (Ava_3855). Ces deux homologies interviennent dans la liaison de la glycine et de la sérine au noyau 4-déoxygadusol via les liaisons imines. L'activité de ce gène a été ensuite prouvée par clonage chez *Escherichia coli* ; il a permis la production de shinorine (Balskus et Walsh, 2010). La seconde voie de synthèse des MAAs ferait intervenir le sédoheptulose-7-phosphate, dérivé de la voie métabolique du pentose phosphate converti en 4-déoxygadusol (Balskus *et al.*, 2010).

4.2.3.1. Les précurseurs de MAAs :

Ces deux voies de biosynthèse donnent lieu à la formation du 4-déoxygadusol précurseur commun aux MAAs monosubstituées telles que pour la mycosporine-glycine et di-substituées comme par exemple la porphyra-334 et la shinorine. La molécule précurseur (MAA) résultant de ces synthèses est considérée comme la molécule pionnière parmi les photoprotecteurs naturels (Wada, Sakamoto et Matsugo, 2015). La différenciation structurale des MAAs n'est cependant pas seulement due à la substitution d'acides aminés à partir du précurseur 4-déoxygadusol. Bon nombre des structures sont produites via la modification de la chaîne d'acides aminés par condensation, déshydratation, décarboxylation ou au travers de réactions d'oxydo-réduction.

L'ensemble des mycosporines se différencie par deux types de structure, le groupe des aminocyclohexénones Type MAAs (mono-substituée) ou le type des aminocyclohexène Imine-Type MAAs (di-substituée), auquel s'ajoute le substitut d'acide aminé permettant de caractériser les molécules en MAAs sulfatées ou glycosylées. La **Figure 15** présente la différenciation structurale de la famille de composés des MAAs. La MAAs avec le précurseur gadusol (**Figure 16A**) fût la première mycosporine décrite en 1980 après avoir été

isolée d'ovocytes matures et d'œufs de différentes espèces de poissons, parmi lesquels *Scomber scombrus*, *Auxis thazard* et *Gadus morhua* (Grant *et al.*, 1980). La structure du second précurseur, la molécule 4-déoxygadusol (**Figure 16B**), a été décrite suite à la dégradation de la mycosporine-glycine présente dans un hydrolysat d'anémone *Palythoa tuberculosa* (Ito et Hitara, 1977). Ce composé a bien été identifié comme un précurseur de MAAs et non comme un artefact ou un produit de dégradation (Ito et Hitara, 1977 ; Wada, Sakamoto et Matsugo, 2015).

4.2.3.2. Les acides aminés mycosporine-like :

L'origine évolutive des MAAs n'a toujours pas été élucidée, des spéculations se basent sur une molécule ancestrale ayant un rôle physiologique comme l'osmorégulation chez certaines cyanobactéries (Klisch *et al.* 2001). Les modifications des structures moléculaires ont été observées au cours du temps et ont entraîné de nouvelles fonctions notamment la photoprotection (Cockell 1998). Les MAAs répertoriées les plus simples structurellement sont les MAAs mono-substituées. Ces molécules dont la plus simple est la mycosporine-glycine (M-Gly), présentent une absorbance prédominante dans la région UV-B (280 – 315 nm). Cependant, l'absorbance de la région UV-A est également très importante pour limiter la formation de radicaux libres. Il a été observé qu'une modification structurelle par le remplacement de la fonction cétone par un atome d'azote augmente l'effet mésomère du noyau de la molécule entraînant un déplacement de son maximum d'absorption dans la région UV-A (315 – 400 nm) (Singh *et al.*, 2008).

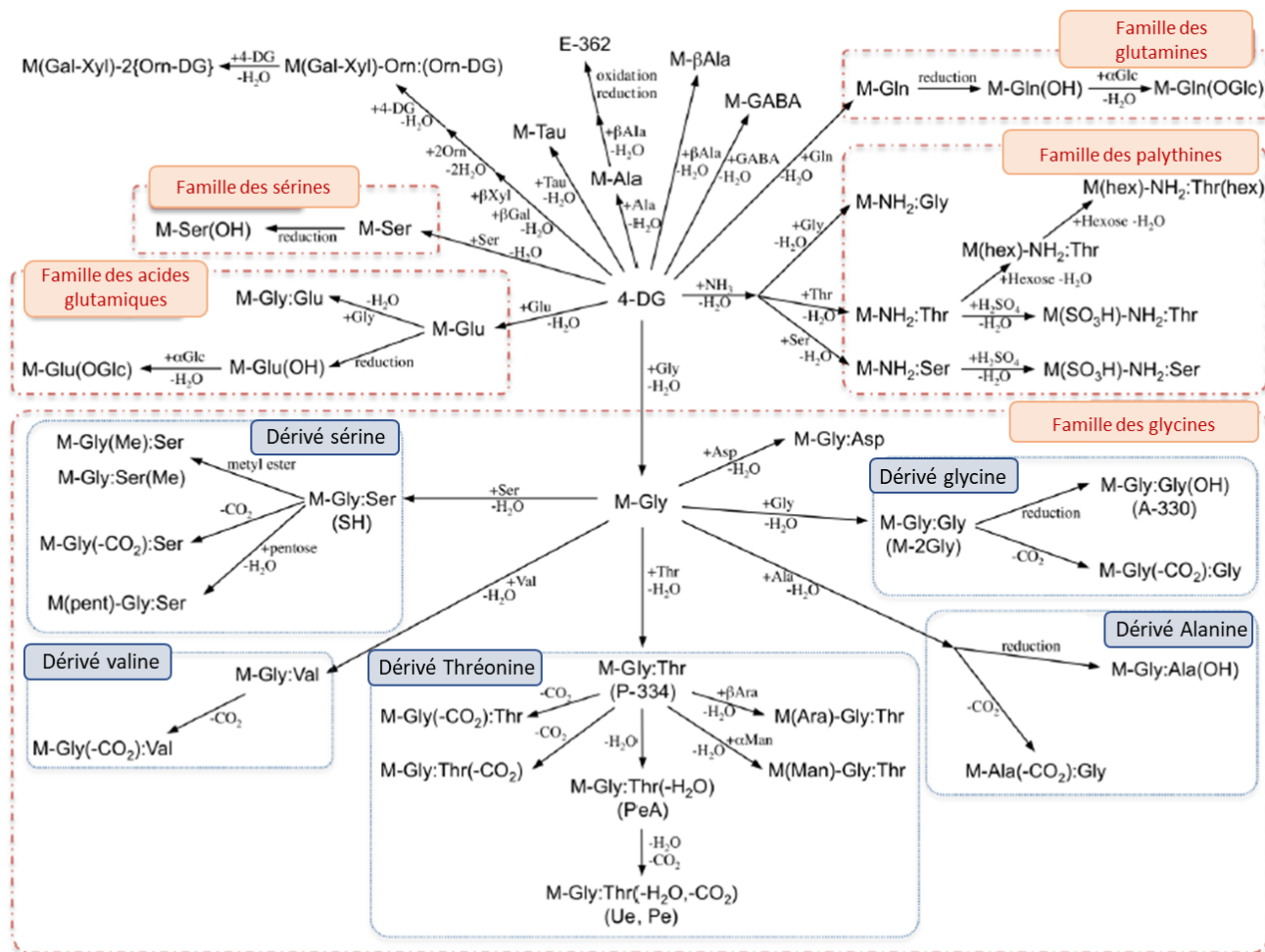


Figure 15: Schéma présentant les réactions engendrant la différenciation structurale des acides aminés mycosporine-like. (traduit de Wada, Sakamoto et Matsugo, 2015).

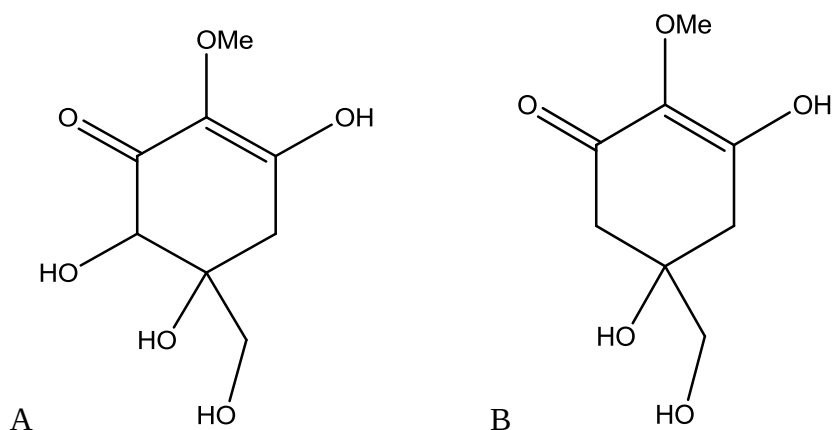


Figure 16: Schémas présentant la structure moléculaire du gadusol (A) et du 4-deoxygadusol (B) les précurseurs d'acides aminés mycosporine-like (MAAs).

Tableau VI: Tableau citant les MAAs de type Aminocyclohexenone décritent dans la littérature.

Nom	Structure (Référence annexe)	λ max (nm) [ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)]	Masse Molaire	Activités	Espèces	Articles	Figure
Mycosporine –Glycine [M-Gly]	C10H15NO6	310	245	DPPH ; ABTS ; LPI ; SOQ ; PP	<i>Palythoa tuberculosa</i> (Cnidaria, Zoantharia)	Ito et Hirata, 1977; White, Camack et Sakuma, 1989	(a)
Mycosporine –Taurine [M-Tau]	C10H17NO7S	309	295	HPQ	<i>Anthopleura elegantissima</i> (Cnidaria, Actiniaria)	Stochaj, Dunlap et Shick, 1994	(b)
Mycosporine-Alanine [M-Ala]	C11H17NO6	310 [640]	259	-	<i>Colletotrichum graminicola</i> (Ascomycota, Incerta sedis)	Leite et Nicholson, 1992	(c)
Mycosporine-β-Alanine [M- βAla]	C11H17NO6		259	-	<i>Radianthus sp.</i> (Cnidaria, Actiniaria)	Nakamura, Kobayashi et Abe, 1984	(d)
M-γ-aminobutyric acid [M-GABA]	C12H19NO6	310	273	ABTS	<i>Nostoc commune</i> (Cyanobacteria, Nostocales)	Nazifi <i>et al.</i> 2015	(e)
Mycosporine-Serine [M-Ser]	C ₁₁ H ₁₇ NO ₇	310	275	-	<i>Stereum hirsutum</i> (Basidiomycota, Russulales) <i>Pyronema omphalodes</i> (Ascomycota, Pezizales)	Arpin, Curt et Favre-Bonvin, 1979	(f)
Mycosporine-Serinol [M-Ser(OH)]	C ₁₁ H ₁₉ NO ₆	310 /365 [27.270]	261	-	<i>Lichina pygmaea</i> (Ascomycota, Lichinomycetes)	Favre-Bonvin, Arpin et Brevard, 1976; Lunel, Arpin et Favre-Bonvin, 1995; Le Pogam <i>et al.</i> 2015	(g)
Mycosporine-Acide Glutamique [M-Glu]	C ₁₃ H ₁₉ NO ₈	311 [20 900]	317	-	<i>Glomerella cingulata</i> (Ascomycota, Sordariomycetes)	Young et Patterson 1982	(h)
Mycosporine-Glutamicol [M-Glu(OH)]	C ₁₃ H ₁₉ NO ₆ C ₁₃ H ₂₁ NO ₇	310	285 ou 303	-	<i>Pyronema omphalodes</i> (Ascomycota, Pezizales) <i>Gnomonia leptostyla</i> (Ascomycota, Diaporthales)	Lunel, Arpin et Favre-Bonvin, 1980 Fayret <i>et al.</i> 1981	(i)
Mycosporine-Hydroxyglutamicol [M-Glu(OH)2]	C ₁₃ H ₂₁ NO ₈	310	319	-	<i>Degelia plúmbea</i> , <i>Nephroma laevigatum</i> (Ascomycota, Lecanoromycetes)	Roullier <i>et al.</i> 2011	(j)
Mycosporine-Glutamine [M-Gln]	C ₁₃ H ₂₂ N ₂ O ₆	310	317	-	<i>Pyronema omphalodes</i> (Ascomycota, Pezizales) <i>Glomerella cingulata</i> (Ascomycota, Sordariomycetes)	Bernillon <i>et al.</i> 1984	(k)
Mycosporine-Glutaminol [M-Gln(OH)]	C ₁₃ H ₂₂ N ₂ O ₆	310	302	-	<i>Deuteromycetes sp.</i>	Pittet <i>et al.</i> 1983 Lemoyne <i>et al.</i> 1985	(l)

Activités mesurées : DPPH : Antiradicalaire au test DPPH ; LPI : Inhibition de la Peroxydation des lipides ; ABTS : Antioxydant au test ABTS (radicaux cationiques) ; SP : Antioxydant au test superoxyde ; SOQ : Singlet Oxygen Quencher ; HPQ : Hydrogen Peroxide Quenching ; PP : Activité photoprotectrice

Les oxo-mycosporines qualifient les MAAs ne présentant qu'un seul acide aminé lié au cycle cyclohexénone. Ces molécules sont caractérisées par leur absorbance à 310 nm. L'ensemble des molécules appartenant au groupe des oxo-mycosporines est présenté dans le **Tableau VI**.

Les MAAs di-substituées décrites dans la littérature sont présentées dans le **Tableau VII**.

De nombreuses études portent sur l'étude de la stabilité des mycosporines face à l'exposition à différents facteurs pouvant entraîner leur dégradation. L'exposition au rayonnement UV sur une période prolongée (24h) ou l'irradiation à des températures élevées (75°C) n'entraînent pas de diminution significative de la concentration de l'extrait en shinorine ou de son absorption (Adams *et al.*, 1996 ; Sinha *et al.*, 2000). Certaines MAAs étudiées (porphyra-334, la shinorine et la palythine) présentent aucune propriété fluorescente, ni de production de radicaux libres. Les résultats montrent une très forte stabilité des composés type imino- ou oxo- mycosporines (Whitehead et Hedges, 2005 ; Balskus et Walsh, 2010 ; Shukla *et al.* 2016).

Ces composés ont démontré des activités anti-oxydantes importantes. Dunlop et Yamamoto (1995) ont étudié l'activité anti-oxydante de la mycosporine-glycine et ont observé une protection de ce composé lors du stress oxydatif induit par les Dérivés Réactifs de l'Oxygène (DRO). Cette activité anti-oxydante est également retrouvée chez le composé 4-déoxygadusol, l'un des précurseurs de MAAs. Sa rétro-biosynthèse est d'ailleurs appliquée chez les bactéries afin de produire ce précurseur pour des applications commercialisées (Dunlop et Sick, 1998). Cette activité n'est cependant pas présente chez toutes les MAAs, les imino-MAAs telles que la shinorine et porphyra-334 ne sont pas actives. Par contre, l'étude de la photodégradation et de la photosensibilité réalisée sur ces molécules, ont démontré leur stabilité et leur rôle d'écran solaire (Whitehead et Hedges, 2005).

Tableau VII: Tableau citant les MAAs de type Aminocyclohexenimine décrits dans la littérature.

Nom	Structure	λ max (nm) [ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)]	Masse molaire	Activité	Espèces	Articles	Figure (Annexe)
Porphyra-334 [P-334 ; M-Gly:Thr]	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₈	334 [42300]	346	LPI ; DPPH ; ABTS ; SP ; SOQ ; PP	<i>Porphyra tenera</i> (Rhodophycée, Bangiales)	Takano <i>et al.</i> 1979	(m)
Acide Palythénique [PeA]	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₇	337 [29200]	328	-	<i>Halocynthia roretzi</i> (Chordata, Pleurogona)	Kobayashi, Nakamura et Hirata, 1981	(n)
Usujirène [Ue]	C ₁₃ H ₂₀ N ₂ O ₅	357	285	LPI	<i>Palmaria palmata</i> (Rhodophycée, Palmariales)	Sekikawa <i>et al.</i> 1986	(o)
Palythène [Pe]	C ₁₃ H ₂₀ N ₂ O ₅	360 [50000]	285	LPI	<i>Palythoa tuberculosa</i> (Cnidaria, Zoantharia)	Takano, Uemura et Hirata, 1978 ; Uemura <i>et al.</i> 1980	(p)
Shinorine [SH ; M-Gly:Ser]	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₈	333 – 334 [44700]	332	LPI ; ABTS ; SP	<i>Mytilus galloprovincialis</i> (Mollusca, Mytiloida) <i>Chondrus yendo</i> (Rhodophycée, Gigartinales)	Tsujino, 1980	(q)
Mycosporine-2-glycine [M-2Gly ; M-Gly:Gly]	C ₁₃ H ₂₀ N ₂ O ₇	331	316	-	<i>Anthopleura elegantissima</i> (Cnidaria, Actiniaria)	Shick <i>et al.</i> 1992	(r)
Asterina-330 [A-330 ; M-Gly:Gly(OH)]	C ₁₃ H ₂₀ N ₂ O ₆	330 [43800]	288	LPI ; ABTS ; SP ; HPQ	<i>Asterina pectinifera</i> (Echinodermata, Valvatida)	Nakamura, Kobayashi et Hirata, 1981	(s)
Palythanol [Pinol ; M-Gly:Ala(OH)]	C ₁₃ H ₂₂ N ₂ O ₆	332 [43500]	302	-	<i>Palythoa tuberculosa</i> (Cnidaria, Zoantharia)	Takano, Uemura et Hirata, 1978	(t)
Palythine [Pi, M-NH ₂ :Gly]	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₅	320 [35500 – 36200]	244	DPPH ; SOQ ; HPQ	<i>Chondrus yendo</i> (Rhodophycée, Gigartinales) <i>Palythoa tuberculosa</i> (Cnidaria, Zoantharia)	Takano, Uemura et Hirata, 1978 ; Tsujino <i>et al.</i> 1978	(u)
Activités mesurées : DPPH : Antiradicalaire au test DPPH ; LPI : Inhibition de la Peroxydation des lipides ; ABTS : Antioxydant au test ABTS (radicaux cationiques) ; SP : Antioxydant au test superoxyde ; SOQ : Singlet Oxygen Quencher ; HPQ : Hydrogen Peroxide Quenching ; PP : Activité photoprotectrice							

Nom	Structure	λ max (nm) [ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)]	Masse Molaire	Activité	Espèces	Articles	Figure (Annexe)
Palythine-thréonine [PT ; M-NH ₂ :Thr]	C ₁₃ H ₂₂ N ₂ O ₆	320	302	-	<i>Pocillopora eydouxi</i> (Cnidaria, Sceractinia) <i>Styllopora pistillata</i> (Cnidaria, Scleractinia)	Carreto, Carignan et Montoya, 2005 ; Carignan <i>et al.</i> 2009	(v)
Palythine-serine [PS ; M-NH ₂ :Thr]	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₆	320 [10500]	288	-	<i>Pocillopora eydouxi</i> (Cnidaria, Sceractinia)	Teai <i>et al.</i> 1997	(w)
Euhalothece-362 [E-362]	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₇	362	330	-	<i>Euhalothece</i> LK-1 (Cyanobacteria)	Volkman <i>et al.</i> 2006	(x)
M-Glycine : Acide glutamique [M-Glu:Gly]	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₉	330 [43900]	374	-	<i>Dysidea herbacea</i> (Porifera, Dictyoceratida)	Betaranayake, Bemis et Bourne, 1996	(y)
M-Glycine : Acide aspartique [M-Gly:Asp]	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₉	332 – 334	360	-	<i>Artemia cysts</i> (Arthropoda, Anostraca)	Grant <i>et al.</i> 1985	(z)
M-Glycine : Valine [M-Gly:Val]	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₄	335	344	-	<i>Phaeocystis antarctica</i> (Haptophyta, Phaeocystales)	Karentz <i>et al.</i> 1991	(aa)
M-Methylamine : Thréonine [M-MA:Thr]	C ₁₃ H ₂₂ N ₂ O ₆	330 [33300]	302	-	<i>Pocillopora damicornis</i> <i>Stylophora pistillata</i> (Cnidaria, Scleractinia)	Won, Rideout et Chalker, 1995	(ab)
M-Methylamine:Serine [M-MA:Ser]	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₆	325 [16600]	288	-	<i>Pocillopora eydouxi</i> (Cnidaria, Sceractinia)	Teai <i>et al.</i> 1997	(ac)
Aplysiapalythine A [APA ; M-Gly :Thr(-CO ₂)]	C ₁₃ H ₂₂ N ₂ O ₆	332	302	-			(ad)
Aplysiapalythine B [APB ; M-Gly:Ala(-CO ₂)]	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₅	332	272	-	<i>Aplysia californica</i> (Mollusca, Anaspidea)	Kamio <i>et al.</i> 2011	(ae)
Aplysiapalythine C [APC ; M-Gly:Gly(-CO ₂)]	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₅	330	258	-			(af)
Activités mesurées : DPPH : Antiradicalaire au test DPPH ; LPI : Inhibition de la Peroxydation des lipides ; ABTS : Antioxydant au test ABTS (radicaux cationiques) ; SP : Antioxydant au test superoxyde ; SOQ : Singlet Oxygen Quencher ; HPQ : Hydrogen Peroxide Quenching ; PP : Activité photoprotectrice							

5. Marché économique des macroalgues

Les algues sont consommées depuis de nombreuses générations principalement sur le continent asiatique, mais leur consommation devient de plus en plus populaire dans la culture occidentale. Cet intérêt est notamment dû à la demande croissante de nouvelles sources de matière naturelle ayant des propriétés en nutrition santé. La connaissance de la ressource et l'apport des algues en protéines, minéraux et vitamines ainsi que le développement de l'algoculture marine ont entraîné un changement des pratiques de la consommation d'algue. Le marché reste encore largement ouvert, car en 2005, les algues ne représentaient que 1% des aliments consommés dans le monde (Patzek et Pimentel, 2005). Les bénéfices sur la santé d'une consommation d'algue sont largement étudiés et reconnus du fait de la diversité et la richesse de leur composition. Le marché actuel s'est développé autour de 145 espèces principalement du genre *Enteromorpha* (Chlorophycée, Ulvales), *Monostroma* (Chlorophycée, Ulotrichales), *Caulerpa* (Chlorophycées, Bryopsidales), *Laminaria* (Phéophycées, Laminariales), *Undaria* (Phéophycées, Laminariales), *Hizikia* (Phéophycée, Fucales), *Palmaria* (Rhodophycées, Palmariales), et *Porphyra* (Rhodophycée, Bangiales) face à plus de 10 000 espèces recensées. Les applications s'orientent actuellement autour des propriétés texturantes, aromatisantes dans l'alimentation humaine.

5.1. Marché des fertilisants

Les macroalgues sont historiquement utilisées par les agriculteurs pour l'enrichissement des sols et le traitement des cultures. Les goémoniers récoltaient les algues échouées sur les côtes. L'agriculture s'étant intensifiée et les rendements devant être mieux contrôlés, les groupements agricoles se sont tournés vers l'industrie de la chimie pour la fabrication de fertilisants chimiques. Avec l'effervescence d'études démontrant les conséquences des traitements des cultures sur la santé et l'environnement, l'agrochimie revient, à présent, vers la production de fertilisants et d'amendement d'origine naturel. L'intérêt historique pour les algues est renaissant et de nombreuses études montrent que l'application des algues ou de leurs extraits sur les cultures ont un apport positif certain au développement et à la protection des plantes (Sharma *et al.* 2014 ; Hernández-herrera *et al.* 2014). Les algues par l'apport important en macro et micro nutriments, en vitamines, en acides aminés et en hormones végétales (auxines, cytokines et gibbérellines) jouent le rôle de biofertilisants, stimulent le conditionnement des graines et la croissance (Daume, Long et Crouch 1993, Kumar et Sahoo, 2011). Ces études ont permis de montrer une stimulation de la

germination, une croissance plus rapide de la plante et de la production de fruits. Cet effet stimulateur serait notamment dû à l'augmentation de l'incorporation des nutriments (Norrie, Branson et Keathley, 2001 ; Arthur et al., 2003 ; Mancuso et al., 2006) et des modifications morphologiques avec un développement plus important du nombre de racines latérales augmentant ainsi sa surface d'échange (Hernandez-Herrera et al. 2014 ; Satish et al. 2015).

Les extraits sont également reconnus pour stimuler les défenses des plantes contre les parasites et les maladies (Allen *et al.*, 2001, Cluzet *et al.*, 2004), mais également favoriser son adaptabilité aux variations environnementales avec une meilleure tolérance à la chaleur, au manque d'eau et à l'augmentation de la concentration en sels (Zhang et Ervin 2004 ; Mancuso 2006 ; Zhang et Ervin, 2008). Il a été également étudié l'apport en engrais des biofertilisants à base d'algues par rapport aux autres types de traitements tels que les fertilisants chimiques ou les lisiers. La richesse de la composition nutritionnelle des algues entraîne un apport organique plus important. Il a été démontré une capacité à retenir davantage l'humidité.

Les espèces les plus valorisées dans ce domaine sont les algues brunes telles que *Ascophyllum nodosum*, *Fucus* sp. (Phéophycées, Fucales), *Ecklonia maxima* et *Laminaria* sp. (Phéophycées, Laminariales) du fait d'une utilisation culturellement connue. Cependant, les études scientifiques cherchent à démontrer l'activité d'autres espèces et notamment les macroalgues appartenant aux *Chlorophyceae* et *Rhodophyceae*. Ce type de fertilisants possède des avantages certains en comparaison avec les concurrents. Ils présentent notamment l'avantage d'être une ressource disponible sur l'estran, une durée de vie plus longue, une manipulation non toxique et un apport en nutriments plus important (Fleurence et Levine, 2016).

5.2. *Marché de la médecine*

Les études menées sur la biomasse algale a mis en exergue plus de 15000 composés naturels prometteurs de par leurs activités biologiques suggérant une application potentielle dans le secteur de la médecine (Naseri, Holdt et Jacobsen, 2016). Les molécules extraites des algues ont démontré, en effet, de nombreuses activités parmi lesquelles des activités antimicrobienne, antifongique, antivirale, antocoagulante, immunostimulante, anti-inflammatoire, antimalariale (Smit, 2004 ; P MacArtain *et al.*, 2007 ; Mayer, 2009 ; Holdt et Kraan, 2011 ; Wijesinghe et Jeon, 2012 ; Ferraces-Casais *et al.*, 2012 ; Prabha, Prakash et Sudha, 2013 ; Sharifuddin *et al.*, 2015 ; Michalak et Chojnacka, 2015 ; Naseri, Holdt et Jacobsen, 2016).

Tableau VIII: Tableau présentant les composés des Rhodophycées démontrant des activités dans le domaine de pharmaceutique.

Composés	Espèces de Rhodophycées	Activités	Références
PUFAs	<i>Gracilaria corticata</i>	Antibactérienne <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Stapylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	Choudhury <i>et al.</i> 2005
Flavonoïdes	<i>Gracilaria dendroides</i>		Plaza <i>et al.</i> 2010
Polysachharides sulfatés	<i>Constantinea simplex</i> <i>Farlowia mollis</i> <i>Sphaerococcus</i> <i>Coronopifolius</i> <i>Boergeseniella thuyoides</i>	Antivirale Virus de l'Herpès <i>simplex</i> de type 1 (VHS-1) et de type 2 (VHS-2), Virus de la vaccine, Virus de la stomatite vésiculaire, Virus de l'encéphalomyocarde, Virus de la forêt de Semliki, Cytomégalo virus murin, Virus de l'immunodéficience humaine.	Richards <i>et al.</i> 1978, Bouhlal <i>et al.</i> 2011
Galactofucanes sulfatés	<i>Gigartina Atropurpurea</i> <i>Plocamium cartilagineum</i>	Cellules : Fibroblaste du prépuce humain, cellules Vero.	Harden <i>et al.</i> 2009
Bromophénols	<i>Polysiphonia morrowii</i>	Antivirale Virus pathogènes chez le poisson : Virus infectieux de la nécros hématopoïétique, Virus infectieux de la nécrose pancréatique.	Kim <i>et al.</i> 2011
Terpènes	<i>Laurencia dendroide</i> <i>Gracilaria edulis</i>	Antifongique <i>Colletotrichum lagenarium</i> <i>Aspergillus flavus</i>	Peres <i>et al.</i> 2012
Acides Aminés mycosporine-likes (MAAs)	<i>Porphyra yezoensis</i>	Antioxydants Méthode au thiocyanate de fer Méthode à l'acide thiobarbiturique	Nakayama <i>et al.</i> 1999
Lactones, Phénols, Triterpènes, Stéroïdes,	<i>Dichotomaria obtusata</i>	Anti-inflammatoire Tests <i>in-vivo</i> : Oedème de l'oreille induit par 12-O-tetradecanoylphorbol acétate	Vàzquez <i>et al.</i> 2011

Cependant, au contraire des plantes terrestres, les macroalgues ne sont encore très peu exploitées et commercialisées par l'industrie médicinale (Smit, 2004). Certains de ces composés extraient des Rhodophycées sont présentés dans le **Tableau VIII**.

L'application principale des composés extraits des algues marines est l'utilisation des phycocolloïdes comme agent texturant, mucoprotecteur (sirop contre les ulcères, pommades contre les hémorroïdes, agent protecteur dans les pansements pour les accidentés de la route...). Les applications reconnues chez les macroalgues sont leurs propriétés antioxydantes du fait que certaines molécules puissent neutraliser les radicaux libres entraînant des réactions en chaîne dans les cellules. Ceci permet de réduire les risques de mutations cellulaires à l'origine de cancers et de maladies cardiaques (Yan, Nagata et Fan, 1998). De nombreuses études ont montré l'intérêt des phycobiliprotéines pour leur activité antioxydante (Tello-Irelet *et al.*, 2011 ; Sanz-Pintos *et al.*, 2017).

En plus de sa propriété de colorant rose-rouge, la phycoérythrine possède une fluorescence jaune, elle est ainsi utilisée en recherche médicale, en immunologie ou encore en biologie cellulaire (Sekar et Chetramohan 2008, Senthilkumar *et al.*, 2013). Pour finir, les phycobiliprotéines ont démontré de nombreuses activités biologiques (Sekar et Chetramohan, 2008). Par exemple, chez la *Portiera hornemannii* (Gigartinales), la phycoérythrine a été mise en avant comme bonne candidate pour augmenter la sensibilité de certaines cellules cancéreuses, les rendant alors plus vulnérables aux médicaments conventionnels tout en diminuant leurs effets secondaires (Senthilkumar *et al.*, 2013).

Certaines publications citent des effets positifs sur le cancer du sein, des maladies cardiaques, des problèmes de thyroïde, de la réponse immunitaire, l'inflammation et des activités à la fois antivirales et antibactériennes (Philpott et Bradford, 2006). De nombreuses recherches font la promotion des macroalgues comme agent antiviral pour le traitement de maladies sexuellement transmissibles liées aux Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) ou le virus de l'Herpes (HSV-1, Herpès simplex virus type 1) (Mendis et Kim, 2011).

Différentes études montrent qu'un apport minéral serait probablement responsable d'effet sur le traitement de la thyroïde (Burtin 2003, Mendis et Kim, 2011). L'utilisation de la ressource macroalgale naturelle reste cependant complexe pour la valorisation des minéraux car la composition varie au cours du cycle de croissance des algues. Pour limiter ce problème, des études s'orientent vers le développement de l'algoculture afin de pouvoir mieux contrôler et orienter la

composition minérale (Ross *et al.*, 2008). Les phycobiliprotéines ont un intérêt dans le domaine de la pharmaceutique, ces molécules peuvent représenter jusqu'à 50% de la part totale en protéine chez certaines espèces. Parmi ces composés, la phycoérythrine présente chez *Porphyridium cruentum* et *Palmaria palmata* suscite un intérêt en tant que principe actif (Boussiba et Richmond, 1979 ; Fan-Jie *et al.*, 1984). Leur bénéfice pour la santé a été étudié pour la prévention des risques et le traitement de certaines maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer et de Parkinson) causés par un stress oxydatif qui conduit également à la formation d'ulcères de l'intestin et de certains cancers (Gonzalez *et al.*, 1999, Padula et Boiteux, 1999 ; Michikawa *et al.*, 2012 ; Reiter *et al.*, 2013 ; Collins *et al.*, 2016). Cependant, le marché s'intéresse également aux phycobiliprotéines pour leur propriétés anti-oxydantes (Zubia, Freile-Pelegrín et Robledo, 2014 ; Wu *et al.* 2015) et anti-inflammatoires (Lee et Kim et Nam, 2017). Ces composés offrent diverses perspectives de développement industriel, notamment leur incorporation dans la formulation de produit alimentaire (gomme, glaces, sucreries et produits laitiers) (Baweja et Sahoo, 2015).

Les macroalgues ont aussi un intérêt dans le domaine de la médecine du fait de la quantité importante en vitamine C. Ce composé est reconnu pour renforcer le système de défense immunitaire, améliorer l'absorption du Fer au niveau intestinal, de piéger la vitamine E et ainsi limiter l'oxydation de lipoprotéine de faible densité. La présence de gamma et alpha tocophérol est également intéressante pour la prévention des risques cardiovasculaires (Burtin, 2003 ; Holdt et Kraan, 2011 ; Mohamed, Hashim et Rahman, 2012).

5.3. Le marché des cosmétiques

Les algues en France sont très utilisées dans le secteur des cosmétiques. Ainsi, 5% des espèces sont concernées, elles représentent environ 30 espèces. Elles peuvent être employées comme excipients (2-20%) pour leurs propriétés gélifiantes ou épaississantes. Sous forme de poudres capables de se disperser dans l'eau, elles entrent alors dans la formulation de gels aqueux, de gels solaires protecteurs comme des gels cicatrisants après-soleil, des gels anti-inflammatoires, d'agents gainants pour les cheveux dans les lotions capillaires, fixateurs pour cheveux, les lotions démêlantes. Les extraits d'algues peuvent intervenir également comme actifs (0,2-2%) pour leurs propriétés tonifiantes, hydratantes, nourrissantes ou anti-radicalaires. Enfin, ils peuvent être intégrés comme additifs

Tableau IX: Les principes du concept de la chimie verte définis par Paul Anastas et John C. Warner.

Concept de la chimie Verte	
Toxicité	- Gestion visant à contrôler et réduire la production des déchets. - Limiter l'utilisation de composés chimiques toxiques dans la conception des produits. - Limiter les réactions chimiques présentant des produits à forte toxicité. - Remplacement des solvants toxiques par des alternatives moins toxiques.
Ressources	- Gestion des ressources en favorisant les matières premières renouvelables vis-à-vis des ressources fossiles.
Optimisation	- Optimiser les réactions chimiques par l'utilisation de catalyseur permettant la réduction de consommation en réactifs. - Minimiser les étapes réactionnelles intermédiaires. - Développer le concept de bioraffinerie afin d'optimiser la transformation complète de la matière première. - Analyser le procédé en continu et prévenir la production de sous-produits afin de les limiter.
Énergétique	- Optimiser l'efficacité énergétique du procédé, limiter les pertes énergétiques.
Biodégradation	- Prévenir les risques de production de composés toxiques sensibles pour l'environnement lors de la dégradation du produit.
Accident	- Réduire les risques accidentogènes dans la conception des produits.

(<0,2%) pour leurs propriétés colorantes, aromatisantes ou conservatrices : masques, enveloppements. Trois types d'algues sont classiquement utilisés en cosmétologie : *Fucus*, *Ascophyllum*, et quelques espèces de *Laminaria*. Cependant, l'action de ces algues sur la peau ou les cheveux est en fait mal déterminée. Les algues sont utilisées sous forme séchées, microéclatées ou lyophilisées, sous forme de bouillies ou cryobroyées, elles peuvent être employées en cytofiltrats, extraits aqueux, alcooliques, glycolipidiques...En général, les algues n'entrent qu'en faible proportion dans la composition de ces nouveaux produits qui affichent "principe actif marin" (Bedoux *et al.* 2014).

6. Les technologies appliquées à l'extraction de molécules naturelles

6.1. L'orientation vers la chimie « verte »

Le domaine de la chimie occupe une place importante dans le secteur industriel et représente le bassin le plus important en termes d'emploi et de chiffres d'affaires (Antoniotti, 2013). Les applications liées à la chimie sont représentées dans tous les domaines agroalimentaire, santé, cosmétiques, parfumerie mais également dans les domaines de l'électronique, de la construction et de l'hygiène. La chimie dans le domaine industriel est également qualifiée de polluante au niveau environnementale et toxique malgré cela, ses applications sont indispensables dans la production industrielle actuelle (Antoniotti, 2013 ; Sarrade, 2015). Une prise de conscience de l'impact de nos modes de consommation a entraîné la mise en place de mesures restrictives visant à faire évoluer l'impact environnemental des pratiques industrielles. La réglementation industrielle sur l'impact écologique évolue également dans ce sens, c'est dans ce contexte que le concept de la chimie verte développé par Paul Anastas et John C. Warner est né (Sarrade, 2015). Le concept de la chimie verte vise à identifier les risques dans la conception des produits, de les prévenir et d'identifier des alternatives afin de les éliminer. Les grands principes de ce concept sont définis par 12 points détaillés dans le **Tableau IX**.

Ces différents principes sont destinés à l'ensemble des domaines de la chimie. Certaines pratiques peuvent être appliquées dans le domaine de la chimie des produits naturels. Au niveau industriel, une recherche importante a été réalisée pour l'optimisation des procédés afin de réduire les coûts de production. La recherche s'oriente de plus en plus vers l'étude de l'application de solvants alternatifs dans les procédés de production afin de réduire les risques sanitaires et environnementaux.

6.2. Les technologies conventionnelles

Les méthodes conventionnelles d'extraction incluant l'extraction au Soxhlet, la macération, la percolation et la sonication sont utilisées depuis de nombreuses années et ont participé au développement de l'industrie de l'extraction de molécules naturelles. Cependant, ces techniques sont très consommatrices en énergie du fait des temps de traitements importants et très polluantes du fait de l'utilisation d'une quantité importante de solvant à recycler (Kaufmann et Christen, 2002).

L'extraction par solvant est la plus ancienne des méthodes traditionnelles. Ce type d'extraction est dépendante de plusieurs facteurs intervenant sur la solubilité des composés chimiques et sur l'efficacité du transfert de masse parmi lesquelles, la nature du solvant utilisé, l'énergie appliquée et l'agitation du mélange solvant/produit (Awika *et al.*, 2003). Le choix du solvant ou d'un mélange de solvants est lié directement à la nature des composés d'intérêt ciblés mais également au type de biomasse traitée. Le facteur principal intervenant sur le choix du solvant est la polarité des molécules, les composés lipophiles vont nécessiter l'application de solvants non polaires tandis que les composés hydrophiles vont nécessiter l'utilisation de solvants plus polaires. Cependant, le mélange de différents solvants permet une diversité de polarité entre le solvant le plus polaire, l'eau, et les plus apolaires à longue chaîne carbonée tel que l'hexane, le pentane et le cyclohexane. Toutefois d'autres facteurs physicochimiques parmi lesquels le poids moléculaire peut influencer l'extraction de certains composés. Xu et Chang (2007) ont démontré l'effet du solvant sur l'extraction des polyphénols. Les polyphénols de faible poids moléculaire ont plus d'affinités vis-à-vis du méthanol alors que ceux de haut poids moléculaire vont s'extraire davantage dans un solvant acétone/eau.

Certaines méthodes conventionnelles font également intervenir des acides tels que l'acide formique, acétique, citrique et phosphorique afin d'améliorer l'extraction de certains composés. Ces méthodes améliorent sensiblement la dénaturation membranaire entraînant la libération de composés d'intérêt (Nicoué *et al.*, 2007). Ces méthodes dites conventionnelles présentent de nombreux désavantages. D'une part, elles nécessitent l'utilisation d'une quantité importante de solvant et d'eau pour l'obtention de composés présentant des puretés critiquables du fait de la co-extraction d'impuretés auxquelles s'ajoute l'application d'étapes intermédiaires de séparation et de concentration énergivores. D'autre part, du fait de ces traitements cela engendre la dénaturation de composés thermolabiles ayant un intérêt pour la valorisation. Enfin, l'utilisation de solvants organiques pose

des limites importantes dans la valorisation des extraits du fait de la toxicité des résidus pouvant être présents. Un exemple d'application particulièrement consommatrice est l'extraction des lipides par voie conventionnelle. Le procédé d'extraction appliqué pour l'obtention de lipides à partir d'une matière première est basée sur une méthode faisant intervenir un solvant organique mis en contact avec une matière solide appelé extraction solide/liquide (S/L). Le rapport entre la quantité de phase liquide et phase solide peut varier en fonction des méthodes. Cependant, le mélange de solvants généralement utilisé lors des méthodes conventionnelles est composé de chloroforme, méthanol et d'eau dans les proportions 2/2/1 (v/v/v), respectivement (Bligh et Dyer, 1959). L'utilisation de ces trois solvants a démontré que le chloroforme permet de dissoudre les acides gras alors que le méthanol inactive les lipases présentes en solution et casse les liaisons protéines-lipides (Maciel *et al.*, 2016). L'eau étant non miscible avec le chloroforme permet d'obtenir un système biphasique entraînant la séparation entre différents composés en solution et les lipides, ces derniers ayant plus d'affinité avec la phase organique. Ce procédé d'extraction nécessite d'être répété au moins deux à trois fois afin d'atteindre un rendement d'extraction optimal, ceci entraîne des temps d'extraction relativement longs pouvant engendrer une oxydation des lipides. De plus, la consommation de solvant est importante produisant un volume de déchets coûteux à retraiter.

Les chercheurs se sont donc orientés vers l'application de la centrifugation qui permet d'augmenter la vitesse de transfert des composés de la phase solide vers la phase liquide réduisant significativement le temps d'extraction.

6.3. Les technologies innovantes

6.3.1. L'extraction par fluide supercritique

L'extraction par fluide supercritique est une méthode écoresponsable utilisée pour l'extraction de composés généralement apolaires (lipides, caroténoïdes,) ne consommant que très peu de solvants organiques (Fattori *et al.*, 1988 ; Awasthi et Trivedi., 1997 ; Grosso *et al.*, 2015).

L'extraction en condition supercritique représente un état physique de la matière régi par un couple pression/température déterminant le point critique dépendant du fluide utilisé. Cet état de la matière qualifié de ni liquide ni solide confère des propriétés idéales pour l'extraction de composés à hautes valeurs ajoutées. L'état de la matière d'un fluide peut être déterminé suivant le diagramme de phase du produit. La **Figure 17** présente le diagramme de phase du dioxyde de carbone.

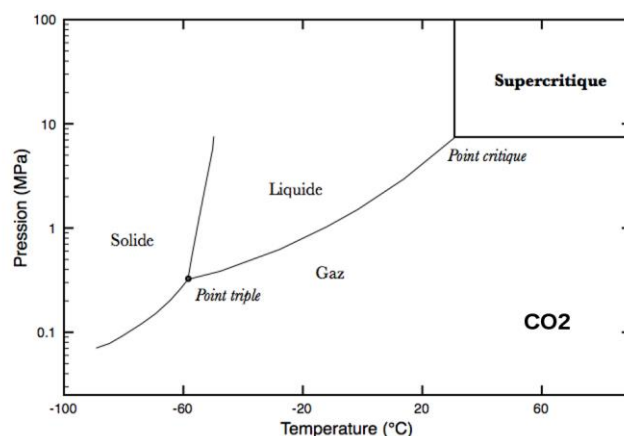


Figure 17 : Schéma représentant le diagramme de phases du dioxyde de carbone (<http://planet-terre.ens-lyon.fr/article/fluide-supercritique.xml>)

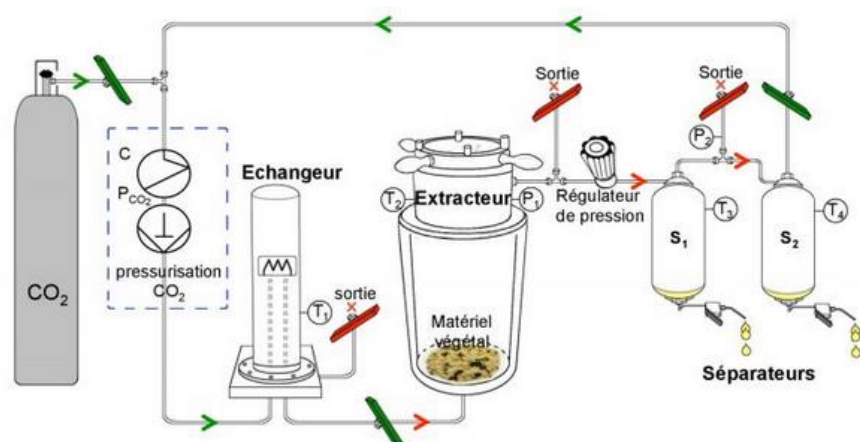


Figure 18 : Schéma représentant l'appareillage du procédé d'extraction au CO₂ supercritique. (UTC Compiègne ; <http://www.tai-team.fr/fr/equipement/co2-supercritique>)

Les propriétés les plus importantes lors de la sélection d'un fluide supercritique sont sa densité, sa viscosité, sa diffusivité, sa capacité d'échauffement et sa conductivité thermique. Une densité élevée va contribuer à augmenter le pouvoir de solubilité des composés, alors qu'une viscosité faible va permettre une meilleure pénétration du fluide au sein de la matière et facilite l'écoulement du fait d'une diminution des forces de frottement.

Pour ce type d'application, le dioxyde de carbone est le fluide majoritairement utilisé du fait de ses propriétés physico-chimiques lui permettant d'atteindre son point critique pour un couple de 79,3 bars/31,1°C atteignables avec les technologies actuelles. Cette technique regroupe les conditions idéales à l'extraction de composés photosensibles (Brunner, 2009). Cet état de la manière confère au dioxyde de carbone une faible viscosité et une forte diffusivité, lui permettant d'augmenter les surfaces d'échanges avec la matière du fait d'une pénétration et une diffusivité améliorées (Careri *et al.*, 2001; Ali-Nehari *et al.*, 2012). L'utilisation du dioxyde de carbone est également intéressante pour son coût et son importante pureté, mais également pour sa manipulation sécurisante, sa non toxicité et sa présence résiduelle dans les extraits. Effectivement, la majeure partie du fluide contenue dans le produit est éliminée lors de la détente en sortie du système du fait du retour à l'état gazeux du CO₂ (Careri *et al.*, 2001 ; Mendes *et al.*, 2003 ; Macías-Sánchez *et al.*, 2008 ; Quitain *et al.*, 2013). Un schéma du système de CO₂ supercritique est présenté par la **Figure 18**.

Les propriétés du CO₂ à l'état supercritique peuvent être résumées en quelques mots, ce fluide permet de dissoudre les composés apolaires ou très faiblement polaires, son pouvoir solvant est très intéressant pour les molécules de faible poids moléculaire et diminue vis-à-vis de composés présentant des poids moléculaires d'autant plus importants. Ce solvant possède également une forte affinité pour les composés organiques oxygénés. Étant un solvant polaire, le CO₂ supercritique ne permet pas de solubiliser des composés du type protéine, polysaccharide, sucre et minéraux, tout comme il n'est pas soluble à l'eau hormis si la température soit supérieure à 100°C. Cependant, une augmentation de la pression supérieure au point critique au sein du système peut permettre au CO₂ de séparer des molécules peu volatiles présentant des poids moléculaires ou une polarité plus importante (del Valle et Aguilera, 1999).

Afin de pouvoir améliorer le pouvoir solvant du dioxyde de carbone à l'état supercritique, il est possible de pouvoir d'y ajouter un co-solvant au cours de l'extraction. Généralement, le méthanol, l'éthanol et l'hexane sont les co-solvants utilisés à des taux allant de 1 à 10% par rapport à la quantité de CO₂ (Zaidul *et al.*, 2006, 2007a). Cependant, il est possible d'utiliser des taux plus

importants que le présente l'étude de Tanaka, Sakaki et Ohkubo, (2004) avec 20% de méthanol afin de favoriser l'extraction de phospholipides d'œufs de saumon. De plus, le CO₂ a la particularité de pouvoir prévenir la dégradation des extraits en limitant la sensibilité oxydative avec l'atmosphère (Jaime *et al.*, 2007).

Le système d'extraction par fluide supercritique fait intervenir plusieurs facteurs pouvant influencer l'extraction des lipides, de matière grasse ou d'huile. Des conditions d'extraction optimisées doivent permettre d'extraire la totalité des composés lipidiques en ayant une pureté très importante. Cependant, l'analyse des facteurs de densité et de composition chimique de la matière première en plus des paramètres pression et température d'extraction sont nécessaires afin de déterminer l'efficacité maximale du procédé pour l'extraction de l'ensemble des métabolites polaires. Les paramètres pression et température peuvent influencer l'extraction de métabolites ciblés plus ou moins apolaires (Lou *et al.*, 1996).

Cette technologie est appliquée aux macroalgues, quelques études sont présentées dans le **Tableau X**. Ce type d'extraction est principalement destiné à l'obtention des molécules de la famille des acides gras, pigments et composés phénoliques.

Tableau X: Tableau présentant les applications sur les macroalgues utilisant l'Extraction par CO₂ supercritique pour l'extraction de composés d'intérêt, les avantages et les inconvénients de ce procédé.

Extraction au CO ₂ supercritique (ScCO ₂)				
Molécules ciblés	Biomasse	Références	Avantages	Inconvénients
Acide Eicosapentaénoïque	<i>Bangia atropurpurea</i> <i>Porphyra angusta</i> <i>Porphyra dentate</i> <i>Helminthocladia australis</i> <i>Liagora orientalis</i> <i>Liagora boergesenii</i> <i>Scinaia moniliformis</i> <i>Galaxaura cylindrical</i> <i>Grateloupia filicina</i> <i>Halymenia ceylanica</i> .	Chen et al. 2002	Économique. Extraction rapide permettant un rendement élevé. Température critique basse. Peu de perte de composés volatiles. Production d'extraire ne contenant pas de solvant. Aucun solvant à recycler.	Investissement initial coûteux Faible polarité du CO ₂ Ne permet pas d'extraire de composés polaires (sauf par ajout de co-solvant méthanol, éthanol ou eau) Mise en place du procédé contraignante.
Acides gras ω-3	<i>Sargassum hemiphyllum</i> <i>Hypnea charoides</i>	Cheung et al. 1998, 1999	Sépare l'extraire des métaux lourds et des sels inorganiques pouvant être contenues dans la biomasse.	
Fucoxanthine	<i>Undaria pinnatifida</i>	Roh et al. 2008	Sélectivité de l'extraction (fonction P°/T°).	
Polyphénols	<i>Undaria pinnatifida</i>		Majeure partie du CO ₂ est recyclé.	
Isoflavones	<i>Sargassum muticum</i> <i>Sargassum vulgare</i> <i>Hypnea spinella</i> <i>Porphyra sp</i> <i>Undaria pinnatifida</i> <i>Chondrus crispus</i>	Klejdus et al. 2010	Applicable à échelle industrielle.	

6.3.2. L'Extraction Assistée par Micro-ondes (EAM)

L'utilisation des micro-ondes date de l'après-guerre pour des applications dans le domaine de la technologie radar puis ensuite lors de la création des premiers fours à micro-ondes pour des applications domestiques. L'utilisation de l'énergie micro-onde comme source de chauffage a été analysée en laboratoire au début des années 1970 (Abu Samra *et al.*, 1975). Les premières études sur l'utilisation de ce type d'onde dans le domaine des extractions de produits naturels datent du milieu des années 80 (Ganzler *et al.*, 1986a, Ganzler et Salgo, 1987). Deux types d'instruments micro-ondes sont utilisés dans l'industrie de l'extraction, l'un utilisant un système clos permettant le contrôle de la température et de la pression, l'autre étant un système d'extraction ouvert soumis à la pression atmosphérique. Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques d'une fréquence comprise entre 0,3 à 300 GHz (Camel, 2001). Le principe du mécanisme de l'Extraction Assistée par Microondes est basé sur l'émission d'ondes fixes à une fréquence comprise entre 0,8 et 2,45 GHz, ceci pour limiter les interférences pouvant intervenir avec les ondes utilisées par les services de communication. De par leur nature électromagnétique, les micro-ondes possèdent à la fois un champ électrique et un champ magnétique perpendiculaire l'un à l'autre. Le champ électrique agit sur le chauffage via deux mécanismes qui sont la conduction ionique et la rotation dipolaire des molécules (Thuéry, 1992).

La rotation dipolaire est fonction de l'alignement de la molécule possédant un moment dipolaire au sein du champ électrique à la fois au sein du solvant d'extraction et du produit traité. Les oscillations entraînent des collisions intermoléculaires libérant de l'énergie sous forme de chaleur au sein du milieu. Ce phénomène étant dépendant de la fréquence de l'onde, celui-ci se répète environ 5.10^9 fois par seconde à une fréquence d'émission de 2,45 GHz (Onuska et Terry, 1993). Ceci entraîne un échauffement très rapide du produit, cependant cet effet est dépendant de la nature du produit et plus spécifiquement de sa constante di-électrique (Jassie *et al.* 1997). Comparativement à la méthode de chauffage conventionnel par effet conducteur, les microondes permettent d'améliorer le chauffage du produit avec une répartition de la température plus homogène ce que ne permet pas le chauffage conducteur faisant intervenir la diffusion de la chaleur du point le plus chaud vers le moins chaud et présentant une perte de chaleur. L'intérêt des microondes est également intéressant pour l'extraction car elle entraîne la formation de liaisons hydrogènes de faible énergie du fait de la rotation dipolaire des molécules. Cependant, la viscosité

du milieu entraîne une diminution de cet effet. D'autre part, la migration d'ions dissous permet l'augmentation de la pénétration du solvant d'extraction dans la matière entraînant une augmentation de la solvation des composés (Ganzler *et al.*, 1990). Un second effet agit sur l'extraction, il s'agit du courant ionique également produit au sein de l'échantillon par le champ électrique. Ce phénomène qui libère de l'énergie du fait de l'effet Joule est dépendant de la taille et la charge des ions en solution.

L'effet de l'énergie micro-onde est très dépendant de la nature à la fois du milieu sélectionné et du produit traité. Généralement, les solvants utilisés pour ce type d'application peuvent être d'une gamme de polarité très large. L'hexane à l'eau sont généralement privilégiés du fait qu'ils possèdent une constante di-électrique élevée. Cependant, l'utilisation d'un mélange de solvant est réalisable de manière à optimiser la sélectivité et l'interaction des solvants avec les microondes. Dans certains cas, l'utilisation de solvant possédant une constante diélectrique faible permet de faire interagir seulement le produit traité aux micro-ondes et maintenir le milieu à basse température (Jassie *et al.*, 1997). Ceci est intéressant pour des applications visant l'extraction de composés thermosensibles notamment les huiles essentielles. Cette technologie est utilisée pour la recherche de biomolécules chez les algues marines. Les différentes études entreprises sont résumées dans le **Tableau XI** et concernent les molécules de la famille des polysaccharides, des pigments, des composés phénoliques et des stérols.

Tableau XI: Tableau présentant les applications sur les macroalgues utilisant l'Extraction Assistée par Microondes pour l'extraction de composés d'intérêt, les avantages et les inconvénients de ce procédé.

Extraction Assistée par Microondes (EAM)				
Molécules ciblées	Biomasse	Références	Avantages	Inconvénients
Fucoïdane	<i>Fucus vesiculosus</i>	Rodriguez-Jasso <i>et al.</i> 2011	Rapide, Améliore l'extraction tout en réduisant le temps d'application.	Énergie importante nécessaire
	<i>Laminaria japonica</i>	Xiao <i>et al.</i> 2012	Diminue le coût par la baisse de consommation de solvants.	Étape de séparation nécessaire pour séparer le résidu.
Fucoxanthine	<i>Undaria pinnatifida</i>		Augmente le rendement pour les composés ciblés.	Pas adapté pour l'extraction de composés thermosensibles.
	<i>Sargassum fusiforme</i>			
	<i>Porphyra sp.</i>	Romarís-Hortas,	Lyse des parois cellulaires, libère la totalité du contenu intracellulaire.	
	<i>Palmaria sp.</i>	Moreda-Piñeiro		
Iodine et bromine	<i>Undaria pinnatifida</i>	et Bermejo-	Ne peut être couplé à un autre procédé en même temps.	
	<i>Himanthalia Elongate</i>	Barrera, 2009		
	<i>Laminaria ochroleuca</i>			
	<i>Ulva rigida</i>			
Phénols	<i>Caulerpa racemosa</i>	Li <i>et al.</i> 2012		
Phytostérols et phytols	<i>Undaria pinnatifida</i>	Xiao, Yuan et Li,		
	<i>Sargassum fusiforme</i>	2013		
Polysaccharide	<i>Enteromorpha prolifera</i>	Wang <i>et al.</i> 2011		

6.3.3. Extraction Assistée par Enzyme (EAE)

L'Extraction Assistée par Enzyme est une technologie issue des biotechnologies ayant pour objectif de mettre en solution un substrat et un enzyme pouvant hydrolyser ce dernier. Ce type de technologie est aujourd'hui très étudié car elle offre une alternative à l'extraction conventionnelle tout en ayant un impact faible sur la production de déchet recyclable. Cette méthode permet d'augmenter l'efficacité de l'extraction aqueuse du fait que l'enzyme diluée dans le milieu d'extraction permet d'améliorer la libération de composés présents dans le produit traité. L'hydrolyse nécessite des conditions physico-chimiques avec des températures de l'ordre de 25 à 60°C et des pH proches de la neutralité (4,5 à 9). Cette technologie est facilement transposable à de larges échelles de production industrielle dépendant de la taille des bioréacteurs (Hardouin *et al.*, 2014).

L'EAE a un intérêt particulier par la diversité des enzymes pouvant être appliquées. Actuellement, les enzymes spécifiques sont très coûteuses, de ce fait l'industrie s'oriente vers l'utilisation de cocktails enzymatiques. Des travaux se développent afin de rendre cette technologie plus rentable par la séparation des enzymes en fin de traitement et sur la production d'enzymes spécifiques provenant de bactéries, champignons ou d'organismes marins permettant d'améliorer l'efficacité du traitement (Nyvall Collén *et al.*, 2011 ; Genicot *et al.*, 2014 ; Hardouin *et al.*, 2014 ; Grosso *et al.*, 2015). Un listing des enzymes généralement utilisés dans le domaine de l'Extraction Assistée par Enzyme est présenté dans le **Tableau XII**.

Le mécanisme d'action des enzymes est le point le plus important du procédé d'extraction du fait de la spécificité des enzymes. Principalement, ceci est relié à la capacité qu'à l'enzyme d'hydrolyser la paroi cellulaire du produit traité et ainsi d'hydrolyser la structure complexe formant la paroi cellulaire. Cette déstructuration entraîne ensuite la libération des composés d'intérêt dans le milieu (Hanefeld, Gardossi et Magner, 2009). La spécificité du mécanisme s'explique biochimiquement par la compatibilité entre l'enzyme et le substrat à former un complexe. L'enzyme par sa structure protéique a la capacité de changer de conformation pouvant entraîner une affinité différente par rapport au substrat. Les facteurs physico-chimiques qui jouent sur l'efficacité d'une enzyme sont les conditions, du traitement tels que la température du substrat, le pH du milieu le rapport quantité enzyme / quantité de substrat, la granulométrie du produit traité et le temps d'application du traitement. L'utilisation d'un mélange approprié d'enzyme peut permettre d'hydrolyser la majeure partie du produit et ainsi libérer une plus grande quantité de composés d'intérêt. L'utilisation d'un

mélange approprié d'enzyme peut permettre d'hydrolyser la majeure partie du produit et ainsi libérer une plus grande quantité de composés d'intérêt. Cependant, l'application des enzymes pour ce type de procédé est régie par la bonne appréhension des propriétés catalytiques, de leurs modes d'action et des conditions opératoire optimales de chacune d'entre elles ainsi que la composition du produit traité (Puri, Sharma et Barrow, 2012).

Les limites technologiques de ce procédé sont la stabilisation des enzymes dans l'extrait, la faible réutilisation des enzymes, la difficulté de maintenir la réaction en continue ce qui engendre la production de quantité modérée. De ce fait, de nombreuses recherches s'orientent vers l'immobilisation des enzymes, le développement de méthode de séparation de celles-ci afin de pouvoir les réutiliser et le rapport entre la spécificité des enzymes et leur coût de production (Nyvall Collén *et al.*, 2011, Hardouin *et al.*, 2014, Marathe *et al.*, 2017). Malgré le fort intérêt porté par l'industrie des extraits de produits naturels à cette technologie, les aboutissements restent peu nombreux du fait d'un coût de production élevé. L'analyse technico-économique suggère que des progrès doivent être apportés pour une application commerciale. Pour cela, des alternatives pour une application à grande échelle sont proposés, notamment, par de nouvelles approches de bioraffinerie, en activant l'expression des enzymes directement au sein de la biomasse afin de produire les enzymes permettant de prétraiter cette dernière et en extraire les composés. Ceci permet de réaliser une production centralisée ne demettant pas des étapes de concentration, de stockage et de transport réduisant ainsi le coût de production (Egelkrout *et al.*, 2013 ; Culbertson *et al.*, 2013).

Cependant, l'EAE est considérée comme une des solutions permettant de surmonter les limites rencontrées au travers des méthodes conventionnelles. Cette méthode est considérée comme une approche « verte » ayant pour intérêt de réduire les questions liées à la protection de l'environnement (Marathe *et al.*, 2017). De ce fait, il est possible d'appliquer l'appellation « Enzyme Generally Recognized As Safe » aux extraits issus de ce cette technologie (Université of Gothenburg & others, 2013).

Dans le cas de l'application de l'EAE pour l'extraction de composés issue des algues, l'utilisation des carbohydrases permet d'hydrolyser les polysaccharides pariétaux et améliore ainsi la libération des composés alors que les protéases vont cibler les protéines fibreuses contenue dans la paroi. Du fait de l'enchevêtrement complexe des composés structurant la paroi d'algues, de nombreuses applications ont montré la nécessité d'appliquer un mélange d'enzymes (Wijesinghe et Jeon, 2012).

Tableau XII : Listing des enzymes décrites pour l'application de l'Extraction Assistée par Enzymes.

Enzyme	Activités	Source	pH optimum	Température optimale (°C)
Agarase	β -Agarase	Alteromonas beaufortensis	6,0	55
AMG	exo-1,4- β -D-Glucosidase	Aspergillus niger	4,5	60
Carraghénase	α -carraghénase	Cytophaga drobachiensis	6,8	45
Celluclast	Cellulase	Trichoderma reesei	4,5	50
Cellulase	Cellulase	Trichoderma viride	3,8	50
Snailase	Cellulase, hemicellulase, galactase, pectinase, protéase, β -glucuronidase	snail	5,8	37
Termamyl	α -amylase	Bacillus licheniformis	6,0	60
Ultraflo	β -glucanase	Humicola insolens	7,0	60
Viscozyme	β -glucanase, hemicellulase, xylanase	Aspergillus aculeatus	4,5	50
Xylanase	Xylanase	Disporotrichum dimorphosporum	5,0	55
Alcalase	α -Endoprotéase	Bacillus licheniformis	8,0	50
Alcaline protéase	Protéase	Bacillus licheniformis	8,5	55
Flavourzyme	Endoprotéase et exopeptidase	Aspergillus oryzae	7,0	50
Kojizyme	Amino- et carboxypeptidase	Aspergillus oryzae	6,0	40
Neutrase	Metalloendoprotéase	Bacillus amyloliquefaciens	6,0	50
Neutral protease	Protéase	Bacillus subtilis	7,0	50
Papain	Protéase	Carica papaya	7,0	55
Protamex	Protéase	Bacillus sp.	6,0	40
Trypsin	Protéase	Pancréas de porc	8,0	37
Umamizyme	Endo- et exopeptidase	Aspergillus oryzae	7,0	50

Grosso *et al.* (2015) ont notamment démontré que les carbohydrases et les protéases étaient nécessaires pour déstabiliser cette structure pariétale. 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.

Les applications de cette technologie pour l'extraction de composés d'algues sont présentées dans le **Tableau XIII**. Les molécules ciblées sont les polysaccharides, les pigments, les fractions lipidiques et l'obtention de molécules actives telles que les composés antioxydants.

6.3.4. Extraction Assistée par Ultrasons

L'extraction assistée par ultrasons repose sur le transfert d'ondes sonores au travers d'un produit (liquide, solide ou gazeux). Le phénomène des ultrasons a été mis en évidence par Pierre et Jacques Curie en 1880, puis développé au cours de l'invention du sonar par Langevin. Les premières applications des ultrasons dans le domaine industriel remontent aux années 1950 (Pétier, Gondrexon et Boldo, 2008). Les ondes ultrasonores sont caractérisées par différentes grandeurs physiques que sont la fréquence (en Hz), la puissance (en W). Le principe de l'extraction via les ultrasons est basé sur l'émission d'ondes acoustiques qui entraînent un phénomène de cavitation ultrasonore lié à la propagation des ondes au travers du milieu. La propagation des ondes entraîne des variations de pression formant des bulles de cavitation au sein de la biomasse concernée (Michalak, Tuhy et Chojnaka, 2015). Au cours de ces changements de pression, les bulles de cavitations ont tendance à prendre du volume jusqu'à atteindre un état critique entraînant son implosion. L'énergie libérée par cette implosion engendre localement une augmentation très importante de la température et de la pression (mesuré au-delà de 2000°C et 800 bars). Ce phénomène de cavitation au contact d'un produit solide entraîne la déformation des bulles. Celles-ci en implosant libèrent un microjet de liquide qui crée des forces de cisaillement localisé au moment de l'impact avec le produit. L'application des ultrasons est un procédé qui permet d'augmenter le transfert de composés contenus dans la biomasse par la rupture de la paroi cellulaire facilitée également par une augmentation des surfaces de transfert avec le solvant d'extraction (Ying, Han et Li *et al.*, 2011 ; Hahn *et al.*, 2012).

L'application de cette technologie pour le traitement des algues marines afin d'en extraire les minéraux et les pigments. Le **Tableau XIV** résume les différents travaux.

Tableau XIII : Tableau présentant les applications sur les macroalgues utilisant l'Extraction Assistée par Enzymes pour l'extraction de composés d'intérêt, les avantages et les inconvénients de ce procédé.

Extraction Assistée par Enzymes (EAE)				
Molécules ciblés	Biomasse	Références	Avantages	Inconvénients
Antioxydants	<i>Sargassum horneri</i>	De Souza da Silva <i>et al.</i> 2014	Facilite la libération des composés désirés dans le milieu. Écologique, pas toxique, sans produits chimiques. Rendement d'extraction important. Limité par les propriétés de solubilités des composés dans l'eau.	Coût des enzymes limite les applications industrielles
Fucoxanthine Lipides polyinsaturés	<i>Undaria pinnatifida</i>	Park, Shahidi et Jeon, 2004	Conditions d'extraction moins agressives. Concentration enzymes adaptable à l'alimentaire. Sélectivité de l'extraction en fonction de l'enzyme. Possibilité de l'application à grande échelle.	
Polysaccharides	<i>Sargassum coreanum</i>	Ko <i>et al.</i> ; 2012		
R-phycoerythrine	<i>Grateloupia turuturu</i>	Le Guillard <i>et al.</i> , 2016		

Tableau XIV : Tableau présentant les applications sur les macroalgues utilisant l'Extraction Assistée par Ultrasons pour l'extraction de composés d'intérêt, les avantages et les inconvénients de ce procédé.

Extraction assistée par Ultrasons (EAU)				
Molécules ciblées	Biomasse	Références	Avantages	Inconvénients
Minéraux (Ca, K, Na, Mg, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb et Zn)	<i>Porphyra</i>	Dominguez-González <i>et al.</i> 2005	Simple, peu coûteux.	Énergie nécessaire pour l'extraction.
	<i>Palmaria</i>		Nécessite peu de solvants.	
	<i>Undaria pinnatifida</i>		Améliore le rendement et accélère la vitesse d'extraction/réaction.	
	<i>Himanthalia elongata</i>		Entraîne peu de dommages pour les composés thermosensibles.	
	<i>Laminaria ochroleuca</i>		Extraction sélective.	
			Investissement matériel inférieur aux autres procédés innovants.	
			Possibilité de transfert à échelle industrielle.	
			Possibilité de couplage avec d'autres procédés EAE, MAE ou ScCO ₂ .	
R-phycoérythrine	<i>Grateloupia turuturu</i>	Le Guillard <i>et al.</i> , 2016	Possibilité de couplage extraction/réaction.	

6.3.5. Extraction par Fluide Pressurisé

Le procédé d'extraction par fluide pressurisé est une méthode en plein développement du fait de l'intérêt grandissant qu'elle suscite. Cette méthode est considérée comme une amélioration de la méthode Soxhlet, dans la littérature elle est également citée sous les termes « extraction par l'eau chaude sous pression », « extraction par eau subcritique » et « extraction accélérée par solvant ». Cette méthode présente de nombreux avantages par rapport à l'extraction au solvant classique. Elle permet notamment d'obtenir une meilleure sélectivité, de réduire la consommation en solvant tout en réduisant également le temps du traitement. L'extraction par fluide pressurisé nécessite de soumettre le système à un couple de température et de pression élevées. Le fait d'augmenter la pression permet au fluide d'atteindre des températures supérieures à sa température d'ébullition. Cette méthode a été appliquée sur des biomasse macro et microalgues afin d'extraire les composés apolaires tels que les caroténoïdes, les acides gras et également les phénols et les fucostérols. L'extraction par fluide pressurisé a un intérêt au niveau industriel car elle permet d'extraire des composés d'intérêt en limitant les étapes intermédiaires, son application se développe notamment dans les domaines de l'extraction de produits naturels pour la nutrition, la pharmaceutique mais également pour la valorisation de coproduit (Michalak, Tuhy et Chojnaka, 2015).

Cette technologie a été étudiée pour l'extraction de composés d'algues marines. Le **Tableau XV** présente les différents travaux qui ont ciblé les molécules de la famille des stérols, des phénols, des acides gras et des pigments.

Tableau XV : Tableau présentant les applications sur les macroalgues utilisant l'Extraction par Fluide Pressurisé pour l'extraction de composés d'intérêt, les avantages et les inconvénients de ce procédé.

Extraction par Fluide Pressurisé (EFP)				
Molécules ciblées	Biomasse	Références	Avantages	Inconvénients
Acides gras : Acides palmitique, palmitoléique et oléique Phytols et fucostérols	<i>Himanthalia elongate</i>	Santoyo et al. 2011	Réduction significative de la consommation en solvant. Diminue le temps d'extraction comparé à une extraction par solvant traditionnelle. Applicable à une large gamme de solvant comparé au procédé supercritique.	Pas adapté pour les composés sensibles à la température et la pression. Moins efficace que l'extraction par fluide supercritique
Neophytadiène			Large gamme de composés ciblés également. Nécessite des températures et des pressions élevées.	
Fucoxanthine	<i>Eisenia bicyclis</i>	Shang et al. 2011	Augmentation de la solubilité des composés, et du transfert de matière par une augmentation de température.	
Phénols	<i>Ascophyllum nodosum</i> <i>Pelvetia canaliculata</i> <i>Fucus spiralis</i> <i>Ulva intestinalis</i>	Tierney et al. 2013		

7. Purification des extraits

La purification de molécules présentes dans un extrait issu d'une matière première (algues, plantes, coproduits, etc...) consiste à séparer les composés ou groupe de composé cibler afin de les isoler. Ceci permet également d'éliminer les composés indésirables comme des impuretés. Les méthodes de chromatographie destinées à la purification d'extraits existantes sont très diversifiées, cependant toutes ces méthodes sont basées sur deux principes qui sont la séparation liquide-liquide ou liquide-solide (Marston et Hostettmann, 1991 ; Hostettmann, Marston et Hostettmann, 1998 ; Sticher, 2008 ; Bucar, Wube et Schmid, 2013). La chromatographie faisant intervenir une phase stationnaire solide est une méthode très répétue et présente de multiples applications pour la purification de composés dans les domaines de l'industrie des produits naturels. La chromatographie liquide-liquide basée sur la séparation au sein d'un système solvant biphasique présente de plus en plus d'intérêts pour la purification de composés.

4.1. *Les principes de la chromatographie préparative*

Les premières applications de la purification de molécules naturelles par la chromatographie préparative remontent aux années 1900 par Tswett avec pour objectif de cibler les pigments (Scott, 2003 ; Guiochon et al., 2006). La chromatographie analytique permettant une meilleure résolution a été développée plus tard dans les années 1930 par Kuhn et Lederer (Lederer, 1972 ; Wixom, 2001). La fin des années 60 va connaître une avancée importante dans le domaine de la chromatographie liquide avec le développement de la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) (Scott, 2003). Cependant cette technologie est principalement appliquée dans le domaine de la chimie analytique, la chromatographie préparative restant plutôt attribuée au domaine de la production industrielle. Ces deux technologies restent cependant complémentaires ; la chromatographie analytique permettant une résolution plus importante est un atout pour analyser la composition des extraits bruts et d'optimiser les conditions afin d'atteindre la meilleure séparation avec un temps d'analyse court. La chromatographie préparative est destinée principalement pour production en isolant un ou plusieurs composés d'un extrait, l'objectif principal est d'obtenir un taux de récupération et une pureté importante tout en ayant une finalité orientée vers la productivité. Certains facteurs influencent la productivité tel que la charge (quantité d'extrait injecté), la résolution (qualité de la séparation, pureté des composés) et le temps de traitement, chacun de ses paramètres sont directement liés (Hostettmann, Marston et Hostettmann, 1998).

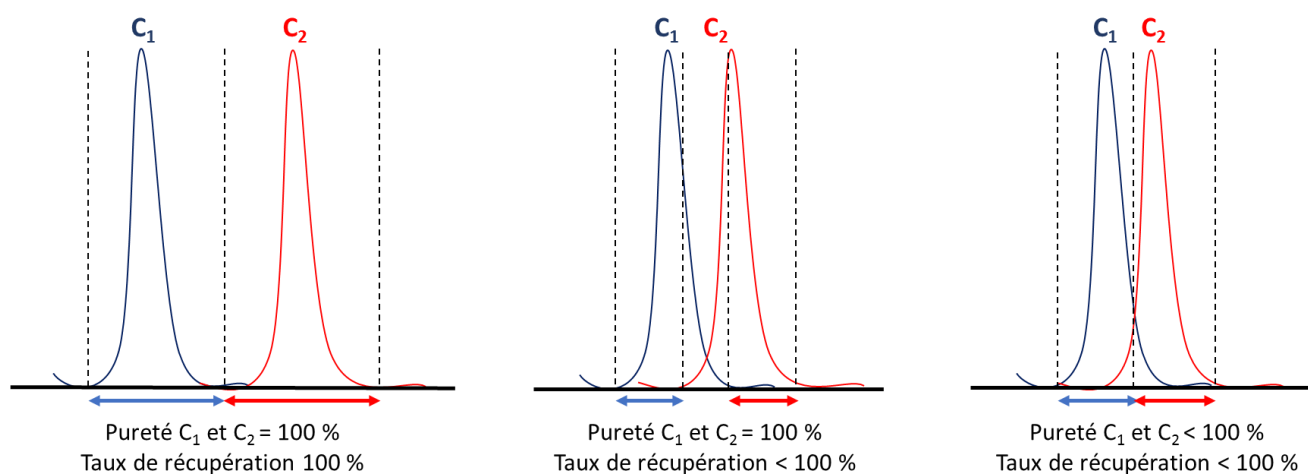


Figure 19 : Influence de la qualité de séparation sur la pureté et le taux de récupération des composés C_1 et C_2 .

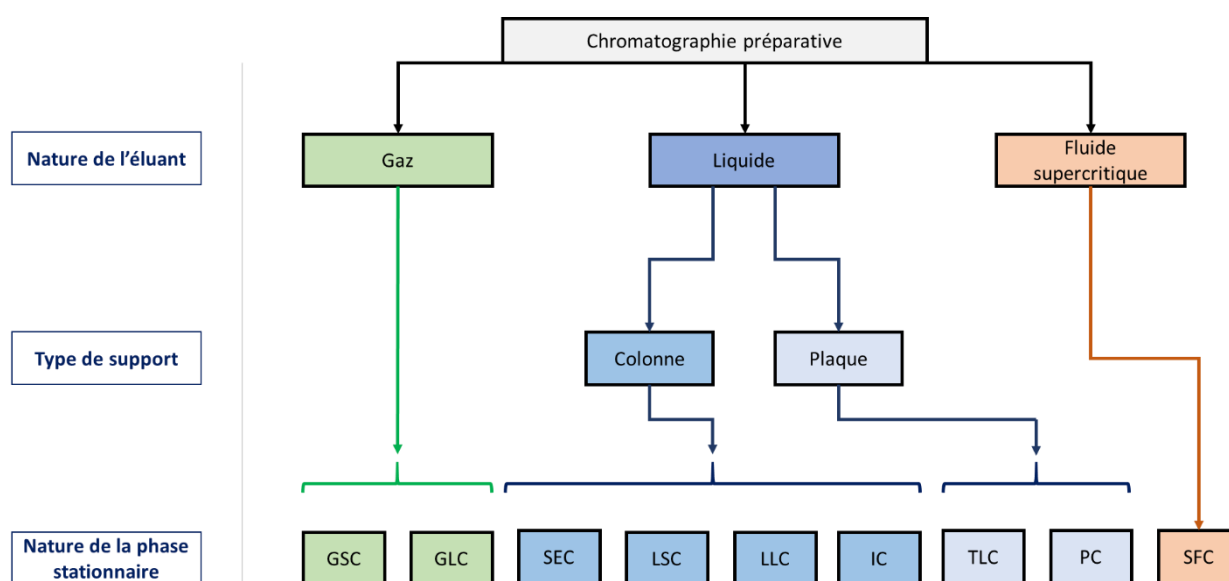


Figure 20: Schéma présentant les différentes techniques de chromatographie préparatives. La chromatographie gaz-solide (GSC), gaz-liquide (GLC), d'exclusion stérique (SEC), liquide-solide (LSC), liquide-liquide (LLC), échangeuse d'ions (IC), chromatographie sur couche mince (TLC) ou papier (PC) et la chromatographie par fluide supercritique (SFC).

La pureté des composés collectés et le taux de recouvrement sont deux paramètres qui régissent l'efficacité du système. La pureté (P) représente le rapport entre la quantité du composé ciblé dans l'extrait isolé collecté (**Eq. 1**). Le taux de recouvrement (T_R) permet de déterminer les pertes de matière au cours de la chromatographie ; il est représenté par le rapport en la quantité totale de fractions collectées (Q_f) et la quantité d'extrait brut initialement injecté (Q_{inj}) (**Eq. 2**).

$$P = \frac{m_{\text{composé ciblé}}}{m_{\text{fraction collectée}}}$$

Équation 1

$$T_R(\%) = \frac{Q_s}{Q_{inf}} \times 100$$

Équation 2

La qualité de la purification et du taux de recouvrement sont directement liés à la capacité du système à séparer les composés. La collecte des composés purifiés est généralement déterminée à partir du chromatogramme ; la **Figure 19** présente les situations rencontrées influençant la purification et le recouvrement.

La chromatographie préparative étant destinée à l'industrie, la notion de productivité est importante. Ce paramètre est directement lié au rendement représenté par la quantité de composés isolés ou d'extrait traité en fonction du temps. Le rendement peut être amélioré en diminuant le temps de la méthode ou en augmentant la quantité injectée mais tient compte également de la qualité de la séparation. Cette efficacité est intéressante pour comparer différents systèmes entre eux. La **Figure 20** présente une liste non exhaustive des différents types de techniques en chromatographie préparative.

4.2. La chromatographie préparative avec phase stationnaire solide

La chromatographie liquide avec une phase stationnaire solide repose sur la rétention des molécules par cette phase stationnaire et l'affinité des composés avec l'éluant (phase mobile) entraînant leur séparation. La phase stationnaire formant les colonnes de chromatographie correspond en général à un greffage de silice compatible avec la majorité des solvants dans une large gamme de polarité. Ce type de phase solide permet de limiter les risques d'adsorption irréversibles de composés et de diminuer les

risques de dénaturation (Hostettmann, Marston, et Hostettmann, 1998). Pour la purification de composés naturels, il existe différents types d'application de la chromatographie liquide en phase solide, le type d'application est principalement lié au coût de production et à la valeur ajoutée du composé purifié. La chromatographie flash et basse pression permet de produire des extraits purifiés en grande quantité avec un coût de production réduit. En comparaison, la chromatographie liquide moyenne pression et haute performance (HPLC) préparative permet d'obtenir des puretés plus importantes mais plus onéreuses (Bucar, Wube et Schmid, 2013).

Les méthodes de chromatographie utilisant une phase stationnaire solide se différencient soit par le type de support, la nature de l'éluant et également la nature des interactions entre la phase solide et les composés. L'ensemble des méthodes de chromatographie préparative utilisant une phase stationnaire solide nécessite un support sous la forme d'une plaque, de papier ou de colonne.

4.2.1. Chromatographie sur couche mince (Thin Layer Chromatography (TLC))

Les méthodes utilisant les plaques de silice telle que la chromatographie sur couche mince ou de papier sont des méthodes économiques pour séparer les composés d'un extrait. Ces techniques permettent d'isoler des quantités de l'ordre du milligramme. Un intérêt important est apporté à cette technique pour la caractérisation de la nature des composés isolés par l'intermédiaire d'une importante gamme de méthodes de révélations chimiques (Merck, 1980).

4.2.2. Chromatographie basse pression

La chromatographie à basse pression utilisant des cartouches ou colonnes « flash » (flash chromatography) en support plastique ou verre contenant une phase solide stationnaire permet de séparer les composés entre eux en les faisant traverser la colonne. La séparation des échantillons se fait en fonction de l'affinité de ses composés vis-à-vis de l'éluant. La quantité traitée est dépendante de la taille de la colonne et peut atteindre plusieurs grammes. Toutefois, ce type de chromatographie est intéressante car elle permet de travailler à des débits relativement élevés tout en restant à basse pression ce qui simplifie le système. La résolution de la séparation obtenue par l'utilisation de ces techniques fait qu'elles restent beaucoup utilisées cependant la quantité d'extrait pouvant être traitée reste limitée.

4.2.3. Chromatographie haute pression

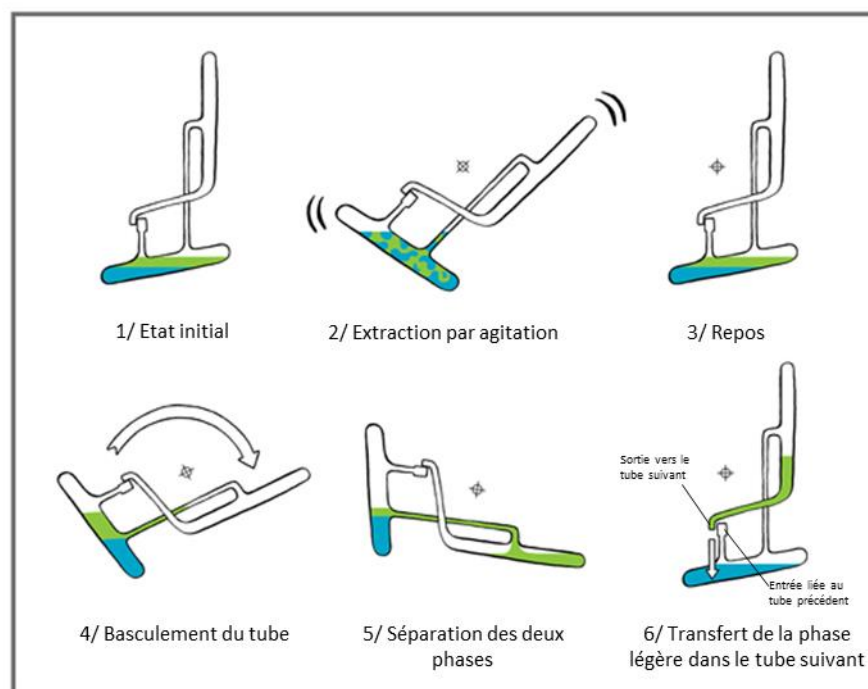
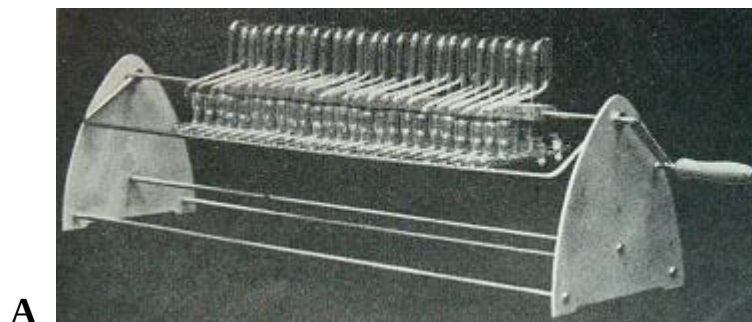
Afin de pouvoir traiter d'avantage d'extrait dans le cadre d'une production industrielle et d'obtenir une résolution importante, les méthodes de chromatographie se sont orientées vers des systèmes hautes pression. La chromatographie liquide haute pression de l'anglais *High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC)*, se distingue généralement par trois qualificatifs : analytique (< 1 mg), semi-préparative (1 mg à 1 g) et préparative (> 1 g) qui dépendent de la capacité du système. La différence avec la chromatographie basse pression repose principalement sur la structure de la phase stationnaire solide des colonnes. La taille des particules étant comprise entre 3 et 10 µm, ceci favorise la séparation des composés du fait d'une surface d'échange plus importante. À débit équivalent ce type de structure engendre également de plus haute pression. Au cours des années, la capacité de traitement des systèmes HPLC a été améliorée, ce type de système est aujourd'hui majoritairement employé dans le cadre de l'industrie de produits naturels.

4.2.4. La chromatographie par fluide supercritique (SFC = Supercritical-Fluid Chromatography) :

La chromatographie par fluide supercritique est une méthode d'élution avec un fluide soumis aux conditions supercritiques. Le fluide généralement utilisé pour ce type d'application est le dioxyde de carbone (CO₂) qui lorsqu'il est soumis au couple température / pression critique possède à la fois les propriétés d'un gaz et d'un liquide. Cet état supercritique de l'éluant permet d'améliorer la diffusivité au sein de la colonne en diminuant sa viscosité lui conférant une meilleure efficacité chromatographique (Rajendran, 2012). Les avantages de ce type d'application sont équivalents à l'utilisation de l'extraction par fluide supercritique (cf. chapitre I.6.3.1 p.141). Le CO₂ est un fluide non-inflammable, non toxique, sans odeur, présentant une pureté élevée et présente peu de contraintes pour son élimination, ce qui fait un candidat intéressant dans la purification de molécules.

4.3. La Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)

La chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) également nommée à contre-courant est un système dont la séparation des molécules est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire liquide retenue dans une colonne au travers de laquelle une phase mobile également liquide va transporter l'extraits.



Principe de fonctionnement

Figure 21: Illustration du système de distribution à contre-courant « machine de Craig » (www.theliquidphase.org) (A) ; Schéma du principe de fonctionnement du système de distribution à contre-courant, modifié d'après (G. Guidotti, 2015 ; <https://chsi.harvard.edu/ccdm>) (B).

4.3.1. Historique du développement de la Chromatographie Partage Centrifuge

Les premiers développements d'application de la chromatographie utilisant une phase stationnaire liquide sont les travaux du Dr. Lyman C. Graig au travers du système de distribution à contre-courant (de l'anglais counter-current distribution (CDD)) (Sutherlet, 2007). Ce système innovant permettait de séparer les composés par une succession de système solvant biphasique présentant différents coefficients de partage. Ce système présente une succession de tubes de verre basculants permettant de réaliser des extractions successives (**Figure 21**) Les tubes de verres possèdent une structure particulière permettant de séparer les deux phases non miscibles en transférant la phase ayant la densité la plus faible les tubes suivants. La phase lourde est maintenue dans chaque tube sous l'effet des forces de gravitation. Le développement de ce système a permis au cours des années 1950 de développer de nombreuses applications pour l'extraction et l'isolement de molécules issues d'extraits naturels.

En 1966, Y.Ito développa le principe d'une distribution à contre-courant en fixant la phase stationnaire liquide par la force gravitationnelle. Cette technique est alors nommée la chromatographie à contre-courant (Weinstein, 1966). Y. Ito poursuivit ses travaux sur le principe de la chromatographie à contre-courant (CCC) et développe des systèmes qualifiés d'hydrodynamique. Cependant, le terme contre-courant donné à ces systèmes est controversé dans le domaine scientifique pour deux raisons. La première controverse porte sur le fait que le même nom, la chromatographie contre-courant, soit donnée pour l'ensemble des systèmes fixant la phase stationnaire liquide et le système développé par Y. Ito. La seconde controverse porte sur le principe physique qui n'est pas réellement l'utilisation de deux fluides à contre-courant (Ito, 2014 ; Berthod, 2014). En parallèle, un autre système est développé sur le principe physique de l'hydrostatique par Nunogaki (2001), nommé la Chromatographie Partage Centrifuge (CPC) (Foucault, 1994).

4.3.2. Principe général de la chromatographie à contre-courant

Les systèmes de chromatographie contre-courant comprenant à la fois les systèmes hydrodynamiques (CCC) qu'hydrostatiques (CPC) ont pour spécificité commune d'utiliser une phase stationnaire liquide. Le mécanisme de rétention n'est donc pas généré par une structure solide mais par un partage entre deux phases liquides non miscibles entre elles, l'une étant la phase stationnaire et l'autre la phase mobile. Les systèmes CCC et CPC comprennent une colonne qui est dans un premier temps

remplie par la phase stationnaire liquide. Une fois la colonne en rotation sur son axe, la phase liquide est maintenue sous l'effet de la force centrifuge et devient stationnaire. La deuxième phase du solvant non miscible avec la phase stationnaire est ensuite introduite dans la colonne sous l'action de pompe haute pression. Un déséquilibre est créé au sein de la colonne libérant une partie de la phase stationnaire jusqu'à atteindre à nouveau un équilibre. Le volume de phase stationnaire libéré équivaut au volume de phase mobile qui a pris place au sein de la colonne.

À l'équilibre du système, il est possible de déterminer le taux de rétention de la phase stationnaire au sein de la colonne par (Eq. 3) :

$$R(\%) = \frac{V_{colonne} - V_{phase\ stationnaire\ sortie}}{V_{colonne}}$$

Équation 3

La valeur de rétention de la phase stationnaire dans la colonne est dépendante de la composition du système solvant, du type de colonne et de son volume, de la vitesse de rotation et du débit de phase mobile. Ceci peut être défini par la perte de charge donnée par (Eq. 4) :

$$\Delta P = (A. \Delta d. \omega^2. R) + (B. \eta. D)$$

Équation 4

Formule donnant la valeur de la perte de charge au sein du système en chromatographie contre-courant ; avec les valeurs de différence de densité entre les phases (Δd), de vitesse de rotation (ω), le taux de rétention de phase stationnaire (R), la viscosité de la phase mobile (η) et son débit (D).

L'effet de la perte de charge est différent en fonction du système CCC ou CPC. En effet, les constantes nommées A et B sont dépendantes du type de système et du système solvant utilisé. La constante A intervient dans la valeur du terme hydrostatique ($A. \Delta d. \omega^2. R$) alors que la constante B intervient dans l'expression du terme hydrodynamique ($B. \eta. D$).

Dans le cas des systèmes CCC, la valeur A est négligeable entraînant un faible effet hydrostatique sur la valeur de perte de charge. La perte de charge est directement liée à la viscosité et au débit appliqués n'entraînant que de faibles pertes de charge (Berthod, 2002). Malgré des similitudes sur le principe physique de fixer une phase stationnaire liquide sous l'effet de la force centrifuge, les systèmes hydrostatiques et hydrodynamiques présentent de nombreuses différences.

4.3.3. Chromatographie Contre-courant (CCC) : Appareil hydrodynamique :

Les systèmes hydrodynamiques ont la particularité de présenter au moins deux axes de rotation (central et planétaire) permettant de générer une force centrifuge variable. La colonne du système est positionnée autour d'une bobine fixée sur l'axe de rotation planétaire, il est possible de compter un à trois axes planétaires différents au sein d'un même système.

Le système hydrodynamique, les transferts de molécules et les échanges entre les phases stationnaire et mobile sont générés par la différence de force centrifuge entre le point inter-axe (zone entre l'axe centrale et planétaire) et la zone externe la plus éloignée de l'axe central. Ce phénomène est schématisé par la **Figure 22**.

4.3.4. Chromatographie Partage Centrifuge (CPC) : Appareils hydrostatiques

Les systèmes de Chromatographie Partage Centrifuge (CPC) également qualifié de système hydrostatique sont composés d'une colonne basée sur un seul axe de rotation. Cette colonne est composée de disques dans lesquelles sont usinés un réseau formé de canaux et de cellules reliés entre eux. La jonction de plusieurs disques entre eux forment la colonne de CPC, **Figure 23**. Le fait d'être positionné sur un seul axe de rotation, la colonne est également qualifiée de rotor. Le système de pompe et de détection est lié à cette colonne via des joints tournants situés au niveau de l'axe de rotation.

Lorsque la colonne est en mouvement sur son axe, elle est soumise à la force centrifuge. L'utilisation d'un système solvant biphasique non miscible est intéressant du fait que l'une des phases après remplissage de la colonne peut être maintenue au sein de celle-ci sous l'effet de la force centrifuge. Lorsque la colonne est en rotation, la deuxième phase va être utilisée comme phase mobile en permettre le transport de l'extrait au sein de la colonne (Roullier *et al.* 2009). Un système de pompe permet de faire circuler cette phase mobile liquide au travers de la phase stationnaire contenue dans la colonne.

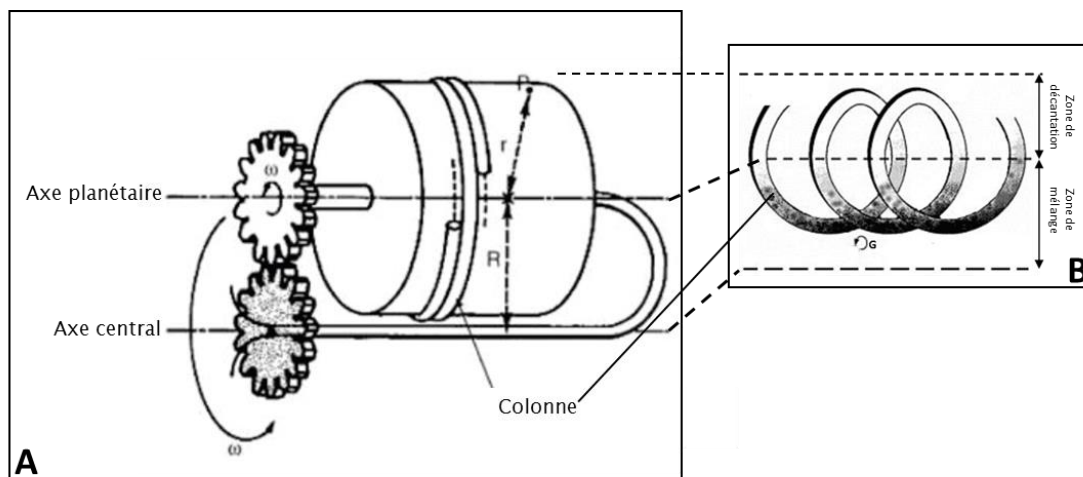


Figure 22: Schéma représentant le fonctionnement de la colonne de Chromatographie à Contre-Courant (CCC) (A) et le schéma représentant les phénomènes physiques se déroulant au sein de la colonne soumis à la force centrifuge (B), (modifié de Berthod et al., 2009 et Berthod et al., 2002)



Figure 23: Structure interne formée de canaux et de cellules (A) formant la colonne (B) par jonction des disques entre eux usités. La colonne fait partie d'un module du système CPC (Armen Instruments) (3).

L'intérêt de s'affranchir de phase stationnaire solide apporte de nombreux avantages par rapport aux colonnes de purification. La colonne de CPC permet d'avoir une capacité de charge plus importante, n'engendre pas de perte d'échantillon pouvant être retenu par la phase solide, ceci évite également la pollution d'échantillon par relargage et simplifie le nettoyage. Ce type de colonne est d'un grand intérêt car elle permet l'utilisation de nombreux solvants rendant le système modulable en fonction du type de composés ciblés (Hostettmann, Marston, Hostettmann, 1998).

Le système de Chromatographie de Partage Centrifuge présente un intérêt certain pour la purification de composés naturels à grande échelle. Ce système permet de réduire les coûts de production en réduisant les consommations de solvants et les temps de séparation. Pour l'application de ce type de système, une phase d'optimisation de la méthode est nécessaire en fonction du composé ciblé. Cette méthode va être étudiée afin de permettre la meilleure séparation du composé en se basant sur son coefficient de partage au sein du système solvant. Le système solvant étant formé par un mélange biphasique de solvants non miscibles, pouvant être un système solvants binaire, ternaire ou quaternaire augmentant les possibilités d'application et rendant plus complexe le choix de solvants.

4.3.5. Détermination du coefficient de partage K_D du composé ciblé

L'un des intérêts de la Chromatographie Partage Centrifuge est sa modularité, c'est-à-dire qu'il est possible d'inverser le sens d'élution au sein de la colonne et de pouvoir utiliser comme phase stationnaire soit la phase légère soit la phase lourde du système solvant. On parle donc de mode ascendant et descendant en fonction du sens dans lequel circule la phase mobile au sein de la colonne (**Figure 24**). Cette caractéristique permet d'avoir l'équivalence d'une chromatographie en phase inverse et en phase normale.

Le choix du système va être réalisé suivant la répartition de l'extrait brut traité au sein du mélange de solvants préparés. Cette répartition se fait en fonction de l'affinité des composés contenus dans l'extrait vis-à-vis des solvants présents. Pour l'étude préalable du système solvants, une méthode nommée « shake flask method » permet de réaliser le test à petite échelle. Cette technique permet de déterminer le coefficient de partage des composés au sein du système solvants appliqué. Ce coefficient est déterminé par le rapport des concentrations par résolution de (**Eq. 5**):

$$K_d = \frac{[A]_{stat}}{[A]_{mob}}$$

Équation 5

[A]_{stat} : concentration de la molécule ciblée [A] dans la phase stationnaire

[A]_{mob} : concentration de la molécule ciblée [A] dans la phase mobile

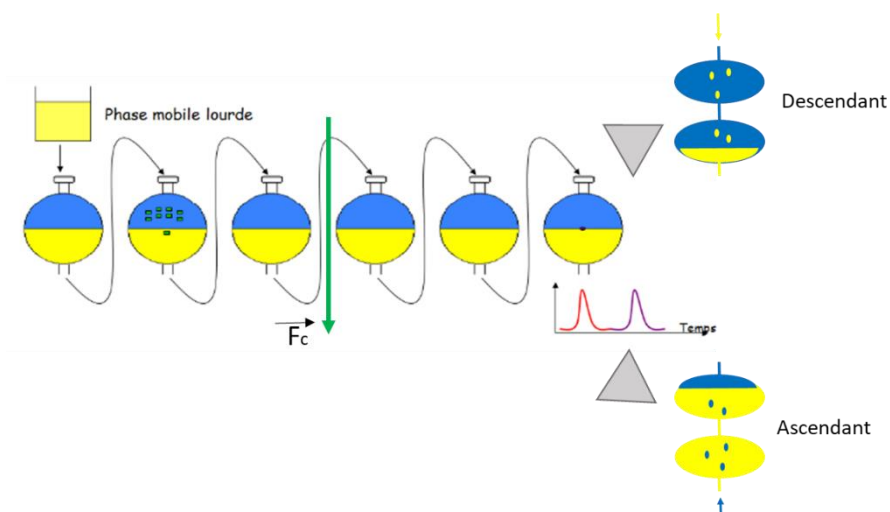


Figure 24 : Schéma représentant le principe de l'élution au sein de la colonne CPC et présente les deux sens d'élution possible en mode ascendant ou descendant. (figure originale modifiée du site <http://www.kromaton.com/fr/la-cpc/technologies>).

Cependant, la colonne CPC permet d'avoir deux sens d'élution au sein du système en fonction de la phase stationnaire utilisée. De ce fait, l'équation précédente peut être exprimée de deux manières en fonction du sens de recirculation ascendant (asc) ou descendant (dsc) donnant les **Eq. 6** et **Eq. 7**.

$$K_d(asc) = \frac{[A]_{inf}}{[A]_{sup}}$$

Équation 6

$$K_d(dsc) = \frac{[A]_{sup}}{[A]_{inf}}$$

Équation 7

[A]_{inf} : concentration de la molécule ciblée [A] dans la phase inférieure

[A]_{sup} : concentration de la molécule ciblée [A] dans la phase supérieure

La valeur du coefficient de partage permet de montrer l'affinité des solutés pour l'une ou l'autre des phases, selon si sa valeur est égale, inférieure ou supérieure à 1. Lorsque le coefficient de partage est égal à 1, le soluté se partage de manière égale entre la phase stationnaire et la phase mobile. Le volume de rétention du soluté est alors constant et égal au volume colonne quel que soit le taux de phase stationnaire. Lorsque le coefficient de partage est inférieur à 1, le soluté a une meilleure affinité pour la phase mobile. Son volume de rétention est alors faible et reste inférieur au volume colonne. Lorsque le taux de phase stationnaire diminue au sein de la colonne, son volume de rétention aura alors tendance à augmenter. Au contraire, si le coefficient de partage d'un soluté est supérieur à 1, ce dernier a plus d'affinité pour la phase stationnaire. Son volume de rétention est alors supérieur au volume colonne et augmente linéairement en fonction de la valeur du K_D (Berthod, 2002).

Chapitre II : Matériels et méthodes

1. Matériel d'étude

Solieria chordalis a été collectée au mois de juillet sur la plage de Saint Gildas de Rhuy (47°29'33.3''N 2°49'51.0''W) située sur la côte du Morbihan, France. Cette algue une fois collectée est lavée à l'eau claire afin d'éliminer les épiphytes et les sédiments résiduels. L'algue est ensuite broyée à l'aide d'un hachoir équipée d'une maille de 3 mm, s'ensuit une congélation à -20°C dans des sacs hermétiques avant une congélation à -80°C pendant une heure avant de débiter la lyophilisation. Une fois cette dernière étape réalisée, l'algue sèche est conservée en sac hermétique afin d'être utilisée pour l'extraction.

2. Protocole d'extraction

2.1. *Procédé d'extraction par solvant organique*

2.1.1. *Méthode d'extraction apolaire*

2.1.1.1. *Extraction solide liquide*

Le procédé d'extraction réalisé est basé en deux étapes. La première étape consiste à une extraction solide/liquide (S/L). La matière sèche est mise à macérer dans un réacteur de trois litres sous agitation et protégée de la lumière. La macération se fait dans du méthanol pur avec un rapport de dilution de 10% (mMS/V). L'extraction est maintenue pendant 24h à une température ambiante régulée à 22°C. L'extrait obtenu est ensuite séparé du marc par filtration sur Buchner à l'aide d'un filtre papier Whatman. Le méthanol est ensuite évaporé à l'aide d'un système rotavapeur (35°C, 120 mbars). Afin d'obtenir un rendement d'extraction maximum, le solvant évaporé est réutilisé pour répéter l'extraction sur le marc précédemment traité ; cette étape est reproduite trois fois.

2.1.1.2. *Procédé de séparation liquide/liquide L/L*

L'extrait méthanolique précédemment concentré est ensuite séparé via une extraction liquide/liquide (L/L) dans une ampoule à décanter. Le système biphasique utilisé pour cette étape est un mélange éthyle acétate / eau (50/50, v/v). L'extrait méthanolique est mélangé au système solvant puis agité énergiquement de manière à dissoudre totalement l'extrait. Après solubilisation totale, le mélange est

laissé au repos pour permettre la séparation de phase entre les deux solvants. Les deux phases sont ensuite séparées et collectées. La phase inférieure aqueuse est congelée. La phase supérieure organique est traitée au rotavapeur de manière à évaporer l'acétate d'éthyle de l'extrait.

2.1.2. Méthode d'extraction polaire

Le procédé d'extraction de la fraction polaire de *Solieria chordalis* consiste à une extraction solide/liquide. L'algue lyophilisée est mis à macérer dans un erlenmeyer contenant un mélange éthanol : eau distillée (70 :30 ; v/v) ceci réalisé en triplicata. Le rapport entre la quantité d'algue et le volume de solvant est de 10g pour 100 mL. Les erlenmeyers sont ensuite mis à incuber sous agitation dans un bain-marie thermostaté à 45°C pendant 2h. Le macérât est ensuite filtré sur Büchner, l'extrait obtenu est ensuite concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif à 50°C sous vide (90 mbars).

2.2. Extraction des carraghénanes

2.2.1. Méthode conventionnelle

La méthode d'extraction conventionnelle (codé par un « C ») a été appliquée à *Solieria chordalis* en condition native et alcaline afin de traiter et d'extraire les carraghénanes suivant la méthode décrite par Freile-Pelegrín et Robledo (2008). Brièvement, la matière sèche algale (5 g) est réhydratée dans des erlenmeyers de 500 mL à température ambiante pendant 12h. Le milieu d'extraction est composé d'eau distillée en condition native (codé « C0 ») et d'une solution d'hydroxyde de sodium (1% KOH w/v, codé « C1 », Alfa Aesar). Après réhydratation, les erlenmeyers sont incubés au bain-marie à 85°C pendant 3h afin de réaliser l'extraction à chaud. Suite à l'incubation, chaque essai est mixé en présence de 4 g de terre de diatomée (Celite) et filtré sous pression. Le filtrat obtenu est neutralisé à pH 8,5 -8,6 avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl, 10N, Sigma) ; la précipitation des carraghénanes s'effectue par ajout de 250 mL de Cetavlon 2% (Hexadecyl-trimethylamonium bromide) préparé dans une solution eau distillée / acétone (9 :1, v/v). Les carraghénanes fibreux sont ensuite filtrés sur papier filtre puis rincés par une solution d'éthanol 95% saturée par de l'acétate de sodium (trois fois) de manière à éliminer les résidus de Cetavlon. L'excès d'acétate de sodium est éliminé par lavage à l'éthanol 95% (trois fois). Les carraghénanes sont ensuite collectés dans une boîte de Petri en verre et séchés pendant 24 h à 60°C dans une étuve. Une fois l'extrait de

carraghénane sec, celui-ci est pesé afin de déterminer le rendement d'extraction, puis broyé à l'aide d'un mortier et conservé hermétiquement.

2.2.2. Extraction Assistée par Microondes (EAM)

En parallèle, l'Extraction Assistée par Microondes (MAE) est réalisée à l'aide d'un système Microwave Accelerated Reaction (MARS 800W, CEM, Matthews, NC, USA) en faisant varier les paramètres temps (10, 20 et 25 min) et température (90 ou 105°C). Ceci donnant des couples temps/température codés de la manière suivante, MAE1 : 90°C / 10 min, MAE2 : 90°C / 20 min, MAE3 : 90°C / 25 min, MAE4 : 105°C / 10 min, MAE5 : 105°C / 20 min et MAE6 : 105°C / 20 min. Pour chaque essai réalisé en triplicata, 1g de matière sèche est réhydraté pendant 12 h à température ambiante dans un erlenmeyer contenant le milieu d'extraction. Le milieu d'extraction natif ou alcalin utilisé est une solution d'hydroxyde de potassium à différentes concentrations (0, 0,5 ou 1%) dans de l'eau distillée, ceci est un facteur supplémentaire aux deux précédents (temps / température) qui entraîne la codification suivante MAE/%KOH (ex : MAE2/0,5 correspondant à 90°C / 20 min / 0,5% KOH). Après réhydratation, l'échantillon est transvasé dans un récipient adapté au système MAE (OMPNI/XP-1500), scellé lui permettant de résister à une importante augmentation de pression et de prévenir de la perte de matière et/ou de solvant d'extraction. L'utilisation de ce type de récipient permet également de pouvoir réaliser une extraction à des températures plus importantes et d'augmenter le transfert de masse des composés ciblés contenus dans la matière première. La température du produit à l'intérieur du récipient ainsi que la pression interne sont contrôlées au sein d'un des récipients servant de référence OMNI/XP 1500 équipé de sonde de température et de pression. Durant l'extraction, la pression maximale atteinte est d'approximativement 159 kPa. Après chaque traitement MAE, l'extrait est récupéré et la précipitation des carraghénanes suit le même protocole détaillé dans la méthode conventionnelle précédemment.

2.3. Extraction Assistée par Enzymes (EAE)

2.3.1. Liste des enzymes et leurs caractéristiques

Les cocktails enzymatiques utilisés pour l'étude de l'hydrolyse de *S. chordalis* sont des échantillons fournis par la société Novozymes AS (Danemark). Les enzymes étudiées présentent des propriétés différentes et répondent à un cahier des charges déterminant les conditions optimales de son

utilisation. Au cours de cette étude, huit cocktails ont été étudiés, cinq présentant une activité carbohydrase et trois présentant une activité protéase.

Tableau XVI: Tableau présentant les caractéristiques techniques des protéases utilisées pour l'étude de l'Extraction Assistée par Enzyme

Enzyme	Protéases	
	Alcalase	Protamex
Type activité	Endoprotéase	Endopeptinase (alcaline)/ Endoprotéase
Organisme	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus sp.</i>
Températures optimales (°C)	55 à 70	35 à 60
pH optimal	6,5 à 8,5	5,5 à 7,5
Température / Temps de dénaturation (°C/min)	85/10	85/10
Activité (unités*)	2,4 (UA/g)	1,5 (UA/g)
Références	EC 3.4.21.62. EC 3.4.21.19. EC 3.4.22.31.	EC 3.4.21.62 EC. 3.4.24.28
Référence bibliographique	Hardouin <i>et al.</i> , 2014	Hardouin <i>et al.</i> , 2014

***UA** : Unité d'Activité en unité d'Anson

2.3.1.1. Les protéases

Le **Tableau XVI** suivant présente les caractéristiques des différentes protéases étudiées pour l'hydrolyse de *S. chordalis*.

2.3.1.2. Les carbohydrases

Le **Tableau XVII** présente les caractéristiques techniques des différentes carbohydrases étudiée pour l'hydrolyse enzymatique de *S. chordalis*.

2.3.1.3. Analyse de l'activité des cocktails enzymatiques

2.3.1.3.1. Analyse de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique des enzymes est obtenue suivant la méthode décrite par le document fournisseur « Novozymes Protease activity, AU(N) analysis by Konelab ».

Réaction :

Cette activité est mesurée par la réaction d'hydrolyse de la DiMéthyle Caséine (DMC) par l'enzyme entraînant la formation de peptide. Les groupements amine formés réagissent en présence d'acide TriNitroBenzèneSulfonique (TNBS) formant un complexe chromophore à 40°C. Le complexe formé absorbe à la longueur d'onde 405 nm.

Protocole :

Pour la réalisation du test d'activité des enzymes, une solution tampon phosphate pH 7,0 est préparée en dissolvant dans une fiole de 100 mL, 2,592 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ et 1,330 g de NaH_2PO_4 , H_2O dans de l'eau déminéralisée. Ensuite, une solution de substrat diméthyle caséine (DMC) à 0,32% est réalisée dans ce tampon phosphate. Cette solution est préparée à partir de 320 mg de N, N diméthyle caséine déshydraté dans 20 mL dans de l'eau déminéralisée par chauffage jusqu'au point d'ébullition. Une fois la solution de DMC refroidie l'ajouter au 40 mL de tampon phosphate pH 7,0. La solution de substrat est ensuite filtrée sur filtre Whatmann no. 54 et y ajouter 1,2 mL de solution Brij 35 15% puis ajuster le pH à $7,0 \pm 0,05$ avec de l'HCl.

Tableau XVII: Tableau présentant les caractéristiques techniques des carbohydrases utilisées pour l'Extraction Assistée par Enzyme de *S. chordalis* :

Carbohydrases						
Enzyme	Ultraflo L	VinoTaste Pro	Celluclast 1,5L FG	Viscozyme L	AMG 300L	Glucanex
Type activité	endo- β -glucanase (1,3)-(1,4)- β -D-glucanes	exo-(1,3)- β -glucanase polygalacturonase <i>Aspergillus niger</i>	cellulase	Beta-glucanase (endo- 1,3(4)-)	exo-1,4- α - D- glucanase <i>Aspergillus niger</i>	1,3- β - flucosidase <i>Trichoderma harzianum</i>
Organisme	<i>Humicola insolens</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Aspergillus aculeatus</i>		
Températures optimales (°C)	60	5 à 60	50	50	60	60
pH optimal	7	2,9 à 4	4,5	4 à 6	4,5	4,5
Température/ Temps de dénaturation (°C/min)	90/15	-	-	-	-	-
Activité (unités*)	45 FBG/g	2 500 (PGNU/g) 75 BGXU/g	700 EGU/g	100 FBG/g	-	200 BGXU/g
Références	EC 3.2.1.6 EC 3.2.1.8.	EC 3.2.1.15.	EC 3.2.1.4.	EC 3.2.1.6.	EC 3.2.1.3	EC 3.2.1.58
Référence bibliographique	Hardouin <i>et al.</i> , 2014 Novozyme, 2016	Novozyme, 2016	Hardouin <i>et al.</i> , 2014 Novozyme, 2009	Novozyme, 2010	Hardouin <i>et al.</i> 2014 Novozyme, 2016	Novozyme , 2004

***FBG** : De l'anglais Fungal Beta-Glucanase Units, substrat, de glucanes, spécifique aux champignons ; **PGNU** : unité pectinase; **BGXU** : unité β -glucanase ; **FXU** : Farbe Xylanase Unit ; **EGU** : EndoGlucanase Unit ;

En parallèle une solution de CaCl_2 est diluée à une concentration de 0.002 M à partir d'une solution mère à 0.2M précédemment préparée. Une solution de réactif TNBS d'acide 2,4,6-trinitrobenzènesulfonique est préparée à 0,2% m/v en diluant 49 μL de solution commerciale à 1M dans de l'eau déminéralisée. Le cocktail enzymatique testé est préparé en ajoutant 300 μL de cocktail ou 300 mg de poudre que l'on dilue de manière à obtenir un échantillon final de 3 mL dans le tampon pH 5,0.

Pour l'analyse de l'activité, les différents réactifs sont ajoutés au sein d'une microplaque 96 puits. Le cocktail enzymatique testé est préparé en ajoutant 300 μL de cocktail ou 300 mg de poudre que l'on dilue de manière à obtenir un échantillon final de 3 mL dans le tampon pH 7,0.

Une gamme de solution de substrat est réalisée de la manière suivante (**Tableau XVIII**) auquel on ajoute les 13 μL de cocktails enzymatique et 31 μL de réactif TNBS.

Tableau XVIII: Gamme de dilution pour l'évaluation de l'activité protéase des enzymes :

Substrat DMC (μL)	0	70	90	110	130	156
Enzyme testée (μL)	13					
TNBS (μL)	31					
H_2O (μL)	156	86	66	46	26	0

Un blanc de référence est réalisé en ajoutant 13 μL de solution de CaCl_2 seront ajoutés en remplacement de l'enzyme auxquels viendront compléter les 156 μL de substrat DMC et les 31 μL de réactif TNBS. La microplaque est ensuite incubée à 40°C dans un spectrophotomètre thermostaté. Un suivi de cinétique enzymatique est réalisé par une mesure de DO à 405 nm toutes les 2 minutes pendant 6 minutes.

2.3.1.3.2. Analyse de l'activité cellulase

L'évaluation de l'activité cellulase des cocktails enzymatiques est réalisée suivant le protocole décrit par le fournisseur « Novozymes Cellulase activity, EGU analysis by Konelab ».

Réaction :

La détermination de l'activité de l'enzyme est obtenue suivant la spécificité de la réaction d'hydrolyse de la cellulose en solution par les enzymes contenue dans le cocktail (1,4 endoglucanase). L'hydrolyse de la cellulose va former des carbohydrates réduits. Pour réaliser cette réaction, une forme substituée de la cellulose est mise en solution par l'ajout de substrat carboxyméthyle cellulose (CMC). La réaction est stoppée par le réactif alcalin PAHBAH (4-Hydroxybenzhydrazide) en présence de bismuth. Ces deux réactifs forment un complexe chromophore en présence de sucres réduits. Ce complexe absorbe à la longueur d'onde 405 nm permettant de lire l'absorbance de la solution par spectrophotométrie. La DO mesurée est proportionnelle à la quantité de sucres réduits produits soit à la quantité de cellulose hydrolysée.

Protocole :

Pour la réalisation de l'analyse de l'activité cellulase, un tampon acétate 0,1 M ; pH 5,0 est préparé en diluant 680,5 mg d'acétate de sodium trihydraté dans une fiole de 500 mL. Le pH est ensuite mesuré et ajusté par une solution de HCl 4M. Une partie de ce tampon est ensuite complété par une solution de Brij 23 15% afin d'obtenir une solution tampon acétate 0,1M contenant 225 mg Brij/mL à pH 5,0. Cette solution est réalisée en prélevant 90 mL du tampon précédemment préparé auquel est ajouté 150 µL de solution de Brij 15% obtenue à partir d'une solution de Brij 23 commerciale à 30 %. Le pH est ensuite mesuré puis ajusté à l'aide d'une solution à 2M de NaOH ou d'HCl.

Une solution substrat de carboxyméthyle cellulose (CMC) dans du tampon acétate 0,1 M pH 5,0 est préparée à 80°C en chauffant 9 mL de tampon acétate 0,1 M pH 5,0 dans un bécher. Arrêter le chauffage et ajouter doucement sous agitation les 50 mg de CMC déshydratée. Laisser le substrat reposer 30 minutes une fois totalement dissous afin de faire baisser la température. Contrôler le pH et ajuster-le par une solution de NaOH ou HCl 2M. Ajouter la solution obtenue dans une fiole jaugée de 10 mL et ajuster jusqu'au trait de jauge par du tampon pH 5,0.

Une solution de réactif PAHBAH/Bismuth/Tartrate est obtenue en ajoutant 55,2 mg de bismuth (III) acétate, 200 mg de PAHBAH et 500 mg de tartrate de potassium sodium. Ces trois produits sont ensuite dissous dans 10 mL de NaOH 500 mM. Ces 10 mL sont ensuite incorporés dans une fiole de 100 mL.

Le cocktail enzymatique testé est préparé en ajoutant 300 µL de cocktail ou 300 mg de poudre que l'on dilue de manière à obtenir un échantillon final de 3 mL dans le tampon pH 5,0.

Une gamme de concentration en substrat est réalisée suivant le **Tableau XIX**.

Tableau XIX: Gamme de dilution pour l'évaluation de l'activité cellulase des enzymes

	Témoin	Blanc	1	2	3	4	5
CMC (μL)	0	110	30	50	70	90	110
Enzyme (μL)	30	30	30	30	30	30	30
Tampon (μL)	110	60	80	60	40	20	0

A ce volume vient s'ajouter 60 μL de réactif PAHBAH dans les puits sauf le puit correspondant au blanc. Un blanc échantillon est également réalisé pour chaque échantillon en ajoutant 60 μL de tampon. Les microplaques sont ensuite incubées à 40°C dans un spectrophotomètre thermostaté et un suivi de la cinétique d'hydrolyse de la cellulose est réalisée en mesurant la DO à 405 nm toutes les deux minutes pendant 20 minutes.

2.3.1.3.3. Analyse de l'activité β-glucanase

La méthode d'analyse de l'activité β-glucanase des cocktails enzymatiques a été réalisée suivant l'adaptation du protocole fournisseur « Novozymes détermination of β-glucanase activity by Konelab analyser ».

Réaction :

L'analyse de l'activité β-glucanase est basée sur la réaction d'hydrolyse du substrat b-glucane par l'enzyme formant des carbohydrates réduits. Cette réaction est ensuite arrêtée par le réactif PAHBAH et bismuth. Les sucres réduits produit réagissent avec le réactif pour former un complexe absorbant à la longueur d'onde 405 nm. La cinétique de formation de ces sucres réduits au cours du temps est mesurée par spectrophotométrie.

Protocole :

L'activité β-glucanase des cocktails enzymatiques est évaluée de la même manière que pour l'analyse de l'activité cellulase décrite précédemment (cf. Partie 2.3.1.3.2 p. 187), hormis le substrat qui diffère. Le substrat est une solution de β-glucane 5,9 g/L dans du tampon phosphate. Cette solution est préparée en pesant 59 mg de β-glucane déshydraté qui sont ajouté dans une fiole jaugée

de 10 mL. Ce produit est ensuite dilué dans 300 μ L d'éthanol accompagné de 4 mL de tampon phosphate. De manière à faciliter sa dissolution la solution est chauffée jusqu'au point d'ébullition puis refroidie immédiatement dans un bain de glace sous agitation jusqu'à atteindre les 21°C. Le pH est mesuré et ajusté à 5,0 par une solution de NaOH ou HCl 2M. Le volume est ensuite ajusté à 10 mL par ajout de tampon phosphate pH 5,0. Le réactif PAHBAH/Bismuth/Tartrate permettant d'obtenir le complexe est préparé de la même manière que dans la méthode d'analyse de l'activité cellulase. Le cocktail enzymatique testé est préparé en ajoutant 300 μ L de cocktail ou 300 mg de poudre que l'on dilue de manière à obtenir un échantillon final de 3 mL dans le tampon pH 5,0.

Une gamme de concentration en substrat est réalisée suivant le **Tableau XX**:

Tableau XX : Gamme de dilution pour l'évaluation de l'activité β -glucanase des enzymes:

	Témoin	Blanc	1	2	3	4	5
β-glucane (μL)	0	110	30	50	70	90	110
Enzyme (μL)	30	30	30	30	30	30	30
Tampon (μL)	110	60	80	60	40	20	0

A ce volume vient s'ajouter 60 μ L de réactif PAHBAH dans les puits sauf le puit correspondant au blanc. Un blanc échantillon est également réalisé pour chaque échantillon en ajoutant 60 μ L de tampon. Les microplaques sont ensuite incubées à 40°C dans un spectrophotomètre thermostaté et un suivi de la cinétique d'hydrolyse de la cellulose est réalisée en mesurant la DO à 405 nm toutes les deux minutes pendant 20 minutes.

Détermination de l'activité des enzymes :

La mesure de l'absorbance au cours du temps permet de déterminer la cinétique de dégradation du substrat et la formation du produit. De ce fait en fonction de la concentration en substrat initial il est possible de tracer les courbes $DO = f(\text{temps})$ pour chaque concentration. Ce premier graphique permet d'identifier les pentes des courbes dans la phase exponentielle et d'en extraire les valeurs pour chaque concentration en substrat. Un second graphique est ensuite réalisé, en traçant la droite $\text{pente} = f(\text{concentrations en substrat})$. La pente de cette seconde droite permet d'identifier l'activité de l'enzyme.

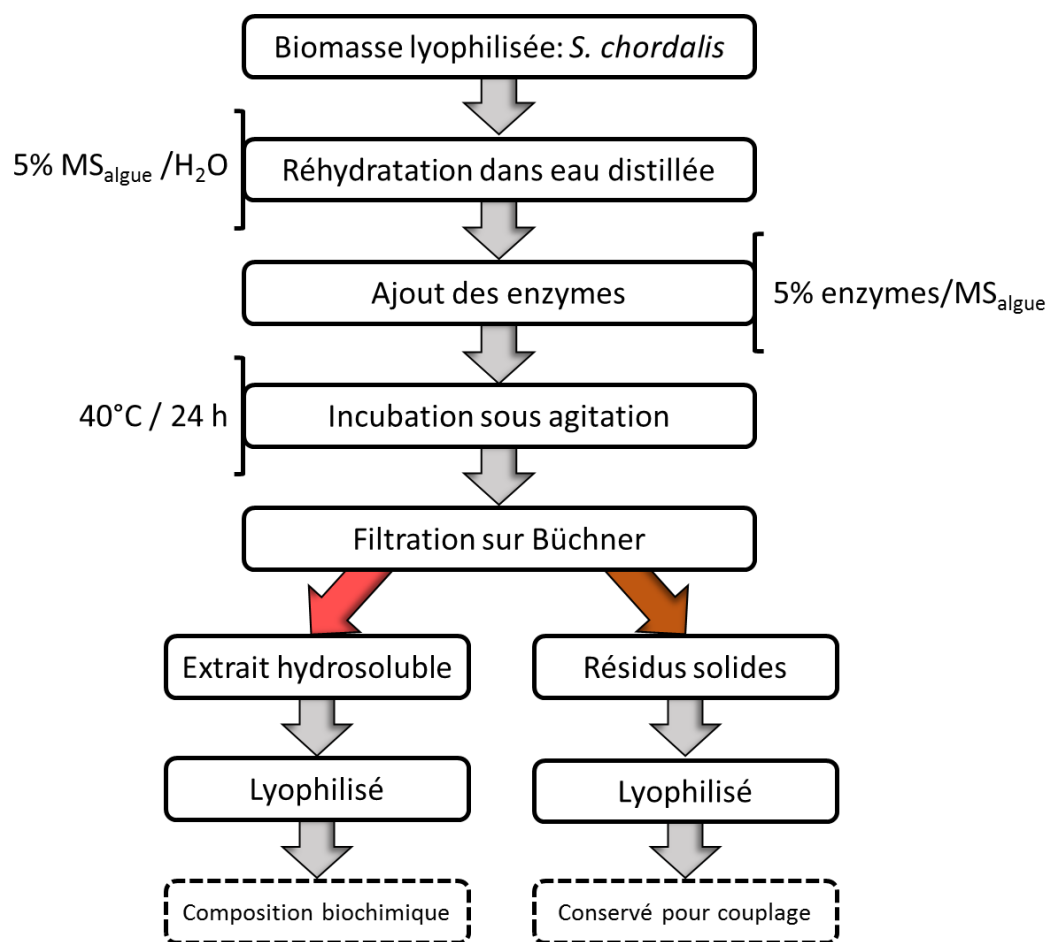


Figure 25: Schéma du protocole d'Extraction Assistée par Enzymes

2.3.2. Protocole d'extraction

L'hydrolyse enzymatique est préparée à partir d'algue congelée. La matière sèche de l'algue est réalisée préalablement afin de déterminer le taux de matière sèche du produit. À partir de ce taux de matière sèche (MS) va être définie la quantité d'algue à utiliser, le taux de dilution et la quantité d'enzyme à ajouter.

Pour la réalisation des hydrolyses, la matière sèche algale a été diluée dans de l'eau déminéralisée de manière à obtenir un taux de matière sèche finale dans le milieu de 5%. Le cocktail enzymatique ajouté dans le milieu équivaut à un ratio de MS enzyme/MS algue de 5% également (soit 0,25% d'enzyme). Après hydratation du mélange enzyme/algue, celui-ci est incubé au bain marie sous agitation. Les conditions l'hydrolyses sont fixées à une température régulée de 40°C ceci pendant 24 heures. En fin d'incubation, les hydrolysats sont filtrés sur Büchner de manière à séparer l'extrait hydrosoluble du résidu. Les deux phases sont ensuite congelées séparément à – 20°C puis lyophilisées afin d'être conservées ensuite dans un sachet hermétique, à l'obscurité et à température ambiante. Pour chaque cocktail enzymatique testé, l'essai est réalisé en triplicata avec en parallèle un essai témoin en milieu aqueux sans enzyme. La **Figure 25** schématise les différentes étapes du procédé d'Extraction Assistée par Enzymes.

Le rendement d'extraction de l'EAE représente la quantité de matière solubilisé dans la phase aqueuse par rapport à la matière sèche de départ de l'échantillon. La matière sèche de l'échantillon est déterminée par gravimétrie suivant la méthode présentée ci-après (cf. Partie 4.1 p 200) La matière sèche calculée décompte la matière sèche apportée par l'ajout de l'enzyme dans le mélange réactionnel.

2.4. Extractions au CO₂ supercritique (scCO₂)

Le système utilisé pour la réalisation de l'extraction au CO₂ supercritique est un appareillage pilote industriel. L'extraction est réalisée sur un échantillon de matière première séchée et broyée d'environ 500 grammes à un taux de matière sèche de 80%. Pour réaliser l'extraction l'algue est incorporée dans une cartouche présentant à chaque extrémité un fritté. Cette cartouche une fois remplie est incorporée au sein de la chambre d'extraction. Le système contient deux pompes indépendantes permettant de réguler le débit de dioxyde de carbone et de co-solvant indépendamment. Avant de démarré l'extraction, le dioxyde de carbone est mis en circulation dans

le système et soumis à une pression de 290 bars et 45°C de manière à atteindre son état supercritique. L'extraction démarre lorsque le solvant à l'état supercritique est mis en contact avec la matière, le temps de traitement dure deux heures par recirculation du solvant au sein du système fermé avec un débit fixé à 10 kg.h⁻¹. Lorsque le dioxyde de carbone est complété d'un co-solvant, la quantité de celui-ci est exprimée en pourcentage de CO₂ utilisé. Ce pourcentage est équivalent au pourcentage de débit de CO₂. Au court de l'extraction, l'extrait est récupéré dans un récipient opaque lors de son passage au sein des séparateurs. Ceux-ci sont vidés régulièrement de manière à éviter le refoulement de l'extrait au sein du système.

Les extraits obtenus par CO₂ supercritique ont été réalisés suivant trois conditions différentes, en présence et en absence de co-solvant (éthanol). Un système de codification a été utilisé pour les différenciés, sc-SC2 correspondant au traitement sans co-solvant de *S. chordalis* ; sc-SC3 correspondant au traitement avec 2% d'éthanol et sc-SC4 correspondant au traitement par 8% d'éthanol. Le temps de traitement est fonction de la variabilité du débit, il est donc dépendant du rapport Q_{CO2}/Q_{MS} (Q_{CO2} : quantité de dioxyde de carbone (g) ; Q_{MS} : quantité de matière sèche traitée (g)).

3. Purification des molécules par chromatographie préparative

3.1. Caractérisation des différentes classes de lipides

Une partie des lipides totaux sont séparés sur une colonne de gel de silice (rapport silice/lipide, 100/1 ; m/m ; Silica 60 Å, taille des particules 20 à 45 µm, Fischer scientific, UK). L'élution de la fraction lipidique est réalisée par un du dichlorométhane pour la collecte des lipides neutres, par l'acétone pour l'élution des glycolipides et pour terminer par l'élution au méthanol pour la collecte de phospholipides. Les fractions sont collectées et évaporées afin d'éliminer les solvants organiques sous basse pression. L'ensemble des masses sont additionnées afin de faire le rapport avec la quantité de lipides totaux injectée. Chaque classe de lipides sont exprimées en pourcentage de la masse des lipides totaux.

3.2. *Purification par Chromatographie Partage Centrifuge*

3.2.1. *Détermination, composition et préparation du système solvant*

Le système solvant utilisé pour la Chromatographie Partage Centrifuge (CPC) est composé d'un système biphasique composé d'un mélange de solvant quaternaire. Le ratio de solvant est déterminé en fonction du coefficient de partition (K_d) du composé ciblé. Le ratio entre les différents solvants suit la gamme Arizona et est déterminé de manière préliminaire par la méthode de « shake flask » dans des vials de 4 mL. La méthode consiste à l'incorporation d'environ 5 mg d'extrait brut dans un faible volume de système solvant (1 mL). L'échantillon est agité de manière à dissoudre l'extrait entre les deux phases lui permettant de se répartir entre les deux phases en fonction de son affinité. De manière à optimiser la détermination du système solvant, les différents systèmes présentés dans la gamme Arizona sont testés par dichotomie. Les phases supérieure et inférieure du système solvant sont analysées via une méthode de chromatographie sur couche mince (plaque Alugram en gel de silice, SiO_2 , F254, Macherey-Nagel GmbH&co). L'élution est réalisée en cuve contenant un mélange chloroforme/méthanol (90 :10, v/v) qui sature la cuve et permet d'éluer les extraits au travers de la couche mince. Pour chaque essai, deux plaques sont réalisées simultanément. Suite à l'élution, une plaque est exposée aux rayonnements UV à 365 nm pour observer l'absorbance des composés élués avant d'être ensuite révélés par une solution d'anysaldéhyde sulfurique 1% (anysaldéhyde / acide sulfurique / acide acétique / méthanol / eau, 1/2/10/40/50, v/v). La seconde plaque est révélée par une solution de 2,2-diphenyle-1-picrylhydrazyle (DPPH) à 0,1 mg/mL diluée dans du méthanol.

3.2.2. *Méthode de fractionnement par Chromatographie Partage Centrifuge (CPC)*

Le fractionnement de l'échantillon est réalisé à l'aide d'un système SCPC-250 produit par Armen Instrument (Saint-Avé, France). L'appareillage se compose d'une colonne CPC contenant 1953 cellules représentant un volume de 250 mL et d'un système Spot-prep permettant le contrôle de l'ensemble de l'appareillage. Ce dernier contient également l'ensemble du système de pompe ayant une capacité de débit de 250 mL/min, une boucle d'injection de 10 mL liée à une valve six voies ainsi que le détecteur UV-DAD. Le fractionnement est réalisé par l'utilisation d'un système solvant biphasique de la gamme Arizona (Y) composé de n-heptane, d'acétate d'éthyle, de méthanol et d'eau distillée dans les proportions 19/1/19/1 (v/v) respectivement. L'élution se réalise en mode

isocratique ascendant. C'est-à-dire, la phase inférieure du système solvant est dans un premier temps injecté à un débit de 50 mL/min au sein de la colonne en rotation à 500 rpm pendant 10 minutes soit environ deux volumes de colonnes. Une fois cette étape réalisée, la vitesse de rotation de la colonne est augmentée jusqu'à 2000 rpm. Une fois la vitesse de rotation ajustée, la colonne est équilibrée en injectant la phase supérieure au travers de la colonne à un débit de 10 mL/min. L'équilibre est atteint pour une pression de 51 bars et avec un volume de phase stationnaire libérée de 65 mL. L'extrait méthanolique de *S. chordalis* (m=1.432 g) est diluée dans un volume de système biphasique de 7 mL ($\phi_{\text{inférieure}}/\phi_{\text{supérieure}}$, 1:1 v/v). Après dilution de l'échantillon, celui-ci est filtré avant injection sur filtre seringue de $\varnothing$ 25 mm et de porosité 0,45 μm (VWR). Au cours de l'élution de l'échantillon au travers de la colonne, la collecte se réalise en sortie de détecteur à l'aide d'un collecteur de fraction dans des tubes de 25 mL en séparant les tubes par fraction de 10 mL. Les conditions de la méthode ainsi appliquées nécessitent un temps de traitement de 90 minutes afin d'obtenir les fractions d'intérêt et pouvoir poursuivre par l'étape d'extrusion de la phase stationnaire à un débit de phase inférieure de 50 mL/min. La séparation des différents composés au cours de l'élution est suivie par une analyse du signal UV aux longueurs d'onde 254, 280, 310 et 330 nm complétée par un scan en continu entre les longueurs d'onde 200 à 400 nm. Après collection, la séparation des composés entre les fractions collectées est étudiée à nouveau par chromatographie sur couche mince.

3.2.3. Méthode de purification par Chromatographie liquide préparative.

La purification des extraits de *S. chordalis* sont réalisés à partir du système de Chromatographie Liquide Préparative couplé à un détecteur à barrette de diode UV-visible (Prep-LC-DAD) (Spot-prep II 50, Armen-Instruments) équipé d'une colonne semi-préparative phase inverse avec greffage C18 (Reprosil 100, 5 μm , 250x10 mm). L'élution est réalisée par un mélange de deux solvants l'Acétonitrile (ACN) et l'eau MilliQ. La méthode démarre par une phase d'équilibration de la colonne avec un mélange ACN : eau (80 :20, v/v) pendant 5 min. L'injection du produit est réalisée par injection de l'échantillon dans une boucle, celui-ci est ensuite injecté par le système à la fin de l'étape d'équilibration de la colonne. L'élution se poursuit par une phase isocratique ACN : eau (80 :20, v/v) pendant 25 min, puis un gradient de 80% à 100% d'ACN pendant 5 minutes et une phase isocratique 100% ACN pendant 3 minutes. L'élution est réalisée à un débit de 10 mL/min. Le chromatogramme est enregistré pour des longueurs d'onde de 280, 310, 330 et 400 nm et complété par la mesure du spectre (200-600 nm).

4. Méthode d'analyse de la composition biochimique

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

Avant la réalisation de l'Extraction Assistée par Enzyme, la détermination du taux de matière sèche du lot d'algue utilisé est primordiale pour la détermination des ratios matière première/eau et matière première/enzyme comme présenté ci-après.

Pour déterminer la matière sèche de l'algue une masse arbitraire de 500 mg de matière fraîche est pesée dans un tube de à hémolyse dont on connaît la masse. Le tube est ensuite incubé pendant 12 heures dans une étuve à 100 °C. La masse du tube est ensuite repesée avec la matière sèche.

Le taux de matière sèche de l'algue est obtenu par (Eq.8) :

$$\% MS = \frac{masse_{tube+éch\ sec} - tare_{tube}}{masse_{éch\ fraîche}}$$

Équation 8

4.2. Analyse de la composition biochimique des extraits.

La composition biochimique des extraits de carraghénanes obtenus par les méthodes d'extraction conventionnelle et assistée par micro-ondes est analysée par le dosage des 3,6 anhydrogalactose (DA), des protéines et des sucres totaux suivant les méthodes décrites respectivement par Matsuhira et Zanolungo (1983), Smith *et al.* (1985) et Dubois *et al.* (1956). De plus, une analyse de la composition en sulfate est menée suivant deux méthodes, l'une décrite par Jacques *et al.* (1968) permet de quantifier les groupements sulfates liés à la structure des carraghénanes. La seconde méthode décrite par Jackson et McCandless (1978) quantifie la composition totale en sulfate de l'extrait. Les méthodes précédemment citées sont décrites précisément par la suite.

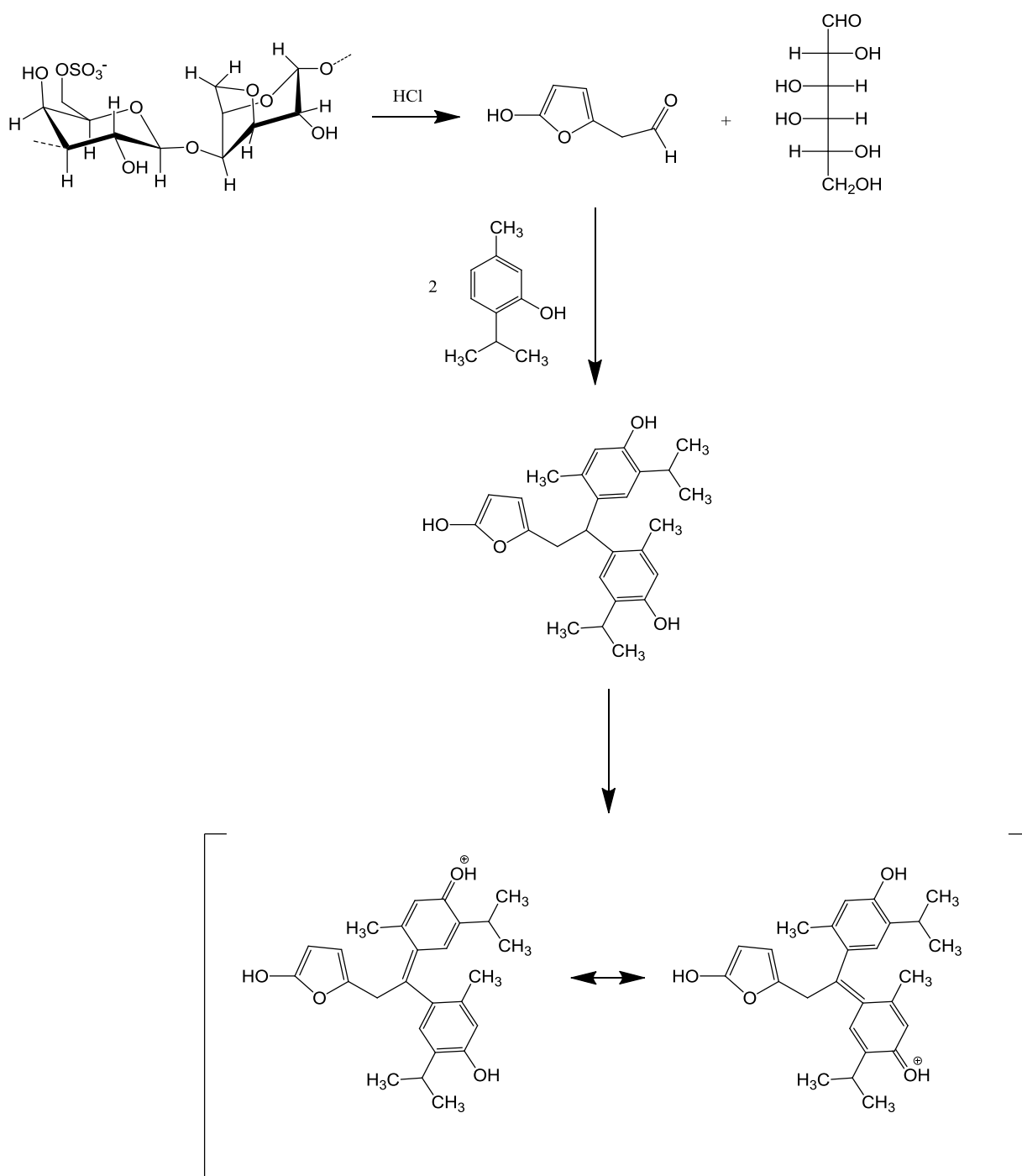


Figure 26: Schéma de la réaction d'hydrolyse des carraghénanes et de la formation du complexe chromophore permettant le dosage des 3,6 anhydrogalactose suivant la méthode décrite par Matsuhira et Zanlungo, (1983).

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

Cent mg de matière sèche d'un échantillon sont déposés dans un creuset 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 (Carbolites Furnaces CSF, UK) à moufle à 685°C. Les creusets sont ensuite placés dans un dessiccateur. La différence des masses initiales et finales correspond à la masse de la matière minérale de l'échantillon.

4.2.2. Dosage colorimétrique du 3,6-anhydrogalactose

La méthode de dosage en 3,6 anhydrogalactose est réalisée suivant la méthode décrite par Matsuhira et Zanlungo (1983).

Principe : Le dosage colorimétrique de 3,6 anhydrogalactose est basé sur la transformation des hexoses en hydroxyméthylfurfural par leur cyclisation et déshydratation en milieu acide à chaud. En présence de phénols et d'ions fer III, ces dérivés furfural ont la capacité de se condenser avec le phénol en solution pour former des complexes chromophores de coloration verte (**Figure 26**) absorbant dans les longueurs d'onde visible.

Protocole :

Les extraits de carraghénane et le standard d'agarose (Sigma) sont préalablement séchés à une température de 100 – 105°C. Pour chaque extrait, 10 mg de carraghénanes sont prélevés puis ajoutés dans une fiole de 50 mL, un volume d'eau distillée est ensuite ajouté afin de pouvoir dissoudre l'extrait à chaud sous agitation. Après dissolution totale, l'extrait est refroidi à température ambiante puis le volume est complété jusqu'au trait de jauge. Pour chaque extrait dilué un aliquot de 2 mL est prélevé et ajouté dans un tube à col visé de 25 mL. A ce volume vient s'ajouter 0,5 mL de réactif thymol/éthanol et 5 mL de réactif de FeCl₃/HCl. Le mélange formé est homogénéisé par agitation à l'aide d'un vortex. Les tubes sont ensuite fermés et incubés à 80°C pendant 13 minutes. Après incubation, les solutions sont refroidies rapidement dans la glace. Les solutions présentent une coloration verte et sont diluées par ajout de 10 mL d'éthanol. L'absorption est ensuite mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à longueur d'onde 635 nm.

En parallèle de la préparation des échantillons de carraghénanes, une gamme étalon est réalisée à partir de la solution mère d'agarose à 200 µg/mL (0, 40, 80, 120, 160, 200 µg).

Un contrôle positif de la réaction est réalisé à partir de l'extrait de référence d'agar (REF : A 112/95).

Détermination de la concentration en % de 3,6 anhydrogalactose (3,6 AG) :

La teneur en 3,6 AG est déterminée suivant l'**équation 9** et est exprimée en % de l'extrait total :

$$\% \text{ 3,6 AG} = \frac{[2,5 \times \mu\text{g de 3,6 AG}]}{[m_{\text{échantillon}} \times 1000]}$$

Équation 9

4.2.3. Dosage colorimétrique des groupements sulfates

4.2.3.1. Dosage colorimétrique par la méthode Jackson et McCandless (1978)

Principe : Le dosage des sulfates est réalisé suivant la méthode décrite par Jackson et McCandless, (1978).

Protocole :

Les échantillons sont préalablement séchés à 100 – 105°C. Ces derniers sont ensuite dissous dans 1mL la solution d'HCl 1N en pesant 2,5 mg de chaque échantillon dans un tube à col visé de 15 mL. Après être scellés, les tubes sont incubés dans un bloc chauffant à 105°C pendant 12 heures. Après refroidissement, un volume d'eau distillée de 10 mL est ajouté à chaque échantillon. Afin d'éliminer les résidus en suspension, une filtration sur filtre seringue de porosité 0,45 µm est réalisée pour chaque échantillon. Un aliquot de 1,1 mL de la solution filtrée est prélevé et ajouté dans un tube auquel on ajoute 1,2 mL de solution TCA 8% et 0,6 mL de réactif d'agarose 0,01%. Les mélanges obtenus sont ensuite homogénéisés par vortex et laissés reposer pendant 35 minutes à température ambiante. Après apparition d'un trouble au bout de la période de repos, les échantillons sont homogénéisés et leur absorbance est lue à la longueur d'onde 500 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Courbe d'étalonnage :

Une courbe d'étalonnage est obtenue à partir de la solution mère de sulfate de potassium en réalisant une gamme de concentration de 0 à 100 µg/mL.

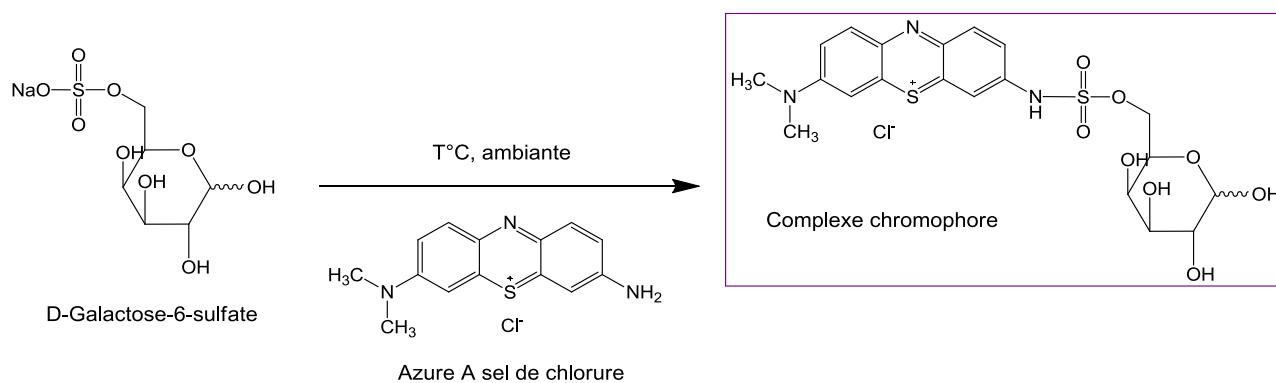


Figure 27: Principe et réaction du dosage des groupements sulfates liés aux polysaccharides par la méthode de Jaques et al. (1968)

Détermination de la concentration en sulfates :

La concentration en sulfate est exprimée en pourcentage de l'extrait et déterminée suivant l'équation 10 suivante :

$$\% \text{ de } SO_4^{2-} = \frac{\mu g \text{ de } SO_4^{2-}}{m_{\text{échantillon}} \times 1000}$$

Équation 10

4.2.3.2. Dosage colorimétrique par la méthode Jaques et al. (1968)

Le dosage des sulfates est déterminé suivant la méthode colorimétrique décrite par Jaques et al. (1968).

Principe

Le dosage colorimétrique est basé sur la réaction de complexation (**Figure 27**) formant un chromophore de coloration violette absorbant à longueur d'onde 535 nm. Cette réaction a lieu entre le groupement sulfate du polysaccharide et le réactif 3,7-bis (diméthylamino)-1,9-diméthylphénothiazine-5-ium chloride (Azure A).

Protocole :

Dans une microplaque 96 puits, 20 µL de chaque échantillon à 1 mg/mL sont ajoutés dans chaque puits puis complétés par 200 µL de réactif Azure A (Alfa Aesar, N° CAS : 531-53-3). En parallèle, une gamme de dextran sulfaté (Sigma, N°CAS : 9015-73-0) est réalisée en mesurant le taux de sulfate pour des concentrations de 0 à 50 µg/mL. Une courbe d'étalonnage est obtenue à partir de la solution mère de dextran sulfaté en réalisant une gamme de concentration de 0 à 50 µg/mL.

La concentration en sulfate est exprimée en pourcentage, elle est déterminée suivant l'équation 11 suivante :

$$\% \text{ groupements sulfates} = \frac{DO \times d \times 0,17}{a \times 32} \times 96 \times 0,1$$

Équation 11

Correspondant à :

La moyenne DO calculée à partir du triplicata analysé dont la DO du blanc a été soustraite (0 µg/mL de dextran sulfaté), le coefficient « a » obtenue par la droite linéaire de la gamme étalon du standard

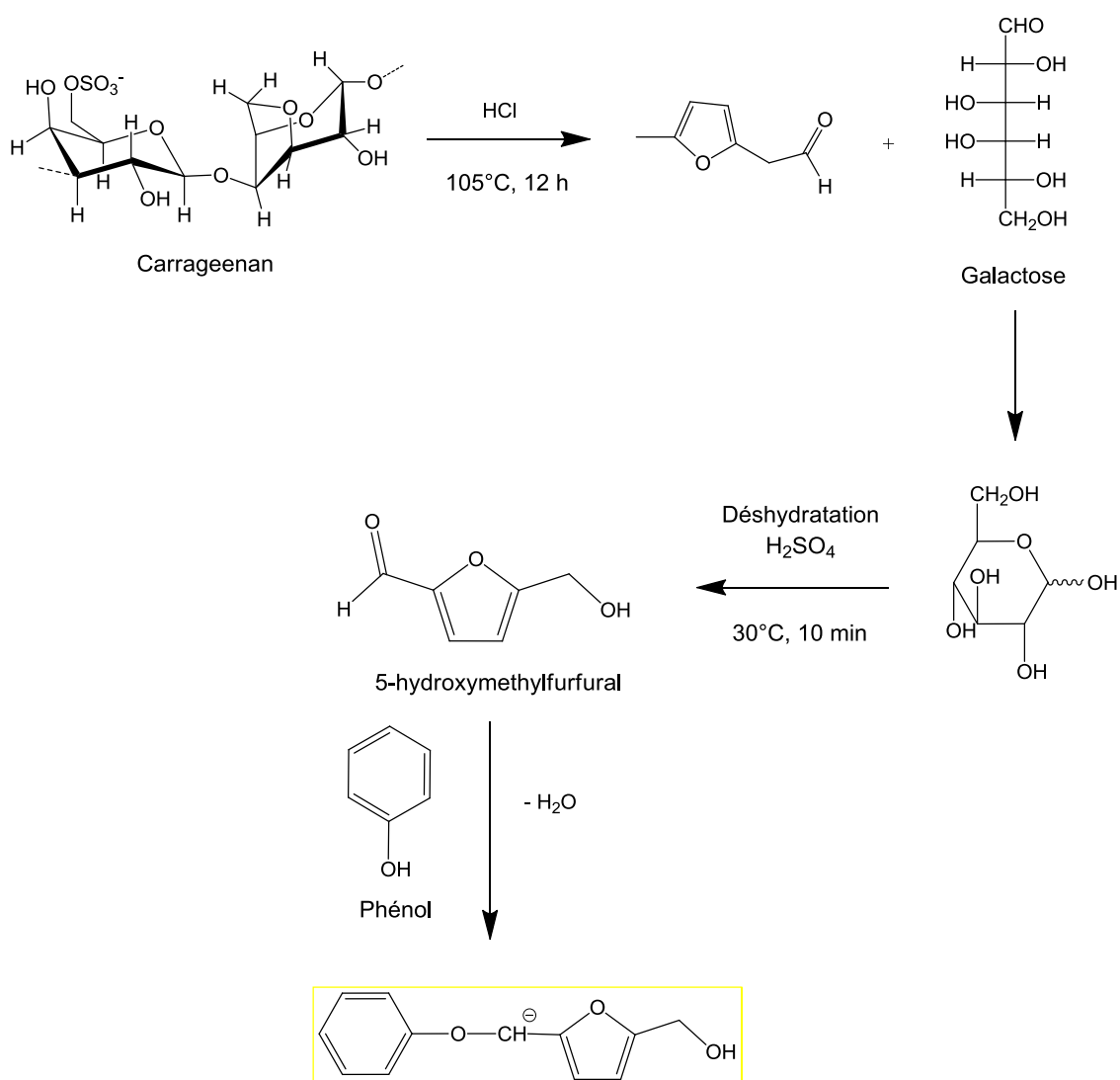


Figure 28: Schéma de la réaction d'hydrolyse entraînant la formation de furfural et la formation du chromophore permettant le dosage des sucres totaux par la méthode de Dubois et al. 1956

et le facteur de dilution « d » pris en compte par rapport à la concentration initiale de l'échantillon. Un facteur correctif de 0,17 permet d'obtenir la concentration en soufre dans l'échantillon par rapport à la concentration en sulfate du dextran (17%), et la masse molaire du soufre équivalent à 32 g.mol^{-1} . Cette méthode considère qu'une mole de soufre qui réagit équivaut à une mole de sulfate d'où le facteur 96 permettant de déterminer la concentration massique de sulfate.

4.2.4. Dosage colorimétrique des sucres totaux

Le dosage colorimétrique utilisé pour déterminer la teneur en sucres totaux suit la méthode décrite par Dubois *et al.* (1956).

Principe

Le principe du dosage des sucres totaux est basé sur la réaction de complexation entre les dérivés furfural et le phénol. L'hydrolyse des polysaccharides libère les monosaccharides formant le polymère (**Figure 28**). Les oses formés sont déshydratés en présence d'acide minéral concentré sous l'effet de la chaleur. Cette déshydratation des oses entraîne la formation de dérivés furfural. L'ajout de réactif phénol en solution entraîne une réaction de condensation entre deux molécules de phénol et ces dérivés furfurals. Ceci aboutit à la formation d'un complexe chromophore caractérisé par la formation d'une coloration jaunâtre. L'intensité de cette coloration est dépendante de la concentration en complexe indirectement liée à la teneur en sucres de l'extrait qui absorbe à 485 nm.

Protocole :

Dans un tube à hémolyse, un aliquot de 1 mL d'échantillon préalablement hydrolysé par l'acide sulfurique concentré est réalisé. À cet échantillon vient s'ajouter 50 μL de réactif phénol 75% puis le mélange est homogénéisé par vortex. Pour chaque échantillon, un volume de 2,5 mL d'acide sulfurique concentré est ajouté sous sorbonne, la réaction étant exothermique une importante chaleur se forme au sein du tube, il est donc nécessaire de refroidir ces derniers dans la glace avant de les incubés à 30°C pendant 10 minutes. Après incubation, l'absorbance de chaque tube est mesurée précisément à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde 485 nm (Spectrophotomètre UV-1800, Shimadzu Europe GmbH, Allemagne). Une courbe d'étalonnage est obtenue à partir de la solution mère de glucose en réalisant une gamme de concentration de 0 à 100 $\mu\text{g/mL}$. Cette gamme de concentration permet de déterminer la linéarité de la courbe de dosage.

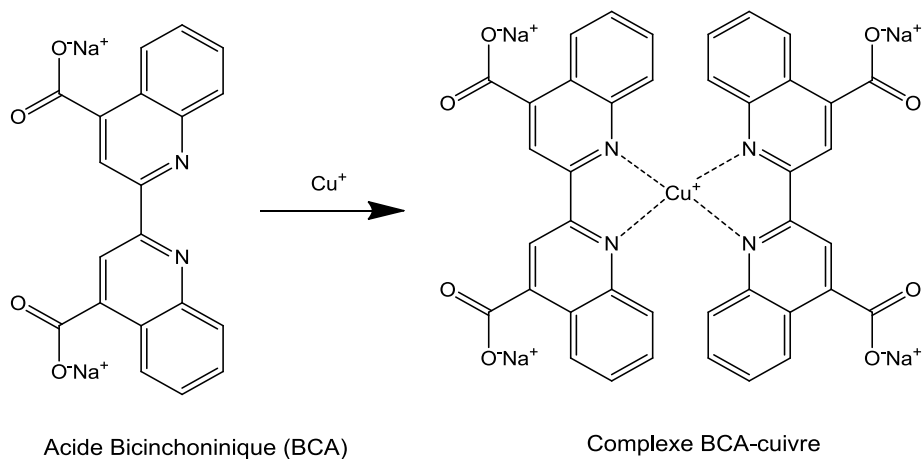
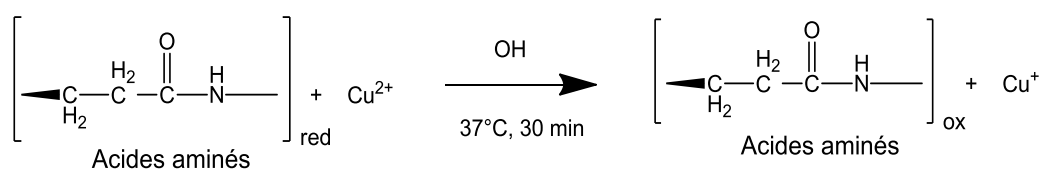


Figure 29: Schéma de la réaction de Biuret et de complexation permettant le dosage des protéines suivant la méthode décrite par Smith *et al.* (1985)

Détermination du taux de sucre totaux dans l'échantillon :

La concentration en sucre totaux est exprimée en pourcentage, celle-ci est déterminée suivant l'équation 12 suivante :

$$\% \text{ sucres totaux} = a \times DO \text{ moyenne} \times 10 \times d$$

Équation 12

Correspondant à :

La moyenne de DO est déterminée à partir des mesures réalisées en triplicata sur l'échantillon. Le coefficient directeur « a » de la droite de calibration obtenue par l'analyse de la gamme de standard. Le facteur de dilution « d » est pris en compte par rapport à la concentration de l'échantillon.

4.2.5. Dosage colorimétrique des protéines

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 selon la méthode de Smith *et al.* (1985).

Les ions cuivreux vont alors être chélatés par le 4,4'-dicarboxy-2,2'-biquinoline (acide bicinchoninique, BCA fournisseur) pour former un chromophore absorbant à $\lambda=562$ nm. La réaction est schématisée par la **Figure 29**.

Protocole :

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. Une gamme étalon de BSA (Agros Organic, N° CAS 9048-46-8) est réalisée avant chaque série d'analyse (0, 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g} / \text{mL}$).

Détermination de la composition en protéines.

Les teneurs en protéines sont calculées en appliquant l'équation 13 :

$$\text{Teneur en protéine (\% extrait total)} = \frac{DO_{\text{moyenne}} \times \text{facteur de dilution}}{a \times 10}$$

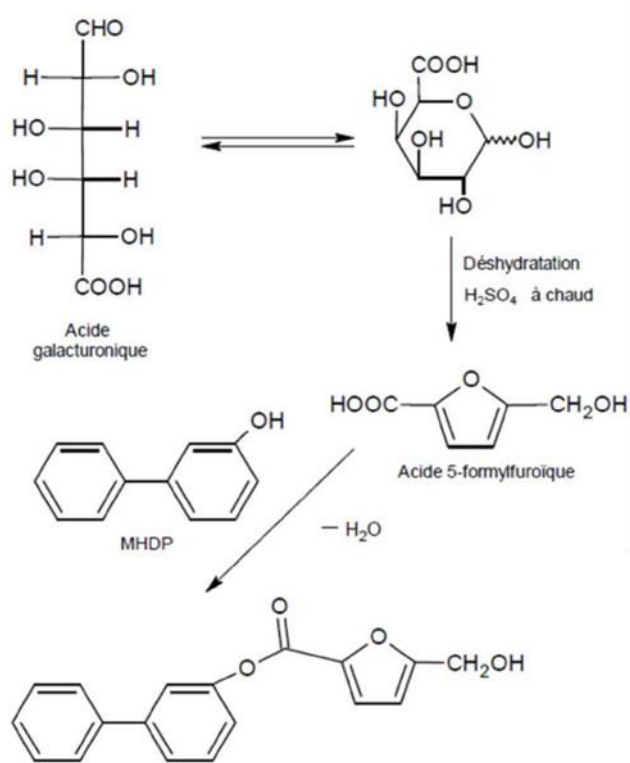


Figure 30: Principe et réaction du dosage des acides uroniques par la méthode de Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973) modifiée par Filisetti-Cozzi et al. (1991).

Correspondants :

La valeur de DO est obtenue par la moyenne des DO mesurée par spectrophotométrie sur le triplicata pour chaque échantillon ; le facteur nommé « a » est déterminé par la pente de la droite d'étalonnage ; le facteur multiplicatif « 10 » permet d'exprimer les résultats obtenus en concentration (µg/mL) en % de la matière sèche d'extrait.

4.2.6. Dosage colorimétrique des acides uroniques.

Principe :

Le dosage des acides uroniques est réalisé suivant la méthode développée par Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973) puis modifiée par Filisetti-Cozzy et al. (1991). 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 (**Figure 30**). Ces dérivés au contact du Méta-HydroxyDiPhényle (MHDP) forment un chromophore de couleur rose absorbant à $\lambda=525$ 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.

Mode opératoire :

Pour la réalisation du dosage des acides uroniques, une solution standard d'acide glucuronique (Sigma-Aldrich G5269, N°CAS 207300-70-7) est préparée dans de l'eau ultra-pure (Purelab Ultra, ELGA, France) à 1 mg/mL. Les réactifs, sulfamate de potassium 98 % à 4 M (Alfa Aesar, B24447) et tétraborate de sodium à 75 M (Merk, 524 A12408) sont dissous dans d'une solution d'acide sulfurique concentré 96 %. Le réactif MHDP à 0,15 % est dissous dans une solution d'hydroxyde de sodium à 0,5 % (Fisher Scientific 11983223). Les échantillons analysés sont préparés à une concentration de 1 mg/mL obtenu suite à une hydrolyse acide de l'extrait.

Pour chaque essai, un mL d'échantillon à analyser (dilué si nécessaire) est disposé dans un vial puis un volume de 40 µL de sulfamate de potassium 98% à 4 M y est ajouté. Après homogénéisation du mélange, un volume de tétraborate de sodium à 75 M (2,4 mL) est ajouté au mélange. Les vials sont ensuite bouchés puis incubés à 80°C pendant 20 minutes puis refroidi rapidement dans la glace. Après avoir agité sous vortex le mélange, 2,4 mL d'une solution 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.

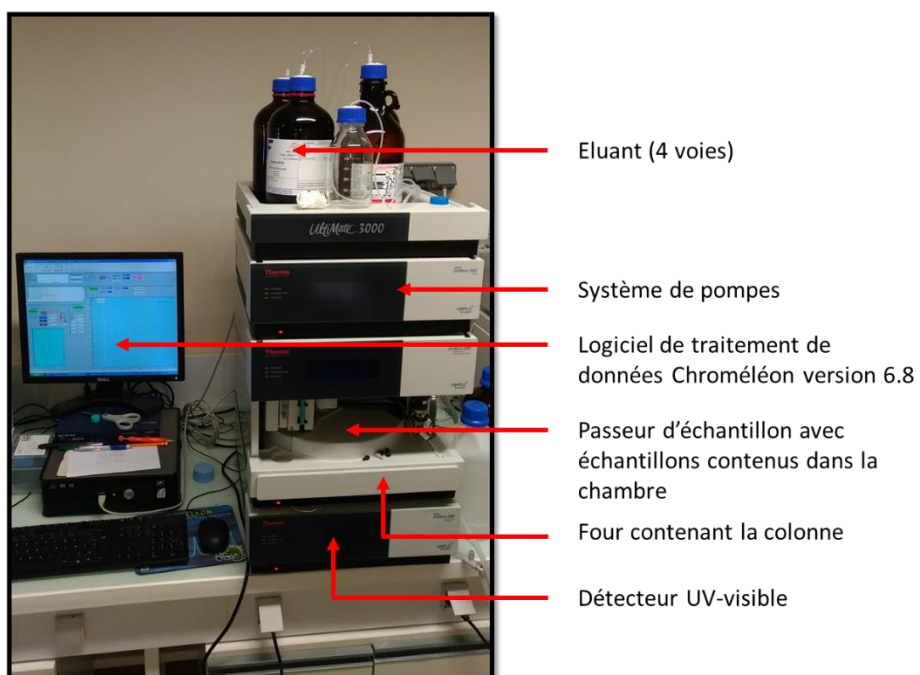


Photo 4 : photo du système de Chromatographie Liquide Haute Performance pour la chromatographie analytique des composés.

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. Une gamme étalon d'acide glucuronique est réalisée avant chaque série d'analyse (0, 20, 40, 60, 80 et 100 µg / mL)

Détermination du taux d'acide uronique :

Le taux d'acide uronique est déterminé par la mesure de DO obtenus sur l'échantillon comparé à la droite de calibration. L'équation 14 permettant de calculer ce taux est la suivante :

$$\%_{\text{acide uronique}} = \frac{DO_{\text{moyenne}} \times d}{a \times 10}$$

Équation 14

Correspondants :

La DO moyenne est déterminé par la mesure de l'absorbance en triplicata de l'échantillon analysé. Le coefficient d est le facteur de dilution de la matière sèche de l'extrait à analyser ; le facteur a est le coefficient directeur de la droite de calibration obtenus par l'analyse de la gamme d'acide glucuronique, équation de la droite sous la forme y=ax (avec y : DO mesurée et x : la concentration du standard).

5. Analyses par système chromatographique :

5.1. Composition moléculaire

5.1.1. Méthode d'analyse des fractions par HPLC-DAD

Les analyses HPLC sont conduites par un système UHPLC Dionex UltiMate 3000 système de chromatographie liquide équipé de quatre voies de solvants reliées à deux pompes permettant la réalisation de mélange. Dans la configuration appliquée, seules deux voies étaient utilisées. Ce système est équipé d'une colonne Macherey-Nagel Nucléodur 100-5 C18ec de dimension L : 250 mm et de Ø : 4,6 mm avec un greffage présentant une porosité de 5 µm qui se trouve dans un four thermostaté à 30°C. Le système de détection utilisé par ce système est un détecteur DAD UV-visible, **Photo 4**.

Les vials contenant les différents échantillons sont conservés au sein d'un passeur d'échantillon thermostaté dont la température est maintenue à 8°C. Les fractions collectées lors de la purification sont mises à sec.

Conditions d'analyse extrait apolaire :

Une quantité de chacune des fractions est utilisée afin de préparer des échantillons à une concentration de 5 mg/mL diluée dans un volume équivalent d'éthyle acétate (degré HPLC). Un volume de 200 µL est injecté pour chaque échantillon. L'élution des composés au sein de la colonne se fait suivant un gradient de solvant composé d'acétonitrile (degré HPLC) en voie A et de l'eau MilliQ contenant 0,1% acide acétique en voie B. La méthode d'élution démarre avec 80% d'acétonitrile pour augmenter jusqu'à 90% au bout de 23 minutes d'élution. Ce gradient est suivi par une phase isocratique de 2 minutes à 90% d'acétonitrile avant de revenir à 80% d'acétonitrile et d'être équilibré pendant 5 minutes. Le chromatogramme est enregistré à la longueur d'onde 310 nm.

Conditions d'analyse extrait polaire :

L'extrait polaire obtenu à partir de *Solieria chordalis* est préparé à une concentration de 10 mg/mL dans un mélange éthanol degré HPLC : eau MilliQ (70 :30 ; v/v). L'analyse est réalisée sur une colonne phase inverse avec un greffage C18 (Macheret Nagel, 5 µm, 250 x 4,6 mm). Cinquante µL de cet échantillon est injecté par le système puis élué en condition isocratique par un mélange méthanol : eau MilliQ 5 :95 v/v et 0,1% acide acétique à un débit de 0,2 mL/min. L'analyse est programmée pendant 35 min avec une détection UV fixée aux longueurs d'ondes 310 et 334 nm.

5.1.2. Profil des monosaccharides par Chromatographie Haute performance Échangeuses d'Anions HPAEC-PAD couplé à un Détecteur par Ampérométrie Pulsée (HPAEC-PAD).

L'analyse de la composition en monosaccharides est réalisée par un système de chromatographie liquide à haute performance échangeuse d'anions. Le système est lié à un détecteur ampérométrique pulsé (High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection, HPAEC-PAD). Le système (Dionex ICS-5000+ DC) est composé de différents modules qui comprennent un système de pompe, un détecteur PAD, une chambre thermostatée qui contient la colonne chromatographique et un système d'analyse de donnée (logiciel Chroméléon version 6.8). La colonne utilisée pour cette application est composée de la colonne échangeuse d'ions (CarboPac

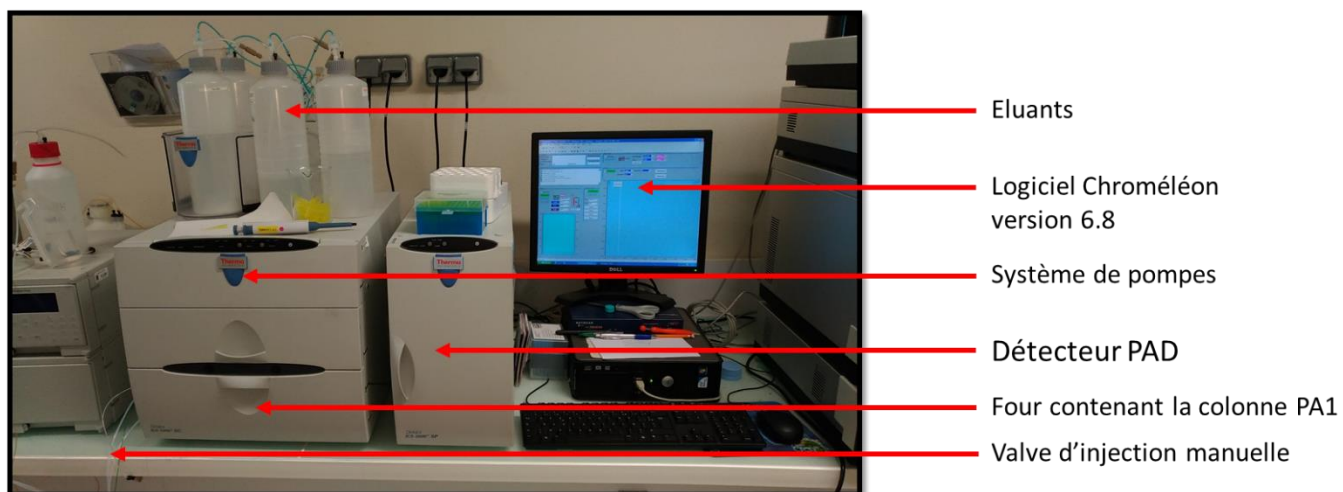


Photo 5 : photo du système de Chromatographie Haute performance Échangeuses d'Anions HPAEC-PAD couplé à une Détecteur par Ampérométrie Pulsée (HPAEC-PAD).

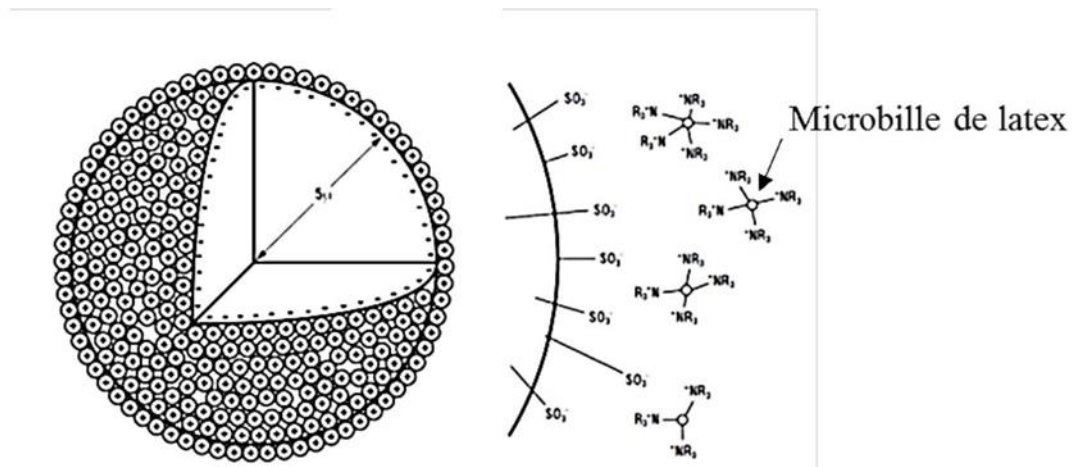


Figure 31: Colonne CarboPac PA1. Les fonctions amines quaternaires des microbilles de latex se fixent aux groupements SO_3^- du substrat de la colonne (Dionex, 2013).

PA1, 4 x 250 mm, Dionex) et de sa colonne de garde (CarboPac Guard Column, 4 x 60 mm, Dionex) **Photo 5**.

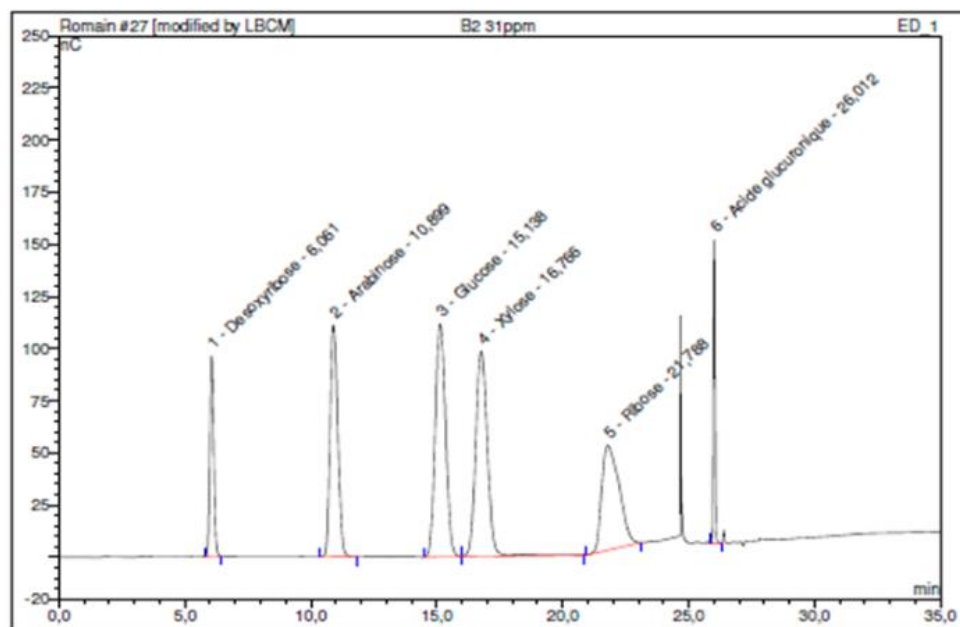
Principe de séparation des monosaccharides :

La colonne CarboPac PA1 (Dionex, Thermo Scientific) est composée d'une phase stationnaire échangeuse d'anions formée d'un substrat polystyrène/divinylbenzène de 10 µm de diamètre sur laquelle viennent se fixer des microbilles de latex (350 nm) portant des fonctions amines quaternaires. La fixation a lieu au travers de l'interaction entre les fonctions SO₃⁻ du substrat et les fonctions amines portés par les microbilles. Cette fixation est représentée schématiquement dans la **Figure 31**.

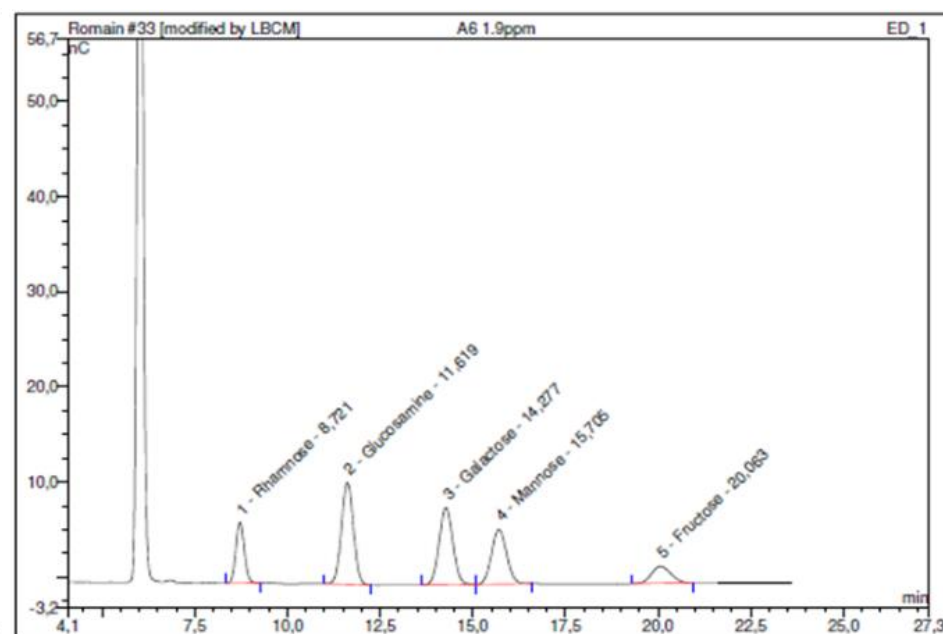
En milieu alcalin (pH>12), les sucres présentent la propriété de devenir légèrement acides. La séparation des différents monosaccharides entre eux est basée sur le nombre et le positionnement de leurs groupements hydroxyles, ceci étant lié également au pKa. Les microbilles fixées au sein de la colonne sont chargées positivement, au travers de la colonne, les sucres portants des groupements hydroxyles (-OH) vont interagir avec les microbilles. En présence de l'éluant NaOH, le pH augmente entraînant un échange d'anions avec les sucres. Plus les sucres présentent un pKa élevé moins ils ont d'interactions avec la phase stationnaire de la colonne, entraînant une élution plus rapide.

Identification et quantification de monosaccharides :

En sortie de colonne, le détecteur ampérométrique pulsé (PAD) permet de détecter et de quantifier les monosaccharides. Cette détection se fait par la mesure d'un courant électrique (0,10 volts) généré par de l'oxydation des groupements hydroxyles portés par les glucides lors de leur passage à la surface de l'électrode d'or. Le temps d'élution permet de déterminer quel type de glucides est détecté, l'aire du signal mesuré permet de quantifier celui-ci. 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. Les échantillons sont injectés manuellement indépendamment les uns des autres. Une fois injecté, les échantillons sont élués au travers de la colonne par la solution de NaOH à l'aide du système de pompe. En sortie de



No.	Ret. Time min	Peak Name	Height nC	Area nC*min	Rel. Area %	Amount ppm	Type
1	6.06	Desoxyribose	95,842	17,754	8,29	n.a.	BMB*
2	10.90	Arabinose	111,055	39,466	18,42	31,115	BMB
3	15.14	Glucose	111,701	53,165	24,81	31,200	BM
4	16.77	Xylose	98,207	53,347	24,90	31,187	MB*
5	21.79	Ribose	50,160	40,103	18,72	31,176	BMB*
6	26.01	Acide glucuronique	145,094	10,416	4,86	31,062	BMB*
Total:			612,060	214,250	100,00	155,739	



No.	Ret. Time min	Peak Name	Height nC	Area nC*min	Rel. Area %	Amount ppm	Type
1	8.72	Rhamnose	6,398	1,708	13,14	2,176	BMB
2	11.62	Glucosamine	10,701	4,014	30,89	2,126	BMB
3	14.28	Galactose	8,084	3,495	26,90	2,171	BM
4	15.71	Mannose	5,740	2,697	20,75	2,022	MB
5	20.06	Fructose	1,788	1,081	8,32	1,330	BMB
Total:			32,711	12,995	100,00	9,825	

Figure 32: Chromatogramme des standards de monosaccharides et paramètres de calibration du dosage

colonne, la présence des sucres est détectée par le PAD et chaque signal permet de quantifier la molécule. Cette quantification est basée sur une étape d'optimisation et de calibration de la méthode à l'aide de standard de monosaccharide purs (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 glucoheptose (Sigma-Aldrich) et d'acide glucuronique (G5269, Sigma-Aldrich)). Ces standards de concentration connu permettent de calibrer le signal par la réalisation de droites de calibrations permettant ensuite par intégration de déterminer le profil de chaque échantillon.

Calibration des standards :

Les droites de calibrations ont été obtenues par l'analyse d'une gamme de concentration allant de 0, 25, 50, 100, 150, 200 et 250 μM . Deux mélanges de standard sont préparés dans de l'eau ultrapure et filtrées à 0,20 μm . La **Figure 32** 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.

Analyse des échantillons :

Les échantillons secs subissent une hydrolyse acide, 10 mg de chaque échantillon est pesé et ajouté dans une fiole de verre, 1 mL d'acide chlorhydrique à 1M (Carlo Erba) est ensuite ajouté puis les fioles sont scellées à la flamme. Les échantillons sont ensuite incubés dans un bloc chauffant à 100 °C pendant 48h. Après incubation, une neutralisation est réalisée en ajoutant 1 mL de soude à 1M (Sigma Aldrich) auquel on ajoute 3 mL d'eau ultrapure. Avant analyse, les échantillons sont filtrés (0,20 μm) puis conservés dans des vials afin d'être analysé par HPAEC-PAD.

Programme d'élution :

Le programme d'élution permettant la séparation des monosaccharides contenue dans les échantillons est présenté schématiquement par la **Figure 33**. La séparation des sucres au sein de la colonne CarboPac PA1 est réalisée à un débit constant d'1 mL/min et à une pression de 110 bars. L'injection est réalisée en remplissant manuellement la boucle d'injection par 100 μL d'échantillon, le système va ensuite injecter 30 μL de ce volume. Le programme d'élution comprend trois éluants différents : NaOH 1M ; NaOAc 1M dans du NaOH 0,1M et de l'eau ultrapure.

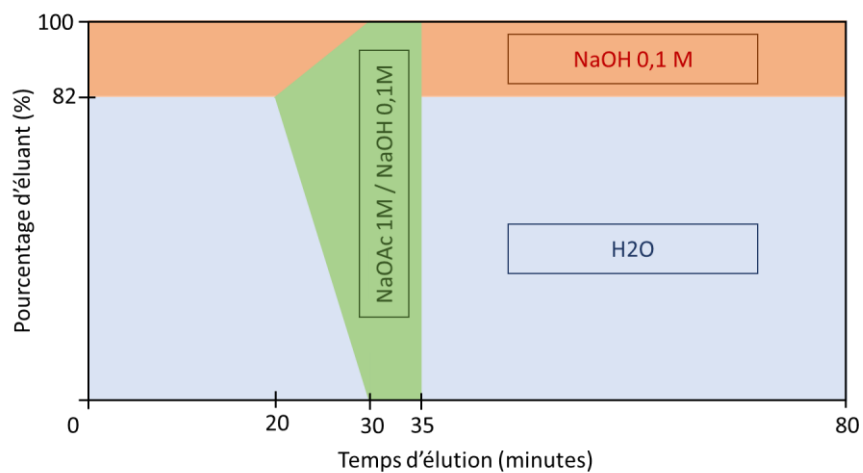


Figure 33: Schéma représentant le programme d'élution appliquée pour l'analyse du profil de monosaccharide.

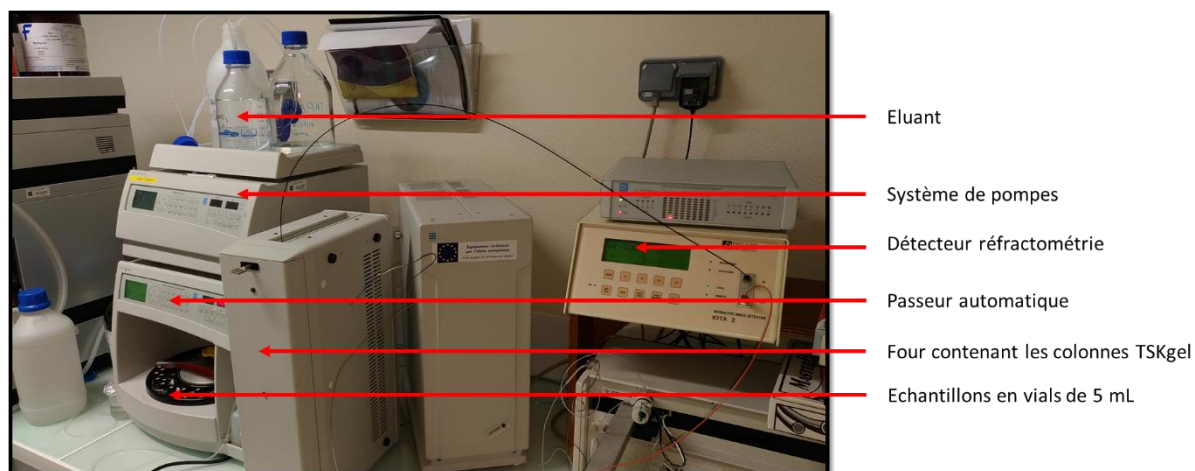


Photo 6 : Photo du système de Chromatographie d'Exclusion Stérique Haute Performance (HPSEC)

L'élution des monosaccharides s'est faite principalement en mode isocratique pendant 80 minutes. Un gradient d'acétate de sodium allant de 0 à 100% démarre à la 20^{ème} minute pendant dix minutes et une phase isocratique à 100% de cette solution est maintenue pendant 5 minutes. Ensuite, le système revient dans ses conditions initiales isocratique 18% NaOH 0,1M / 82% H₂O. Les ions acétate de par leur propriété plus électronégative, vont interagir avec microbilles d'amines quaternaires. Les résultats obtenus sous forme de chromatogramme permettent ensuite d'exprimer la quantité de monosaccharide en proportion (%) d'un monosaccharide par rapport à la totalité des sucres détectés.

5.1.3.Détermination du profil de poids moléculaire des polysaccharides par Chromatographie d'Exclusion Stérique Haute Performance (HPSEC)

La Chromatographie d'Exclusion Stérique Haute Performance (HPSEC) permet de déterminer le profil de poids moléculaire d'un échantillon de polysaccharide. Ce système se compose de différents modules, un passeur d'échantillon (ASI 100, Dionex), une pompe analytique haute pression (P680, Dionex), une chambre thermostatée contenant les colonnes et un système de détection par réfractométrie (Iota 2, Précision Instruments). Le système de colonne utilisé pour cette application est composé de deux colonnes en série présentant des seuils de coupure différents. La première colonne présente seuil de coupure $2\,000\text{ Da} < X < 50\,000\text{ Daltons (Da)}$ (TSKgel G3000PWXL, 7 μm , 7,8 x 300 mm, Tosoh Biosciences) et à une seconde colonne présentant un seuil de coupure plus important de $X > 50\,000\text{ Da}$ (TSKgel G6000PWXL 13 μm , 7,8 x 300 mm, Tosoh Biosciences). Ces colonnes sont précédées d'une colonne de garde (TSKgel Type Guard colum, 12 μm , 6 x 400 mm, Tosoh Biosciences) (**Photo 6**).

Programme d'élution :

L'élution des échantillons au travers de la colonne est réalisée par une solution de nitrate de sodium (NaNO₃) à 0,1 M, à un débit de 0,7 mL/min avec une pression de 35 bars. La durée de la méthode est de 60 minutes en condition isocratique.

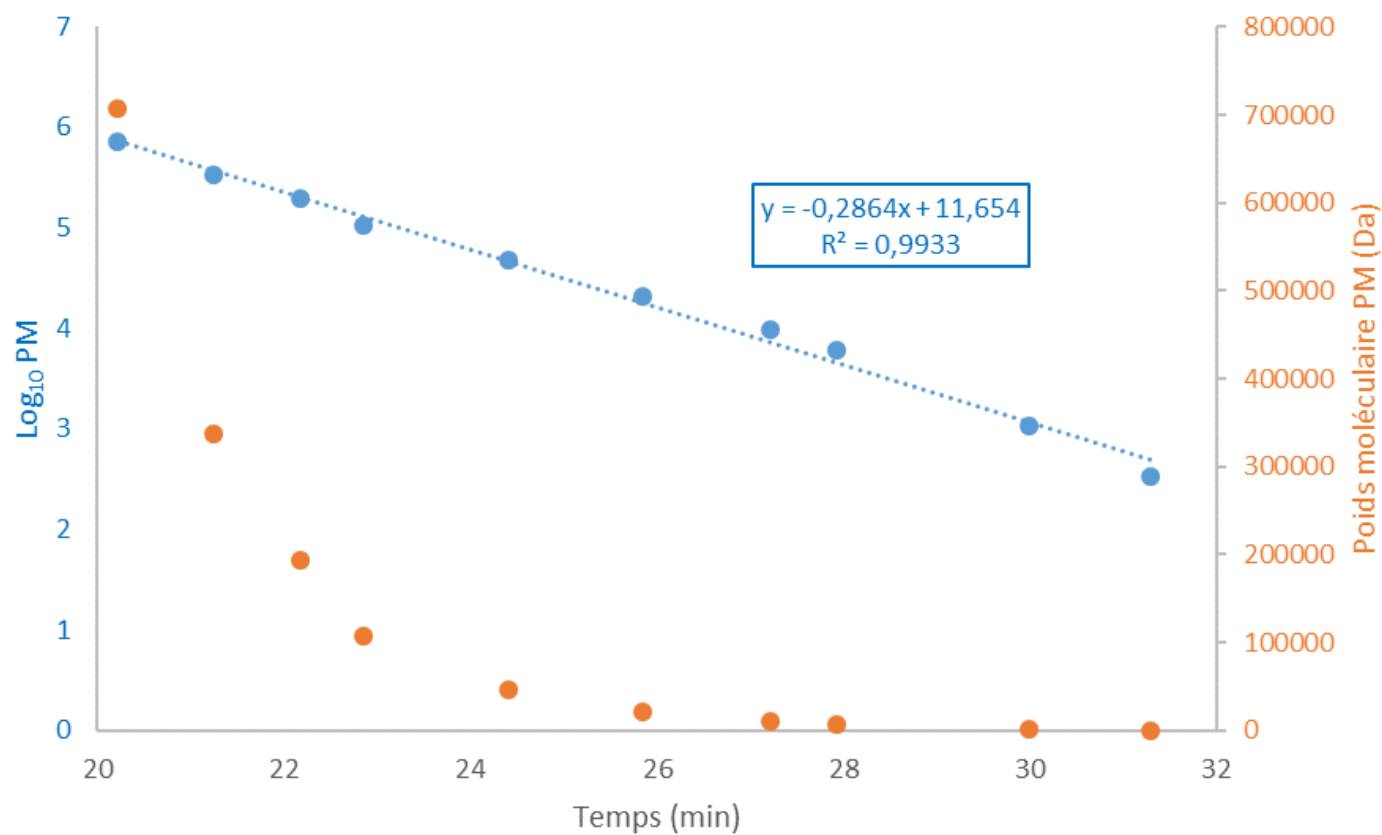


Figure 34 : Courbe de calibration des temps de rétention des standards de pullulans en fonction de leur poids moléculaire. Équation de la forme $\log_{10} (PM) = f(\text{temps})$.

Calibration de la méthode :

Une calibration de la méthode est réalisée à partir de différents standards de poids moléculaire connus.

Les étalons de pullulan de poids moléculaires 342 Da ; 6,1 kDa ; 9,6 kDa ; 21,1 kDa ; 47,1kDa ; 107 kDa ; 194 kDa ; 337 kDa et 708 kDa sont préparés à une concentration de 0,5 mg/mL dans une solution de NaNO₃ 0,1 M. Le temps de rétention de chaque étalon permet de réaliser une courbe d'étalonnage $\log_{10} PM = f(\text{temps de rétention})$ présentée **Figure 34**.

Préparation des échantillons :

Les échantillons de polysaccharides analysés ont été préparé dans les même conditions que les étalons, en dissolvant 5 mg d'échantillon dans 5 mL de solution de NaNO₃ à 0,1M. Les échantillons sont ensuite filtrés sur filtre Whatman 0,45 µm puis conservé dans des vials adapté pour être analysé par le système HPSEC.

5.2. Analyses structurales

5.2.1. Analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance couplé à un détecteur de Spectrométrie de Masse (q-TOF)

Le système de Chromatographie Liquide Haute Performance couplé à un Détecteur de Masse (**photo 7**) est composé d'une chaîne HPLC (Dionex, Ultimate 3000) décrite dans la partie 5.1.1. Le détecteur de Spectrométrie de Masse est un système Q-TOF (de l'anglais Quadupole Time-of-Flight) (Bruker, micrOTOF focus II). Le système est contrôlé par le logiciel Compass HyStar (Bruker).

La calibration de ce détecteur est réalisée par une solution d'Acétate de sodium avec 10 mM de NaOH dans une mélange Isopropanol/eau (50 :50, v/v) et 0,2% d'acide acétique. Le spectromètre de masse est configuré en mode positif pour la détection des ions.

La méthode d'élution et les paramétrages du système HPLC pour l'analyse des fractions apolaires et de l'extrait polaire sont présentés dans la **partie 5.1.1**.



Photo 7 : Photo du système de Chromatographie Liquide Haute Performance couplé à un détecteur de Spectrométrie de Masse (q-TOF).

5.2.2. Analyse Infrarouge par Transformée de Fourier (FTIR)

L'analyse spectrale par FTIR des échantillons de carraghénanes est réalisée par un spectrophotomètre FTIR-NIR (Perkin Elmer, Frontier). Afin de pouvoir analyser les échantillons, une solution liquide de carraghénanes à une concentration de 0,2 % (w/v) est réalisée. Cette solution est ensuite déposée dans un récipient à surface plane, le séchage à 60°C pendant 24h permet de former un film qui sera ensuite analysé. En parallèle des échantillons, sont analysés les standards de carraghénanes iota (-ι) et kappa (-κ). (Sigma, degrés de pureté commercial).

5.2.3. Analyse spectrale par Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN) du carbone (^{13}C)

L'analyse spectrale RMN du ^{13}C est enregistrée par un système de spectrométrie Varian/Agilent Premium Compact 600 NMR. Les extraits sont dilués dans de l'eau deutérée à 99,8% (D_2O) deux fois, puis lyophilisés pour être ensuite dilués dans le D_2O à une concentration de 30 mg/mL. Une solution de triméthylsilylpropanoate de sodium deutéré (TSP- d_4) est ajoutée pour jouer le rôle d'étalon interne et de référence pour déterminer la ligne de base à (0,00 ppm). Chaque spectre RMN est obtenu par enregistrement à 65°C et a été interprété suivant les travaux de Van de Velde et Rollema (2008). Travaux réalisés par la Plate-forme technologique RMN-RPE-SM de l'Université Bretagne Occidentale de Brest, France et par le Centro de Investigación y de Estudios Avanzados de Merida (CINVESTAV), Mexique Yucatan.

6. Évaluation des activités biologiques des extraits :

6.1. Évaluation des activités biologiques

6.1.1. Activité anti-radicalaire

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire des différentes fractions CPC est réalisée par la méthode DPPH. Le réactif 1,1Diphényle-2-Picryl-Hydrazyle (DPPH) a été appliqué suivant la méthode décrite par Shimada en apportant quelques modifications (Shimada *et al.*, 1992).

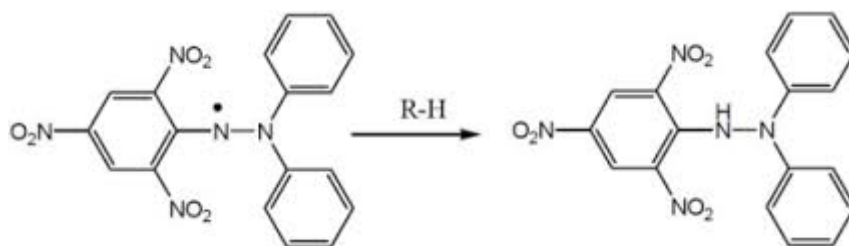


Figure 35: Réaction de formation des radicaux libres par méthode DPPH.

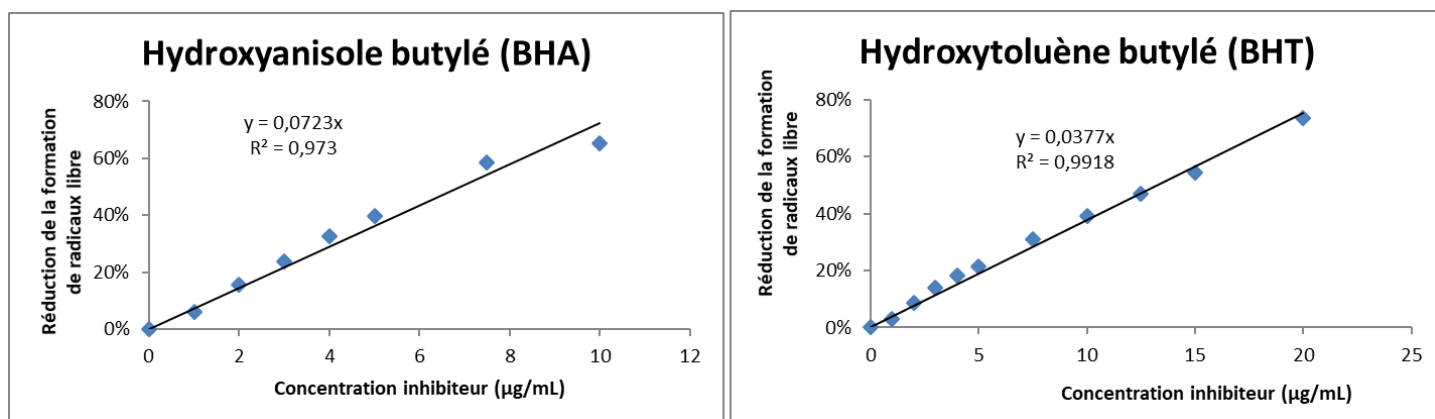


Figure 36: Courbe étalon de l'activité antiradicalaire des standards hydroxyanisole butylé (BHA) et hydroxytoluène butylé (BHT).

Principe :

Le composé chimique 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle (DPPH) possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Cette délocalisation, empêche la formation d'un dimère et permet de rester sous sa forme DPPH•. Cette délocalisation confère à la solution DPPH sa coloration bleue caractéristique. L'efficacité d'un oxydant se caractérise par la diminution de cette coloration mesurable spectrophotométriquement à la longueur d'onde 515 nm. Cette diminution de coloration est due à la recombinaison des radicaux DPPH• par le transfert d'un atome d'hydrogène sur le DPPH• formant alors la forme DPPHH plus stable (**Figure 35**).

Une solution journalière de DPPH• à 0,1 mg/mL (soit 0,25 mM) est préparée dans du méthanol puis conservée à 4 °C tout en étant protégée de l'exposition UV. Des solutions standards de BHA (Hydroxyanisol butylé), BHT (Hydroxytoluène butylé), dire ce que c'est ainsi que les fractions étudiées sont préparées à une concentration de 1 mg/mL dans du méthanol. Les solutions standards sont diluées de manière à obtenir des gammes étalon allant de 2 à 50 µg/mL et les échantillons sont dilués directement à une concentration de 500 µg/mL. Les solutions préparées sont testées par ajout de 100 µL dans un puit auquel sont ajoutés 100 µL de réactif DPPH• pour un volume final par puit de 200 µL. Chaque standard et chaque essai est réalisé en triplicata. La microplaque 96 puits utilisé pour réaliser le test est ensuite agitée puis incubée pendant 30 minutes à 40°C au sein d'un lecteur de microplaque permettant l'incubation (Thermo scientific Multiscan Go UV-Vis apparatus). Ce matériel permet par la suite de réaliser la lecture de l'ensemble des puits à 517 nm en fin d'incubation.

Détermination de la courbe d'étalonnage :

Les résultats obtenus pour chaque standard, BHA et BHT, permettent de déterminer leur CI_{50} (Concentration Inhibitrice 50% qui correspond à la concentration nécessaire pour diminuer de 50% la formation de radicaux libres) à partir des courbes de calibration présentées par la **Figure 36**. Les deux CI_{50} permettent par la suite de pouvoir exprimer l'activité de chaque fraction CPC en équivalence de molécule standard.

Détermination de la concentration CI_{50} :

L'activité d'un extrait est évaluée par détermination de sa concentration inhibitrice 50% (CI_{50}). Cette concentration est estimée en fonction de la courbe d'inhibition de la gamme de concentration de

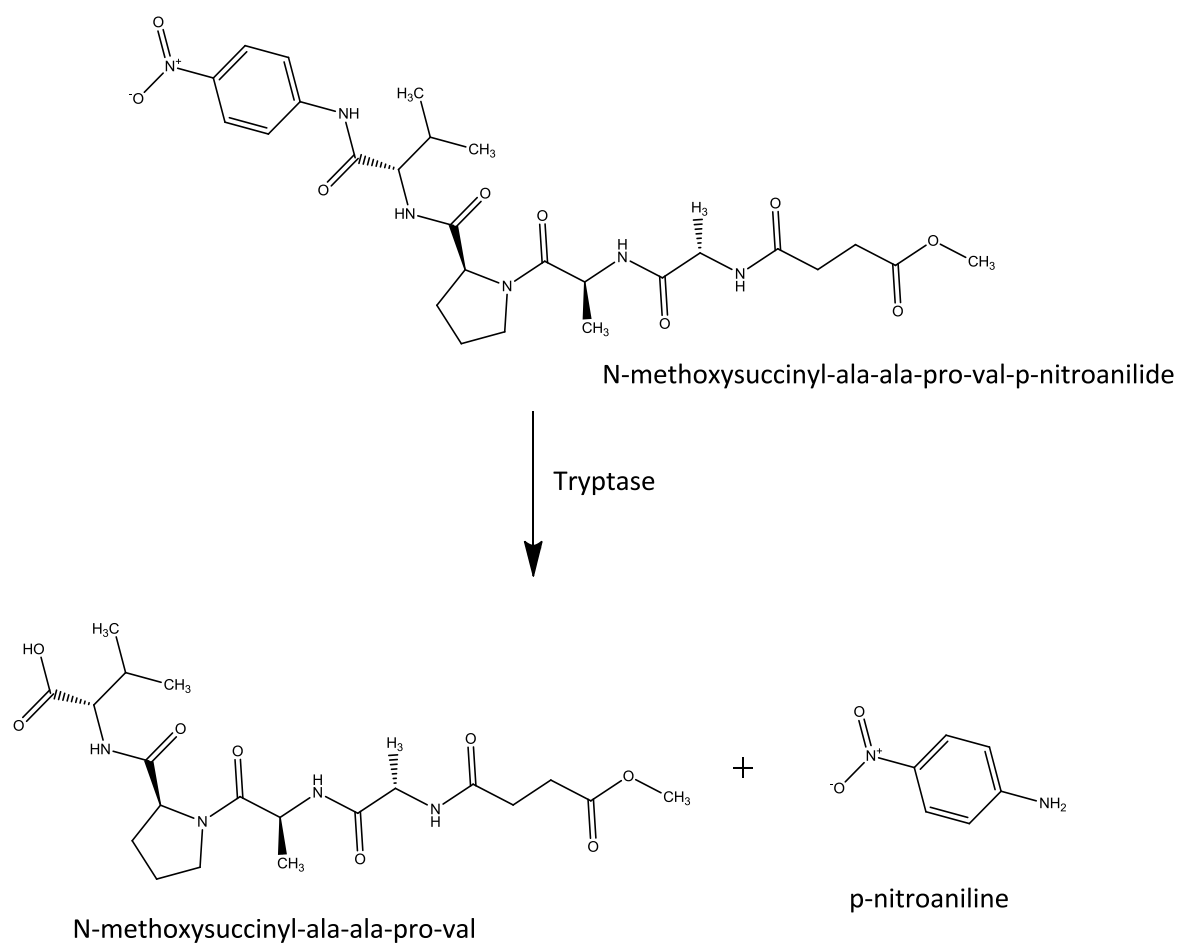


Figure 37: Schéma de réaction de l'hydrolyse du substrat N-methoxysuccinyl-ala-ala-pro-val-p-nitroanilide par l'enzyme élastase formant le produit p-nitroaniline.

L'extrait suivant l'équation 15 $y=ax$ soit :

$$IC_{50} = \frac{\% \text{ inhibition } (= 0,5)}{a} \equiv \frac{(DO_0 - DO_m)/DO_0}{a}$$

Équation 15

Correspondant :

DO_0 : DO mesurée sans extrait, correspondant au 100% de formation de radicaux libres ; DO_m : DO mesurée avec extrait à une concentration ; a : coefficient directeur de la droite d'inhibition obtenue par l'analyse d'une gamme de concentration.

6.1.2. Évaluation de l'activité anti-âge

L'évaluation de l'activité anti-âge des extraits est basée sur la réaction d'inhibition de l'enzyme élastase porcine par les enzymes ovomucoïdes de dinde et de poulet décrite par Gertler et Feinstein (1971).

Réaction :

La détermination de l'inhibition de l'activité enzymatique de l'élastase est basée sur l'étude de la cinétique de formation de p-nitroaniline au cours du temps régi par l'hydrolyse du substrat N-methoxysuccinyl-ala-ala-pro-val-p-nitroanilide par l'élastase. Cette réaction est optimale à une pH 8,0 et à une température de 25°C. Le produit p-nitroaniline absorbe à la longueur d'onde 410 nm (Figure 37).

Protocole :

Pour la réalisation de l'évaluation de l'activité inhibitrice des échantillons, il est tout d'abord nécessaire de déterminer la cinétique maximale de l'activité de l'enzyme élastase en présence de substrat. Pour cela une solution d'enzyme élastase est préparée extemporanément et conservée dans la glace à une activité de 0,4 U/mL à partir de la solution commerciale (2,73 U/mL). La solution enzymatique est ajoutée en présence de substrat préparée à une concentration de 0,68 mM. L'enzyme et le substrat sont ajoutés au dernier moment afin de pouvoir suivre la cinétique de dégradation du substrat par l'enzyme. Afin d'étudier l'inhibition de cette activité, une gamme de standard d'inhibiteur trypsine ovomucoïde est préparée (0,1 à 0,5 mg/mL) à partir d'une solution à 1 g/L (Tableau XXI).

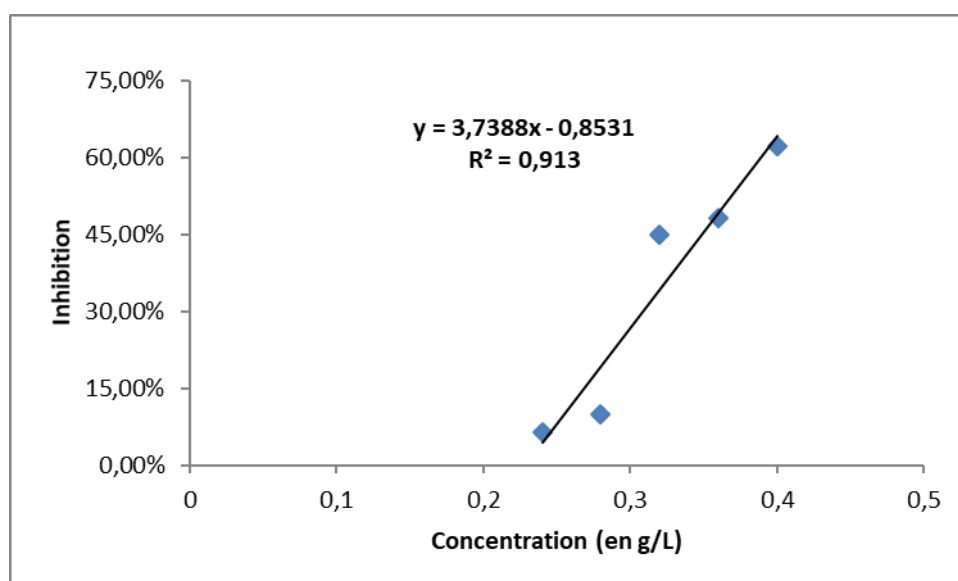


Figure 38 : Courbe étalon de l'activité inhibitrice du standard trypsine sur l'enzyme elastase.

Tableau XXI : Gamme de dilution pour la réalisation du test de l'inhibition de l'élastase

	Concentration en Inhibiteur (mg/mL)					
	Témoin	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Solution E (μL)	50	50	50	50	50	50
Solution I (μL)	0	20	40	60	80	100
Tampon Tris-Base (μL)	100	80	60	40	20	0
Solution S (μL)	50	50	50	50	50	50

Solutions : Solution enzymatique Elastase (E) ; solution d'inhibiteur ovomucoïde (I) ; solution substrat N-methoxysuccinyl-ala-ala-pro-val-p-nitroanilide (S).

Les extraits testés sont préparés à une concentration de 1g/L dans une solution de DMSO 10% de manière à ce que les extraits soient parfaitement solubilisés en milieu aqueux. 100 μL de chaque échantillon est ajouté aux 50 μL d'enzyme et aux 50 μL de substrat. Ce test est réalisé en triplicata avec un témoin échantillon contenant 100 μL de solution DMSO 10%.

Une fois l'enzyme ajoutée, les microplaques sont incubées dans un lecteur de microplaques thermostaté à 25°C pendant 40 min. Le suivi de la cinétique de réaction est mesuré par adsorption à 405 nm toutes les 10 minutes après agitation de la microplaque.

Détermination de la courbe d'étalonnage :

Les résultats obtenus pour le standard de trypsine permettent de déterminer la CI_{50} (Concentration Inhibitrice 50% qui correspond à la concentration nécessaire pour diminuer de 50% la formation de radicaux libres) à partir de la courbe de calibration présenté par la **Figure 38**.

Évaluation de l'activité inhibitrice :

L'activité inhibitrice des échantillons est obtenue pour une certaine concentration d'échantillon. Le pourcentage d'inhibition déterminé permet d'exprimer les activités en équivalent de l'activité standard grâce à la courbe de calibration du standard trypsine.

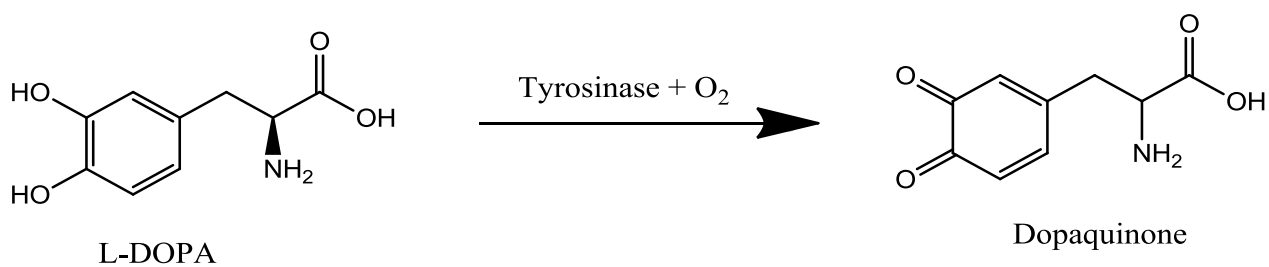


Figure 39: Schéma de formation de la Dopaquinone par la réaction d'hydrolyse du substrat L-DOPA par l'enzyme tyrosinase.

6.1.3. Évaluation de l'activité anti-tyrosinase

L'évaluation de l'activité blanchissante des extraits est basée sur la capacité des extraits à inhiber la réaction enzymatique entre la tyrosinase en présence de L-Dopa. Cette méthode suit le protocole décrit par Lim *et al.* (2009).

Principe

La tyrosinase est une enzyme clef intervenant dans la biosynthèse de mélanine. Cette enzyme intervient dans l'étape limitante de la biosynthèse par l'oxydation de la tyrosine en 3,4 dihydroxyphénylalanine (L-Dopa) ensuite oxydé en dopaquinone. La réaction biochimique mise en place au laboratoire se base sur cette dernière étape et évalue l'inhibition de l'oxydation de la L-Dopa en dopaquinone présentée par la **Figure 39**.

Protocole :

Pour la détermination de l'inhibition de l'activité de la tyrosinase, il est nécessaire de suivre la cinétique de la formation de dopaquinone au cours du temps. Pour cela, une solution enzymatique de tyrosinase à 16 U/mL est préparée par dilution de la solution commerciale dans du tampon phosphate. Cette préparation est réalisée extemporanément puis conservée dans de la glace. Une solution de substrat L-Dopa est également préparée à une concentration de 5 mM dans le tampon phosphate également puis conservée dans la glace. Pour pouvoir évaluer la capacité inhibitrice des différents échantillons, deux gammes de solutions de standard inhibiteur acide Kojic (Sigma, N° CAS 501-30-4) et Quercetine (Sigma, N°CAS 117-39-5) sont préparées de manière à obtenir des gammes de concentration finale dans les puits de 200 µL allant de 0 à 50 mg/mL pour l'Acide Kojic et 0 à 100 mg/mL pour la Quercetine. Dans un puit de la microplaque 96 puits, un contrôle de la réaction va être réalisé en incorporant 80 µL de tampon phosphate et 40 µL de solution de DMSO 50% dans lesquels sont dilués les 40 µL de substrat et les 40 µL d'enzyme ajoutés en toute fin de préparation. Ce test est réalisé en triplicata. En parallèle, un contrôle négatif de l'absorbance du substrat au cours du temps est réalisé dans un puit contenant 40 µL de substrat dilué dans 120 µL de tampon et 40 µL de solution DMSO 50%. De la même manière, sont organisés les tests inhibiteurs des standards. Le suivi cinétique réalisé en triplicata contenant 80 µL de tampon, les 40 µL de standard aux concentrations préalablement préparés dans solution DMSO 50% auquel on ajoute les 40 µL de substrat et d'enzyme. Un contrôle échantillon est réalisé en parallèle pour s'affranchir de l'absorbance de l'inhibiteur testé dans un puits ne contenant pas d'enzyme. Le test d'inhibition est réalisé de la même manière que le test des standards d'inhibition. L'extrait est dilué dans une solution de DMSO 50%. Quarante µL

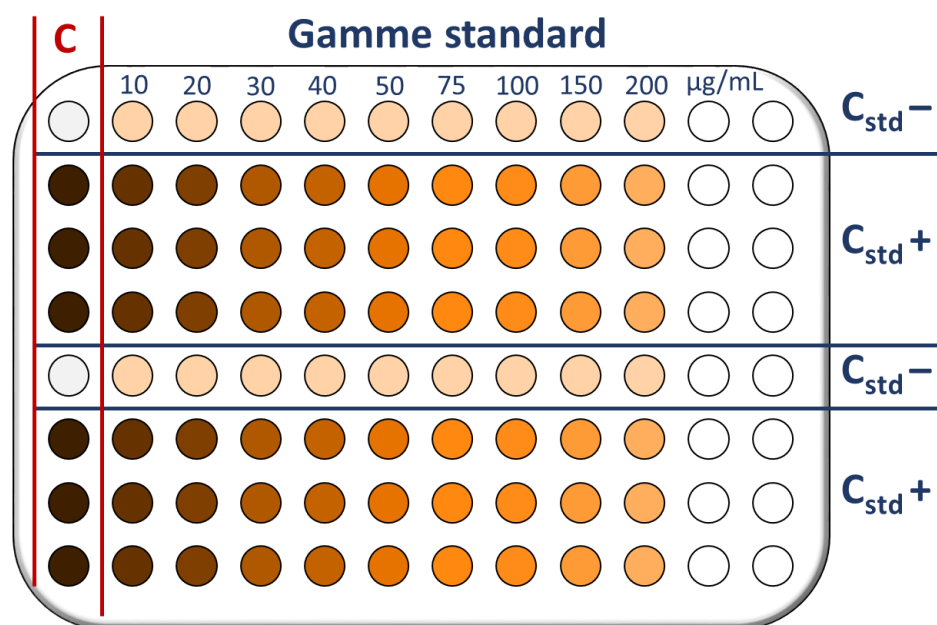


Figure 40: Schéma de préparation de la microplaque pour la réalisation du test d'inhibition de l'activité tyrosinase. La colonne (C) correspond au contrôle positif sans inhibiteur. La ligne (C_{std-}) correspond au contrôle négatif sans enzyme et les lignes (C_{std+}) correspondent au puits permettant le suivi de la cinétique enzymatique en présence ou absence d'inhibiteur.

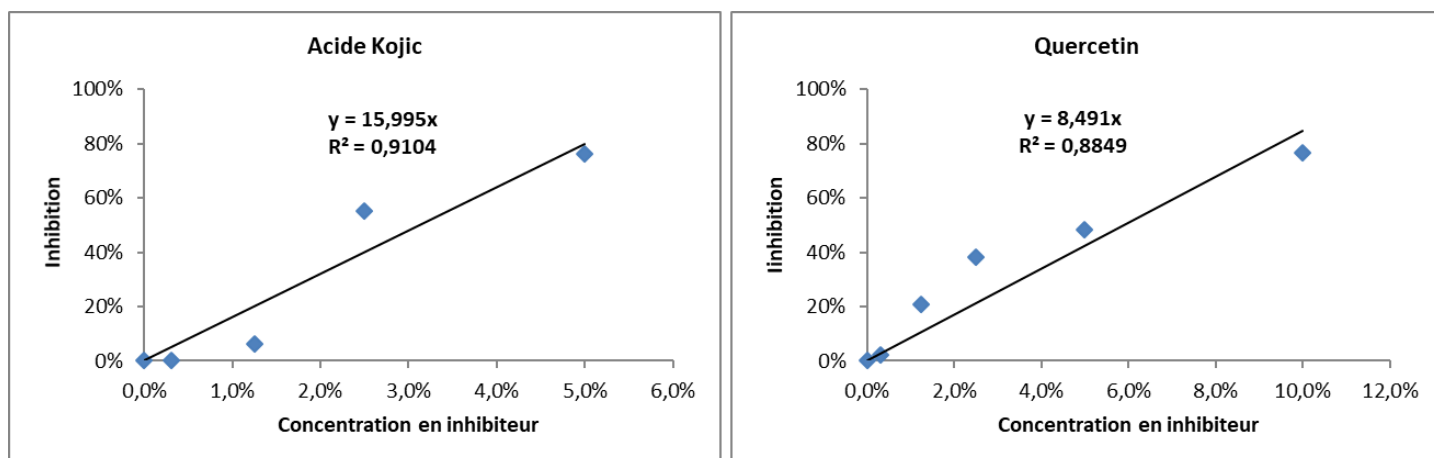


Figure 41: Courbe étalon de l'activité inhibitrice des standards Acide Kojic et Quercetine vis-à-vis de la tyrosinase.

d'extrait sont ajouté au puit contenant les 80 μL de tampon et les 40 μL de substrat et d'enzyme. L'analyse est réalisée en triplicata et un contrôle de l'absorbance est réalisé en parallèle dans un puit ne contenant pas d'enzyme. L'organisation des échantillons dans la microplaque est schématisée par la **Figure 40**.

Détermination de la courbe standard d'inhibition :

Les résultats obtenus pour les standards Acide Kojic et Quercetine permettent de déterminer leur CI_{50} (Concentration Inhibitrice 50% qui correspond à la concentration nécessaire pour diminuer de 50% la formation de radicaux libres) à partir des courbes de calibration présentées par la **Figure 41**.

Évaluation de l'activité des échantillons :

L'inhibition des échantillons est exprimée en équivalent de l'activité standard. Cette valeur est déterminée par comparaison de l'activité inhibitrice de l'échantillon à une concentration fixe et l'inhibition obtenue par la courbe de calibration des standards.

6.1.4. Évaluation de l'activité photoprotectrice et de la photosensibilité des extraits.

L'évaluation de l'activité photoprotectrice d'un extrait est réalisée suivant la méthode décrite par Bedoux *et al.* (2014) à laquelle certaines modifications ont été apportées.

Principe

La détermination de l'activité photoprotectrice d'un extrait ou d'un composé est basée sur l'évaluation de la capacité de cet extrait a diminué la vitesse de dégradation de la chlorophylle a au cours du temps lorsque celle-ci est exposée aux rayons UV. La chlorophylle a présente un maximum d'absorption à 662 nm, lorsqu'elle est dénaturée son absorption diminue.

Protocole :

Pour déterminer la cinétique de dégradation de la chlorophylle a exposée aux rayons UV, une solution de chlorophylle est préparée extemporanément à partir d'un extrait commercial standardisé pour obtenir une concentration de 10 $\mu\text{g/mL}$ dans du méthanol. Un spectre UV-visible est réalisé sur l'échantillon de chlorophylle afin de confirmer le maximum d'absorption à 662 nm.

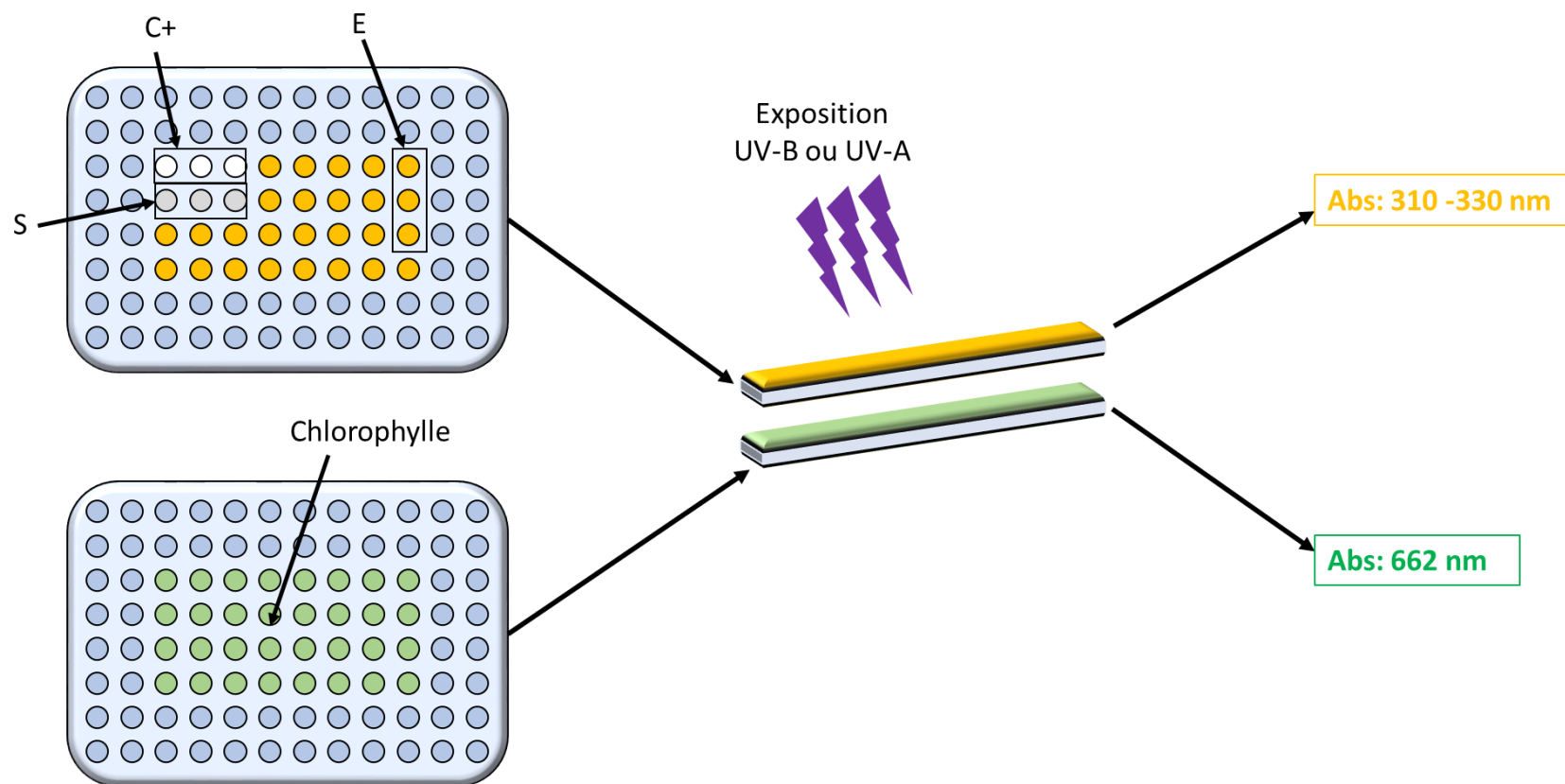


Figure 42: Schéma de la méthode de l'analyse de l'activité anti-UV des extraits présentant la répartition dans les puits de la chlorophylle, du contrôle (C+) avec les puits vide, du blanc solvant (S) et des échantillons (E).

Dans une première microplaque 96 puits, 100 μ L d'échantillon sont ajoutés dans un puit, ceci est réalisé en triplicata pour chaque échantillon. La concentration d'échantillon est à déterminer préalablement. Un blanc solvant est réalisé pour chaque solvant de dilution utilisé pour dissoudre les échantillons testés. Trois puits sont laissés vides pour le témoin positif.

Dans une seconde microplaque 96 puits, 100 μ L de chlorophylle sont ajoutés à chaque puit correspondant à la position des puits utilisés au sein de la microplaque contenant les échantillons préparés à une concentration de 10 mg/mL. Pour les deux microplaques, les puits périphériques et l'espace inter-puit sont remplis d'eau ultrapure afin de limiter l'effet de bord entraînant l'évaporation des échantillons lors de l'exposition UV. Chaque plaque est réalisée en duplicata pour pouvoir tester les différents rayonnements UV.

Une première absorbance est mesurée à $t=0$ minutes pour les deux plaques contenant la chlorophylle à 662 nm, et pour les plaques contenant les échantillons à la longueur d'onde maximal d'absorption, ici 310 et 330 nm.

Une fois les deux plaques préparées, elles sont conservées à l'obscurité et dans la glace. Celles-ci sont superposées l'une sur l'autre. La plaque contenant la chlorophylle étant disposée sous la plaque contenant les échantillons de manière à faire écran vis-à-vis de rayonnement UV.

Un premier lot de deux plaques est disposé dans la chambre UV équipé de lampe UV-A émettant un rayonnement à la longueur d'onde à 365 nm, le deuxième lot étant exposé dans une seconde chambre équipé d'une lampe UV-B émettant un rayonnement à 312 nm.

Les lots de plaques sont ensuite exposés aux rayonnements pendant 70 minutes interrompus toutes les dix minutes afin de pouvoir réaliser une mesure d'absorbance comme précédemment nécessaire au suivi cinétique de dégradation de la chlorophylle et des échantillons au cours du temps. La méthode est schématisée par la **Figure 42**.

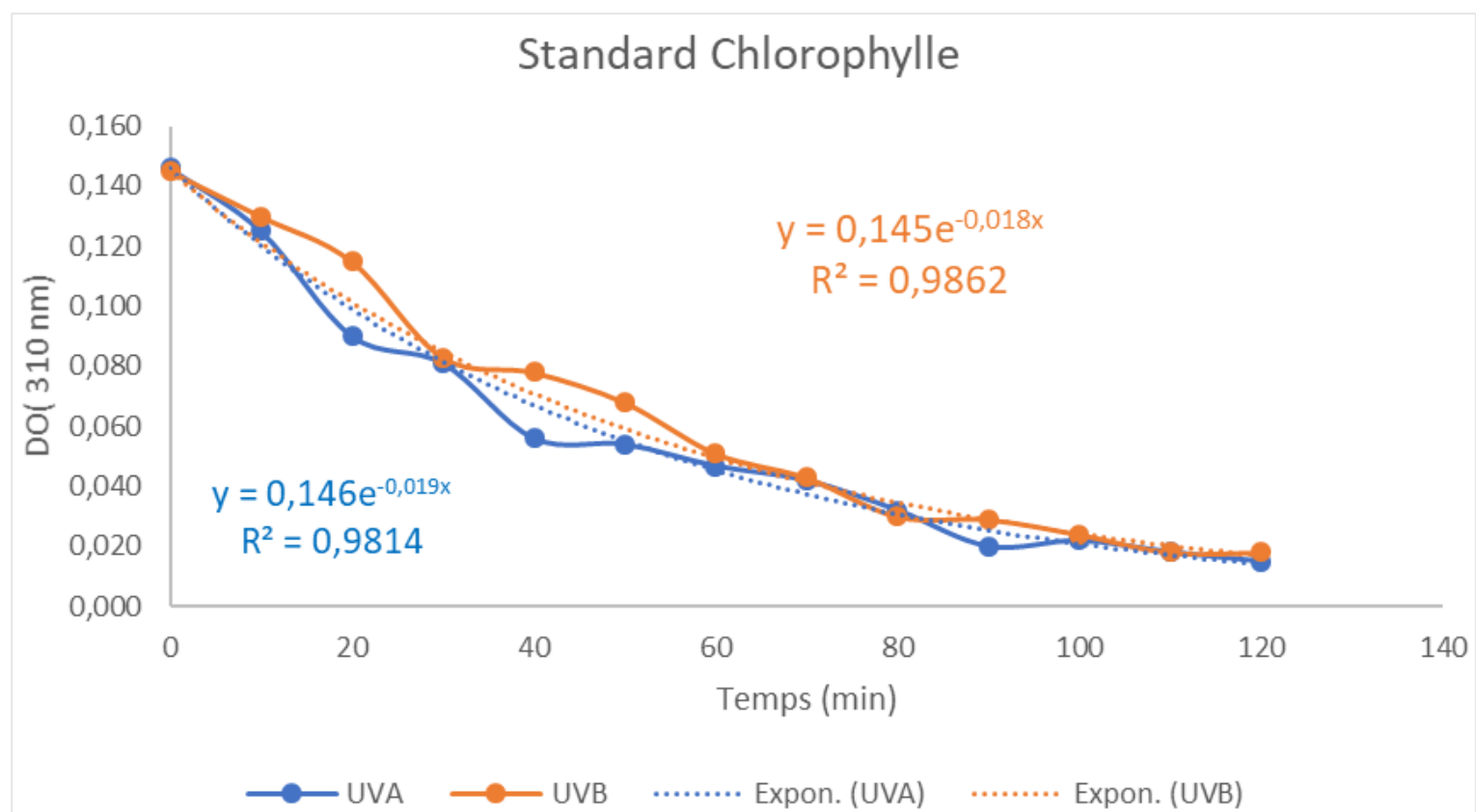


Figure 43: Courbe de dénaturation de la chlorophylle lors de l'exposition aux UV-A et UV-B

Suivi cinétique de la dégradation de la chlorophylle :

La courbe de calibration de la cinétique de dégradation de la chlorophylle b est présentée par la **Figure 43**.

Détermination de l'activité photoprotectrice des échantillons.

L'activité photoprotectrice des échantillons est évaluée selon la méthode de calcul décrite par Hupel, Poupart et Gall, (2011). La première étape consiste à suivre la cinétique de dégradation de la chlorophylle au cours du temps par mesure de DO. Les mesures de DO présentent une allure exponentielle et permet de tracer la courbe de tendance :

$$y = a.e^{kt} \quad \text{avec } k < 0$$

Correspondant :

La valeur « y » correspondant à la mesure de DO à l'instant t ; la constante « a » correspondant à la valeur de DO mesurée à t = 0 ; la valeur « t » qui est le temps exprimé en minutes et le coefficient « k » qui est la variable de dégradation de la chlorophylle.

Dans une deuxième étape, la valeur de demi-vie exprimée en minutes de la chlorophylle peut être déterminée par l'**équation 16** :

$$demi - vie = \frac{\ln(2)}{k}$$

Équation 16

Correspondant :

Le facteur « k » est la variable de dégradation de la chlorophylle déterminée par la première étape.

6.2. Évaluation de l'activité cytotoxique et antivirale des extraits de carraghénanes sur le modèle du virus de l'herpès de type 1 (VHS-1)

6.2.1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire utilisée (n° ATCC CCL81) est cultivée dans un milieu MEM (Minimum Essentielle Medium) Eagle supplémenté à 8% en sérum fœtal de veau (FCS, Eurobio, France), 1% de L-glutamine (200 mM) ainsi que 1% d'antibiotique PCS (pénicilline (10000 U),

colicine (25000 U) et streptomycine (10 mg)). La culture cellulaire est maintenue à 37°C sous atmosphère contrôlée à 5% en CO₂ tout en renouvelant quotidiennement le milieu. La souche de virus Herpès simplex de type 1 (VHS-1 ; de la famille de Herpesviridae) a été fournie par le Pr. Agut (Laboratoire de Dynamique, épidémiologie et traitement des infections virales de la Pitié Salpêtrière Paris, France). La collection de virus est obtenue par infection du tapis cellulaire de cellules Vero (350 000 cellules/mL) dans des flasques de culture (75 cm²) incubées pendant trois jours (37°C, 95% CO₂). Suite à l'incubation, la suspension est congelée et décongelée à deux reprises avant d'être centrifugée à faible vitesse (10000 g, 10 min) afin de collecter le surnageant. La phase liquide contenant la suspension virale est stockée à -80°C avant d'être utilisée. La titration du virus est réalisée suivant la méthode de dilution de Reed et Muench (1938). La dose d'infection médiane (ID₅₀) correspondant à 50% de la mortalité totale est exprimée en ID₅₀/mL et a été estimée pour la suspension virale utilisée à 2.10^{6,71} ID₅₀/mL.

6.2.2.Évaluation de l'activité cytotoxique et de la cinétique de l'activité antivirale par viabilité cellulaire

Les extraits de carraghénanes obtenus sont solubilisés dans le milieu MEM Eagle supplémenté à 8% de sérum fœtal de veau (FCS). Un volume (50 µL) est distribué dans les 96 puits de la microplaques (microtest III tissue culture plate, Nucleon Intermed, France). Pour chaque échantillon, une série de cinq concentrations allant de 1 à 200 µg/mL est réalisée et répétée sur quatre lignes de la microplaque. A ce volume vient s'ajouter les 100 µL de suspension cellulaire diluée de manière à obtenir une concentration de 3,5.10⁵ cellules Vero/mL dans le milieu MEM Eagle (8% FCS). L'infection des suspensions cellulaires est réalisée à partir d'une suspension virale préparée dans le milieu MEM afin d'obtenir une multiplicité d'infection (MOI) de 0,001 ID₅₀/cellules. Chaque microplaque est ensuite incubée à 37°C, 5% CO₂ pendant trois jours. Le tapis cellulaire est ensuite observé quotidiennement au microscope afin de déterminer la concentration minimale des extraits entraînant une altération de la morphologie cellulaire, notamment le gonflement, le rétrécissement, une modification de la granularité et leur détachement du tapis.

Dans une deuxième partie, une cinétique de l'activité antivirale et de la cytotoxicité des échantillons est étudiée. La méthode consiste à préparer six microplaques en parallèle et deux suspensions virales de manière à obtenir une MOI de 0,001 et 0,01 (ID₅₀/cellules) et de laisser les plaques incubées pendant 24, 48 et 72h à 37°C, 5% CO₂. La révélation par coloration au rouge neutre et la détermination des CC₅₀ et EC₅₀ sont déterminées selon la méthode précédemment décrite. Après

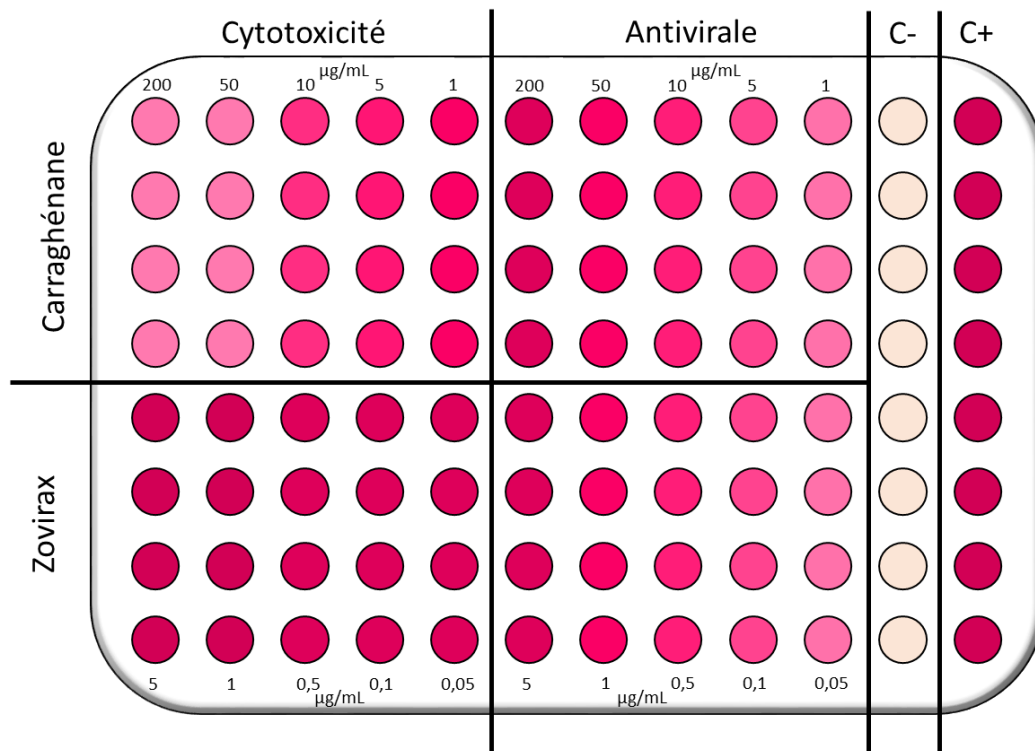


Figure 44: Schéma de l'organisation du test d'activité cytotoxique et du test de l'activité antivirale sur une microplaque 96 puits, sont présentés les gammes de dilution pour l'analyse des carraghénanes et du standard l'Acyclovir « Zovirax », le contrôle de mortalité cellulaire par infection virale (C-) et le contrôle de viabilité cellulaire (C+).

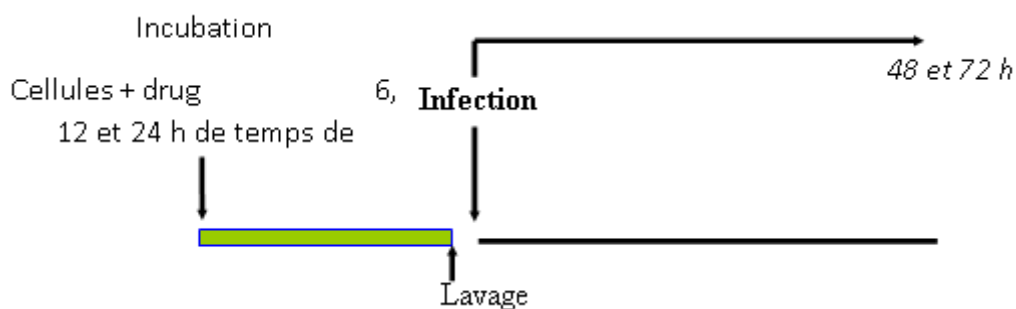


Figure 45 : Schéma représentant les étapes du traitement permettant d'évaluer l'effet de l'extrait sur la fixation virale.

incubation la mortalité cellulaire est évaluée suivant le protocole de révélation au rouge neutre (Cf. 6.2.4). L'organisation de la microplaque est schématisée par la **Figure 44**.

6.2.3. Détermination des mécanismes d'action des extraits sur le modèle virus VHS-1

L'étude des mécanismes d'action de l'inhibition du virus Herpès simplex de type 1 ont été réalisées suivant le protocole décrit par Olicard *et al.*, (2005).

6.2.3.1. Inhibition de la fixation virale : Évaluation de l'effet du traitement par l'extrait en pré-infection

La première étape consiste à mettre la suspension cellulaire en présence de la molécule standard (Acyclovir) et de l'échantillon d'étude. Ce test est réalisé pour deux multiplicités d'infection de 0,001 et 0,01 ID₅₀/cellules durant des cinétiques de 48 et 72 heures. Pour cela, dans chaque microplaque 96 puits, 100 µL de la suspension cellulaire (concentration 350 000 cellules Vero/mL) sont ajoutés dans chaque puit. Une colonne servira de contrôle cellule dans laquelle sera ajouté 100 µL de milieu MEM 8% SVF. Une deuxième colonne servira de contrôle pour le virus et sera réalisée de la même manière dans un premier temps.

Une gamme de standard Acyclovir (fournisseur) est préparée allant d'une concentration de 5 à 0,05 µg/mL (5 ;1 ;0,5 ;0,1 et 0,05 µg/mL). En parallèle, une gamme de concentration allant de 200 à 1 µg/mL d'extrait à tester est réalisée. Pour chaque série de dilution (standard ou échantillon) un ajout de 50 µL de la solution à tester est ajouté à chaque puits auquel est ajouté un volume de milieu MEM 8% SVF qsp 200 µL. S'en suit une incubation des microplaques pendant 12 heures à 37°C sous atmosphère contrôlée à 5% CO₂. Après incubation, l'ensemble du contenu des puits est éliminé sur papier absorbant et un lavage des puits par 100 µL de tampon PBS est réalisé. À cette étape, deux suspensions virales sont préparées dans le milieu MEM 8% SVF de manière à obtenir des MOI de 0,001 et 0,01 DI₅₀/cellules. Cinquante µL des suspensions virales sont ajoutées au puits de la colonne du contrôle virus et des gammes servant à déterminer la protection virale des composés testés, à ceci s'ajoute un volume de 150 µL de milieu MEM supplémenté. Pour la série de puits destinés à contrôler la viabilité cellulaire et la cytotoxicité des échantillons, seuls 200 µL de milieu viennent compléter les puits. S'en suit une incubation des microplaques infectées pendant 48 ou 72 heures à 37°C sous atmosphère contrôlée (5% CO₂). Après incubation la mortalité cellulaire est

évaluée suivant le protocole de révélation au rouge neutre (Cf. 6.2.4). Les étapes du protocole sont schématisées par la **Figure 45**

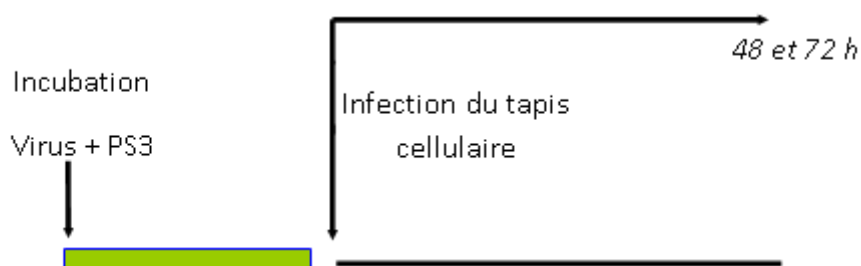


Figure 46 : Schéma représentant les étapes du traitement permettant d'évaluer l'activité virucide de l'extrait

6.2.3.2. Effet direct sur le virus : Évaluation de l'activité virucide de l'extrait

Pour étudier l'effet direct de l'extrait sur le virus, un test à différentes MOI (0.001 et 0.01 DI_{50} /cellules) est réalisé à 48 heures et 72 heures d'incubation. Dans un premier temps, une suspension cellulaire (350 000 cellules Vero / mL) est préparée puis 100 μ L de cette suspension sont ajoutés dans chacun des 96 puits de chaque microplaque (quatre microplaques / échantillon). Les microplaques sont ensuite incubées 24h à 37°C sous 5% CO_2 afin que le tapis cellulaire puisse se former dans le tube. Le jour suivant, des gammes de solution d'Acyclovir (5 à 0,05 μ g/mL) et d'échantillons à tester (200 à 1 μ g/mL) sont préparées dans en tube à hémolyse en duplicata. Ces différentes solutions vont ensuite être infectées par la suspension virale à deux MOI de 0,001 et la seconde avec une MOI de 0,01 DI_{50} /cellules. Ces gammes sont ensuite incubées dans les mêmes conditions que les cellules pendant une heure. Après incubation, 100 μ L de chaque gamme de solution sont ajoutés dans les puits des microplaques contenant le tapis cellulaire formé après 24 heures d'incubation. Une colonne de puits témoin ne contenant que le tapis cellulaire est complétée par 100 μ L de milieu MEM 8% SVF pour déterminer la viabilité cellulaire, dans une seconde colonne sont ajoutés 50 μ L de suspension cellulaire sans extrait et 50 μ L de milieu de culture afin de déterminer la mortalité cellulaire par infection virale. Après infection des microplaques par les différentes solutions, celles-ci sont incubées pendant 48 à 72 heures à 37°C, 5% de CO_2 . Après incubation la mortalité cellulaire est évaluée suivant le protocole de révélation au rouge neutre (Cf. 6.2.4). Le déroulement du test est schématisé par la **Figure 46**.

6.2.3.3. Effet du temps d'addition : Évaluation de l'effet du traitement post-infection

Cette expérience consiste à évaluer l'effet du temps d'addition après infection sur l'activité antivirale du produit testé. Cela nécessite de préparer une gamme de concentration pour l'échantillon (200 à 1 µg/mL) et d'Acyclovir (5 à 0,05 µg/mL) et dix microplaques pour tester l'effet d'ajout au temps d'infection, puis l'ajout après 1,2,3 et 5 heures après infection. Les microplaques sont préparées en ajoutant 100 µL de la suspension cellulaire (350 cellules Vero / mL) dans chaque puits. De la même manière que pour les autres tests réalisés, une colonne témoin est utilisée pour évaluer la viabilité cellulaire dans laquelle seront ajoutés 100 µL de milieu MEM 8% SVF aux 100 µL de suspension cellulaire. Une deuxième colonne permettant de contrôler la mortalité cellulaire est infectée par 50 µL de suspension virale à une MOI 0,001ID₅₀/Cellules puis complétée par 50 µL de milieu.

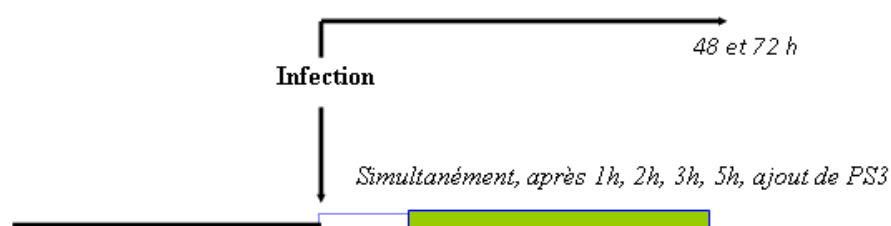


Figure 47 : Schéma représentant les étapes du traitement par addition pour évaluer l'effet de l'extrait post-infection.

Tableau XXII : Tableau présentant les trois traitements appliqués aux cellules pour évaluer l'effet de l'inactivation virale de l'extrait.

traitement A	traitement B	traitement C
Ajout 100 µL de carraghénane ou Acyclovir + virus	Ajout 50 µL de suspension virale + 50 µL de milieu MEM	Ajout 100 µL Carraghénane ou Acyclovir + virus
Incubation 1h à 4°C	Incubation 1h à 4°C	Incubation 1h à 4°C
Lavage du tapis cellulaire par 100 µL PBS	Lavage du tapis cellulaire par 100 µL PBS	Lavage du tapis cellulaire par 100 µL PBS
Ajout de 200 µL milieu MEM 8% de SVF	Ajout de 150 µL milieu MEM 8% de SVF + 50 µL carraghénane ou Acyclovir	Ajout de 150 µL milieu MEM 8% de SVF + 50 µL carraghénane ou Acyclovir
Incubation 72h à 37°C 5% CO ₂	Incubation 72h à 37°C 5% CO ₂	Incubation 72h à 37°C 5% CO ₂

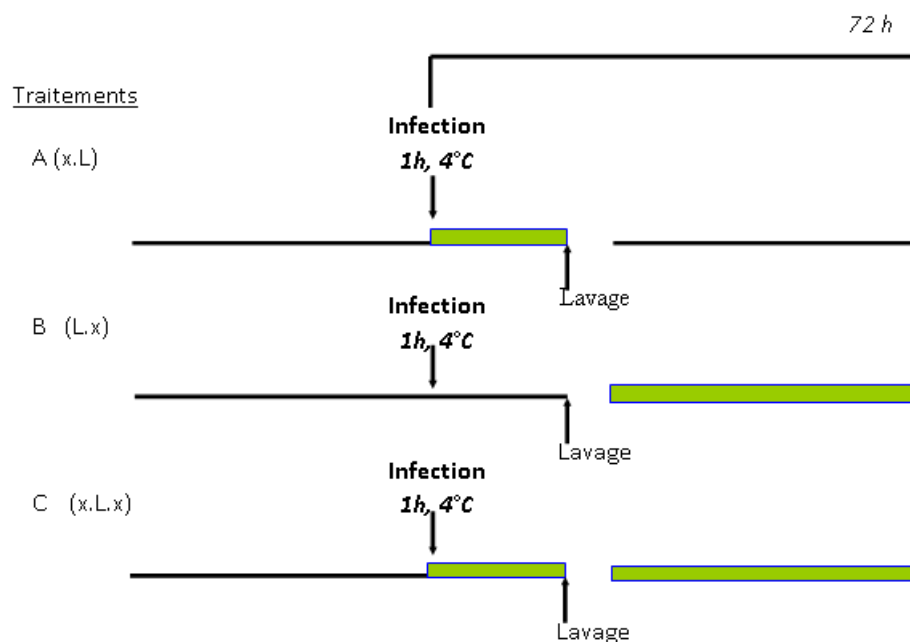


Figure 48 : Schéma représentant les différentes étapes du test afin d'évaluer l'effet d'inactivation virale de l'extrait.

Les puits affiliés au contrôle de l'activité antivirale des échantillons testés sont également complétés par la suspension virale (50µL) alors 50µL de milieu seront ajoutés aux puits destinés à l'évaluation de la cytotoxicité des échantillons. Les microplaques sont ensuite incubées à 37°C sous atmosphère 5% de CO₂ avant l'ajout des échantillons. L'addition des solutions de la gamme d'échantillon est ensuite réalisée dans les différents puits (cytotoxicité et activité antivirale) au moment de l'infection pour les deux premières microplaques puis après 1, 2, 3 et 5 heures après infection (deux microplaques par temps d'addition). Les microplaques sont ensuite incubées pendant 48 et 72 heures dans les mêmes conditions avant la révélation le protocole de coloration au rouge neutre décrit en (Cf. 6.2.4). La **Figure 47** schématise les différentes étapes du traitement.

6.2.3.4. Inactivation virale : Évaluation de l'effet sur l'adsorption virale

La journée précédant l'infection virale, une suspension cellulaire est préparée (350 cellules Vero / mL), 100 µL de cette suspension sont ajoutés dans chaque puits puis incubés à 37°C 5% CO₂ pendant 24 heures.

Le jour suivant, une gamme de concentration (200 à 1 µg/mL) pour l'échantillon et (5 à 0,05 µg/mL) pour l'Acyclovir sont préparées en duplicata. L'un va être infecté par une suspension virale de manière à obtenir une MOI de 0,001 DI₅₀/ cellules ; l'autre gamme n'étant pas infectée.

Trois traitements sont ensuite appliqués sur le tapis cellulaire suivant les procédures décrites dans le **Tableau XXII**.

Après incubation la mortalité cellulaire est évaluée suivant le protocole de révélation au rouge neutre (Cf. 6.2.4). La **Figure 48** schématise les étapes du traitement.

6.2.4.Méthode d'analyse des résultats pour l'évaluation de la cytotoxicité par viabilité cellulaire et de l'activité antivirale

La cytotoxicité des extraits est également évaluée par viabilité cellulaire en appliquant la méthode de coloration au rouge neutre décrit par McLaren, Ellis et Hunter (1983). La densité optique (DO) des suspensions cellulaires est mesurée à 540 nm en utilisant un spectrophotomètre (SpectraCount™, Packard). La concentration entraînant 50% de mortalité cellulaire (CC₅₀) est déterminée comme étant la concentration qui réduit de moitié l'absorbance obtenue par le témoin cellules correspondant au 100% de viabilité cellulaire. La valeur CC₅₀ est exprimée comme un pourcentage de destruction cellulaire obtenu par l'**équation 17** :

$$\%D = \left[\frac{(DO_c)_c - (DO_c)_{MOCK}}{(DO_c)_c} \right] \times 100$$

Équation 17

(DO_c)_c et (DO_c)_{MOCK} correspondent respectivement à la DO mesurée pour le contrôle de cellules non traitées (100% viables) et les cellules traitées suivant la méthode décrite par Langlois *et al.* (1986).

Après incubation, l'activité antivirale est également évaluée par la méthode de coloration au rouge neutre. De manière à évaluer l'activité des échantillons, une molécule de référence est analysée en parallèle. Pour cette étude, le composé antiviral de référence est l'acyclovir [9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine] à préciser avant. L'activité antivirale d'un extrait ou d'un composé est déterminé par la Concentration Effective à 50% (EC₅₀) correspondant à la concentration permettant de protéger 50% des cellules infectées par le virus vis-à-vis de la mortalité cellulaire induite par le virus sur les cellules non protégées. La DO mesurée est directement liée au pourcentage de cellules viables, soit inversement liée à l'Effet CytoPathique (ECP). Une régression linéaire est réalisée pour chaque échantillon basée sur le contrôle de viabilité cellulaire (0% ECP) et

de l'efficacité du virus (100% ECP). Les données sont exprimées en pourcentage de protection (%P) via l'**équation 18** :

$$\%P = \left[\frac{((DO_t)_{\text{virus}} - (DO_c)_{\text{virus}})}{((DO_c)_{\text{MOCK}} - (DO_c)_{\text{virus}})} \right] \times 100$$

Équation 18

(DO_t) virus correspond à la DO obtenu pour l'échantillon, (DO_c)virus correspond à la mesure de DO du témoin virus et (DO_c)MOCK est la DO correspondant à la cytotoxicité de l'échantillon (Langlois et al., 1986).

7. Analyse statistique

Les tests d'analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA), de Kruskal-Wallis et le test d'ajustement de Bonferroni sont utilisés de manière à déterminer la significativité des différences entre les rendements, la composition biochimique et les activités obtenus pour l'ensemble des extraits obtenus par les différents procédés conditions native et alcaline. L'ensemble des tests statistiques ont été obtenus à partir du logiciel XLSTAT 2015. Les différences significatives déterminés entre les différents échantillons sont exprimées graphiquement par des lettres. Les niveaux de significativité retenus pour les analyses sont un $\alpha = 0,01$ pour les facteurs de composition en 3,6 anhydrogalactose et en sulfate totaux (**partie I.2.1**) et un $\alpha = 0,05$ pour les rendements, la composition des extraits EAE et ScCO₂ et les activités biologiques.

Chapitre III : Résultats et discussions

Partie I : Étude de l'activité antiherpétique (HSV-1) de carraghénanes extraits de la macroalgue rouge *Solieria chordalis* (Rhodophycée, Gigartinales) par l'application de l'Extraction Assistée par Microondes (EAM).

1. Introduction :

1.1. L'application des micro-ondes au domaine des macroalgues

Comme présenté dans le chapitre introductif, l'Extraction Assistée par Microondes (EAM) est une méthode appliquée aux algues marines. Malgré les premiers travaux sur l'extraction de composés naturels par cette méthode datant de 1986. L'intérêt de cette technique pour l'extraction de composés algaux n'a été décrite que depuis le milieu des années 2000 (Navarro et Stortz, 2005). De manière générale, cette technologie visait principalement à améliorer l'extraction des phycocolloïdes. Peu de travaux lie l'impact de cette technologie sur les molécules extraites et leur bioactivités.

Le **Tableau XXIII** présente les travaux réalisés sur l'étude de l'EAM appliquée aux macroalgues (Rhodophycées, Chlorophycées et Phéophycées). Le tableau comporte les informations concernant les conditions appliquées au procédé, la biomasse traitée et les molécules ciblées.

Actuellement, la méthode d'extraction conventionnelle utilisée dans l'industrie est très consommatrice en temps et produit de grande quantités de déchets (consommatrice de solvant). De nombreuses recherches se concentrent sur l'étude de procédés innovants permettant d'extraire les polysaccharides sulfatés des macroalgues. Parmi ces technologies, l'Extraction Assistée par Microondes (EAM) a prouvé son efficacité vis-à-vis de la méthode conventionnelle. Elle permet de réduire sensiblement le temps, la consommation de solvants et la production de déchets (Vazquez-Delfin *et al.* 2013).

Tableau XXIII: Tableau présentant les études appliquant l'Extraction Assistée aux Microondes pour l'obtention d'extraits de macroalgues (Rhodophycées, Chlorophycées et Phéophycées)

Ordre	Espèces	Conditions				Composé extrait	Rendement (%)	Références
		Temps (min)	Température (°C)	pH	Puissance (W)			
Rhodophycées	<i>Gelidiella acerosa</i>	30	-	Alcalin	360	Cellulose	-	Singh <i>et al.</i> , 2017
	<i>Gracilaria vermiculophylla</i>	10, 15 et 20	70, 80, 90	Neutre	1500	Agar	3 à 13,7 %	Sousa <i>et al.</i> , 2010
	<i>Polysiphonia sp.</i>	30	25, 40 et 60	Neutre	1000	Extraits	-	Michalak, Tuhy et Chojnacka, 2015
	<i>Iridaea undulosa</i>	0,25	-	Alcalin	1200	Modifications des galactanes	-	Navarro et Stortz, 2005
	<i>Iridaea undulosa</i> <i>Corallina officinalis</i>	0, 15	-	Alcalin	1200	Désulfatation des polysaccharides	-	Navarro, Flores et Stortz, 2007
	<i>Eucheuma cottonii</i> <i>Eucheuma spinosum</i>	30	-	Solvants organiques / eau	800	I- et κ- carraghénanes	-	Uy <i>et al.</i> , 2005
	<i>Hypnea musciformis</i>	10 et 20	85, 95 et 105	Alcalin et Neutre	800	Carraghénanes	14 à 24	Vázquez-Delfín, Robledo et Freile-Pelegrián, 2014
	<i>Gracilaria sp.</i>				200 / 300	Bio-oil	-	Budarin <i>et al.</i> , 2011

Ordre	Espèces	Conditions				Composé extrait	Rendement (%)	Références
		Temps (min)	Température (°C)	pH	Puissance (W)			
Pheophycées	<i>Ascophyllum nodosum</i>	5 à 30	90 à 150	Acide	-	Fucoïdane	6 à 16	Yuan et Macquarrie, 2015
						Alginate	0 à 2	
	<i>Carpophyllum flexuosum</i>	3	160	Neutre	-	Polyphénols	11,4	Magnusson <i>et al.</i> , 2017
	<i>Undaria pinnatifida</i>	10		Hexane	950	Hydrocarbure aliphatique	-	Punin Crespo <i>et al.</i> 2006
	<i>Himanthalia elongata</i>					Hydrocarbures polycyclique aromatique	-	
	<i>Saccorhiza polyschides</i>							
	<i>Fucus vesiculosus</i>	1, 16 et 31	122, 152 et 172	Neutre	-	Fucoïdane	1 à 18	Rodriguez-Jasso <i>et al.</i> , 2010
	<i>Ecklonia radiata</i>	180	50	-	-	Extraits antioxydants	-	Charoensiddhi <i>et al.</i> , 2014
	<i>Fucus vesiculosus</i>	1, 11 et 31	-	Neutre	-	Fucanes	15,6 à 27,6	Rodriguez-Jasso <i>et al.</i> , 2010

Chlorophycées	<i>Ulva sp.</i>	30	25, 40 et 60	Neutre	1000	Extraits	-	Michalak, Tuhy et Chojnacka, 2015
	<i>Cladophora sp.</i>							
	<i>Enteromorpha linza</i>	240	-	-	40	Huiles essentielles	-	Patra, Kim et Baek, 2015

Virus de l'Herpès *simplex* de type 1 (HSV-1)

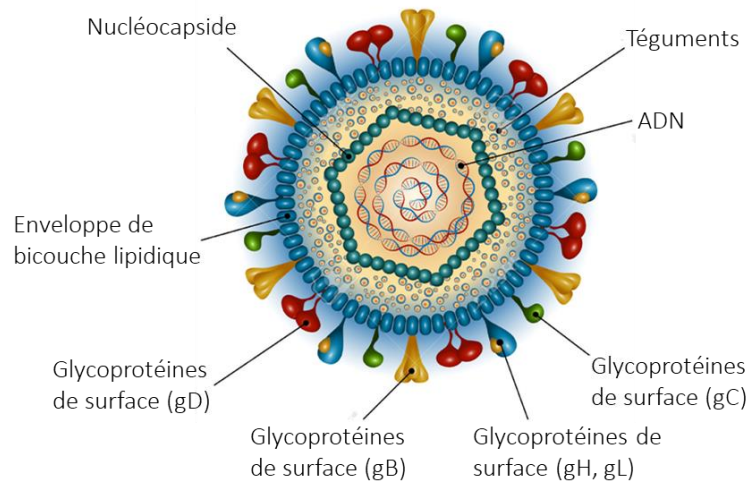


Figure 49 : Structure du virus Herpès simplex de type 1 (VHS-1).

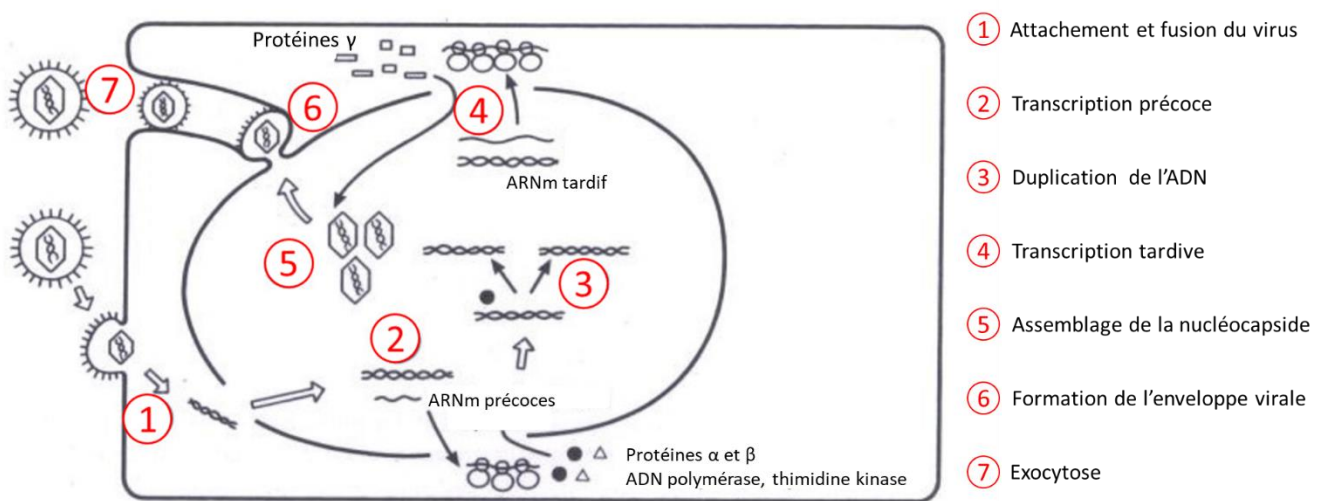


Figure 50 : Représentation schématique du cycle de réplication du Virus de l'Herpès simplex de type 1 (Schéma modifié d'après Fleury, 2009)

1.2. Le virus de l'Herpès, modèle de pathogénicité du corps humain.

Le virus Herpès simplex de type 1 (HSV-1) est un virus enveloppé à ADN qui appartient à la famille des *Herpesviridae*, constituée de plus de quatre-vingts souches pathogènes pour l'homme, la souche HSV-1 a infecté plus de 45% de la population (Fatahzadeh & Schwartz, 2007). Le virus de l'Herpès est qualifié de neurotrophique, c'est-à-dire qu'il a la capacité de persister à vie au niveau des neurones sensoriels du corps humain, puis de se répliquer au sein des cellules épithéliales lors de la primo infection mais également lors de sa réactivation (Heldwein et Krummenacher, 2008). La structure du virus est schématisée dans la **Figure 49**. L'infection se manifeste sous différente forme clinique parmi laquelle l'Herpès labial, buccal qui se traduit par l'apparition de vésicules fines en bouquet sur une base érythémateuse ; mais peut également dans les cas les plus grave entrainer des méningites et des encéphalopathie (Connolly et al., 2011 ; Karasneh et Shukla 2011). Ce type de virus a une capacité d'adaptation du système immunitaire de l'hôte très importante, ceci entraine dans le cas de faiblesse immunitaire la manifestation d'infections très rapides.

Le cycle de virus est présenté par la Figure 50. L'interaction du virus avec la cellule démarre par l'étape d'adsorption qui a lieu suite à la reconnaissance et l'interaction de la capsid/supercapsid protéique du virus par le récepteur spécifique de la cellule (Nesterova *et al.*, 2005). Dans sa partie la plus externe le virus possède une enveloppe également nommé supercapsid qui présente 16 protéines membranaires dont 12 glycoprotéines. Une seconde enveloppe nommée capsid est présente à l'intérieur de la supercapsid et entoure le brin d'ADN viral le tout formant la nucléocapsid. Pour pouvoir interagir avec la cellule hôte et réussir l'attachement, le virus fait intervenir quatre glycoprotéines (gB, gD, gH et gI) (Campadelli-Fiume *et al.* 2007 ; Diefenbach *et al.* 2008). Une fois l'attachement réalisé le virus libère sa capsid dans la cellule (Étape 1). Puis la capsid transporte et libère le brin d'ADN viral dans le noyau de la cellule. L'intégration de l'ADN viral dans le noyau entraine la mise en place de mécanisme de transcription (Étape 2) qui vont générer la formation de protéines α et β correspondant à des enzymes telles que l'ADN polymérase et la thymidine kinase intervenant dans la réplication du brin d'ADN (Étape 3). Ces mécanismes sont indépendants des mécanismes de la cellule et sont propres au virus de l'Herpès. Suite à cette étape, se produit la transcription du brin d'ARN messenger viral au niveau des ribosomes, cet ARNm est traduit en protéines virales (protéines γ) (Étape 4). S'en suit l'étape d'auto-assemblage formant une nouvelle nucléocapsid (Étape 5), le matériel viral produit étant en excès une partie reste non utilisée dans la cellule. Cette nucléocapsid va ensuite sortir du noyau et en profiter pour former son enveloppe (supercapsid) dérivée de la membrane nucléaire (Étape 6) puis sortir de la cellule en

empruntant les canalicules du réticulum endoplasmique (Étape 7). Le virus libéré est ensuite disposé à contaminer d'autres cellules et poursuivre sa multiplication.

Les infections par le virus de l'Herpès sont qualifiées de très complexes car le virus présente de multiples mécanismes d'adsorption par la cellule hôte (Karasneh et Shukla 2011 ; Hadigal, 2013). Une primo infection par le virus entraîne un parasitisme intracellulaire pouvant se manifester par l'apparition d'infection par de nouvelles souches et la coexistence de plusieurs souches. La complexité de l'activation de l'infection est régie par une compétition constante entre l'homéostasie immunitaire et la virus (Sergeev *et al.*, 2011). Généralement, les complications sévères d'infection par le virus de l'Herpès sont observées chez les patients immunodépressifs, mettant en exergue la présence de déficience immunitaire pouvant atteindre dans les situations les plus graves, la mort du patient.

Malgré la présence de nombreux médicaments antiherpétiques, cette infection est toujours mal maîtrisée du fait de la complexité génotypique du pathogène, de sa longue persistance dans l'hôte, de sa capacité à esquiver les mécanismes de défense du système immunitaire et de la formation de souches résistantes (Besednova *et al.*, 2016). Il a été démontré que les traitements les plus efficaces sont obtenus par une thérapie complexe combinant à la fois des activités antivirales, antiinflammatoires et immunostimulantes en appliquant des molécules ayant différents mécanismes d'actions. Parmi ces molécules actives, la littérature a démontré que les polysaccharides sulfatés (fucoïdanes, galactofucanes et carraghénanes) extraits de macroalgues marines brunes, vertes et rouges possèdent des activités efficaces antivirales.

Les polysaccharides extraits des Rhodophycées ont démontré des activités antivirales contre une grande diversité de virus (**Tableau XXIV**) incluant plusieurs agents pathogènes humains tels que le Virus d'Immunodéficience Humaine (VIH), le Virus de l'Herpès (VHS), le Virus de la Stomatite Vésiculaire (VSV) et le Cytomégalovirus (CMV) (Baba *et al.* 1988 ; Harden *et al.* 2009 ; Bouhlal *et al.* 2011). Un exemple d'application de ces propriétés antivirales contre le VIH est le gel nommé « Carraguard », incorporant des carraghénanes dans sa formulation comme principe actif. Il est destiné à un traitement vaginal antiseptique et désinfectant permettant de bloquer le VIH et d'autres maladies sexuellement transmissibles (MST) (Béress *et al.* 1993). Il reste controversé. De plus, d'autres polysaccharides de Rhodophycées extraits des Dumontiacees sont prescrits comme suppléments alimentaires incorporés sous forme de capsules comme actif antiviral lors de l'apparition de premiers symptômes de contamination virale.

Tableau XXIV: Tableau présentant les études réalisées sur l'activité antivirale de polysaccharides sulfatés extraits de macroalgues rouges.

Espèces d'algues	Extraction	Composés extraits	Souche du virus	Concentration active* (µg/mL)	Références
<i>Schizymenia dubyi</i>	Hydrolyse aqueuse	Polysaccharides sulfatés hydrosolubles, galactanes sulfatés	VHS-1	ED ₅₀ : 1,5 à 5	Bourgougnon <i>et al.</i> 1993
			VHS-2	ED ₅₀ : 6 à 25	
			Virus de la polio	ED ₅₀ : 30 à 44	
			VVS	ED ₅₀ : 10 à 15	
<i>Nothogenia fastigiata</i>		Polysaccharides sulfatés		CE ₅₀ : 0,6 à 100	Kolender <i>et al.</i> 1997
<i>Callophyllis variegata</i>	Hydrolyse aqueuse, traitement acide et alcalin	Polysaccharides sulfatés	VHS-1	IC ₅₀ : 0,16 ± 0,02 à 1,55 ± 0,37	Rodriguez <i>et al.</i> 2005
			VHS-2	IC ₅₀ : 0,21 ± 0,08 à 2,19 ± 0,70	
			DENV-2	IC ₅₀ : 0,10 ± 0,01 à 0,41 ± 0,12	
			VCMH	IC ₅₀ : 0,79 ± 0,2	
<i>Sphaerococcus coronopifolius</i>	Hydrolyse aqueuse	Polysaccharides sulfatés hydrosolubles	VHS-1	CE ₅₀ : 4,1	Bouhlal <i>et al.</i> 2011
			VIH	CE ₅₀ : 12,5	
<i>Pterocladia capillacea</i> <i>Laurencia obtusa</i>	Hydrolyse aqueuse	Polysaccharides sulfatés	VHC	PI : 42 à 82 %	Gheda, El-Adawi et El-Deeb, 2016

Espèces d'algues	Extraction	Composés extraits	Souche du virus	Concentration active* (µg/mL)	Références
<i>Gigartina skottsbergii</i>	Hydrolyse aqueuse et traitement alcalin	Carraghénanes	VHS-1	IC ₅₀ : 0,3 à 67,6	Carlucci <i>et al.</i> 1997 ; Carlucci <i>et al.</i> 1999
			VHS-2	IC ₅₀ : 0,3 à 60,2	
<i>Stenogramme interrupta</i>		Carraghénanes		Actifs	Caceres <i>et al.</i> 2000
<i>Meristiella gelidium</i>	Hydrolyse aqueuse, traitement acide et alcalin	Carraghénanes (kappa, iota et nu)	VHS-2	IC ₅₀ : 0,04 ± 0,01 à 0,06 ± 0,01	de S.F- Tischer <i>et al.</i> 2006
			DENV-2	IC ₅₀ : 0,014 ± 0,01 à 0,79 ± 0,04	
<i>Gigartina atropurpurea</i>	Hydrolyse aqueuse haute température	Carraghénanes	VHS-1	CE ₅₀ : 2,5 à 3,6	Harden <i>et al.</i> 2009
			VHS-2	CE ₅₀ : 0,7 à 6,6	
<i>Hypnea musciformis</i>	Hydrolyse aqueuse	Carraghénanes (kappa)	TMV	CE ₅₀ : 20 µM à 800 µM	Ghannam <i>et al.</i> 2013
<i>Gigartina skottsbergii</i>	Hydrolyse aqueuse, traitement acide	Carraghénanes (Lambda)	BoHV-1	CE ₅₀ : 0,52 ± 0,01	Diogo <i>et al.</i> 2015
				VC ₅₀ : 0,96 ± 0,08	
			SuHV-1	CE ₅₀ : 10,42 ± 0,88	
				VC ₅₀ : 31,10 ± 2,28 YC ₅₀ : 73,54 ± 2,07	
Espèces d'algues	Extraction	Composés extraits	Souche du virus	Concentration	Références

active* (µg/mL)					
<i>Acanthophora specifira</i>	Hydrolyse aqueuse	Carraghénanes	VHS-1	CE ₅₀ : 0,943	Gomaa et Elshoubaky, 2016
			RVFV	CE ₅₀ : 1,001	
<i>Solieria filiformis</i>	Extraction organique éthanol / eau (v/v) à chaud, traitement acide	Carraghénanes	MeV	CE ₅₀ : 0,985	Morán-Santibañez <i>et al.</i> 2016
<i>Rhodymenia pseudopalmata</i> <i>Hydropuntia cornea</i>	Hydrolyse aqueuse	Carraghénanes	HSV-1	CE ₅₀ : >200	Bedoux <i>et al.</i> 2017
<i>Gymnogongrus griffithsiae</i> <i>Cryptonemia crenulata</i>	Hydrolyse aqueuse	Galactanes sulfatés	VHS-1	IC ₅₀ : 1 à 5,6 VC ₅₀ : 8,5	Talarico <i>et al.</i> 2004
			VHS-1 (B 2006)	IC ₅₀ : 0,4 à 2,8	
			VHS-1 (1C3-syn 13-8)	IC ₅₀ : 0,3 à 3,4	
			VHS-1 (1C3-syn 14-1)	IC ₅₀ : 2,7 à 16,7	
			VHS-2 (G)	IC ₅₀ : 1,0 à 3,3	
			VHS-2 (MS)	IC ₅₀ : 0,1 à 0,4	

Espèces d'algues	Extraction	Composés extraits	Souche du virus	Concentration active* (µg/mL)	Références
<i>Schizymenia binderi</i>	Hydrolyse aqueuse, traitement natif et alcalin	Galactanes sulfatés	VHS-1	CE ₅₀ : 0,76 ± 0,01	Matsuhiro <i>et al.</i> 2005
			VHS-2	CE ₅₀ : 0,63 ± 0,02	
<i>Grateloupia indica</i>		Galactanes sulfatés		CE ₅₀ : 0,12 à 0,16	Chattopaddhyay <i>et al.</i> 2006
<i>Hypnea musciformis</i> <i>Pterocladia capillacea</i>		Extraits hydrosolubles, galactanes sulfatés		IP: 95,5% à 57,3% CE ₅₀ : 3,2 à 6,1	Pujol <i>et al.</i> , 1996 ; Santos <i>et al.</i> , 1999 ; Soares <i>et al.</i> 2012
<i>Mazzaella cornucopiae</i>		Extraits		IC ₅₀ : 200	Kim <i>et al.</i> 1997
<i>Chondrus ocellata</i>	Extraction organique	Extraits méthanoliques	Virus de la polio	200	Hudson <i>et al.</i> 1998
<i>Hypnea musciformis</i> <i>Plocamium cartilagineum</i> <i>Sphaerococcus coronopifolius</i>	Extraction organique / hydrolyse aqueuse	Extraits organiques et extraits aqueux bruts	VHS-1	CE ₅₀ : 4,4 à 51,4 (extraits organiques) CE ₅₀ : 2,5 à 75,9 (extraits aqueux)	Bouhlal <i>et al.</i> 2010
<i>Plocamium brasiliense</i> <i>Tricleocarpa cylindrica</i> <i>Chondracanthus acicularis</i> <i>Hypnea spinella</i>		Extraits		PI : 68,4 à 92 %	Soares <i>et al.</i> 2012
Espèces d'algues	Extraction	Composés extraits	Souche du virus	Concentration active* (µg/mL)	Références

<i>Solieria chordalis</i>	Extraction Assistée par Enzyme / hydrolyse aqueuse	Extraits hydrosolubles	VHS-1	CE ₅₀ : 23,0 ± 1,7 à 101,1 ± 11,0	Hardouin <i>et al.</i> 2014
<i>Hypnea spinella</i>	Extraction organique	Extraits méthanoliques	WSSV	Extraits actifs	Dinesh <i>et al.</i> 2014
<i>Chondrus crispus</i>	Extraction Assistée par enzyme	Extraits hydrosolubles	VHS-1	CE ₅₀ : 161,1 ± 4,3	Kulshreshtha <i>et al.</i> 2015
<i>Solieria chordalis</i>	Hydrolyse enzymatique	Extraits hydrosolubles	HSV-1	CE ₅₀ : 23,0 à 101,1	Burlot <i>et al.</i> 2016

*Unité d'activité :

IC₅₀ : Concentration Inhibitrice 50 : concentration de l'échantillon (extrait ou composé) qui réduit de 50 % l'effet cytopathique de virus. **VC₅₀** : Virucidal Concentration 50 : concentration de l'échantillon qui inactive 50 % des virions. **YC₅₀** : 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. **CE₅₀ = ED₅₀** : Concentration Efficace ou en anglais Effective Dose 50% : concentration de l'échantillon qui protège 50 % des cellules infectées par le virus. **PI** : Pourcentage d'inhibition de l'activité du virus par la dose testée.

**Souche de Virus :

VHS-1 : Virus Herpès simplex de type 1 ; **VHS-2** : Virus Herpès simplex de type 2 ; **MeV** : Virus de la rougeole ; **VHC** : Virus de l'hépatite C ; **RVFV** : Rift Valley fever virus ; **SuHV-1** : Suid herpesvirus 1 ; **BoHV-1** : bovine herpes virus 1 ; **WSSV** : White Spot Syndrome Virus ; **TMV** : tobacco mosaic virus ; **VIH** : Virus de l'immunodéficience humaine ; **VVS** : Vulvar vestibulitis syndrome ; **DENV-2** : Dengue Virus Type 2 ; **SINV** : Virus Sindbis

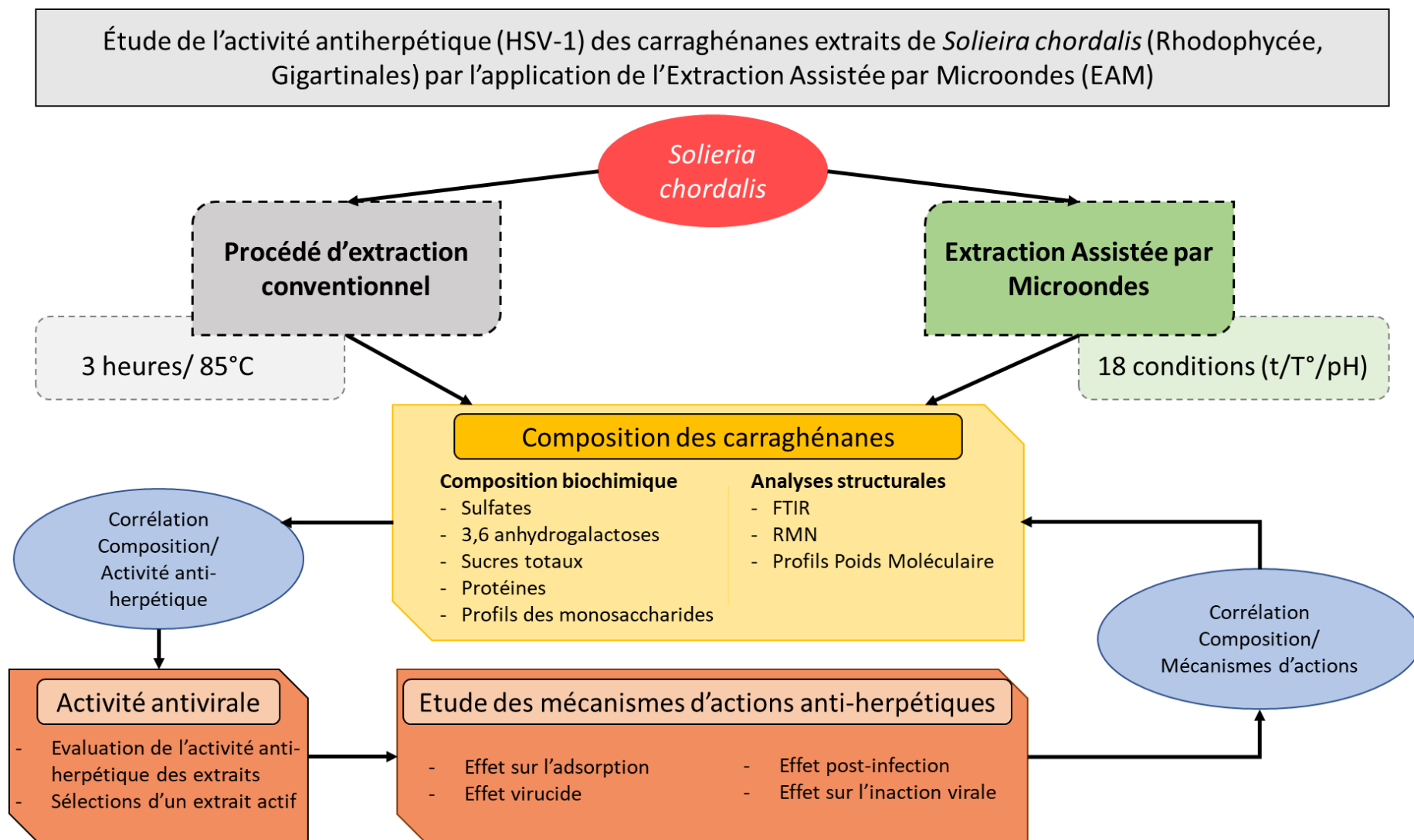


Figure 51: Plan d'étude de l'activité antiherpétique (HSV-1) de carraghénanes extraits de la macroalgues rouge *Solieria chordalis* (Rhodophycée, Gigartinales) par l'application de l'Extraction Assistée par Microondes (EAM).

1.3. Objectifs de l'étude :

L'objectif de cette étude a été d'étudier l'effet antiherpétique des carraghénanes extraits de *Solieria chordalis* par l'application du procédé d'Extraction Assistée par Microondes. Le plan d'étude est schématisé par la **Figure 51**.

La première étape de l'étude a été d'étudier la capacité du procédé d'Extraction Assistée par Microondes (EAM) à extraire les polysaccharides de *S. chordalis* en faisant varier les paramètres de temps, de température et de traitement alcalin. Afin d'évaluer l'efficacité du procédé celui-ci a été comparé à la méthode d'extraction dite conventionnelle par chauffage à 85°C pendant 3 heures. L'efficacité du procédé a pu être déterminée par le rendement d'extraction.

L'étude a été complétée par une analyse plus approfondie des extraits produits analyser l'influence du procédé sur la composition de l'extrait. Tout d'abord, l'analyse de la composition biochimique a permis d'évaluer l'influence du type de procédés (Conventionnel ou EAM) sur la sulfatation et la formation des ponts 3,6 Anhydrogalactose (3,6 AG) des carraghénanes et sur la composition en sucres totaux et en protéines des polysaccharides. L'analyse a été complétée par l'étude du profil de sucres et le poids moléculaire de chaque extrait ; et également par des analyses structurales (FTIR, RMN) afin de déterminer la composition en carraghénanes des extraits.

L'étude s'est poursuivie sur l'évaluation de l'activité antiherpétique des extraits de carraghénanes produits. L'ensemble des extraits ont démontrés une activité sur le modèle de pathogénicité du virus Herpès *simplex* de type 1 avec des efficacités plus ou moins importantes. L'évaluation de la capacité des extraits à protéger les cellules mammaliennes face à l'infection virale a permis de sélectionner un extrait pour l'étude des mécanismes d'actions des carraghénanes sur les étapes de réplication du virus.

L'étude de l'ensemble des paramètres d'extraction, de la composition des extraits produits et de l'activité antivirale a pour objectifs de caractériser l'influence des paramètres du procédé pouvant sur la composition de l'extrait et d'identifier les corrélations entre la composition de l'extrait et sa capacité à bloquer les mécanismes de réplication du virus.

2. Résultats

2.1. Présentation de la publication

La première partie de cette étude a permis d'obtenir des résultats qui ont été publiés dans le "Journal of Applied Phycology" sous la dénomination "Antiherpetic (HSV-1) activity of carrageenans from the red seaweed *Solieria chordalis* (Rhodophycées, Gigartinales) extracted by Microwave Assisted Extraction". Cette publication, présentée ci-après, relate des résultats obtenus sur l'étude des paramètres appliqués par l'Extraction Assistée aux Microondes (EAM). L'impact du temps de traitement (10, 20 et 25 minutes), la température de traitement (90 et 125 °C) et la concentration en KOH du milieu d'extraction (0, 0,5 et 1%) sur l'extraction des carraghénanes a été étudiée.

La publication présente les rendements d'extraction, la composition biochimique des extraits de carraghénanes et l'étude structurale (FTIR, RMN) qui a permis de confirmer la présence majoritaire du type iota-carraghénane.

La publication présente également les résultats d'activité antiherpétique des extraits de carraghénanes pour différentes MOI.

Antiherpetic (HSV-1) activity of carrageenans from the red seaweed *Solieria chordalis* (Rhodophyta, Gigartinales) extracted by microwave-assisted extraction (MAE)

Romain Boulho¹ · Christel Marty¹ · Yolanda Freile-Pelegrín² · Daniel Robledo² · Nathalie Bourgougnon¹ · Gilles Bedoux¹

Received: 28 November 2016 / Revised and accepted: 1 June 2017
© Springer Science+Business Media B.V. 2017

Abstract Carrageenan yield, physicochemical properties, and antiviral activity of the carrageenan from *Solieria chordalis* (Rhodophyceae, Solieriaceae) harvested at the Brittany coast (France) were investigated. *S. chordalis* carrageenan was extracted by conventional and the microwave-assisted extraction (MAE) methods. The effect of different parameters during MAE extraction such as alkali concentration (0, 0.5 and 1% KOH), extraction time (10, 20, and 25 min) and temperature (90 and 105 °C) were evaluated. Native carrageenan extracted by MAE had the highest yield (29.3%) after 10 min at 90 °C. After alkali treatment, carrageenan yield ranged from 10.7 to 18.4%. No significant differences in the carrageenan yield were observed between MAE and conventional method under alkaline conditions. Chemical analysis and FTIR spectra revealed the presence of a predominant iota-carrageenan. Evaluation of the antiviral activity of *S. chordalis* carrageenan against HSV-1 (*Herpes simplex virus* type 1) showed a EC_{50} of the iota-carrageenans fractions in the range of 3.2 to 54.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MOI 0.01 $ID_{50} \text{ mL}^{-1}$) without cytotoxicity in that range of concentrations.

Keywords *Solieria chordalis* · Rhodophyta · Carrageenan · MAE · Antiherpetic activity · HSV-1 · Extraction

✉ Romain Boulho
romain.boulho@univ-ubs.fr

¹ Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA3884, UBS, IUEM, F-56000 Vannes, France

² Departamento de Recursos del Mar, Cinvestav - Unidad Merida, A.P. 73, Cordemex, 97310 Merida, Yucatan, Mexico

Introduction

Carrageenans are a family of linear sulfated galactans extracted mainly from red seaweed of the order Gigartinales. They are widely used for their gelling, thickening, and stabilizing properties in food, cosmetic, or pharmaceutical industries. Carrageenans are mainly obtained from certain species of Rhodophyta: *Chondrus*, *Eucheuma*, *Gigartina*, and *Hypnea* (Campo et al. 2009; Li et al. 2014). They are composed of alternating 3-linked-D-galactopyranose (G-units) and 4-linked D-galactopyranose (D-units) or 4-linked 3,6-anhydro-D-galactopyranose (DA-units), forming the disaccharide repeating units of carrageenans. They are classified according to the presence of the 3,6-anhydro-bridge on the 4-linked galactose residue and the position and number of sulfate groups. These polysaccharides can also be traditionally identified as kappa (κ -; G4S-DA), iota (ι -; G4S-DA2S), and lambda (λ -; G2S-D2S,6S) (Knutsen et al. 1994). The precursors of κ - and ι - respectively named mu (μ -) and nu (ν -) present sulfate groups in carbon 6, coded as D6S, and under alkaline treatment this group is converted in DA units.

Polysaccharides extracted from Rhodophyta have been shown to exhibit antiviral activity against a wide spectrum of viruses including important human pathogenic agents such as human immunodeficiency virus (HIV), *Herpes simplex virus* (HSV), *Vesicular stomatitis virus* (VSV), and Cytomegalovirus (CMV) (Baba et al. 1988; Harden et al. 2009; Bouhlal et al. 2011; Serive et al. 2012). An example of these antiviral properties against anti-HIV is the gel named “Carraguard”, a carrageenan-based formulation used as vaginal microbicide that blocks HIV and other STD (sexually transmitted diseases) (Béress et al. 1993). Moreover, other red seaweed polysaccharides extracted from the Dumontiaceae are available in capsules as a food supplement prescribed as an antiviral agent after

the first sign of viral breakout. Nowadays, innovative processes to extract the sulfated polysaccharides from marine seaweeds are being investigated. The conventional methods are time consuming and require a high quantity of solvents. One of these technologies, the microwave-assisted extraction (MAE), has proven its efficiency due to several advantages over the conventional methods, such as, time saving, reduced solvent consumption and waste treatment (Vázquez-Delfin et al. 2013). MAE technology is based on the heat transfer that enables a homogeneous heating generated by dipole rotation and ionic conduction. By this means microwave radiation is used to heat samples and extract ingredients into a solvent, thus improving the transfer of compounds (Yuan and Macquarrie 2015).

Of the commercially exploited carrageenophytes, some of the most abundant belong to the Solieriaceae family. The eulittoral red alga *Solieria chordalis* (C. Agardh) J. Agardh (Gigartinales, Solieriaceae) is found in various habitats ranging from oceanic to low-salinity estuarine environments. Bondu et al. (2009) reported that *S. chordalis* adapts its metabolism to particular environmental conditions. The genus *Solieria* contain ι -carrageenan as its main cell wall component (Deslandes et al. 1985; Saito and de Oliveira 1990; Murano et al. 1997).

Solieria chordalis has been observed in the Gulf of Morbihan (France) since 2005 and in the Sarzeau peninsula (Morbihan, France) where strandings have become extremely abundant between July and October. During the summer over 15,000 t per year of red algae, mainly composed of *S. chordalis*, are removed. Given the renewal and current interest in biopolymers and new product from renewable sources, this underexploited biomass represents a potential source to be evaluated. Thus, the aim of the present study was to evaluate the antiviral activity against *Herpes simplex* virus of the native and alkali treated carrageenans from *S. chordalis* obtained by MAE at different extractions conditions. For comparison, native and alkali-treated carrageenans were extracted by the conventional method. All carrageenans obtained were characterized for their biochemical and structural composition.

Materials and methods

Solieria chordalis was collected at Saint Gildas de Rhuy beach (47° 29' 33.3" N 2° 49' 51.0" W) on the Morbihan coast, France during July 2015. After collection, seaweed was washed with tap water, to remove sediment, epiphytes, and drained. Fresh seaweed was ground to 3 mm, frozen at -20 °C and stored at -80 °C for 1 h before freeze-dried. The homogenized material was used for carrageenan extraction.

Carrageenan extraction

Native and alkali-treated carrageenan from *S. chordalis* were extracted using the conventional method (coded as C) according to Freile-Pelegrín and Robledo (2008). Briefly, dry seaweed (5 g) were rehydrated at room temperature for 12 h in 500 mL of distilled water (coded C0) or KOH solution (1% w/v, coded C1), followed by hot extraction at 85 °C for 3 h. After incubation, the samples were mixed with diatomaceous earth (4 g, Celite) and pressure filtered. The filtrate was neutralized at pH 8.5–8.6 with a solution of HCl (10 N). The filtrate was completed by slow addition of 250 mL of 2% Cetavlon solution (hexadecyltrimethylammonium bromide) in distilled water/acetone (9:1 v/v) and recovered over paper filter in vacuo. After filtration, the fibrous carrageenan was washed three times with 95% ethanol saturated with sodium acetate to remove Cetavlon residues. Sodium acetate was eliminated with 95% ethanol by washing three times. The carrageenan was removed in a Petri plate and dried for 24 h at 60 °C then weighed to determine the extraction yield. For native carrageenan extraction we used the same protocol except for the KOH treatment.

MAE was performed using a microwave-accelerated reaction apparatus (MARS 800 W, CEM, Matthews, NC, USA) under different temperature (90 and 105 °C) and time (10, 20, and 25 min) extraction conditions (coded by MAE1: 90 °C/10 min; MAE2: 90 °C/20 min; MAE3: 90 °C/25 min; MAE4: 105 °C/10 min; MAE5: 105 °C/20 min; and MAE6: 105 °C/25 min). The raw material used for each extraction was 1 g in triplicate ($n = 3$). Before extraction, the dry material was rehydrated over 12 h in distilled water (50 mL) at different KOH concentration (0, 0.5, or 1%) (i.e., coded as MAE2/0.5: 90 °C / 20 min/0.5% KOH) to indicate native or alkaline conditions. The samples were placed in a closed-vessel system (OMNI/XP-1500) sealed to withstand an increase of pressure and to prevent product or/and solvent losses. The use of closed container allowed the extraction at elevated temperatures and enabled to increase the mass transfer of target compounds from the matter. The internal temperature and pressure conditions were monitored within one reference OMNI/XP-1500 vessel equipped with temperature and pressure probes to control extraction conditions. The vessels are designed to vent excess pressure. During the experiment, the maximal pressure was approximately 159 kPa. After each MAE treatment, the extract was recovered and the precipitation of carrageenan was carried out following the same protocol used for "conventional extraction". All the extractions were performed in triplicate.

Chemical analysis

Conventional and microwave-extracted carrageenans were analyzed for 3,6 anhydrogalactose (DA), protein, and total

sugar content according to Matsuhiro and Zanlungo (1983), Smith et al. (1985), and Dubois et al. (1956), respectively. Two different methods were used to determine the sulfate content. That described by Jaques et al. (1968) which reacts specifically with sulfate groups linked to the polysaccharide backbone. This reaction is based on the formation of a complex between sulfate groups and the 3-amino-7-(dimethylamino) phenothiazin-5-ium (Azure A, Sigma-Aldrich A6270) to give a purple color. A sulfated dextran (17%) was used as standard ($0\text{--}100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$). Two hundred microliter of standard or samples were added to 2 mL of Azure A reagent (10 mg L^{-1}) for the reaction and the optical density (OD) was measured at 535 nm. The second method used the technique described by Jackson and McCandless (1978) that measures the total sulfate content. The sulfate content was measured turbidimetrically after hydrolyzing 25 mg of carrageenan in sealed tubes for 12 h in 1 N HCl at $105\text{ }^{\circ}\text{C}$. This method relies in the formation of barium sulfate after the addition of 0.5 g BaCl_2 per 100 mL of sample. To 1.1 mL of the hydrolyzed sample, 1.2 mL of 8% trichloroacetic acid (TCA) was then added, mixed, and after 35 min, absorbance was determined at 500 nm.

Fourier transform infrared spectra

Fourier transformed infrared spectra (FTIR) analysis was recorded with FTIR-NIR spectrometer (Perkin Elmer, Frontier). Carrageenan films were obtained by evaporation of an aqueous solution of carrageenan extracts (0.2% w/v) and measured together with standards of ι - and κ -carrageenans (Sigma commercial grade) for comparison.

^{13}C -NMR spectra analysis

The spectra were recorded on a Varian/Agilent Premium Compact 600 NMR spectrometer. The extracts were exchanged twice with 99.8% deuterium oxide (D_2O) with intermediate lyophilization and dissolved in D_2O (30 mg/mL). Sodium [3-trimethylsilyl] 2,2',3,3'-2-H₄] propionate (TSP-d₄) was used as an internal reference for the baseline (0.00 ppm). All NMR spectra were recorded at $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ and interpreted according to Van de Velde and Rollema (2008).

Cells and virus

Vero cell lines (line no. ATCC CCL81) were cultivated in Eagle's MEM supplemented with 8% fetal calf serum (FCS, Eurobio, France), 1% L-glutamine (200 mM), and 1% PCS (penicillin (10,000 U), colimycin (25,000 U), and streptomycin (10 mg). The culture was maintained at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ under a 5% CO_2 atmosphere, and the medium was renewed daily. *Herpes simplex* virus type 1 (HSV-1; family Herpesviridae) was provided by Prof. Agut (Laboratoire de Dynamique,

épidémiologie et traitement des infections virales de la Pitié Salpêtrière Paris, France). The virus collection was obtained by infection of Vero cells monolayers (75 cm^2 culture flasks, $350,000\text{ cells mL}^{-1}$) incubated at 95/5 air/ CO_2 , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ during 3 days. After incubation, the suspension was frozen and thawed two times before centrifugation at low velocity ($10,000\times g$, 10 min) to collect supernatant. The liquid phase containing the virus suspension was stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ before use. Virus titration was performed following the Reed and Muench dilution method. The median infectious dose (ID_{50}) dose which resulted in 50% positive reactions, expressed as ID_{50} per milliliter was estimated at $2.10^{6.71}\text{ ID}_{50}\text{ mL}^{-1}$.

In vitro antiviral and cytotoxicity evaluation by cell viability

The carrageenan extracts were prepared in Eagle's minimum essential medium (MEM) supplemented with 8% fetal calf serum (FCS). Samples ($50\text{ }\mu\text{L}$) were distributed into the 96 wells microplate (microtest III tissue culture plate, Nuclon Intermed, France). A dilution series included five concentrations repeated in four lines (quadruplicate) ranging from 1 to $200\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ extract concentrations. A $100\text{ }\mu\text{L}$ of cell suspension diluted to a concentration at $3.5 \times 10^5\text{ Vero cells mL}^{-1}$ in Eagle's MEM (8% FCS) was added to the wells. The cell suspension was infected by addition of two different viral suspensions at a multiplicity of infection (MOI) of 0.001 $\text{ID}_{50}/\text{cells}$. The microplates were incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% of CO_2 during 3 days. In a second step, the MOI of 0.01 $\text{ID}_{50}/\text{cells}$ was used, and a 48 and 72 h kinetic screening was carried out. The cells were examined daily under a phase-contrast microscope to determine the minimum concentration of extracts that induced alterations in cell morphology, including swelling, shrinkage, granularity, and detachment. Cytotoxicity by cell viability was tested using the neutral red dye method (McLaren et al. 1983). Optical density (OD) was measured at 540 nm using a spectrophotometer (SpectraCountTM, Packard). The 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) was defined as the concentration that reduced the OD of treated cells to 50% of that of untreated cells. CC_{50} values were expressed as the percentage of destruction (%D): $[(\text{ODc})_{\text{C}} - (\text{ODc})_{\text{MOCK}} / (\text{ODc})_{\text{C}}] \times 100$. $(\text{ODc})_{\text{C}}$ and $(\text{ODc})_{\text{MOCK}}$ were the OD values of the untreated cells and treated cells, respectively (Langlois et al. 1986). After incubation, antiviral activity was evaluated by the neutral red dye method. The antiherpetic compound acyclovir [9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine] 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 from virus-induced destruction. The OD was related directly to the percentage of viable cells, which was inversely related to the cytopathic effect (CPE). The linear regression was determined for each assay based

on cell controls (0% CPE) and virus controls (100% CPE). Data were expressed as a percentage of protection (%P): $[(\text{ODt}_{\text{virus}} - (\text{ODc}_{\text{virus}})/((\text{ODc}_{\text{MOCK}} - (\text{ODc}_{\text{virus}})) \times 100. (\text{ODt}_{\text{virus}})$ was the OD of the test sample, $(\text{ODc}_{\text{virus}})$ was the OD of the virus control, and $(\text{ODc}_{\text{MOCK}})$ was the OD of the mock-infected control (Langlois et al. 1986).

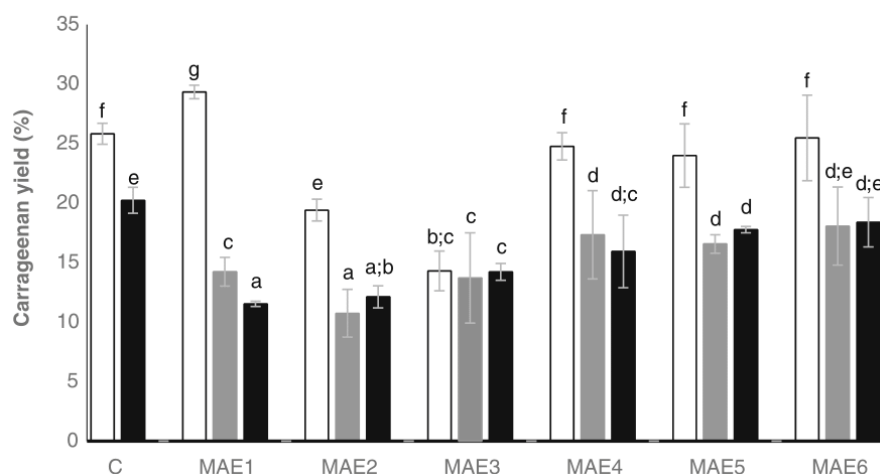
Statistical analysis

One-way analysis of variance (ANOVA), Kruskal-Wallis test and Bonferroni adjustment were used to find differences in carrageenan yield, DA content and sulfate content between aqueous and alkali treatment of conventional and MAE extracted carrageenan (XLSTAT 2015). Significant differences between the different extracts was indicated by superscript letters at a significance level of $\alpha = 0.001$ for 3,6 anhydrogalactose and total sulfate contents, and $\alpha = 0.05$ for carrageenan yields. The comparison includes the analysis of 20 extraction conditions (20^{20} combinations) with $n = 3$ replicates for the carrageenan yields and $n = 9$ replicates for the biochemical composition analyzes.

Results

Carrageenan extraction yields obtained by conventional and MAE, varied in relation to temperature, time, and alkali concentration (Fig. 1). In general, native extractions for both conventional and MAE showed higher carrageenan yields than those extracted under alkaline conditions. The highest yield (29.3%) was observed for MAE1 (90 °C, 10 min). No significant differences in yield were found between the native under conventional method (25.8%) and those obtained at the highest temperature tested (MAE4-MAE5-MAE6). Likewise, yields obtained under alkaline treatment with MAE6 at 105 °C and 25 min using 0.5 and 1% KOH were similar to that obtained by the conventional method (20.2%).

Fig. 1 Carrageenan yield from *S. chordalis* obtained by conventional method (C) and under different conditions of MAE (MAE1: 90 °C, 10 min; MAE2: 90 °C, 20 min; MAE3: 90 °C, 25 min; MAE4: 105 °C, 10 min; MAE5: 105 °C, 20 min; and MAE6: 105 °C, 25 min) at different KOH concentrations: 0% (white bars), 0.5% (gray bars), and 1% (black bars). Statistical yield significant differences were indicated by different letters from a to g ($p < 0.05$) and sample size $n = 3$



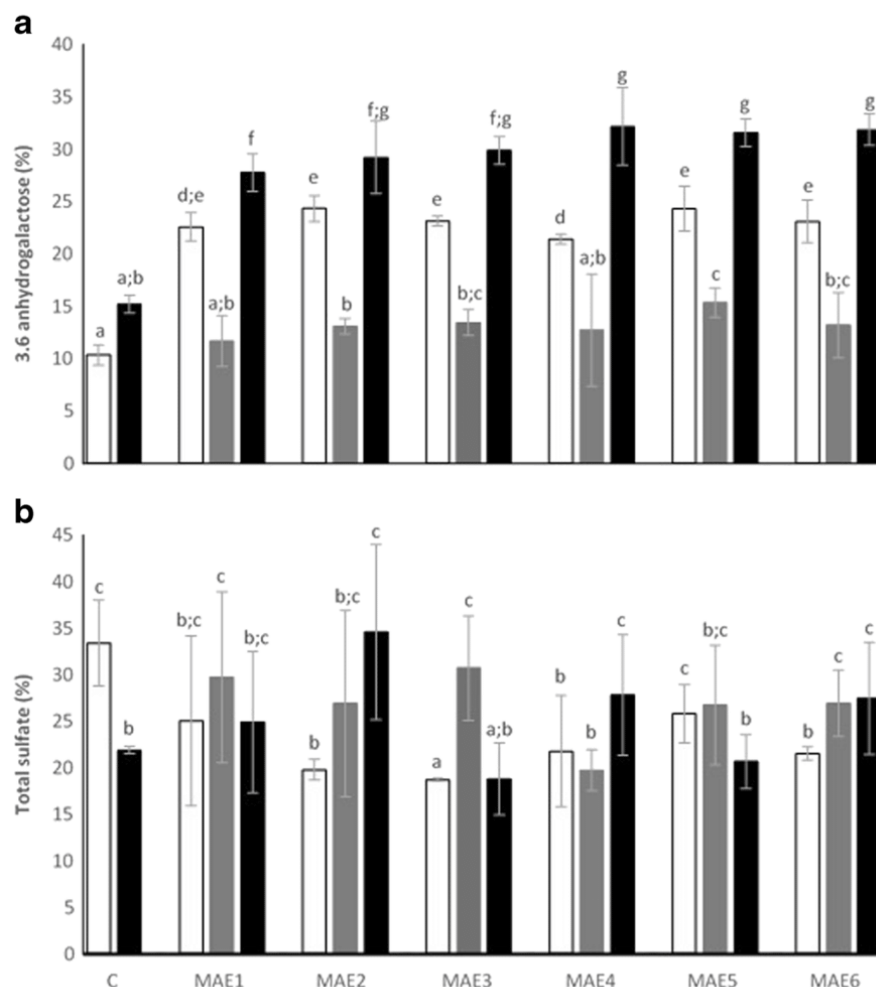
Chemical analysis

Content of 3,6 anhydrogalactose (DA) and total sulfate in carrageenan extracted by the conventional and MAE methods under different conditions are shown in Fig. 2. For the conventional method, the DA content (Fig. 2a) increased by 50% after alkaline treatment at 1% KOH, whereas under MAE (MAE1-MAE6) the DA exhibited an increase (between 20 to 50% for MAE2 and MAE4, respectively) under native and alkaline conditions. However, it is noteworthy that under MAE conditions at 1% KOH DA content was notably higher (27.8–32.2%) than that obtained by the conventional method (15.2%). This pattern was not observed at 0.5% KOH where a marked decrease in DA was evidenced regardless of the temperature and time used.

A decrease from 33.4 to 21.9% in total sulfate content was observed after alkaline treatment when carrageenan was extracted under conventional method (Fig. 2b). Unlikely, under MAE no desulfation was observed after alkali treatment regardless of the temperature and time used, although in some of the treatments (MAE2, MAE4 and MAE6) a slight increase was noted, without significant differences found ($p > 0.05$).

Biochemical composition of carrageenans extracted by the conventional and MAE method at different conditions of temperature, time, and alkali treatment are shown in Table 1. Average total sugar content was 14% without significant differences between the different extraction methods and conditions. In general, the content of sulfate linked to the polysaccharide backbone was around 5% of the total mass of carrageenan, similar in all methods and conditions tested. Only four specific extraction conditions (C1, MAE2 at 1%, MAE5 at 0.5%, and MAE6 at 1%) had a reduced linked sulfate content within the range of 0.3–0.4%. Interestingly, this coincided with an increased protein content, of around 20%; whereas in general, the protein content was approximately 3%.

Fig. 2 Total sulfate content (a) and 3,6 anhydrogalactose content (b) of carrageenan from *S. chordalis* extracted by conventional method (C) and under different conditions of MAE (MAE1: 90 °C, 10 min; MAE2: 90 °C, 20 min; MAE3: 90 °C, 25 min; MAE4: 105 °C, 10 min; MAE5: 105 °C, 20 min; and MAE6: 105 °C, 25 min) at different KOH concentrations: 0% (white bars), 0.5% (gray bars), and 1% (black bars). Statistical 3,6 anhydrogalactose and total sulfate composition significant differences were expressed by different letters from a to g and from a to c, respectively, for a ($p < 0.05$) and a sample size $n = 9$



FTIR spectra of *S. chordalis* carrageenan extracted by conventional and MAE method are presented in Fig. 3. All samples showed a band at 804 cm^{-1} , characteristic for DA2S present in ι -carrageenan; another at 846 cm^{-1} of G4S, characteristic of κ - and ι -carrageenan (Chopin et al. 1999). Bands at 825 and 867 cm^{-1} specific of the precursor μ - and ν - were not observed. Typical absorption bands of ester sulfate at 1210 – 1260 cm^{-1} and one band at 930 cm^{-1} specific to 3,6 anhydrogalactose were also present (Pereira et al. 2003).

^{13}C NMR spectra of the native and alkali-treated carrageenan extracted by the conventional method are shown in Fig. 4 (A, B). Carbohydrates signals were noted at δ 63.8 and 104.5 ppm. *S. chordalis* carrageenan showed typical chemical shifts of ι -carrageenan at 94.4, 77.2, 80.7, 80.3, 79.2, and 72.2 ppm corresponding to DA2S; signals at 104.5, 71.6, 79.2, 74.5, 77.4, and 63.7 ppm corresponding to G4S (Van De Velde et al. 2004; Van De Velde and Rollema 2008). ^{13}C NMR spectra of carrageenan obtained with MAE showed similar signals to those observed for the carrageenan extracted under conventional method regardless of the treatment (MAE3 at 0.5% and MAE6 at 0 and 1%). Signals of the μ - or ν - precursors were not detected (Fig. 5).

In vitro antiviral and cytotoxicity evaluation by cell viability

No cytotoxic effects of *S. chordalis* carrageenan were observed on Vero cells line ($\text{CC}_{50} > 200.0\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) (Table 2). After 3 days of treatment, no microscopically visible alteration of normal cell morphology was observed and viability assay showed no destruction of the cell layer.

The antiviral activity screening of the carrageenans extracted by conventional and MAE performed at $\text{MOI } 0.001\text{ ID}_{50}/\text{cells}$, for 72 h, allowed us to select the most active extract in order to evaluate antiviral kinetics. The kinetic antiviral activities of the carrageenan obtained by conventional method, by MAE (MAE3, MAE5 and MAE6 under different alkaline conditions), and for the reference inhibitor acyclovir are shown in Table 2. At $\text{MOI } 0.001\text{ ID}_{50}/\text{cells}$, The EC_{50} for acyclovir had similar activities between 48 and 72 h at $\text{MOI } 0.001\text{ ID}_{50}/\text{cells}$ (0.15 and $0.79\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively) but not at $\text{MOI } 0.01\text{ ID}_{50}/\text{cells}$ (0.50 and $3.30\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$). Acyclovir at $1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ conferred total cell protection (100%) against HSV-1.

Soliera chordalis carrageenan extracted by the conventional method after alkali treatment showed the highest antiviral

Table 1 Biochemical composition of *Solieria chordalis* carrageenan obtained by conventional method (C) and under MAE at different conditions of temperature and time (MAE1: 90 °C, 10 min; MAE2: 90 °C, 20 min; MAE3: 90 °C, 25 min; MAE4: 105 °C, 10 min; MAE5: 105 °C, 20 min; and MAE6: 105 °C, 25 min) at different KOH concentrations (0, 0.5, and 1%)

Treatment	KOH (%)	TotalSugars (%)	Linked sulfate (%)	Total protein (%)
C	0	15.4*	5.00***	3.00***
(85 °C/3 h)	1	15.4*	0.30***	21.1**
MAE1	0	14.8*	4.8***	2.6***
(90 °C/10 min)	0.5	13.3**	4.9***	2.4***
MAE2	1	13.4**	4.6***	4.6**
(90 °C/20 min)	0	13.3*	4.7***	2.7***
MAE3	0.5	13.4*	4.9***	2.5***
(90 °C/25 min)	1	13.3**	0.4***	19.6**
MAE4	0	13.4*	4.8***	3.4***
(105 °C/10 min)	0.5	13.5**	5.1***	2.1***
MAE5	1	13.3**	4.7***	3.5***
(105 °C/20 min)	0	13.0*	5.1***	2.9***
MAE6	0.5	13.4**	4.9***	3.4***
(105 °C/25 min)	1	13.4***	4.6***	4.8***
MAE1	0	12.7*	5.0***	2.7***
(105 °C/20 min)	0.5	13.6**	0.3***	20.2**
MAE2	1	13.8**	4.5***	2.4***
MAE3	0	13.6**	4.9***	2.7***
(105 °C/25 min)	0.5	13.5**	4.7***	2.3***
MAE4	1	13.6**	0.3***	19.3**

Average $\pm$ standard deviation ($n = 9$) indicated

*Standard deviations <0.005 , **standard deviations <0.001 , ***standard deviations <0.0001

activity ($0.08 \mu\text{g mL}^{-1}$ at 48 h at MOI of 0.001 ID₅₀/cells) comparable to that of acyclovir under the same conditions. All carrageenans extracted by MAE, at the conditions specified in Table 2, showed an effective antiviral activity, with EC₅₀

between 0.33 and 18.9 at a MOI of 0.001 ID₅₀/cells, and between 0.5 and $8.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ at MOI 0.01 ID₅₀/cells. However, carrageenan obtained by MAE6 (105 °C, 25 min, 0.5% KOH) had the highest antiviral activity ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) at

Fig. 3 FTIR spectra of carrageenan from *S. chordalis* extracted by conventional method (C/0: native; C/1: alkali treated) and under different conditions of MAE (MAE2/0.5: 90 °C, 20 min, 0.5% KOH; MAE3/0.5: 90 °C, 25 min, 0.5% KOH; MAE5/0.5: 105 °C, 20 min, 0.5% KOH; and MAE6/0.5: 105 °C, 25 min, 0.5% KOH). Spectra of κ - and ι -commercial carrageenan are included

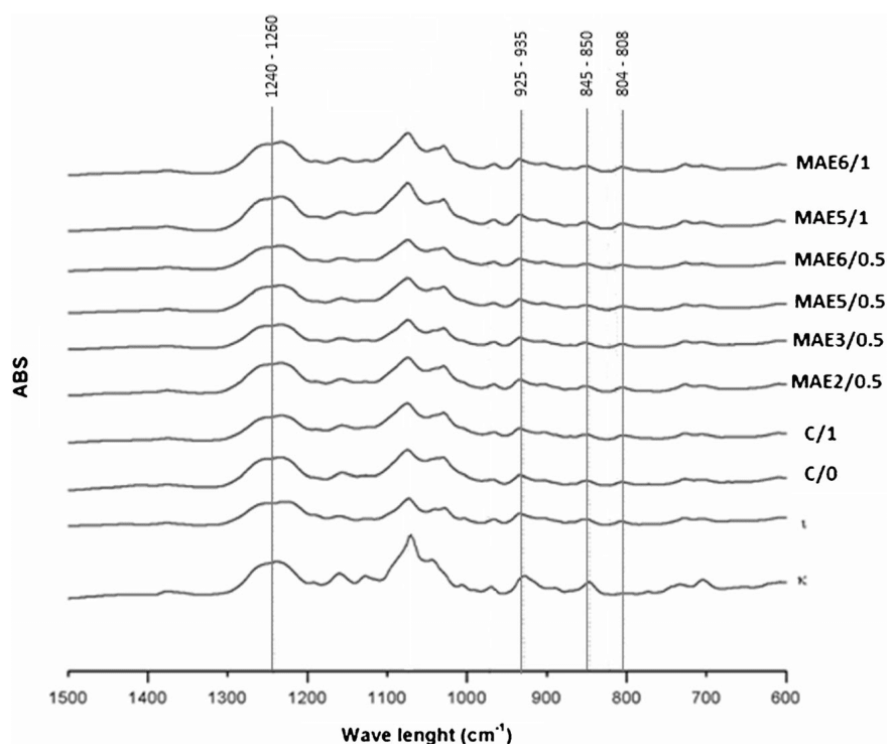
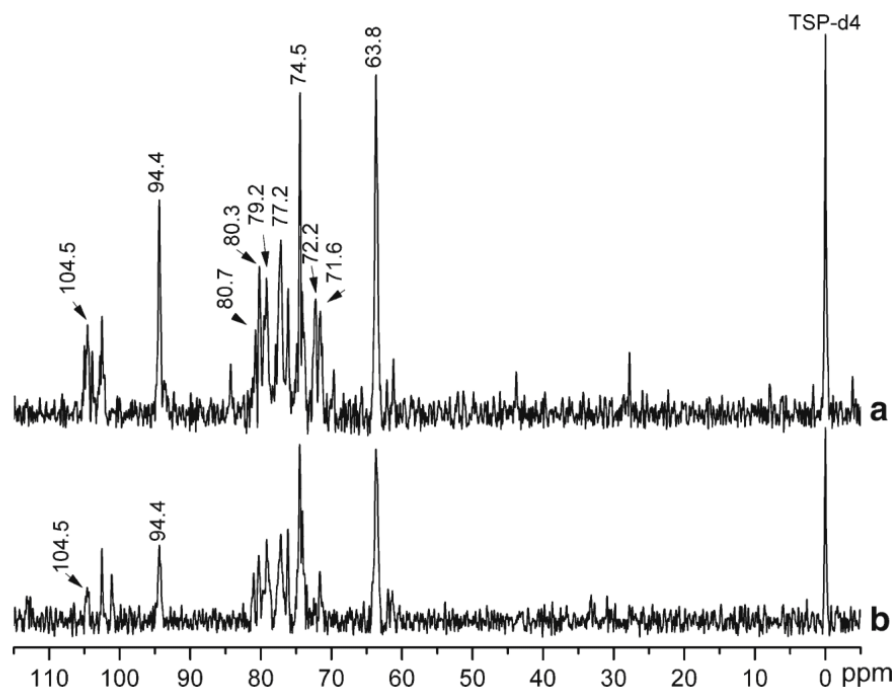


Fig. 4 ^{13}C -NMR of carrageenan from *S. chordalis* extracted by conventional method technique: A alkali treated; B native carrageenan



48 h at MOI of 0.01 ID₅₀/cells, similar to the acyclovir under the same conditions.

Discussion

Sulfated polysaccharides have shown potent inhibitory effects in vitro against several enveloped human and animal viruses (Ghosh et al. 2009). Some of these macromolecules are currently under clinical evaluation to

develop novel antiviral drugs (Kleymann 2005; McReynolds and Gervay-Hague 2007).

Soliera chordalis, from the Morbihan coast in France, holds considerable potential for biotechnological development, since their polymers have been shown to possess immunological, hemagglutinin, and antiviral activities with practical application in biomedicine (Bondu et al. 2010). Past reports on the properties of *S. chordalis* polysaccharides used traditional extraction methods; however, several new methods have been developed for an efficient extraction, including MAE. To our

Fig. 5 ^{13}C -NMR of carrageenan from *S. chordalis* extracted under different conditions of MAE: A MAE6 1% KOH; B MAE3 0.5% KOH; and C MAE6 0% KOH

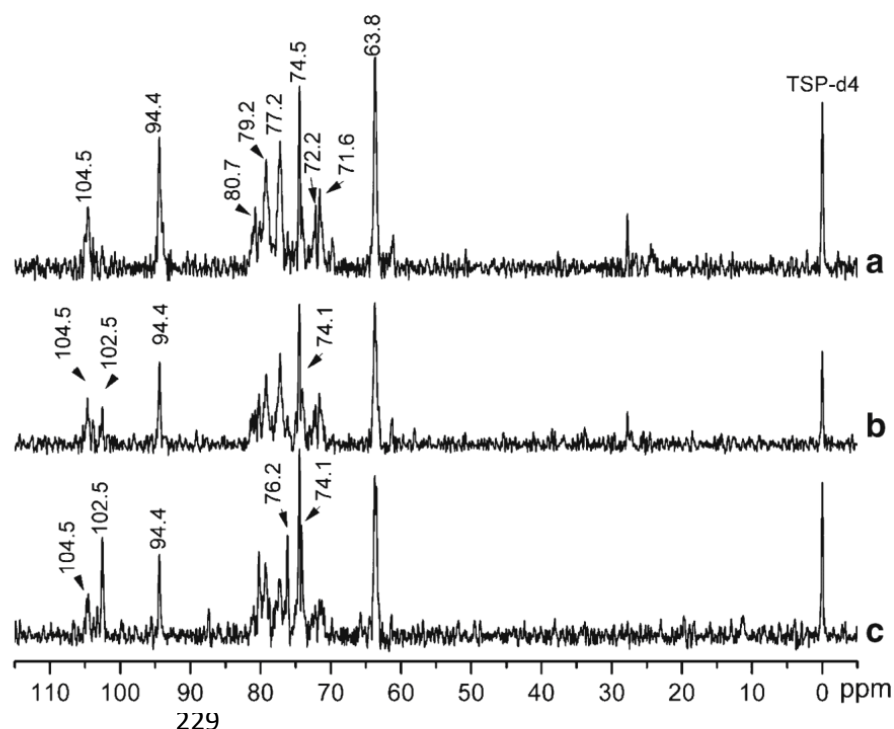


Table 2 CC₅₀ values (half cytotoxicity concentration) and anti-HSV1 EC₅₀ (half maximal effective concentration) of *Solieria chordalis* carrageenan obtained by conventional method (C) and MAE methods (MAE3: 90 °C, 25 min; MAE5: 105 °C, 20 min; and MAE6: 105 °C, 25 min) at different KOH concentrations (0, 0.5 and 1%). Acyclovir (Z) was used as reference at multiplicity of infection (MOI) 0.001 and 0.01 ID₅₀/cells

Treatment	% KOH	CC ₅₀ (μg mL ⁻¹)	EC ₅₀ (μg mL ⁻¹)			
			MOI 0,001 ID ₅₀ /cell		MOI 0.01 ID ₅₀ /cell	
			48 h	72 h	48 h	72 h
Z		>5	0.2 ± 0.002	0.8 ± 0.014	0.5 ± 0.008	3.3 ± 0.099
C	0		6.6 ± 0.54	26.1 ± 3.6	16.5 ± 1.8	54.4 ± 11.4
	1		0.1 ± 0.007	1.8 ± 0.59	2.9 ± 0.32	14.9 ± 0.21
MAE3	0.5	>200	0.3 ± 0.12	2.3 ± 0.34	6.6 ± 1.1	12.4 ± 1.7
MAE5	0.5		7.5 ± 1.2	4.7 ± 0.99	3.7 ± 0.41	8.8 ± 0.84
	1		1.0 ± 0.089	4.0 ± 0.091	7.3 ± 0.53	4.9 ± 0.26
MAE6	0.5		19.0 ± 1.3	4.1 ± 0.79	0.5 ± 0.13	3.2 ± 0.21
	1		5.1 ± 0.40	4.1 ± 0.19	1.7 ± 0.19	8.6 ± 0.88

Results as IC₅₀ (inhibitory concentration 50%) concentration of drug that is required for 50% inhibition in vitro. IC₅₀ ± standard error (*n* = 4)

knowledge, no studies on antiviral activity of *S. chordalis* carrageenan extracted using MAE have been carried out.

Our results showed higher carrageenan yields than those reported previously for *S. chordalis* (Bondu et al. 2010; Hardouin et al. 2014). The decrease in carrageenan yields observed after alkali treatment under conventional and MAE has been reported before for other carrageenophytes (Vázquez-Delfin et al. 2013). Although, no significant differences were found between native yields obtained by the conventional method and by MAE at the highest temperature, yields obtained after alkaline treatment with MAE (105 °C and 20 and 25 min) were similar to the conventional method at 85 °C over 3 h. It is noteworthy that the elevated temperatures reached by microwave heating favored the carrageenan extraction using less time. Soria et al. (2015) described the convection heating by microwave-assisted extraction which promotes the internal matter heating causing cell wall disruption; however, an excessive increase of temperature and/or time could result in a yield decrease by degradation of the polymers under extraction (Zhou et al. 2006a, b; Vázquez-Delfin et al. 2013).

The total sulfate contents obtained under the experimental conditions tested (23–34.8%), were close to the range reported for kappa or iota family (25–33%) which includes ι- and κ-producing species (Campo et al. 2009). DA content of carrageenan treated with 1% KOH at all MAE conditions ranged between 27 to 32%, similar to that for commercial ι-carrageenan (28–35%, Usov 2011). No evident desulfation was observed using MAE after alkali treatments, probably due to the alkali-stable sulfate hemi-ester group at DA2S and G4S, corresponding to ι-carrageenan, and to the lack of κ- and ι-precursors, which was confirmed by FTIR and ¹³C NMR spectra. FTIR and NMR spectra confirmed the ι-carrageenan type of this species. However, the increase in sulfate content observed after alkali treatment at some of the MAE parameters tested could be attributed to depolymerization of the

polysaccharide, probably related to extraction time, as previously observed by Navarro et al. (2007) and Vázquez-Delfin et al. (2013). Moreover, the significant increase of DA after alkali treatment especially with MAE conditions at 1% KOH, may also suggest the existence of undetectable levels of the precursor γ-carrageenan.

Nevertheless, FTIR and NMR spectra of the native and alkali carrageenans extracted under MAE were virtually identical with those extracted by the conventional method used as reference, indicating no differences in the structure associated with the extraction heating method. Zhou et al. (2004) also reported no change in the chemical components and structure of lambda carrageenan from *Chondrus ocellatus* extracted under different MAE conditions.

Sulfated polysaccharides extracted from various species of Gigartinales have shown antiviral activity against human and animal virus strains such as dengue virus (DENV-2) (Rodríguez et al. 2005; de SF-Tischer et al. 2006); human cytomegalovirus (HCMV) (Rodríguez et al. 2005); human immunodeficiency virus (HIV) (Bouhlal et al. 2011); tobacco mosaic virus (TMV) (Ghannam et al. 2013); bovine herpes virus (BoHV-1), Suid Herpes virus (SuHV-1) (Diogo et al. 2015). In the present study, native ι-carrageenan from *S. chordalis* obtained by the conventional method had lower antiviral activity when compared with native MAE extract. On the contrary, after alkali treatment, carrageenan from MAE showed an increased antiviral activity at MOI 0.001 and 0.01 ID₅₀/cells, comparable to that obtained by conventional method. The maximum inhibition of viral activity (0.5 μg mL⁻¹ with MOI of 0.01 ID₅₀/cells, equal to acyclovir) was observed for carrageenan obtained under MAE6 (105 °C, 25 min, 0.5% KOH). These observations suggest that native and alkali-treated extraction conditions may influence the antiviral activity of the carrageenan extracted. Earlier reports have shown antiviral activity of sulfated polysaccharides from *Schizymenia dubyi*, *Callophyllis variegata*, *Sphaerococcus coronopifolius*, and *Boergeseniella thuyoides*

against two herpes virus strains with EC_{50} ranging from 0.16 to $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ against HSV-1 (*Herpes simplex virus* type 1) and from 0.21 to $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ against HSV-2 (*Herpes simplex virus* type 2) (Bourgougnon et al. 1993; Rodríguez et al. 2005; Bouhlal et al. 2011). It has been also shown that the antiviral activity of carrageenan isolated from *Gigartina skottsbergii*, *Meristiella gelidium*, *Gigartina atropurpurea*, and *Plocamium cartilagineum* depends on the HSV-virus strain as indicated by the EC_{50} ranges, from 0.3 to 67.6 against HSV-1 and from 0.04 to $60.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ against HSV-2 (Carlucci et al. 1997; de SF-Tischer et al. 2006; Harden et al. 2009). More recently, *S. chordalis* antiviral activity against HSV-1 has been demonstrated using enzymatic hydrolysates, with EC_{50} ranging from 29.3 to $170.1 \mu\text{g mL}^{-1}$, depending of the enzymatic treatment (Hardouin et al. 2014; Burlot et al. 2016).

In this study, the maximum anti HSV-1 activity ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) was displayed by a carrageenan with high sulfate content and low proportion of DA obtained under MAE6 (105 °C, 25 min, 0.5% KOH). Previous studies have shown that the antiviral activity of some seaweed extracts is correlated with sulfate content because its ability to interfere with the initial attachment of the virus to the target cell, thus blocking virus entry (de SF-Tischer et al. 2006; Prajapati et al. 2014; Levendosky et al. 2015; Gomaa and Elshoubaky 2016). However, from our results, no evident correlation was found between sulfate content and the antiviral activity of *S. chordalis* carrageenans extracted under different MAE conditions. Recent evidence indicates that besides sulfate concentration, molecular weight (MW) of seaweed polysaccharides it is also an important factor that influence its biological behavior (Ghosh et al. 2009; Bondu et al. 2010). Nevertheless, existing research on the effect of various factors on the bioactivity of sulfated polysaccharides are scarce, therefore studies combining these factors together must be explored.

The high antiviral activity of *S. chordalis* carrageenan obtained at elevated temperatures with long treatment time (25 min), suggest that under these MAE conditions the polysaccharide could be degraded, yielding LMW carrageenan. Previous reports have shown that low MW polysaccharides are more effective than high MW polysaccharides at enhancing their biological activities (Franz and Alban 1995; Sun et al. 2009). In this regard, antiviral activity of low MW ($<10^4$ kDa) κ -carrageenan demonstrated efficiency against HIV (Yamada et al. 1997). More recently, an increase in the anti-influenza virus activity was observed for low MW κ -carrageenan extracted under microwave-aided acid hydrolysis (Tang et al. 2013). Zhou et al. (2004) also reported the degradation of λ -carrageenan from *Chondrus ocellatus* by using microwave (6 min, 15 atm) obtaining a low MW fraction (from 652 to 9.3 kDa), without changes in the structure of the polysaccharide. The use of microwave radiation to depolymerize polysaccharides has been presented as an effective method to

increase their antitumor and immunomodulation activities (Zhou et al. 2004, 2006b; Sun et al. 2009).

In conclusion, *S. chordalis* ι -carrageenan displaying a strong HSV-1 activity, comparable to that of the reference drug acyclovir, can be obtained using microwave-assisted extraction. Alkaline treatment (0.5% KOH) under MAE at 105 °C for 25 min was the most active carrageenan against HSV-1 strain. This antiviral activity was higher than that shown by the carrageenan extracted by the conventional method. No changes in the chemical structure due to microwave radiation were evident by the FTIR and ^{13}C NMR spectra when compared to carrageenan extracted under conventional method. The main advantage of the MAE is extraction time reduction and improvement of the antiviral activity. Despite the antiviral activity against HSV-1 of *S. chordalis* ι -carrageenan, its mode of action is not clear at present. Further studies are needed to clarify the relationship between chemical structure, properties, and anti-HSV-1 activity.

Acknowledgements The authors thank C. Chavez Quintal and E. Caamal Fuentes for their skillful technical assistance during extraction, FTIR and ^{13}C NMR analysis. Financial support from ECOS-Nord CONACYT for the collaboration project M14A03 is also acknowledged.

References

- Baba M, Snoeck R, Pauwels R, de Clercq E (1988) Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* 32:1742–1745
- Béress A, Wassermann O, Bruhn T, Béress L, Kraiselburd EN, Gonzaless LV, de Motta GE, Chavez PJ (1993) A new procedure for the isolation of anti-HIV compounds (polysaccharides and polyphenols) from the marine alga *Fucus vesiculosus*. *J Nat Prod* 56:478–488
- Bondu S, Cerantola S, Kervarec N, Deslandes E (2009) Phytochemistry impact of the salt stress on the photosynthetic carbon flux and ^{13}C -label distribution within floridoside and digeneaside in *Solieria chordalis*. *Phytochemistry* 70:173–184
- Bondu S, Deslandes E, Fabre M-S, Berthou C, Guangli Y (2010) Carrageenan from *Solieria chordalis* (Gigartinales): structural analysis and immunological activities of the low molecular weight fractions. *Carbohydr Polym* 81:448–460
- Bouhlal R, Haslin C, Chermann JC, Collic-Jouault S, Singuin C, Simon G, Cerantola S, Riadi H, Bourgougnon N (2011) Antiviral activities of sulfated polysaccharides isolated from *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophyta, Gigartinales) and *Boergeseniella thuyoides* (Rhodophyta, Ceramiales). *Mar Drugs* 9:1187–1209
- Bourgougnon N, Lahaye M, Chermann JC, Kornprobst JM (1993) Composition and antiviral activities of a sulfated polysaccharide from *Schizymenia dubyi* (Rhodophyta, Gigartinales). *Bioorganic Med Chem Lett* 3:1141–1146
- 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* 5:1000148
- Campo VL, Kawano DF, da Silva DB, Carvalho I (2009) Carrageenans: biological properties, chemical modifications and structural analysis—a review. *Carbohydr Polym* 77:167–180

- Carlucci MJ, Pujol CA, Ciancia M, Noseda MD, Matulewicz MC, Damonte EB, Cerezo AS (1997) Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. *Int J Biol Macromol* 20:97–105
- Chopin T, Kerin BF, Mazerolle R (1999) Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae: a review and current developments using Fourier transform infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Phycol Res* 47:167–188
- de SF-Tischer PC, Talarico LB, Noseda MD, SMPB G, Damonte EB, MER D (2006) Chemical structure and antiviral activity of carrageenans from *Meristiella gelidium* against herpes simplex and dengue virus. *Carbohydr Polym* 63:459–465
- Deslandes E, Floc JY, Bodeau-Bellion C, Brault D, Braud JP (1985) Evidence for ι -carrageenans in *Solieria chordalis* (Solieriaceae) and *Calliblepharis jubata*, *Calliblepharis ciliata*, *Cystoclonium purpureum* (Rhodophyllidaceae). *Bot Mar* 28:317–318
- Diogo JV, Novo SG, González MJ, Ciancia M, Bratanich AC (2015) Antiviral activity of lambda-carrageenan prepared from red seaweed (*Gigartina skottsbergii*) against BoHV-1 and SuHV-1. *Res Vet Sci* 98:142–144
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PT, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350–356
- Franz G, Alban S (1995) Structure-activity relationship of antithrombotic polysaccharide derivatives. *Int J Biol Macromol* 17:311–314
- Freile-Pelegrín Y, Robledo D (2008) Carrageenan of *Eucheuma isiforme* (Solieriaceae, Rhodophyta) from Nicaragua. *J Appl Phycol* 20:537–541
- 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*). *Physiol Mol Plant Pathol* 84:19–27
- 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* 19:2–15
- Gomaa HHA, Elshoubaky GA (2016) Antiviral activity of sulfated polysaccharides carrageenan from some marine seaweeds. *Int J Curr Pharm Rev Res* 7:34–42
- Harden EA, Falshaw R, Carnachan SM, Kern ER, Prichard MN (2009) Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against herpes simplex virus. *Antivir Res* 83:282–289
- Hardouin K, Burlot AS, Umami A, Tanniou A, Stiger-Pouvreau V, Widowati I, Bedoux G, Bourgougnon N (2014) Biochemical and antiviral activities of enzymatic hydrolysates from different invasive French seaweeds. *J Appl Phycol* 26:1029–1042
- Jackson SG, McCandless EL (1978) Simple, rapid, turbidometric determination of inorganic sulfate and/or protein. *Anal Biochem* 90:802–808
- Jaques LB, Ballieux RE, Dietrich CP, Kavanagh LW (1968) A microelectrophoresis method for heparin. *Can J Physiol Pharmacol* 46:351–360
- Kleymann G (2005) Agents and strategies in development for improved management of herpes simplex virus infection and disease. *Expert Opin Investig Drugs* 14:135–161
- Knutsen S, Myslabodski D, Larsen B, Usov A (1994) A modified system of nomenclature for red algal galactans. *Bot Mar* 37:163–169
- 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* 14:201–211
- Levendosky K, Mizenina O, Martinelli E, Jean-Pierre N, Kizima L, Rodriguez A, Kleinbeck K, Bonnaire T, Robbiani M, Zydowsky TM, O'Keefe BR, Fernández-Romero JA (2015) Griffithsin and carrageenan combination to target HSV-2 and HPV. *Antimicrob Agents Chemother* 59:AAC. 01816-15.
- Li L, Ni R, Shao Y, Mao S (2014) Carrageenan and its applications in drug delivery. *Carbohydr Polym* 103:1–11
- Matsuhiro B, Zanlungo AB (1983) Colorimetric determination of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides from red seaweeds. *Carbohydr Res* 118:276–279
- McLaren C, Ellis MN, Hunter G (1983) A colorimetric assay for the measurement of the sensitivity of herpes simplex viruses to antiviral agents. *Antivir Res* 3:223–234
- McReynolds KD, Gervay-Hague J (2007) Chemotherapeutic interventions targeting HIV interactions with host-associated carbohydrates. *Chem Rev* 107:1533–1552
- Murano E, Toffanin R, Cecere E, Rizzo R, Knutsen SH (1997) Investigation of the carrageenans extracted from *Solieria filiformis* and *Agardhiella subulata* from Mar Piccolo, Taranto. *Mar Chem* 58:319–325
- Navarro DA, Flores ML, Stortz CA (2007) Microwave-assisted desulfation of sulfated polysaccharides. *Carbohydr Polym* 69:742–747
- Pereira L, Sousa A, Coelho H, Amado AM, Ribeiro-Claro PJ (2003) Use of FTIR, FT-Raman and ^{13}C -NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. *Biomol Eng* 20:223–228
- Prajapati VD, Maheriya PM, Jani GK, Solanki HK (2014) Carrageenan: a natural seaweed polysaccharide and its applications. *Carbohydr Polym* 105:97–112
- Rodríguez MC, Merino ER, Pujol CA, Damonte EB, Cerezo AS, Matulewicz MC (2005) Galactans from cystocarpic plants of the red seaweed *Callophyllis variegata* (Kallymeniaceae, Gigartinales). *Carbohydr Res* 340:2742–2751
- Saito RM, de Oliveira EC (1990) Chemical screening of Brazilian marine algae producing carrageenans. *Hydrobiologia* 204:585–588
- Serive B, Kaas R, Bérard JB, Pasquet V, Picot L, Cadoret JP (2012) Selection and optimisation of a method for efficient metabolites extraction from microalgae. *Bioresour Technol* 124:311–320
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76–85
- Soria AC, Ruiz-Aceituno L, Ramos L, Sanz LM (2015) Microwave-assisted extraction of polysaccharides. *Polysaccharides* 987–1008.
- Sun L, Wang C, Shi Q, Ma C (2009) Preparation of different molecular weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum* and their antioxidant activities. *Int J Biol Macromol* 45:42–47
- Tang F, Chen F, Li F (2013) Preparation and potential in vivo anti-influenza virus activity of low molecular-weight κ -carrageenans and their derivatives. *J Appl Polym Sci* 127:2110–2115
- Usov AI (2011) Polysaccharides of the red algae. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 65:115–217
- Van De Velde F, Rollema HS (2008) High resolution NMR of carrageenans. *Mod Magn Reson* 1605–1610
- Van De Velde F, Pereira L, Rollema HS (2004) The revised NMR chemical shift data of carrageenans. *Carbohydr Res* 339:2309–2313
- Vázquez-Delfín E, Robledo D, Freile-Pelegrín Y (2013) Microwave-assisted extraction of the carrageenan from *Hypnea musciformis* (Cystocloniaceae, Rhodophyta). *J Appl Phycol* 26:901–907
- Yamada T, Ogamo A, Saito T, Watanabe J, Uchiyama H, Nakagawa Y (1997) Preparation and anti-HIV activity of low-molecular-weight carrageenans and their sulfated derivatives. *Carbohydr Polym* 32:51–55
- Yuan Y, Macquarrie D (2015) Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from *Ascophyllum nodosum* and its antioxidant activity. *Carbohydr Polym* 129:101–107
- Zhou G, Sun Y, Xin H, Zhang Y, Li Z, Xu Z (2004) In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. *Pharmacol Res* 50:47–53
- Zhou G, Sheng W, Yao W, Wang C (2006a) Effect of low molecular lambda-carrageenan from *Chondrus ocellatus* on antitumor H-22 activity of 5-Fu. *Pharmacol Res* 53:129–134
- Zhou G, Yao W, Wang C (2006b) Kinetics of microwave degradation of lambda-carrageenan from *Chondrus ocellatus*. *Carbohydr Polym* 64:73–77

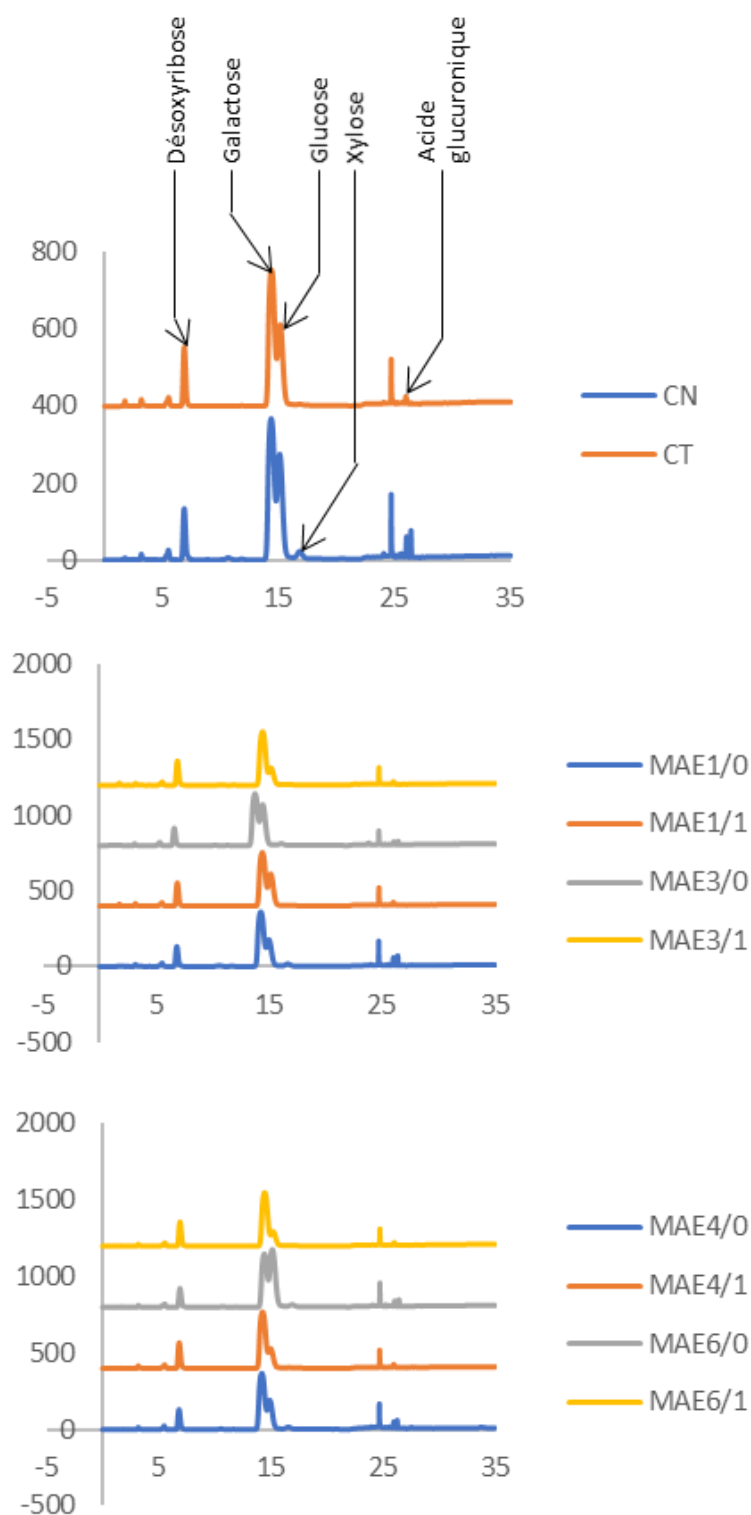


Figure 52: Chromatogramme des profils en monosaccharide des extraits de carraghénanes obtenu par Extraction Assistée par Microondes. La codification correspond aux conditions d'extractions (publication, p274) : MAE1 (90°C, 10 min) ; MAE3 (90°C, 25 min) ; MAE4 (105°C, 10 min) et MAE6 (105°C, 25min). Les valeurs MAE1/X, X correspondant à la concentration en KOH du milieu (0%, 0,5% ou 1%).

2.2. Conclusion de la publication

Les résultats obtenus dans cette première partie de l'étude ont démontré un effet de l'Extraction Assistée par Microondes sur le rendement d'extraction d'extrait d'iota-carraghénane. Ils ont également permis d'observer une variation de la composition de la teneur en sulfate et en 3,6 anhydrogalactose (3,6 AG) entre l'extraction conventionnelle et les conditions appliquées par micro-ondes.

L'évaluation de l'activité antivirale des extraits de carraghénanes a permis de d'identifier des extraits permettant de bloquer la réplication du virus de l'Herpès simplex de type 1. Pour la poursuite des études sur les mécanismes d'actions de l'extrait, l'extrait obtenu par l'EAM en conditions alcalines à 105°C pendant 25 minutes (MAE6/1) a été sélectionné.

2.3. Analyses des profils de sucres par Chromatographie Haute Performance Échangeuse d'Anions (HPAEC-DAD)

Les profils en monosaccharides des extraits de carraghénanes ont été obtenus par Chromatographie Échangeuse d'Anions Haute Performance (HAPEC), ils sont présentés dans la **Figure 52**. La calibration des différents monosaccharides a permis de déterminer le pourcentage de chaque composé dans les extraits, les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau XXV.

Ces profils présentent différents signaux correspondant au désoxyribose, galactose, glucose, xylose et à l'acide glucuronique. L'ensemble des extraits montrent la présence de deux signaux majoritaires correspondant au glucose et au galactose. Les profils des extraits démontrent également la présence de désoxyribose et d'acide galacturonique à des intensités moins importantes. D'autres signaux sont observables sur les chromatogrammes, ces signaux seront considérés comme une fraction d'autres sucres non caractérisés.

Les profils de sucres varient en fonction des conditions appliquées par l'EAM, on remarque le signal correspondant au xylose est observé seulement dans les extraits obtenus en conditions natives sans KOH (CN, MAE1/0, MAE3/0, MAE4/0 et MAE6/0). Contrairement au signal de galactose et au signal de glucose qui varient significativement d'un extrait à l'autre.

Tableau XXV : Tableau présentant la distribution des monosaccharides composants les extraits de carraghénanes exprimer en % de sucres totaux :

Conditions		Galactose	Glucose	Xylose	Acide glucuronique	Autres
Traitement EAM	% KOH	(% sucres totaux)				
C	0	60,1%	31,6%	2,8%	4,2%	1,2%
	1	68,2%	27,6%	1,5%	2,4%	0,3%
MAE1	0	70,2%	21,2%	2,4%	5,0%	1,3%
	1	85,2%	10,8%	2,9%	0,9%	0,2%
MAE2	0	41,9%	53,1%	1,6%	2,4%	1,0%
	1	88,8%	7,4%	0,8%	2,5%	0,4%
MAE3	0	63,2%	31,4%	1,8%	2,5%	1,0%
	1	85,3%	10,7%	1,1%	2,6%	0,4%
MAE4	0	69,8%	22,8%	2,2%	4,2%	1,1%
	1	86,5%	10,0%	0,9%	2,5%	0,1%
MAE5	0	61,0%	32,7%	2,0%	3,5%	0,9%
	1	86,7%	9,4%	0,7%	2,9%	0,3%
MAE6	0	44,6%	49,2%	2,6%	2,7%	0,9%
	1	87,3%	9,0%	1,0%	2,6%	0,1%

Les carraghénanes extraient par l'Extraction Assistée par Microondes montrent des compositions différentes par rapport à ceux obtenus par la méthode conventionnelle. L'extrait obtenu par microondes à la température de 90° présente une composition plus élevée en galactose (70%) et inférieure en glucose (21%) comparé à l'extrait obtenu en condition conventionnelle.

Sur des temps de traitement court (10 min, MAE1 et MAE4), le pic du glucose varie peu en condition native contrairement aux traitements plus longs (25 min, MAE3 et MAE6) où l'on remarque des différences significatives. Le signal de glucose présente une intensité élevée dans les extraits obtenus en conditions natives par rapport aux extraits obtenus en conditions alcalines. L'augmentation du temps de traitement pendant 20 et 25 minutes (MAE2 et MAE3) permet d'obtenir un extrait présentant une composition de 53,1 et 31,4% en glucose et 41,9 et 63,2% en galactose.

L'augmentation de la température (105°C ; MAE4 et MAE5) avec des temps de traitement différents 10 et 20 minutes présentent des compositions similaires en glucose et galactose par rapport à l'extrait obtenu à 90°C (MAE1). L'augmentation du temps de traitement pendant 25 minutes montre un profil en monosaccharide similaire au traitement obtenu à 90°C pendant 20 minutes avec une concentration plus importante glucose (49%) par rapport au galactose (44,6%).

L'application du traitement alcalin lors de l'EAM entraîne des compositions très différentes par rapport aux extraits obtenus en condition native. On remarque que dans l'ensemble des extraits obtenus par le traitement alcalin et EAM, le taux de galactose est beaucoup plus important (85 à 88%) et le taux de glucose est largement diminué (7 à 10%). Les résultats montrent également qu'il y a moins de xylose dans ces extraits (1%).

Le traitement alcalin semble entraîner une augmentation du taux de galactose et une diminution des taux de glucose, xylose, acide glucuronique et autres sucres par rapport aux conditions natives. L'extrait natif présente un rapport de concentration en galactose/glucose de 60/31 alors que ce rapport est de 68/27 pour le traitement alcalin.

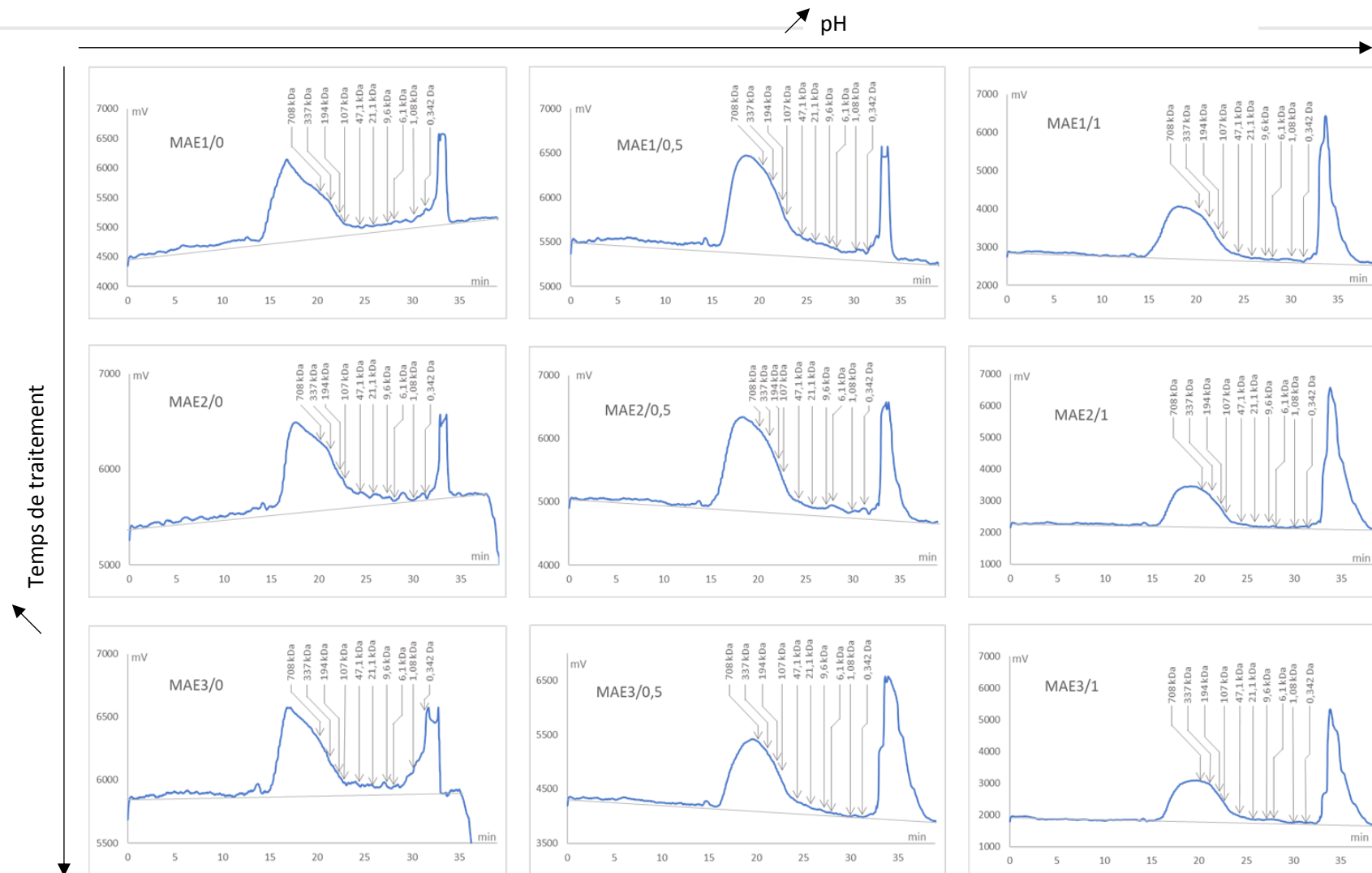


Figure 53: Figure présentant le profil des poids moléculaires des différents extraits de carraghénanes obtenu par Extraction Assistée aux Microondes. Codification : MAE1 (90°C, 10 min) ; MAE3 (90°C, 25 min) ; MAE4 (105°C, 10 min) et MAE6 (105°C, 25min). Les valeurs MAE1/X, X correspondant à la concentration en KOH du milieu (0%, 0,5% ou 1%). (1/2)

2.4. Analyse du profil de poids moléculaire par Chromatographie d'Exclusion Stérique Haute Performance (HPSEC).

La distribution des poids moléculaires des différents extraits de carraghénanes obtenu par l'Extraction assistée par microondes (EAM) a été réalisée par Chromatographie d'Exclusion Stérique Haute Performance. Le poids moléculaire est corrélé au temps de rétention au sein du système de colonne. La distribution des poids moléculaire a été calibrée par l'analyse d'une gamme de pullulan de différents poids moléculaires permettant de définir une droite de corrélation $\log PM = f(\text{temps})$.

Les chromatogrammes obtenus pour les différents extraits de carraghénanes sont présentés dans les **Figure 53** et **Figure 54**. L'analyse des poids moléculaires permet d'observer des profils différents en fonction des conditions appliquées par les microondes. Dans tous les échantillons, deux signaux importants sont présents, l'un correspond à la présence d'une fraction de haut poids moléculaire ($x > 107 \text{ kDa}$) ; le second signal montre la présence d'une fraction de bas poids moléculaire ($x < 342 \text{ Da}$). Cependant, la distribution de ces deux fractions semble variée en fonction des échantillons.

Les chromatogrammes des échantillons traités par EAM en conditions natives à une température de 90°C à des temps de traitement court (MAE1/0) présentent un signal important pour la fraction de haut poids moléculaire et la présence de différents signaux plus faible distribué entre les poids moléculaires intermédiaires ($107\text{Da} > x > 342 \text{ Da}$).

Cette distribution semble également représentée dans les extraits de MAE2/0 et MAE3/0 pour des temps de traitement plus long. Le traitement alcalin, par l'ajout de 1% de KOH, appliqué dans les même conditions (MAE1/1 ; MAE2/1 et MAE3/1) entraine des distributions différentes du poids moléculaire relativement différentes. Les deux signaux correspondant aux bas poids moléculaires inférieur à 342 Da et les hauts poids moléculaires supérieur à 107 kDa sont présents. Cependant, on remarque une diminution significative du signal de haut poids moléculaire alors que le signal de bas poids moléculaire semblerait en contrepartie augmenter. De plus, les fractions de poids moléculaires intermédiaires ne présentent plus de signaux.

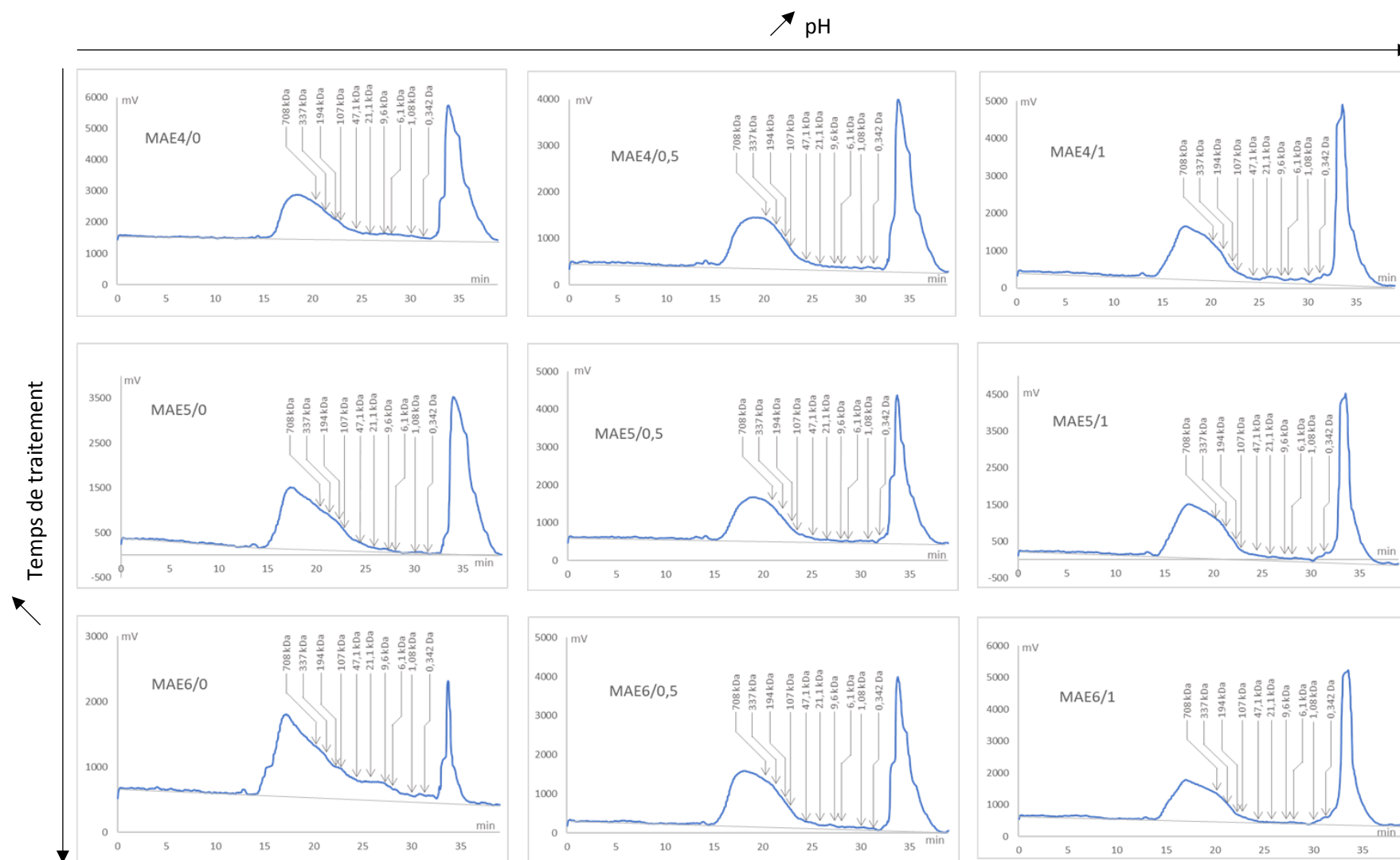


Figure 54: Figure présentant le profil des poids moléculaires des différents extraits de carraghénanes obtenu par Extraction Assistée aux Microondes. Codification : MAE1 (90°C, 10 min) ; MAE3 (90°C, 25 min) ; MAE4 (105°C, 10 min) et MAE6 (105°C, 25min). Les valeurs MAE1/X, X correspondant à la concentration en KOH du milieu (0%, 0,5% ou 1%) (2/2).

Dans le cas du traitement aux microondes à une température plus élevée (105°C), les extraits obtenus en conditions native présentent également un signal plus important pour les fractions de bas poids moléculaire et ne présente pas de signaux de fractions de bas poids moléculaires compris entre 107 kDa et 342 Da. À haute température dans les conditions alcalines, la tendance observée à 90°C semble se confirmer. En effet, on remarque des distributions présentant une fraction plus importante en poids moléculaire inférieur à 342 Da dans les échantillons MAE4/1, MAE5/1 et MAE6/1.

Tableau XXVI : Tableau présentant les CC_{50} et CE_{50} obtenus pour l'extrait de carraghénane MAE6/1 et l'Acyclovir (Zovirax) pour le test de protection cellulaire en pré-infection par le virus Herpès simplex de type 1.

MOI 0,001 ID ₅₀ /cellule				
Temps d'incubation (h)	48		72	
	CC ₅₀	CE ₅₀	CC ₅₀	CE ₅₀
	(µg/mL)			
Zovirax	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0
Carraghénane	>200,0	24,4 ± 5,03	>200,0	>200,0
MOI 0,01 ID ₅₀ /cellule				
Temps d'incubation (h)	48		72	
	CC ₅₀	CE ₅₀	CC ₅₀	CE ₅₀
	(µg/mL)			
Zovirax	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0
Carraghénane	>200,0	>200,0	>200,0	>200,0
CC ₅₀ : Concentration entraînant 50% de mortalité cellulaire exprimée en µg/mL.				
CE ₅₀ : Concentration en produit permettant de réduire de 50% la mortalité cellulaire suite à l'infection du virus, cette valeur est exprimée en µg/mL.				

2.5. Détermination des mécanismes d'action de l'extrait de carraghénane MAE6/1 sur le virus Herpès simplex de type 1.

L'extrait MAE 6/1 présentant une activité antiherpétique *in vitro*, nous avons cherché à mettre en évidence à quel moment du cycle de multiplication virale, il pouvait intervenir. Pour élucider le temps d'action antiviral de l'extrait, il est important de varier les conditions de culture les incorporer à différentes étapes du cycle de multiplication, avant l'infection (action sur les récepteurs cellulaires), pendant l'infection (action intracellulaire), l'effet direct (virucide) et au niveau de l'adsorption du virus sur les cellules (action sur les récepteurs virales) et effet du temps d'addition (action intracellulaire).

2.5.1. Inhibition de la fixation virale : Évaluation de l'effet du traitement par l'extrait en pré-infection.

Pour pénétrer et se répliquer au dépend de la cellule hôte, le virus doit se fixer sur la membrane cellulaire par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques et de glycoprotéines de l'enveloppe virale. Si un des composés, présent dans l'extrait, dégrade ou masque les sites actifs, les virus ne peuvent plus pénétrer dans la cellule pour s'y multiplier. On enregistrera alors un effet de protection des cellules. L'extrait a été pré-incubé avec une suspension cellulaire. Après 12 heures de traitement à 37°C, le tapis cellulaire est lavé et le virus est inoculé à deux MOI de 0,001 à 0,01 ID₅₀/cellule.

Les résultats obtenus suite à la révélation au rouge neutre après 48h et 72h d'incubation après infection sont présentées dans le **Tableau XXVI**.

Les résultats montrent que la molécule de référence Zovirax tout comme l'extrait MAE6/1 ne présentent pas de cytotoxicité vis-à-vis des cellules dans la gamme de concentration testée.

Tableau XXVII: Tableau présentant les CC_{50} et CE_{50} obtenus pour l'extrait de carraghénane MAE6/1 et l'Acyclovir (Zovirax) pour le test de protection cellulaire afin de déterminer l'effet virucide vis-à-vis du virus Herpès simplex de type 1.

MOI 0,001 ID ₅₀ /cellule				
Temps d'incubation (h)	48		2	
	CC_{50}		CC_{50}	CE_{50}
	($\mu\text{g/mL}$)			
Zovirax	>5,0	$0,6 \pm 0,1$	>5,0	$2,0 \pm 0,3$
Carraghénane	>200,0	$17,3 \pm 1,4$	>200,0	$25,2 \pm 1,7$

MOI 0,01 ID ₅₀ /cellule				
Temps d'incubation (h)	48		72	
	CC_{50}	CE_{50}	CC_{50}	CE_{50}
	($\mu\text{g/mL}$)			
Zovirax	>5,0	>5,0	>200,0	>5,0
Carraghénane	>200,0	$16,5 \pm 0,6$	>200,0	$156,1 \pm 73,7$

CC_{50} : Concentration entraînant 50% de mortalité cellulaire exprimée en $\mu\text{g/mL}$.

CE_{50} : Concentration en produit permettant de réduire de 50% la mortalité cellulaire suite à l'infection du virus, cette valeur est exprimée en $\mu\text{g/mL}$.

Les résultats montrent que seulement à la MOI la plus faible (0,001 ID₅₀/cellule), l'extrait de carraghénane semble présenter une activité pour une CE₅₀ de 24,4 µg/mL après 48 heures d'incubation. Au-delà de ce temps d'incubation (72h), la protection n'est plus significative. Les résultats obtenus pour une MOI plus importante (0,01 ID₅₀/cellule) ne montre aucune activité de l'extrait. De plus, la molécule de référence ne présente aucune activité pour les deux multiplicités d'infection, résultats attendus puisque le Zovirax agit au niveau intracellulaire.

En conclusion, l'extrait ne protège pas les cellules Véro de l'infection virale dans ces conditions. Un prétraitement des cellules avant l'infection ne semble pas efficace. L'extrait ne semble donc pas agir au niveau des récepteurs cellulaires. Il serait, tout de même, intéressant d'explorer ce mode d'action en augmentant les concentrations de l'extrait pour confirmer ou non l'effet à 24 heures.

2.5.2.Effet direct sur le virus : Évaluation de l'activité virucide de l'extrait.

L'étude au niveau des récepteurs du virus permet de voir si l'extrait possède un effet direct sur le virus. Le composé dissous dans le milieu pourrait neutraliser le virus en dehors des cellules selon deux modalités : soit en se combinant avec lui, ce qui peut l'empêcher de se fixer sur les récepteurs cellulaires ou de pénétrer dans les cellules (blocage externe) soit en le détruisant directement (destruction virale : effet virucide). Afin de vérifier ces hypothèses, l'extrait est incubé une heure à 37°C avec la suspension virale aux deux multiplicités d'infection. Après une heure de contact, la suspension extrait/virus est additionnée aux cellules.

Les résultats obtenus sur la protection des cellules face à l'infection virale sont présentés dans le **Tableau XXVIII**.

Les résultats montrent que dans la gamme de concentration testée, l'extrait ne présente pas de cytotoxicité vis-à-vis des cellules mammaliennes. Les résultats montrent également qu'à la multiplicité d'infection de 0,001 ID₅₀/cellule, le Zovirax présente un effet virucide après 48 heures et 72 heures d'incubation avec respectivement une CE₅₀ de 0,6 et 2,0 µg/mL. Cet effet disparaît à la multiplicité d'infection plus élevée 0,01 ID₅₀/cellule.

Tableau XXVIII: Tableau présentant les CC_{50} et CE_{50} obtenus pour l'extrait de carraghénane MAE6/1 et l'Acyclovir (Zovirax) pour le test de protection cellulaire afin de déterminer l'effet de l'ajout post-infection des drogues sur la protection des cellules vis-à-vis du virus Herpès simplex de type 1.

Temps d'ajout	Temps d'incubation	Zovirax		Carraghénane	
		CC_{50}	CE_{50}	CC_{50}	CE_{50}
(h)	(h)	($\mu\text{g/mL}$)			
0	48	>5,0	$0,4 \pm 0,1$	>200,0	$10,5 \pm 0,7$
	72	>5,0	$3,5 \pm 0,5$	>200,0	$27,5 \pm 4,1$
1	48	>5,0	>5,0	>200,0	>200,0
	72	>5,0	$1,1 \pm 0,2$	>200,0	$38,1 \pm 4,1$
2	48	>5,0	$0,1 \pm 0,06$	>200,0	$171,4 \pm 9,8$
	72	>5,0	>5,0	>200,0	$162,6 \pm 26,0$
3	48	>5,0	$0,4 \pm 0,1$	>200,0	$88,2 \pm 7,2$
	72	>5,0	$2,7 \pm 0,5$	>200,0	$21,3 \pm 1,2$
5	48	>5,0	$0,6 \pm 0,1$	>200,0	>200,0
	72	>5,0	>5,0	>200,0	$70,4 \pm 5,9$

CC_{50} : Concentration entraînant 50% de mortalité cellulaire exprimée en $\mu\text{g/mL}$.

CE_{50} : Concentration en produit permettant de réduire de 50% la mortalité cellulaire suite à l'infection du virus, cette valeur est exprimée en $\mu\text{g/mL}$.

L'extrait de carraghénane présente également une activité virucide à la multiplicité d'infection de 0,001 ID₅₀/cellule. Cet effet est également observé à la multiplicité d'infection 0,01 ID₅₀/cellule. En effet, après une incubation de 48 et 72 heures, l'évaluation de l'activité antiherpétique par viabilité cellulaire montre des CE₅₀ de 17,3 et 25,2 µg/mL à la multiplicité d'infection de 0,001 ID₅₀/cellule et des CE₅₀ plus élevées pour une multiplicité d'infection de 0,01 ID₅₀/cellule avec des valeurs de 16,5 et 156,1 µg/mL respectivement.

En conclusion, l'extrait de carraghénane présente un effet virucide sur le Virus de l'Herpes, il est donc capable de se lier au virus et de bloquer ainsi l'infection.

2.5.3. Effet du temps d'addition : Évaluation de l'effet du traitement post-infection.

Afin de mettre en évidence un phénomène intracellulaire, les cellules ont été traitées avec l'extrait simultanément et après l'infection sur un cycle de réplication virale. La suspension cellulaire a été infectée par le virus puis, l'extrait a été additionné à différents temps (simultanément, après 1 heure d'infection, après 2 heures, après 3 heures et après 5 heures).

Les cellules sont ensuite incubées pendant 48 et 72h, la révélation après incubation permet de déterminer les CC₅₀ et CE₅₀ présentées dans le **Tableau XXVIII**.

Les résultats obtenus ne montrent aucune cytotoxicité de l'extrait de carraghénane tout comme la molécule de référence. La molécule de référence montre une activité antivirale lorsque le produit est ajouté au moment de l'infection avec des valeurs CE₅₀ de 0,4 et 3,5 µg/mL après 48 et 72 heures d'incubation, confirmant l'efficacité du produit. L'addition après une heure d'incubation montre une protection des cellules face au virus avec une CE₅₀ de 1,1 µg/mL après une incubation de 72 heures. L'ajout successif à 2, 3 et 5 heures après infection confirme l'efficacité de la molécule plusieurs après l'infection, un effet intracellulaire connu de la molécule.

L'extrait de carraghénane présente également une activité antivirale après l'infection. Après 48 heures de contact, l'effet est peu marqué. L'extrait ne semble pas contrôler la prolifération virale.

Tableau XXIX: Tableau présentant les CC_{50} et CE_{50} obtenus pour l'extrait de carraghénane MAE6/1 et l'Acyclovir (Zovirax) pour le test servant à déterminer l'effet des drogues sur l'adsorption virale par les cellules.

	Zovirax		Carraghénane	
	CC_{50}	CE_{50}	CC_{50}	CE_{50}
	(µg/mL)			
Traitement A	>5,0	>5,0	>200,0	118,3 ± 29,8
Traitement B	>5,0	0,7 ± 0,1	>200,0	26,4 ± 2,8
Traitement C	>5,0	1,0 ± 0,1	>200,0	17,7 ± 0,6

CC_{50} : Concentration entraînant 50% de mortalité cellulaire exprimée en µg/mL.

CE_{50} : Concentration en produit permettant de réduire de 50% la mortalité cellulaire suite à l'infection du virus, cette valeur est exprimée en µg/mL.

Curieusement l'évaluation de l'activité antivirale réalisée après 72 heures de contact montre que l'extrait diminue en efficacité après un ajout 2 heures après l'infection puis pour les deux essais avec un ajout respectivement à 3 et 5 heures, l'extrait semble gagner en efficacité comme s'il était capable de contrôler les nouvelles générations virales et donc d'avoir une action intracellulaire limitée dans le temps. Ces résultats mériteraient d'être explorés de nouveau.

2.5.4. Inactivation virale : Évaluation de l'effet sur l'adsorption virale.

L'adsorption virale du virus par la cellule est évaluée par l'application de trois traitements différents permettant d'évaluer le potentiel de l'extrait d'intervenir sur cette étape du cycle d'infection. Les trois traitements sont nommés A, B et C. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau XXIX**.

Pour mémoire, dans le traitement A, l'extrait et les cellules sont incubés ensemble avant lavage au PBS. Dans le traitement B, l'extrait est additionné aux cellules seulement après lavage au PBS. Dans le traitement C, l'extrait est présent avant et après le lavage. Les expériences ont été réalisées à une multiplicité d'infection de 0,001ID₅₀/cellule. Ces différents traitements visent à savoir si l'extrait agit au niveau de l'étape précise de l'adsorption c'est-à-dire au moment où le virus se « dépose » sur une cellule juste avant la pénétration.

Comme dans les cas précédents, aucune cytotoxicité n'est révélée. Les résultats obtenus pour le Zovirax confirment son effet intracellulaire. Présent avant ou après l'infection, cette drogue est efficace. En effet, les valeurs de CE₅₀ déterminées sont de 0,7 et 1,0 µg/mL dans les conditions du traitement B et C respectivement. Dans le traitement A où elle est présente avec le virus pendant 1h à 4°C, elle ne montre aucune activité limitant l'adsorption du virus par les cellules. Elle n'a pas d'activité virucide.

Pour les trois expérimentations, l'extrait s'avère efficace. Cependant, l'activité est plus faible au cours du traitement A où l'extrait est présent seulement au moment de l'adsorption (CE₅₀ : 118,3µg/ml). L'extrait s'avère plus efficace qu'il est appliqué après l'adsorption (CE₅₀ : 26,4µg/ml) et mieux encore avant et après l'adsorption (CE₅₀ : 17,7µg/ml). Ces résultats montrent et confirment que l'extrait est efficace lorsqu'il est présent au moment de l'infection et dans les premières étapes de la réplication virale.

3. Discussion

3.1.1. L'effet du traitement aux microondes sur le profil des monosaccharides.

L'analyse du profil en monosaccharides des différents extraits de carraghénanes a démontré la présence de deux monosaccharides majoritaires, le galactose et le glucose. La xylose est également détectée mais est minoritaire. La présence de galactose est directement liée à la présence de carraghénanes dans l'extrait.

La détection de glucose peut être due à l'hydrolyse de deux polysaccharides, la cellulose et l'amidon floridéen. La composition en cellulose des algues rouges est décrite comme inférieure à 10% de la composition de l'algue. Selon Usov (2011) la présence de glucose dans les extraits est due à l'extraction de l'amidon floridéen, sucres de réserve des Rhodophycées. Sa structure est composée d'un enchainement de α -1,4-D-glucopyranose. La présence de glucose a également été observé dans les extraits de carraghénanes obtenu à partir des espèces *Hypnea musciformis*, *Cryptonemia crenulata*, *Kappaphycus alvarezii* et *Hydropuntia dentata* avec des pourcentages variant de 11 à 18% (Rhein-Knudsen *et al.* 2017).

La présence d'autres monosaccharides a également été décrites parmi lesquels le mannose, le rhamnose, le xylose, l'acide glucuronique et l'acide galacturonique. La détection de ces monosaccharides varie d'une espèce à l'autres et est minoritaire (Usov, 2011). Plus spécifiquement, la présence de xylose dans les extraits de carraghénanes a été décrite comme pouvant être lié à la substitution d'un galactose par un xylose dans la structure du polysaccharide (Araki, Arai et Hirase, 1967 ; Estevez, Ciencia et Cerezo, 2000).

Cette variation des quantités de glucose et de galactose dans les extraits obtenus par l'extraction conventionnelle et l'extraction assistée aux microondes est liée à la spécificité des conditions d'extraction. L'extraction par les deux méthodes (Conventionnelle et EAM) en condition native démontre qu'une fraction d'amidon floridéen est co-extraite avec les carraghénanes. La présence d'amidon floridéen est également détectée dans les extraits de MAE en condition alcaline mais à des taux significativement inférieurs.

3.1.2. L'effet du traitement des microondes sur le poids moléculaire des carraghénanes.

L'analyse des profils de poids moléculaires (PM) des extraits de carraghénanes démontrent deux fractions majoritairement représentées. L'une est composée de carraghénanes présentant des PM supérieur à 107 kDa, la seconde est composée d'oligosaccharides avec un PM inférieur à 342 Da.

Les extraits de carraghénanes obtenus par MAE à haute température semblent démontrer une fraction de bas PM majoritaire contrairement aux extraits obtenus par MAE à 90°C et par la méthode conventionnelle. Ceci lève l'hypothèse d'un effet des conditions de traitement sur le PM des carraghénanes. L'effet de la température est un des facteurs décrit comme intervenant dans la dégradation des carraghénanes. Cependant, d'autres facteurs peuvent également influencer cet effet.

La littérature décrit les nombreux facteurs intervenants dans la dégradation des polysaccharides. Les carraghénanes ont démontrés une sensibilité à la température, au pH, à la pression, aux sels et à l'oxygène du milieu et est fonction de son état (hydraté ou sec) (Friedenthal *et al.* 2000 ; Lai *et al.* 2000 ; Collen *et al.* 2009). La dégradation entraîne un désulfatation et une diminution du PM significative (Robal *et al.* 2017).

3.1.3. Les mécanismes d'actions de l'extrait de carraghénane sur la réplication du virus de l'Herpès simplex de type 1.

Ces résultats confirment également les travaux menés depuis de nombreuses années sur l'activité antivirale des polysaccharides sulfatés extraits des algues marines parmi lesquels les carraghénanes sont cités. Ces composés ont démontré la capacité de pouvoir mimer l'action des facteurs endogènes et d'entraîner la régulation des fonctions de synthèse des macroorganismes au travers des récepteurs cellulaires et des enzymes (Mandal *et al.* 2007). De ce fait, les polysaccharides sulfatés peuvent se lier aux récepteurs glycoprotéiques de la cellule hôte et rentrer en compétition avec le virus de l'Herpès limitant son adsorption (Mandal *et al.* 2007). De nombreux auteurs montrent que l'application des polysaccharides sulfatés issue de différents ordres de macroalgues est efficace sur l'étape d'attachement du virus à la cellule hôte, particulièrement sur les souches nécessitant de la chaîne sulfatée héparine présente à la surface des cellules (Besednova *et al.*, 2016).

Les carraghénanes extraits de *Gigartina skottsbergii* et les xylomannanes sulfatés extraits de *Sebdenia polydactyla* viennent inhiber la chaîne héparine sulfate ceci limitant l'adsorption des particules virales (Carlucci *et al.*, 1997 ; Ghosh *et al.*, 2009). Carlucci *et al.* (2002) ont également démontré que les carraghénanes de par leur charge négative agissent en limitant l'attachement du virus à la surface de la cellule. L'extrait de carraghénane testé dans l'application en pré-infection n'a pas montré d'efficacité de protection des cellules vis-à-vis de l'infection du virus. Ceci montre qu'il n'a pas interagit avec le récepteur des cellules, ne bloquant pas l'étape d'adsorption. Cependant, ceci peut être dû à un effet dose.

De plus, les carraghénanes extraits de *Gigartina acicularis* ont montré avoir un rôle à deux niveaux. Ils ont la capacité d'inhiber l'adhérence du virus. Mais ils jouent également sur l'inhibition de la réplication en intervenant sur la synthèse de l'ADN viral (Montanha *et al.*, 2009). Les échantillons de carraghénanes de *G. acicularis* et de *E. denticulatum* testés ont montré une CE₅₀ de 2,7 et de 26 µg/mL sur le modèle VHS-1 respectivement. Ces résultats sont comparables aux CE₅₀ déterminées à partir des extraits de carraghénanes de *S. chordalis* variant de 0,1 à 54,4 µg/mL (**décrits dans la publication p.281**).

D'autre part, une étude de l'activité antivirale des carraghénanes extraits de l'espèce *G. skottsbergii* a été réalisée sur le modèle virus de l'Herpès simplex de type 2 (VHS-2). Le test a été réalisé de manière *in-vivo* chez des souris infectées au niveau génital par le virus. Les lambda- carraghénanes ont démontré la capacité de protéger 90% des animaux infectés par l'injection intra-vaginale d'une dose concentrée à 10 mg/mL. Cette étude a démontré l'effet virucide des lambda-carraghénanes sur le modèle HSV-2 (Carlucci *et al.*, 2002).

Les nombreuses études réalisées sur l'activité antivirale des polysaccharides sulfatés algaux vis-à-vis de différents modèles de virus démontrent l'effet de différents facteurs pouvant influencer le potentiel du polysaccharide. Plusieurs recherches ont étudié la relation entre la structure, la composition et l'activité antivirale des polysaccharides sulfatés d'algues. Il est majoritairement décrit l'importance de la sulfatation du polysaccharide. Ce caractère structural est requis pour obtenir une réelle efficacité. L'effet de la sulfatation sur l'activité antiherpétique a été démontré sur l'ensemble des polysaccharides tels que les carraghénanes, les agars, les fucanes, les xylomannanes (Carlucci *et al.*, 2002 ; Adhikari *et al.*, 2006 ; Mandal *et al.*, 2007 ; Chattopadhyay *et al.*, 2008 ; Ghosh, *et al.*, 2009 ; Patel *et al.*, 2012 ; Prokofjeva *et al.*, 2013).

Mohamed et Agili (2013) lors de l'étude de l'importance du degré de sulfatation ont également étudié l'effet du poids moléculaire des polysaccharides sur l'activité antiherpétique en analysant deux fractions de 160 et 85 kDa. Ils en concluent que l'activité antivirale augmente lorsque le poids moléculaire est plus important. L'activité antivirale vis-à-vis du virus de l'Herpès serait liée à la fois à la sulfatation et au poids moléculaire. Cette étude a également démontré que l'activité antivirale était corrélée à la position des sulfates au sein du polymère et de la conformation de la chaîne de monosaccharide lui permettant d'adopter une certaine conformation permettant de former un complexe avec le virus (Mohamed et Agili, 2013). Les polysaccharides à longue chaîne présentant des poids moléculaires supérieurs à 100 kDa montre une meilleure efficacité face au virus car ils ont la capacité d'interagir plus efficacement avec les copies multiples de protéines virales (Carlucci et al., 1997 ; Besednova et al., 2016).

Cependant, tous ces facteurs ne peuvent être généralisés car l'interaction des uns par rapport aux autres induit des activités différentes. Il a été notamment observé des cas où l'activité de lambda carraghénane présentant un taux de sulfate élevé présente une activité significativement inférieure comparé à un carraghénane présentant moins de sulfate mais dont le taux de 3,6 anhydrogalactose était plus élevé (Besednova et al., 2016). D'autres parts, les polysaccharides de bas poids moléculaire montrent une efficacité plus faible sur le virus avant adsorption. Cependant des études ont montré que ces composés présentent une activité antivirale importante car ils agissent au niveau de la propagation du virus d'une cellule à l'autre (Nyberg et al., 2004 ; Ekblad et al., 2010). Cette hypothèse est intéressante car l'extrait de carraghénane (MAE6/1) testé montre une composition en sulfate et en 3,6 anhydrogalactose respective de 25 et 30% avec un poids moléculaire majoritairement de petite taille. Ces caractères semblent confirmer la capacité de cet extrait à bloquer certains mécanismes de réplication du virus.

4. Conclusion

L'étude de l'extraction des polysaccharides par l'Extraction Assistée aux Microondes a permis de démontrer l'efficacité de ce procédé par rapport à la méthode d'extraction conventionnelle. Cette technologie a un intérêt car elle permet d'améliorer les rendements d'extractions des carraghénanes tout en réduisant de 18 fois le temps de traitement. Ceci est dû entre autres au fait que les ondes microondes permettent d'avoir un chauffage plus rapide et homogène et que le système permet de travailler à des pressions plus importantes.

L'étude des paramètres de ce procédé a permis de démontrer les effets des microondes sur la composition biochimique et la structure des carraghénanes. L'analyse structurale des extraits a permis de caractériser et confirmer la présence du type iota-carraghénane chez *S. chordalis*. Ce polysaccharide est le composant majeur de la paroi de cette espèce.

Les paramètres temps, température et le pH du milieu influence la structure des iota carraghénanes. Cette étude a démontré que les paramètres appliqués par microondes modifient la composition en sulfate et en 3,6 Anhydrogalactose (3,6 AG) de l'extrait. Comme décrit dans la littérature, cette modification est également observée lors de l'extraction conventionnelle. Le traitement en pH alcalin entraîne la désulfatation et la formation d'unité 3,6 AG. Cependant, le traitement alcalin par les microondes montre une diminution du taux de sulfate moins important. Les sulfates semblent plus stables par l'application des microondes, ceci pourrait s'expliquer au fait que le temps de traitement soit moins long (10 à 25 min). L'effet de la température et du temps de traitement semble jouer un rôle sur la taille des polysaccharides. L'application des conditions les plus extrêmes (105°C, 25 min) montrent la présence de polysaccharide ayant une fraction de bas poids moléculaires plus importante. Ceci démontre que l'application de forte température entraîne le clivage des liaisons glycosidique du polymère et permet d'obtenir des oligosaccharides.

De plus, les carraghénanes produits par l'EAM ont démontrés des activités antivirales contre le virus de l'Herpès *simplex* de type 1 plus importante que les carraghénanes obtenus par voie conventionnelle. Cette activité semble liée à plusieurs paramètres structuraux tels que la composition en sulfate et en 3,6 AG ; la taille des polysaccharides et la pureté de l'extrait de carraghénanes (co-extraction plus ou moins importante des sucres de réserves). Tous ces paramètres agissent sur la charge et les propriétés physicochimiques des composés. Il serait intéressant de compléter les résultats obtenus dans l'étude par une analyse rhéologique des carraghénanes extraits.

L'étude de l'activité antivirale a été approfondie l'évaluation des mécanismes d'action d'un des extraits les plus actifs. Cette partie de l'étude a permis d'identifier les étapes de la réplication du virus dans lesquelles les carraghénanes interviennent afin de bloquer l'infection.

L'extrait de carraghénane testé n'a pas montré de d'efficacité sur l'étape d'attachement du virus à la cellule. Ceci démontre que le carraghénane n'interagit pas avec le récepteur cellulaire, cette absence d'efficacité peut être lié au fait que l'extrait soit majoritairement composé de polysaccharides de bas poids moléculaires. Toutefois, il semble agir sur les premières étapes de la réplication du virus, ceci

peut-être lié au blocage de la réplication de l'ADN comme ce fut démontré par l'étude des carraghénanes de *Gigartina acicularis* (Montanha et al. 2009). L'extrait testé a également démontré un effet virucide. Il semblerait également que sa composition en sulfate (25%) et en 3,6 AG (30%) importante, avec un profil de poids moléculaires majoritairement inférieure à 342 Da soit liée à son activité. Les extraits de carraghénanes obtenus par l'EAM semblent des bons candidats pour le traitement du virus de l'Herpès. Cependant des études complémentaires sont nécessaires, notamment d'évaluer l'innocuité des extraits sur l'organisme car des effets néfastes de polyghénanes de poids moléculaires inférieur à 50 kDa ont été décrits (Spichtig et Austin, 2008).

Il serait également intéressant de pouvoir combiner l'activité d'un extrait de carraghénanes de haut poids moléculaire agissant sur les récepteurs cellulaires. L'étude de l'activité d'un tel mélange de carraghénane pourrait combiner l'activité à d'avantage d'étapes de la réplication du virus.

Partie II : Étude d'un concept de bioraffinerie par couplage des procédés d'extractions (Extraction Assistée par Enzyme, Extraction au CO₂ supercritique et Extraction Assistée par Microondes) afin d'extraire les composés hydrosolubles, lipidiques et polysaccharidiques de *Solieria chordalis* (Rhodophycées, Gigartinales).

1. Introduction :

1.1. Concept de bioraffinerie

Le bioraffinage est définie par la capacité à intégrer entre elles les technologies visant à la destruction cellulaire, l'extraction, la transformation et la séparation de la biomasse (Eppink, 2015). Cette stratégie est basée sur le modèle de l'industrie pétrolière qui permet par l'application d'un raffinage en multi-étapes de pouvoir produire différents types de fuel (essence, gasoil, kérosène, etc...) et des produits chimiques à partir d'une matière commune le pétrole brut (Taylor, 2008). L'émergence de concept de bioraffinage s'est développée dans d'autres domaines de l'industrie pouvant apporter de nouvelles issues de développement durable afin de limiter l'impact sur l'environnement. Ces nouveaux concepts tentent d'améliorer l'utilisation de la biomasse afin de créer une chaîne de valorisation et de générer des produits, des coproduits et de services (Subhadra, 2011 ; Herrero et Ibanez, 2015). Le concept de bioraffinage inclut une isolation sélective des composés contenus dans la biomasse (protéines, carbohydrates, lipides). Le procédé nécessite d'être efficace malgré l'application de conditions modérées afin de conserver la fonctionnalité d'un maximum de composés (ex : conformation des protéines). L'objectif essentiel dans le développement d'une économie durable est fonction de la faisabilité, de pouvoir utiliser l'ensemble des composés actifs de la biomasse et de les valoriser dans des applications. Le bioraffinage doit aboutir à la production d'ingrédients valorisables dans différents domaines tels que l'alimentaire, la nutrition animale, les sources énergétiques, la chimie, le pharmaceutique et la cosmétique (Eppink, 2015). Si l'on ne tient compte que du marché industriel des aliments fonctionnels, marché qui pesait 168 milliards de dollars en 2010, le développement de nouveaux composés, d'extraits ou de produits dans ce domaine est d'un intérêt majeur. L'optimisation de la valorisation des ingrédients

pouvant être produits à partir des différentes sources de biomasse (plantes, macroalgues, microalgues, animal, etc..) est primordiale (Khan et al. 2013 ; Herrero et Ibanez, 2015).

Le challenge de la valorisation des macroalgues s'intègre également dans cette optique de bioraffinage. Le premier verrou déterminant pour l'industrie des macroalgues est de garantir la durabilité et l'homogénéité de la ressource. Cette étape est très étudiée et en plein développement avec la mise en place de l'algoculture. Au niveau industriel, la valorisation des macroalgues présente de nombreux verrous, la grande rétention d'eau (> 80%) entraîne rapidement une dégradation de la biomasse après la récolte et l'application de procédés de séchage limite les perspectives de rentabilité (Van Hal, Huijgen et Lopez-Contreras, 2014). De plus, du fait de la présence en grande quantité de chlorure de sodium, celui-ci n'étant pas éliminé totalement malgré le prétraitement, il se retrouve présent à chaque étape du procédé. Sa présence entraîne la corrosion des systèmes de transformation et inhibe la possibilité de mise en place de certaines réactions telles que la fermentation (Van Hal, Huijgen et Lopez-Contreras, 2014).

Les procédés de production d'ingrédients à partir des macroalgues ne ciblent généralement qu'un seul composé ; majoritairement la famille des polysaccharides (les carraghénanes, les alginates ou les agars) ou des pigments (colorants) délaissant une grande partie de la biomasse considérée comme déchet. Des recherches de procédés alternatifs ont montré l'intérêt de se tourner vers des systèmes de bioraffinage. Une première étude a été réalisée sur la viabilité économique de la valorisation de l'espèce *Sargassum muticum* basée sur la production de six produits incluant les fucoïdanes, les alginates, les phlorotannins, la fucoxanthine et des extraits antioxydants. Cette étude a démontré l'importance de l'application des procédés écoresponsables tels que l'hydrolyse, le CO₂ supercritique et le fractionnement de la biomasse. L'utilisation d'autres procédés, notamment l'application de solvants organiques ne rendait pas viable le système de production du fait des coûts dus à la consommation et aux retraitements des déchets toxiques (Balboa et al. 2015).

L'intérêt pour le concept de bioraffinerie en cascade se révèle important au vu du nombre de projets de recherche récemment développer dans cette direction. On peut notamment citer le projet GENIALG porté par la Société Biologique de Roscoff qui vise à étudier la valorisation des espèces *Ulva sp.* (Chlorophycées) et *Saccharina latissima* (Phaeophycées) ; mais également le programme de recherche « Dutch Seaweed Biorafinery Program » lancé en 2009 par l'université de Wageningen ou le projet « Danish MAB3 project », porté par le centre de recherche AlgeCenter Denmark depuis 2012.

Etude d'un concept de bioraffinerie par couplage des procédés d'extractions (Extraction Assistée par Enzymes, Extraction au CO₂ supercritique et Extraction Assistée par microondes) afin d'extraire les composés hydrosolubles, lipidiques et polysaccharides de *Solieria chordalis* (Rhodophycées, Gigartinales).

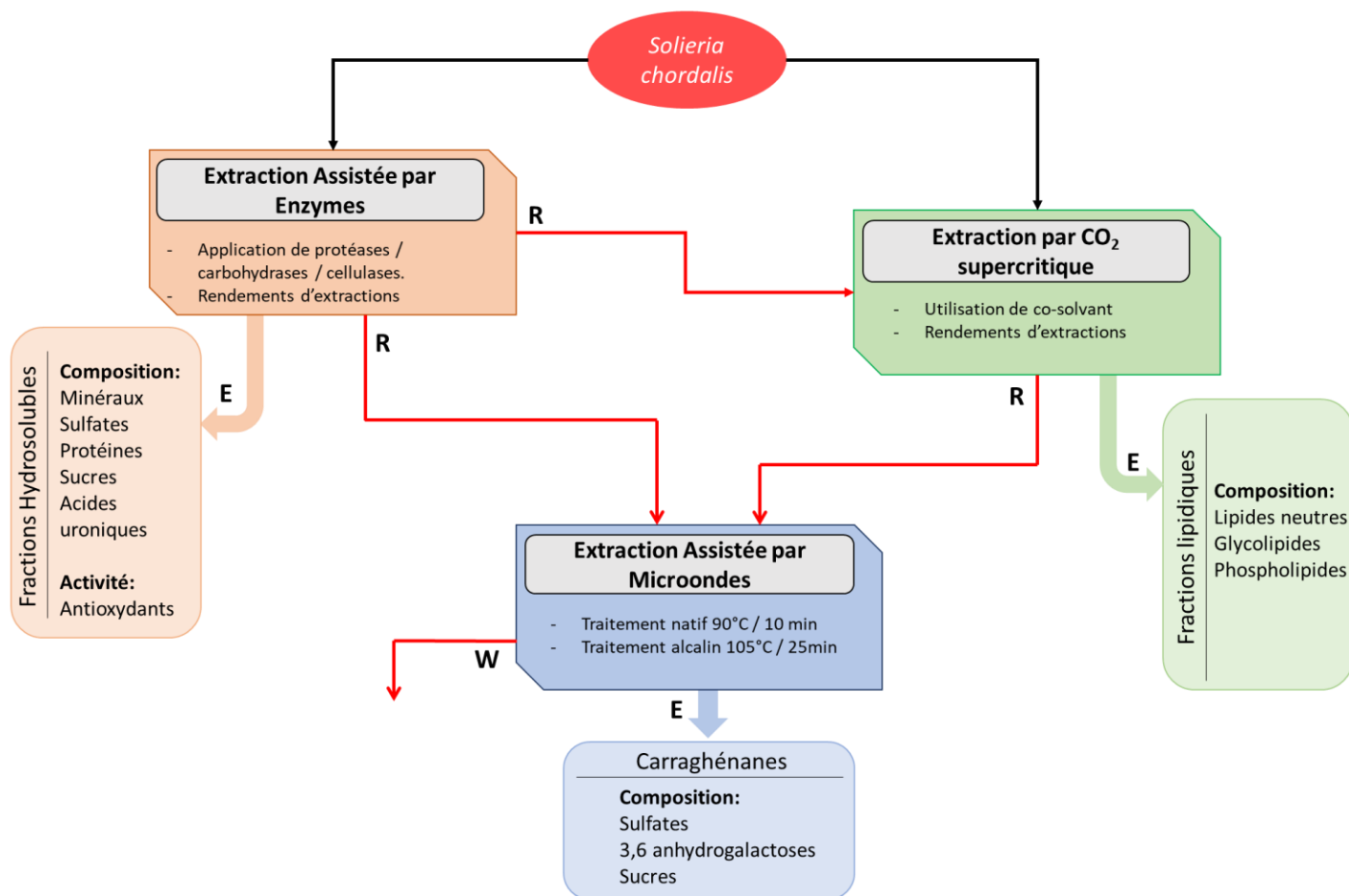


Figure 55: Schéma du plan d'étude de la partie II intitulée « Étude d'un concept de bioraffinerie par couplage des procédés d'extractions (Extraction Assistée par Enzyme, Extraction au CO₂ supercritique et Extraction Assistée par Microondes) afin d'extraire les composés hydrosolubles, lipidiques et polysaccharides de *Solieria chordalis* (Rhodophycées, Gigartinales) » présentant le schéma de procédés en cascade appliqué à l'algue *S. chordalis* afin d'en extraire les composés. (E) correspond au produit extrait ; (R) correspond au résidu ; (W) correspond à la fraction de déchet.

1.2. Objectifs de l'étude

Les objectifs de ce travail ont été d'étudier l'efficacité des différents procédés d'Extraction Assistée par Enzymes, d'Extraction au CO₂ supercritique de manière indépendante afin de produire des extraits de *Solieria chordalis* et d'étudier leur composition. Chaque procédé appliqué cible un type d'extrait, l'hydrolyse enzymatique va cibler les composés hydrosolubles, le CO₂ supercritique va permettre d'extraire la fraction lipidique de l'algue.

Le deuxième objectif a été de valoriser les résidus de *S. chordalis* traités par les deux premiers procédés. Le couplage des procédés EAE et ScCO₂ avec l'Extraction Assistée par Microondes est complémentaire à la partie I du projet. L'intérêt de cette étude est de déterminer l'impact de prétraitement sur les polysaccharides contenus dans l'algue. La deuxième étape de l'extraction par EAM va cibler l'extraction des carraghénanes des résidus de *S. chordalis*.

L'intérêt de mettre en place une chaîne de procédé en cascade est de pouvoir identifier les voies de valorisation possibles dans l'optique de développement d'un système économique durable.

Tableau XXX : Résultats du contrôle de l'activité enzymatique (protéase et β -glucanase) des cocktails commerciaux utilisés pour l'Extraction Assistée par Enzyme.

Activité standardisée des cocktails enzymatiques								
Nom	Protamex	Alcalase	AMG 300 L	Celluclast	Viscozyme L	Vino Taste	Ultraflo	Glucanex
Code	PRO	ALC	AMG	CEL	VIS	VIN	ULT	GLU
Type d'enzyme	Protéase		Amylase	Cellulase	β -glucanase			
Activité spécifique minimale fournisseur	>1200,0	>1200,0	>500,0	>700,0	>100,0	>75,0	>45,0	>200,0
Activité protéase (μ mol [S]/min/g de cocktail)	1388,3	1009,9	68,4	11,8	31,1	646,2	307,7	509,5
Activité β -glucanase / Cellulase	0,0	0,0	0,0	901,9	21,8	12,3	18,3	76,0

2. Résultats

2.1. *Extraction Assistée par Enzyme*

2.1.1. *Évaluation de l'activité standardisée des cocktails enzymatiques :*

Les cocktails enzymatiques ont été testés afin de déterminer l'activité de chaque cocktail à l'instant t et de s'affranchir de la perte d'activité due à la conservation. Les activités protéases et β -glucanase ont été évaluées, les valeurs déterminées sont présentées dans le **Tableau XXX**.

Le tableau présente les différents cocktails enzymatiques testés, le type d'enzyme qui compose le cocktail et l'activité spécifique minimale garantie par le fournisseur à la date d'achat. Les résultats obtenus pour l'activité protéase des cocktails enzymatiques spécifique Protamex et Alcalsase (PRO et ALC) montrent des activités proches des données fournisseurs. Au bout d'un an d'ouverture, le cocktail Alcalase présente une activité inférieure à 16% par rapport à l'activité donnée de départ, le cocktail Protamex présente une activité satisfaisant la donnée fournisseur.

L'analyse des activités β -glucanase et cellulase ont montré des résultats satisfaisants pour le cocktail Cellulase qui présente une activité qui satisfait aux données fournisseurs sur le substrat spécifique cellulase. Les autres cocktails étudiés en présence du substrat spécifique β -glucane montrent une activité inférieure aux données fournisseurs après un an de conservation. L'activité du cocktail AMG est nulle du fait de la spécificité du substrat non compatible.

D'autre part, l'analyse de l'activité protéase a mis en exergue la présence d'activité protéase résiduelle chez l'ensemble des cocktails enzymatiques étudiés. Ces valeurs d'activité sont plus ou moins importante allant de 11,8 à 646,2 $\mu\text{mol [S]}/\text{min/g}$. Le fournisseur annonce la possibilité d'avoir ce type d'activité résiduelle dans ses produits sans annoncer de valeurs finies.

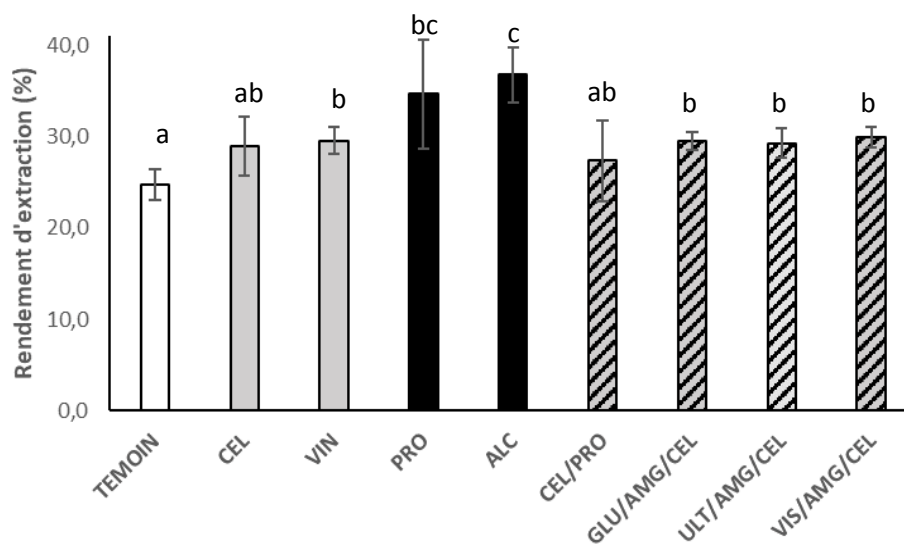


Figure 56 : Diagramme représentant les rendements d'extraction obtenu par le procédé d'Extraction Assistée par Enzymes sur *S. chordalis* (Rhodophycées). Codification : CEL : Cellulase ; VIN : Vino Taste Pro ; PRO : Protamex ; ALC : Alcalase ; GLU : Glucanex ; AMG : AMG 500 L ; VIS : Viscozyme. Les mélanges E/E (1/1, m/m) et E/E/E (1/1/1, m/m).

*2.1.2. Rendements d'extraction des composés de *S. chordalis* après l'Extraction Assistée par Enzyme.*

S. chordalis a été traitée par différentes enzymes et mélanges d'enzymes afin d'extraire les composés hydrosolubles. Les rendements d'extraction obtenus en fonction des enzymes utilisées sont présentés dans le diagramme **Figure 56**.

Afin d'évaluer l'efficacité des enzymes pour l'extraction des composés de la matière première, un témoin est réalisé dans les mêmes conditions sans ajout d'enzyme.

Les rendements mesurés montrent que l'ensemble des enzymes permet d'augmenter l'efficacité de l'extraction. Hormis la Cellulase et le mélange CEL/PRO, toutes les autres enzymes et mélanges testés montrent une différence significative par rapport au rendement par hydrolyse aqueuse (24,7%). Les deux enzymes qui présentent une efficacité plus importante sont les deux protéases Protamex (34,7 %) et Alcalase (36,8%). Malgré un rendement moyen plus important obtenue avec l'Alcalase, les valeurs ne présentent pas de différences significatives entre elles du fait d'une variabilité importante ($\pm 6\%$) mesurée avec l'enzyme Protamex. En comparaison, l'application du cocktail enzymatique Vino Taste Pro ne permet pas d'atteindre cette efficacité en améliorant de 5% le rendement d'extraction. Le couplage de trois enzymes (amylase, cellulase et β -glucanase) en proportion égale par rapport au test réalisé sur les enzymes seules montre une très faible augmentation du rendement par rapport à la cellulase seule (inférieure à 1%). Cependant, ces rendements sont significativement plus importants que le rendement témoin.

2.1.3. Analyse de la composition biochimique des extraits obtenus par l'Extraction Assistée par Enzyme :

La composition biochimique des différents hydrolysats obtenus par l'Extraction Assistée par Enzyme (EAE) a été analysée. Les résultats sont présentés dans le **Tableau XXXI**.

Tableau XXXI: Composition biochimique des extraits hydrosolubles obtenus par l'Extraction Assistée par Enzymes.

	Matière minérale (% MS)	Groupements sulfates	Sucres totaux	Protéines	Acides uroniques
TEMOIN	68,7 ± 0,7 ^a	1,4 ± 0,6 ^a	11,4 ± 0,2 ^a	4,2 ± 0,2 ^a	1,2 ± 0,08 ^a
CEL	65,2 ± 2,5 ^b	2,5 ± 0,4 ^{ab}	19,1 ± 1,4 ^b	5,5 ± 0,2 ^b	1,4 ± 0,09 ^a
VIN	58,9 ± 1,4 ^c	2,7 ± 0,3 ^b	27,5 ± 0,8 ^c	6,7 ± 0,7 ^c	0,4 ± 0,09 ^b
PRO	54,3 ± 1,2 ^c	2,2 ± 0,1 ^a	28,3 ± 0,8 ^c	8,2 ± 0,6 ^d	0,6 ± 0,07 ^b
ALC	61,2 ± 1,9 ^{bc}	1,9 ± 0,4 ^{ab}	25,9 ± 0,3 ^c	5,9 ± 0,3 ^{bc}	0,3 ± 0,08 ^b
CEL/PRO	62,7 ± 2,3 ^{ab}	3,1 ± 0,4 ^b	24,2 ± 0,5 ^d	4,9 ± 0,1 ^b	0,8 ± 0,1 ^c
GLU/AMG/CEL	56,9 ± 1,5 ^c	2,9 ± 0,1 ^b	22,6 ± 0,9 ^d	7,9 ± 0,5 ^d	1,1 ± 0,09 ^{ac}
ULT/AMG/CEL	59,1 ± 0,9 ^c	2,5 ± 0,4 ^{ab}	24,5 ± 1,1 ^{cd}	8,5 ± 0,8 ^d	0,9 ± 0,08 ^{ac}
VIS/AMG/CEL	60,3 ± 3,1 ^{bc}	1,7 ± 0,2 ^a	23,9 ± 0,7 ^{cd}	8,1 ± 0,1 ^d	0,7 ± 0,1 ^{cb}

L'étude de la composition des extraits obtenus par hydrolyse enzymatique montre un effet des enzymes dans la solubilisation de certains composés. Les compositions en sucres totaux, protéines et groupements sulfate sont les plus significatifs. En effet, l'extrait obtenu par hydrolyse aqueuse servant de témoin montre des taux de sulfates, protéines et sucres totaux de 1,4% ; 4,2% et 11,4% respectivement. Les extraits obtenus par l'application des différentes enzymes présentent tous des taux en sucres totaux et protéines significativement plus élevés avec une augmentation moyenne de l'ordre de 3 et 13% en protéines et sucres totaux respectivement. L'effet des enzymes sur la solubilisation des groupements sulfate serait une tendance avec une augmentation moyenne de 1%. Cependant, cette différence n'est pas significative pour tous les extraits (CEL, PRO, ULT/AMG/CEL et VIS/AMG/CEL). D'autre part, la composition minérale des extraits est très élevée dans le témoin comme dans les hydrolysats enzymatiques, ce taux variant de 54 à 69% montre que l'algue relargue une quantité importante de minéraux lorsqu'elle est dans un milieu hypotonique. Ceci signifie que l'effet des enzymes est négligeable sur l'extraction des minéraux. De plus, le taux d'acides uroniques présent dans l'extrait témoin semble également équivalent ou légèrement plus élevé que dans l'ensemble des extraits obtenus après EAE. Cependant ce taux est faible, inférieur à 2% avec des différences inférieures à 1%, ces résultats ne permettent pas d'exprimer un effet clair des enzymes sur l'extraction des acides uroniques. Enfin, la composition des extraits étant exprimés en pourcentage, le total des composés dosés n'atteint pas les 100%, cette différence pourrait être due à la présence de composés non dosés et à l'erreur de précision des dosages.

2.2. *Extraction par dioxyde de carbone (CO₂) supercritique*

2.2.1. *Rendement d'extraction par CO₂ supercritique*

Le procédé d'extraction par CO₂ supercritique a été utilisé pour la production d'extraits apolaires par traitement des macroalgues *S. chordalis*. Cette étude a été réalisée en appliquant trois types d'éluant composés de CO₂ en présence ou non de co-solvant (éthanol). L'efficacité des différents traitements ont été évalués et ont permis de déterminer des rendements d'extraction présentés dans le **Tableau XXXII**.

L'efficacité du procédé d'extraction par CO₂ supercritique a été exprimée par la détermination de deux rendements, le premier étant la quantité d'extrait obtenu et le second étant l'équivalent en lipides totaux extraits.

Tableau XXXII: Rendement d'extraction en extraits bruts et en lipides obtenus par traitement de *S. chordalis* par le procédé CO₂ supercritique dans différentes conditions.

Rendement d'extraction par CO ₂ supercritique				
Éluant	Co-solvant	Prétraitement	Rendement extrait brut (%)	Rendement en lipides totaux (%)
CO ₂	-		0,13 ± 0,04 ^a	4
CO ₂	2% Ethanol		1,21 ± 0,04 ^b	41
CO ₂	8% Ethanol		0,96 ± 0,04 ^c	32
CO ₂	2% Ethanol	Hydrolyse enzymatique Alcalase	0,43 ± 0,04 ^d	14,5

Tableau XXXIII: Distribution des différentes classes de lipides contenus dans les extraits par CO₂ supercritique issus de l'algue rouge *S. chordalis*.

Distribution des classes de lipides				
Éluant	Co-solvant	Lipides neutres	Glycolipides	Phospholipides
		% lipides totaux		
CO ₂	-	17,8 ± 1,0 ^a	59,8 ± 1,0 ^a	19,1 ± 1,0 ^a
CO ₂	2% Ethanol	56,4 ± 1,0 ^b	26,5 ± 1,0 ^b	14,5 ± 1,0 ^b
CO ₂	8% Ethanol	51,5 ± 1,0 ^c	37,5 ± 1,0 ^c	10,3 ± 1,0 ^c

Le rendement en extrait brut montre que l'ajout de co-solvant (éthanol) permet d'augmenter significativement l'efficacité de l'extraction. Cette augmentation est plus importante en présence de 2% d'éthanol (1,21%) et semble diminuer en augmentant la quantité de co-solvant. De plus, l'application d'un prétraitement préalable par une EAE ne montre pas d'augmentation significative du rendement d'extraction en conditions supercritiques, mais une perte d'efficacité de 64%. Le rendement exprimant l'équivalent en lipides totaux extraits est basé sur la différence entre le rendement en CO₂ supercritique et le rendement obtenu par l'extraction des lipides par la méthode de Bligh et Dyer (1959) de 2,96% de la matière sèche (Terme et al., 2017). Cette valeur est prise en compte comme référence équivalant à la fraction de lipides totaux contenue dans *S. chordalis*. On remarque que les rendements en lipides totaux obtenus par le procédé d'extraction au CO₂ supercritique sont faibles comparé à la fraction lipidique totale présente dans l'algue.

2.2.2.Détermination de la distribution des classes de lipides dans les extraits bruts

Une étude de la distribution des classes de lipides au sein des différents extraits obtenus en fonction de l'éluant appliqué a été réalisée. Les résultats sont présentés dans le **Tableau XXXIII**.

La proportion des trois classes de lipides représentés par des lipides neutres, des glycolipides et des phospholipides a été quantifiée dans chaque extrait obtenu après extraction au CO₂ supercritique. Les résultats montrent qu'il y a une différence de répartition des classes en fonction de l'éluant utilisé. L'extrait obtenu sans co-solvant est majoritairement composé de glycolipides (60%) avec des taux de phospholipides et lipides neutres plus faibles (19,1% et 17,8% respectivement). L'analyse des extraits obtenus par l'ajout d'un co-solvant, ici l'éthanol, modifie la répartition des classes de lipides. L'ajout d'éthanol favorise davantage l'extraction de lipides neutres au détriment de l'extraction des glycolipides et des phospholipides. En effet, les résultats obtenus montrent une baisse significative de 33,3% et 22,3% des glycolipides dans les extraits obtenus par l'ajout de 2% et 8% d'éthanol respectivement.

Tableau XXXIV: Rendement d'extraction en carraghénanes obtenus par traitement des résidus de *S. chordalis* prétraités par les procédés d'Extraction Assistée par Enzyme (EAE ; ALC, PRO, VIN) ou par CO₂ supercritique (ScCO₂).

Extraction Assistée par Microondes				
Prétraitement	Traitement Natif		Traitement Alcalin	
	Température	Temps	Température	mps
	90°C	10 min	105°C	25 min
TEMOIN	4 ± 3,4 ^a		21,8 ± 4,4 ^a	
ALC	3 ± 4,2 ^a		25,1 ± 2,0 ^b	
PRO	1 ± 2,1 ^b		18,7 ± 5,2 ^{ab}	
VIN	2 ± 1,5 ^{ab}		22,2 ± 3,2 ^{ab}	
ScCO2	± 1,7 ^c		6,1 ± 0,9 ^c	
* Rendement ± Écart-type (en %) pour un effectif n=3.				

2.3. Extraction Assistée par Microondes appliquée à l'extraction des carraghénanes à partir de résidus de *S. chordalis*.

2.3.1.Évaluation de l'effet des prétraitements sur le rendement d'extraction en carraghénane.

Suite à l'étude des rendements et de la composition des extraits obtenus par l'EAE et l'extraction par CO₂ supercritique, les résidus de *S. chordalis* ont été traités par Extraction Assistée par Microondes (EAM) dans l'objectif d'en extraire la fraction de carraghénane. L'EAM a été réalisée dans deux conditions différentes, les rendements d'extraction en carraghénanes obtenus sur les résidus sont présentés dans le **Tableau XXXIV**.

L'extraction des carraghénanes sur le résidu d'algue ayant été traité par hydrolyse aqueuse (comparable au témoin de contrôle de l'extraction enzymatique) conduit à des rendements d'extraction de 25,4% et 21,84 % en conditions native et alcaline respectivement. Les extractions réalisées sur les résidus traités par EAE (ALC, PRO et VIN) présente une efficacité réduite en conditions natives avec des rendements de 22,3% ; 15,1% et 17,2% pour ALC, PRO et VIN respectivement. Cependant, cette diminution du rendement n'est pas significative pour le rendement obtenu sur le résidu traité par ALC. Au contraire, les deux autres rendements présentent une différence significative par rapport au rendement obtenu sur le témoin. En condition native, les rendements obtenus sur les résidus traités montrent des tendances différentes. L'extraction de carraghénanes par EAM réalisée sur le résidu traité par Alcalase (ALC) présente un rendement significativement plus important (25,1%) par rapport au témoin. L'extraction réalisée dans les mêmes conditions sur les résidus PRO et VIN présente des rendements de 18,7% et 22,2% respectivement. Cependant, ces rendements ne sont pas significativement différents des rendements obtenus par le témoin et ALC.

L'extraction des carraghénanes par EAM a également été réalisée sur le résidu de *S. chordalis* traité par CO₂ supercritique (ScCO₂). Les rendements obtenus par traitement natif et alcalin sont respectivement de 6,9% et de 6,1%. Ces valeurs montrent une diminution très significative de l'efficacité de l'extraction par rapport au témoin ou aux résidus traités par hydrolyse enzymatique.

Tableau XXXV: Composition biochimique des extraits de carraghénane issus des résidus prétraités de *S. chordalis* par traitement aux microondes. Les prétraitements correspondent à l'hydrolyse aqueuse (TEMOIN) ; des Extractions Assistées par Enzyme (Alcalase : ALC ; Protamex : PRO ; Vino Taste Pro : VIN) et par CO₂ supercritique (ScCO₂).

Prétraitements	Conditions d'Extraction Assistée par Microondes					
	Natif			Alcaline		
	90°C	10 min		105°C	25 min	
	Sulfates totaux	3,6 anhydrogalactose	Sucres totaux	Sulfates totaux	3,6 anhydrogalactose	Sucres totaux
TEMOIN	25,6 ± 0,7 ^a	25,4 ± 2,5 ^a	13,6 ± 2,1 ^a	28,3 ± 1,5 ^a	32,1 ± 2,3 ^a	12,7 ± 1,6 ^a
ALC	20,3 ± 0,4 ^b	24,2 ± 1,4 ^a	12,4 ± 1,3 ^a	21,1 ± 1,6 ^b	31,1 ± 3,0 ^a	12,2 ± 1,9 ^a
PRO	21,9 ± 0,4 ^c	26,3 ± 1,0 ^a	13,1 ± 1,1 ^a	23,7 ± 0,3 ^c	31,0 ± 1,6 ^a	12,9 ± 1,6 ^a
VIN	16,5 ± 0,3 ^d	22,2 ± 0,3 ^b	11,9 ± 1,5 ^a	26,0 ± 3,6 ^{ac}	29,6 ± 2,2 ^a	12,1 ± 1,1 ^a
ScCO₂	12,9 ± 0,2 ^e	15,0 ± 1,1 ^c	12,3 ± 2,2 ^a	22,2 ± 1,0 ^c	20,2 ± 1,6 ^b	13,2 ± 1,8 ^a

2.3.2.Effet des prétraitements sur la composition biochimique des carraghénanes

Les extraits de carraghénanes obtenus par l'Extraction Assistée par Microondes sur les différents résidus précédemment présentés ont été analysés afin de déterminer la composition biochimique en sulfates, 3,6 anhydrogalactose et en sucres totaux. Les concentrations mesurées pour chaque extrait sont présentées dans le **Tableau XXXV**.

L'analyse de la composition biochimique de l'échantillon de carraghénane extrait du résidu de *S. chordalis* traité par l'hydrolyse aqueuse montre des taux de 25,6% ; 25,4% et 13,6% en sulfates, 3,6 anhydrogalactose (3,6 AG) et sucres totaux respectivement lorsque l'extraction est réalisée en conditions natives à 90°C pendant 10 min. L'extrait de carraghénanes obtenu à partir du même résidu en condition alcaline (105°C, 25 min) présente une composition significativement plus élevée en sulfates et en 3,6 AG (28,3 et 32,1 % respectivement) ; la quantité de sucres totaux ne varie pas significativement.

La composition des extraits de carraghénanes obtenus par l'extraction en condition native à partir des résidus prétraités par l'Extraction Assistée par Enzyme montre une variation significative du taux de sulfates et de 3,6 AG. La quantité de sulfate diminue de manière significative pour chaque extrait (16,5 à 20,3%) alors que le taux de 3,6 AG diminue significativement pour le prétraitement par la β -glucanase (VIN, 22,2%). Les extraits obtenus par le traitement alcalin aux microondes ne présentent pas de diminution significative du taux de 3,6 AG contrairement aux taux de sulfate qui diminuent (21 à 26%).

L'analyse de la composition de l'extrait de carraghénanes obtenu par traitement aux microondes du résidu prétraité aux CO₂ supercritique montre une variation significative du taux de sulfate et de 3,6 AG. En effet, le traitement natif et alcalin par microondes a permis d'obtenir des extraits de carraghénanes présentant respectivement un taux de sulfate (12,9% et 22,2%) et de 3,6 AG (15% et 20,2%) significativement inférieur à ceux obtenus dans le résidu témoin. Par contre, le taux de sucre totaux reste similaire.

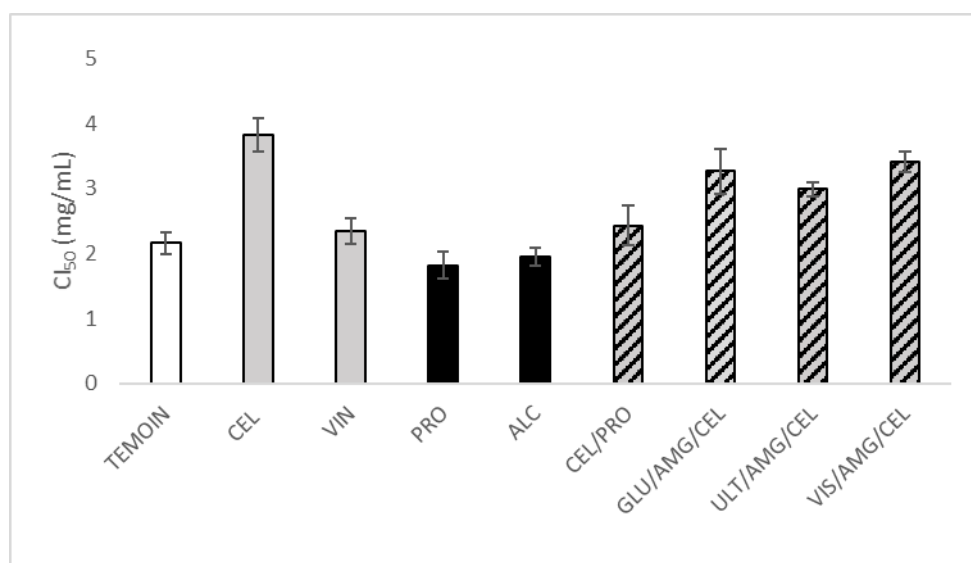


Figure 57: Histogramme présentant les activités antiradicalaires des extraits obtenus par Extraction Assistée par Enzymes. Les résultats sont exprimés en Cl_{50} équivalent à la concentration nécessaire pour réduire de 50% la formation de radicaux libres. Les concentrations sont en mg/mL.

2.3.3. Évaluation de l'activité antiradicalaire des extraits hydrosolubles de *S. chordalis*

L'activité antiradicalaire des extraits de *S. chordalis* obtenue après Extraction Assistée par Enzyme a été évaluée. Les résultats obtenus pour chaque extrait sont présentés dans par la **Figure 57** sous forme d'histogrammes. Les valeurs sont exprimées en CI_{50} , concentration inhibant de 50% la formation de radicaux libres.

L'activité des extraits obtenus par hydrolyse enzymatique est comparée à l'activité de l'extrait témoin obtenu par hydrolyse aqueuse sans l'action des enzymes. L'extrait témoin présente une activité antiradicalaire avec une CI_{50} équivalent à $2,16 \pm 0,16$ mg/mL.

Les résultats obtenus pour les hydrolysats montrent une grande variabilité. Les hydrolysats obtenus par les deux protéases Protamex (PRO) et Alcalale (ALC) montrent une CI_{50} plus faible que celle du témoin avec de valeurs de $1,82 \pm 0,21$ et $1,95 \pm 0,14$ mg/mL. L'activité antiradicalaire est inversement proportionnelle à l' IC_{50} , ce qui signifie qu'une faible valeur correspondant à une inhibition importante de la formation de radicaux libres.

Les hydrolysats obtenus par le mélange d'enzyme CEL/PRO (Cellulase et Protamex (v/v)) et VIN (Vino Taste Pro) montrent des activités relativement similaires à l'activité de l'échantillon témoin avec de valeurs CI_{50} de $2,34 \pm 0,20$ et $2,43 \pm 0,30$ mg/mL respectivement. Toutefois, les autres hydrolysats obtenus par les enzymes présentant des activités cellulase et β -glucanase montrent des activités bien inférieures avec des valeurs CI_{50} comprises entre $2,99 \pm 0,11$ et $3,83 \pm 0,25$ mg/mL.

3. Discussion

3.1.1. L'étude de l'Extraction Assistée par Enzyme

L'intérêt de l'application des enzymes dans le domaine des biotechnologies marines n'est pas récent, les applications aux algues rouges sont nombreuses (**Tableau XXXVI**). Les premières études ont montré l'intérêt de la biocatalyse par le champignon marin *Dendryphiella arenaria* (Ladisch *et al.*, 1983). Cet intérêt n'a cessé d'augmenter ces dernières années avec la nécessité de

Tableau XXXVI : Présentation d'application de l'Extraction Assistée par Enzyme pour l'obtention d'extraits de Rhodophycées.

Cocktails Enzymatique	Activité enzymatique	Enzyme produite par	Conditions			Espèces d'algue rouge	Références
			Température (°C)	Temps (h)	pH		
Celluclast 1,5 L FG	Cellulase	<i>Trichoderma reesei</i> ATCC 26921	50	12 à 24	4,5	<i>Osmundea pinnatifida</i> <i>Chondrus crispus</i> <i>Garcilaria verrucosa</i> <i>Kappaphycus alvarezii</i> <i>Euclima cottonii</i>	Lahaye et Vigouroux, 1992 ; Fleurence <i>et al.</i> , 1999b ; Ahn <i>et al.</i> , 2004 ; Heo <i>et al.</i> , 2005 ; Athukorala <i>et al.</i> , 2006 ; Wang <i>et al.</i> , 2010 ; Wijesinghe et Jeon, 2012 ; Abd-Rahim <i>et al.</i> , 2014 ; Rodrigues <i>et al.</i> , 2015 ; Tan et Lee , 2016
Cellulosin T2	Cellulase	<i>Trichoderma sp.</i>	37	48	4,5		Okuda <i>et al.</i> , 2008
Panlyve HCB 10	Xylanase	<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-		Fleurence <i>et al.</i> , 1999b
Pentosanase	Pentosanase	<i>Aspergillus niger</i>	40	24	4,5		Lahaye et Vigouroux, 1992
Shearzyme 500 L	Endo-1,4- xylanase	<i>Aspergillus arysae</i>					Fleurence <i>et al.</i> , 1999b
Ultraflo L	β -glucanase	<i>Humicola insolens</i>	60	12 à 24	7	<i>Grateloupia turuturu</i>	Fleurence <i>et al.</i> , 1999b ; Ahn <i>et al.</i> , 2004 ; Heo <i>et al.</i> , 2005 ; Athukorala <i>et al.</i> , 2006 ; Wang <i>et al.</i> , 2010 ; Wijesinghe <i>et al.</i> , 2011 ; Le Guillard <i>et al.</i> , 2015

Cocktails Enzymatique	Activité enzymatique	Enzyme produite par	Conditions			Espèces d'algue rouge	Références
			Température (°C)	Temps (h)	pH		
Viscozyme L	Arabanase, cellulase, β - glucanase, hemicellulase et xylanase	Aspergillus acculeatus	50	24	7	<i>Osmundea pinnatifida</i> <i>Gracilaria verrucosa</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2015 ; Kwon <i>et al.</i> , 2016
Sumizyme TG	β -1,3 glucanase Botrytis glucanase		50	6	4	<i>Grateloupia turuturu</i>	Le Guillard <i>et al.</i> , 2016
Sumizyme MC	Polygalacturon ase		45	6	5	<i>Grateloupia turuturu</i>	Le Guillard <i>et al.</i> , 2015
Multifect® CX 15 L	Cellulase β glucosidase		55	6	5	<i>Grateloupia turuturu</i>	Le Guillard <i>et al.</i> , 2015

Cocktails Enzymatique	Activité enzymatique	Enzyme produite par	Conditions			Espèce d'algue rouge	Références
			Température (°C)	Temps (h)	pH		
Alcalase 2,4 L FG	Alcaline endoprotéase	<i>Bacillus licheniformis</i>	50	12 à 24	8	<i>Osmundea pinnatifida</i> <i>Porphyra columbina</i>	Ahn <i>et al.</i> , 2004 ; Athukorala <i>et al.</i> , 2006 ; Wang <i>et al.</i> , 2010 ; Wijesinghe <i>et al.</i> , 2011 ; Cian <i>et al.</i> , 2012 ; Rodrigues <i>et al.</i> , 2015
Protamex	Endo- protéase neutre et alcaline	<i>Bacillus sp.</i>	40	12 à 24	6		Ahn <i>et al.</i> , 2004 ; Heo <i>et al.</i> , 2005 ; Athukorala <i>et al.</i> , 2006 ; Wang <i>et al.</i> , 2010 ; Wijesinghe <i>et al.</i> , 2011
Trypsin	Endo- protéase	<i>Intestin</i>	50	4	9	<i>Porphyra columbina</i>	Cian <i>et al.</i> , 2012
Umamizyme	Endo-, exopeptidase	<i>Aspergillus oryzae</i>	50	24	7	<i>Palmaria palmata</i>	Wang <i>et al.</i> , 2010
Flavourzyme	Endoprotéase, exopeptidase	<i>Aspergillus oryzae</i>	50	24	7	<i>Osmundea pinnatifida</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2015

développer de nouveaux procédés permettant de liquéfier les parois, notamment celles des microalgues afin de libérer les composés d'intérêt (Carrillo-Reyes, Barragan-Trinidad et Buitron, 2016). Les études portent principalement sur le traitement de la biomasse par la cellulase, cependant les travaux de recherches se sont orientés vers d'autres enzymes hydrolytiques telles que les hémicellulases, pectinases, amylases et protéases, mais également des cocktails enzymatiques (Trincone, 2017). Dans le cas des macroalgues, les enzymes produites par les microorganismes ont la capacité de pouvoir déstructurer la paroi cellulaire permettant d'accéder au contenu cellulaire et de se solubiliser dans l'eau (Hardouin et al. 2014).

Dans cette étude, l'Extraction Assistée par Enzyme a été réalisé à 40 °C pendant 24 h avec un ratio de 5% enzyme/biomasse (une ou plusieurs enzymes) sans dénaturation de l'enzyme. Des études antérieures ont été réalisées sur l'optimisation des paramètres de l'hydrolyse enzymatique de *S. chordalis* (Hardouin et al., 2014 ; Burlot et al., 2016). Ces deux études présentent des rendements très différents malgré une température et un temps de chauffage similaires (50°C, 300 min). En effet, Hardouin et al. (2014) appliquent un facteur de dilution de 50% de la biomasse dans l'eau avec un apport de 0,5% d'enzyme/biomasse et une dénaturation à 90°C pendant 15 min. Burlot et al. (2016) ont utilisé un facteur de dilution de 6,5% avec un apport d'enzyme de 5% et une période de dénaturation identique mais à 85°C.

Ces deux protocoles présentent des rendements d'extraction témoin sans enzyme variant de 11,6 à 40% de matière sèche solubilisée, ceci est révélateur de l'influence importante des paramètres d'extractions appliqués. Le rendement obtenu dans notre étude par l'hydrolyse aqueuse sans enzyme est de 24,7%.

Ces deux études précédentes concernent des enzymes ayant des activités spécifiques différentes du type protéase (endo-peptidase, endo-protéase, subtilisine, exopeptidase et neutral metallo protéinase), glucanase (β -glucanase, arabinase, amyglucosidase, α -amylase, endo- β -glucanase et polygalacturonase- β -glucanase), xylanase et cellulase. Elles ont, notamment, montré un effet important des protéases dans l'efficacité du rendement d'extraction avec des rendements augmentant de 30 à 40% la quantité de matière sèche solubilisée. Les enzymes ayant des activités subtilisine et endo-protéase présentent la meilleure efficacité dans chacune des études. Les résultats que nous obtenons confirment ces résultats avec les mêmes tendances observées. Les rendements les plus importants ont été obtenus avec les enzymes ALC et PRO étant des endoprotéases. Cependant, malgré des conditions proches d'extraction (températures et rapport Enzyme/substrat),

le rendement obtenu par les protéases est inférieur à ceux obtenu par Burlot *et al.* (2016). Ceci peut s'expliquer par l'absence d'étape de dénaturation des enzymes avec un chauffage à haute température (85°C) pendant une courte période (15 min) entraînant une variation sensible du rendement.

D'autres études portent sur le traitement par EAE d'espèces d'algue rouges comme les travaux sur l'espèce *Chondrus crispus* (Rhodophycée, Gigartinales) de Kulshreshtha *et al.* (2015). Cette étude est intéressante car elle présente des conditions d'extraction proches des conditions appliquées à *S. chordalis* précédemment citées. Les résultats de cette étude montrent une efficacité plus importante de la cellulase et de β -glucanase par rapport à une protéase. La cellulase permet notamment d'augmenter de 1,8 fois le rendement par rapport au témoin d'hydrolyse aqueuse (25%) en comparaison la protéase augmente de 0,8 fois le rendement (Kulshreshtha *et al.*, 2015). Cependant, le traitement par EAE de *Chondrus crispus* montre que les enzymes les plus efficaces sont les carbohydrases. Ceci montre que l'effet des enzymes est dépendant du type de l'algue de sa période de récolte, du type de paroi. La composition de la paroi des algues est un facteur important influençant l'efficacité du procédé.

Les travaux de Kulshreshtha *et al.* (2015) ont porté également sur l'efficacité d'un mélange d'enzyme ayant des activités différentes. Cette idée a également été développée dans l'étude de Le Guillard *et al.* (2016) par EAE dans le but d'extraire la phycoérythrine de *Grateloupia turuturu*. Un mélange de quatre enzymes (Sumizyme MG Sumizyme TG, Multifect® CX et Ultraflo® XL) comprenant des glucanases et des protéases avait montré la capacité de solubiliser 71% de la biomasse après 6 heures de traitement.

En comparaison, les résultats obtenus au cours de notre étude ne montrent pas d'effets favorables de l'application de tels mélanges. Les quatre mélanges testés composés de deux ou trois enzymes ne permettent pas d'améliorer ou d'atteindre des rendements plus importants que ceux obtenus par l'application des protéases.

En effet, la composition biochimique des algues et notamment la composition de la paroi cellulaire varie d'une espèce à l'autre et au cours du cycle biologique (Usov, 1998). Cette variabilité est aussi notable chez une même espèce en fonction de sa saison (Burlot, 2016). La présence des polysaccharides, composant majeur des parois, influence également l'efficacité des enzymes du fait qu'ils interagissent avec d'autres constituants (Dumay *et al.*, 2013). La composition de la paroi

cellulaire des algues rouges est bien connue, cependant l'organisation des constituants au sein de la structure n'est pas toujours clairement démontrée.

Dans le cas de *S. chordalis*, les études d'EAE ont montré que les protéases s'avéraient les plus efficaces sur la liquéfaction de la paroi. L'ordre des Rhodophycées est reconnu pour présenter une fraction importante de protéines par rapport aux Chlorophycées et Phéophycées (Fleurence, 1999). La présence au sein de la paroi cellulaire de protéines et de glycoprotéines expliquerait sa déstructuration sous l'effet des protéases par la lyse des liaisons peptidiques. Cependant, une étude approfondie des interactions intermoléculaires au sein de la paroi pourrait permettre d'optimiser l'effet et le rôle surtout des enzymes sur la déstructuration pariétale afin de favoriser la libération de composés.

3.1.2. L'étude de l'Extraction par CO₂ supercritique.

Contrairement aux microalgues, les macroalgues sont connues pour posséder une quantité de lipides inférieure à celle des végétaux supérieurs (Darcy-Vrillon 1993 ; Mendes, Reis et Palavra, 2006 ; Couto *et al.*, 2010 ; Mubarak, Shaija et Suchithra, 2015). Les espèces de macroalgues rouges (1%) tout comme les algues vertes (0,7%) renferment un contenu lipidique à des taux inférieurs aux espèces d'algues brunes (jusqu'à 4%). De ce fait, les études cherchant à développer des applications visant à extraire les lipides de macroalgues sont peu nombreuses. L'application du CO₂ supercritique est un procédé étudié pour l'isolation des fractions de composés apolaires tels que les composés phénoliques, les terpènes, vitamines, stérols et les lipides. Ce système est appliqué dans de nombreuses études sur les microalgues et les plantes terrestres avec une certaine efficacité (Grosso *et al.*, 2015 ; da Silva *et al.*, 2016). L'extraction des fractions lipidiques des microalgues par le procédé supercritique est un thème très publié. Altenhofen da Silva *et al.* (2016) ont montré récemment l'efficacité de ce procédé sur l'espèce de microalgues *Desmodesmus subspicatus* permettant d'atteindre des rendements d'extraction de 45% de la matière première. Cette efficacité a été vérifiée sur d'autres espèces telles que *Nannochloropsis sp.* avec des rendements 34% avec le dioxyde de carbone et atteignant les 45% par ajout d'éthanol en co-solvant (Nobre *et al.*, 2013). De manière générale, le procédé d'extraction par CO₂ supercritique appliqué à l'extraction des lipides de microalgues montre des rendements élevés et semble plus efficace que la méthode traditionnelle utilisant les solvants organiques de Bligh et Dyer (Mendes, Reis et Palavra, 2006 ; Nobre *et al.*, 2013 ; Altenhofen da Silva *et al.*, 2016). Toutefois, quelques études montrent des rendements

inférieurs tels que l'étude de Couto *et al.* (2010) qui observe moins d'efficacité du CO₂ supercritique pour l'extraction des lipides de *Cryptocodinium cohnii*.

Dans le cas des macroalgues, l'extraction des fractions lipidiques par le CO₂ supercritique montre peu d'efficacité. L'étude sur *Hypnea charoides* (Rhodophycées, Gigartinales) montre une diminution du rendement par trois lorsque l'extraction est réalisée au CO₂ supercritique comparée à l'extraction au Soxhlet (chloroforme/méthanol) (Cheung 1999 ; Wong et Cheung 2001). Notre étude montre également cette tendance, cependant les résultats mettent en évidence que l'ajout d'un co-solvant peut améliorer le rendement d'extraction des composés lipidiques *S. chordalis*. L'effet de l'ajout du co-solvant sur l'amélioration de l'efficacité de l'extraction par CO₂ supercritique concorde avec les observations de Mendes *et al.* (2006) et Nobre *et al.* (2013).

L'application du prétraitement de la biomasse dans l'objectif d'améliorer l'accessibilité aux composés cellulaires est une voie à explorer et elle est souvent citée (Michalak, Tuhy et Chojnaka, 2015). Le couplage du prétraitement par l'action d'enzymes sur l'efficacité de l'extraction de composés par CO₂ supercritique a été montré dans une étude sur le fruit du gac, *Momordica cochinchinensis* (Cucurbitacées). L'application du prétraitement enzymatique sur cette matière première a montré un effet significatif sur le rendement d'extraction des caroténoïdes par CO₂ supercritique (Kha, Phan-Tai et Nguyen, 2014).

Dans le cas de *S. chordalis*, le prétraitement appliqué sur la matière première avec l'enzyme Alcalase présentant la meilleure efficacité pour l'Extraction Assistée par Enzyme n'a pas montré d'effet significatif sur le rendement obtenu par CO₂ supercritique. On remarque une baisse de plus de 60% du rendement obtenu par l'extraction sans prétraitement dans les mêmes conditions.

Le rôle des co-solvants sur l'effet de la sélectivité des composés apolaires n'est pas totalement détaillé dans la littérature. Théoriquement, l'ajout de co-solvant polaire tel que l'éthanol en complément du CO₂ supercritique augmente la polarité d'où l'obtention d'extraits composés de lipides majoritairement polaires et neutres (Temelli 1992). De plus, la pénétration étant facilitée au sein de la biomasse algale, l'accessibilité des lipides neutres pour les solvants non polaires est améliorée, augmentant la quantité de lipides neutres (Li *et al.*, 2014). Notre étude montre la tendance suivante : l'ajout d'éthanol pour l'extraction de la fraction lipidique de *S. chordalis* favorise l'extraction des lipides neutres au détriment des phospholipides sans affecter le contenu en glycolipides. Ceci a également été décrit par Mendes, Reis et Palavra, (2006) durant l'extraction des

lipides de la microalgue *Arthospira maxima*. Cette étude a notamment montré une augmentation de l'extraction de lipides neutres de 24,5 à 70,9% par l'extraction au CO₂ supercritique par rapport à la méthode de Bligh et Dyer. L'ajout d'éthanol permet une augmentation du taux de lipides neutres de 10,8%, sans modifications du taux de glycolipides mais avec une baisse du taux de phospholipides de 18,4%. Les tendances observées sur les extraits de *S. chordalis* concordent avec les observations de Mendes, Reis et Palavra, (2006). Les profils des différentes fractions de lipides extraites de *S. chordalis* par la méthode de Bligh et Dyer (1959), ont été décrits par Mendel *et al.* (2015). L'étude montre la présence majoritaire d'acides gras saturés (59%) par rapport aux mono insaturés (26%) et aux polyinsaturés (15%). Une fraction d'acides gras insaponifiables (10% du total des lipides) est également détectée et composée principalement de stérols dont le cholestérol (42%). La fraction de glycolipides (38% des lipides totaux) est composé d'acide gras sulfatés (63% ; dont 16 :0 et 19 :0) et de forme mono insaturée (27% ; 17 :1n-5).

3.1.3. Effet du prétraitement sur la composition des carraghénanes.

L'extraction des carraghénanes par EAM a montré une grande différence entre les rendements obtenus entre le témoin et les extraits obtenus avec enzymes et le traitement par CO₂ supercritique. La différence d'efficacité observée sur le résidu prétraité par l'enzyme Vino Taste Pro peut être expliquée par l'activité de l'enzyme. Cette enzyme présente deux types d'activités spécifiques principales qualifiées de polygalacturonase et de β -glucanase (exo-1-3). La diminution du rendement d'extraction pourrait être due à une dépolymérisation de la structure des carraghénanes par l'action de l'enzyme sur les liaisons glycosidiques (Haijin, Xiaolu et Huashi, 2003). Ceci ayant deux effets : l'un d'avoir libéré une quantité de sucres plus importante lors de l'hydrolyse enzymatique avec une action sur les carraghénanes composant la paroi de l'algue ; le deuxième effet est la dépolymérisation des polysaccharides présents dans la biomasse. Le faible rendement observé pour l'extraction des carraghénanes à partir du résidu traité par CO₂ supercritique est difficile à expliquer par l'absence de travaux sur l'impact de ce traitement sur les polysaccharides. Cependant, l'application de modifications structurelles des carraghénanes par voie chimique est un domaine très étudié pour l'obtention de polysaccharides de faible poids moléculaire (Yamada, 2000). L'utilisation de différents acides dans les réactions chimiques permet de dépolymériser les carraghénanes afin d'entraîner des modifications structurales. L'effet des conditions acides (pH 3 – 4) ont été décrites comme ayant un effet sur la stabilité des carraghénanes entraînant dégradations sévères de leur structure (Masson *et al.* 1954 ; Robal *et al.* 2017). De ce fait, il est possible que le

traitement par le CO₂ supercritique, fluide présentant un pH acide, entraîne une dépolymérisation des carraghénanes. Ceci pourrait également expliquer le taux inférieur en sulfate et 3,6 anhydrogalactose.

3.1.4. L'activité antiradicalaire des extraits hydrosolubles de l'EAE.

Le réactif DPPH est un donneur de radicaux libres, il permet de manière simple d'évaluer la capacité d'un extrait à bloquer la formation de ces radicaux. De précédentes études ont démontré l'activité antiradicalaire des extraits hydrosolubles obtenus par hydrolyse enzymatique de macroalgues rouges et brunes. Wang (2009) a réalisé une étude montrant l'activité antiradicalaire d'extraits hydrosolubles de différentes espèces de Rhodophycée et de Phéophycées. Les résultats montrent une activité entre 40 à 60 fois plus importante pour les espèces d'algues brunes notamment chez des extraits de *Fucus* et *Ascophyllum* qui présentent les meilleures activités avec des valeurs CI₅₀ comprise entre 17 et 25 µg/mL. Les extraits d'algues rouges présentent des activités antiradicalaires avec des valeurs CI₅₀ comprises entre 100 µg/mL à plus de 1 mg/mL. Les extraits hydrosolubles de *Chondrus crispus* et *Palmaria palmata* présentent les valeurs les plus faibles. Cependant, les valeurs obtenues par les extraits de ces deux algues sont du même ordre de grandeur que l'extrait hydrosoluble de *S. chordalis* équivalent au témoin. Cette différence entre les extraits d'algues brunes et d'algues rouges s'explique principalement par la composition. La présence de taux élevés en composés phénoliques dans les extraits d'algues brunes pourrait expliquer l'activité forte des extraits (Heo et al. 2005).

Chez les Rhodophycées l'activité antiradicalaire n'étant pas liée à la présence importante de composés phénoliques, cette activité est dépendante d'autres paramètres. Une étude sur l'hydrolyse enzymatique de *Palmaria palmata* a montré des rendements d'extraction d'environ 60% par l'application de l'Alcalase et de Protamex et atteignant les 80% à l'aide de l'enzyme Umamizyme qui est également une protéase (Wang et al. 2010). L'activité antiradicalaire des hydrolysats a été évaluée par un test DPPH. L'activité la plus importante est obtenue par l'extrait Umamizyme qui d'ailleurs avait montré un meilleur rendement d'extraction. La CI₅₀ déterminée est de 625 µg/mL. Les autres extraits obtenus par des protéases ont des valeurs comprises entre 1,4 et 2 mg/mL. Afin de déterminer les facteurs pouvant influencer l'activité antiradicalaire de l'extrait, les chercheurs ont analysé la concentration en composés phénoliques des extraits. L'hydrolysate obtenu par Umamizyme montre une concentration en composés phénoliques de 15 µg/L comparée aux autres

extraits qui présentent des concentrations égales ou inférieures à 10 µg/L. Cependant, cette faible différence de concentration n'explique pas à elle seule l'importante différence d'activité.

Une étude réalisée sur l'algue rouge *Porphyra columbina* permet d'élucider d'autres facteurs pouvant influencer l'activité antiradicalaire (Cian, Martinez-Augustin et Drago, 2012). Ce travail a consisté à étudier l'effet du traitement des enzymes sur l'activité de la fraction protéique de *P. columbina*. Plusieurs traitements ont été réalisés sur la fraction protéique à l'aide de l'enzyme Alcalase et la trypsine en les appliquant de manière indépendante et simultanée. La fraction protéique non traitée présente une activité antiradicalaire de 4,2 mg/mL alors que les fractions protéiques présentent des activités comprises entre 2,7 et 3,0 mg/mL. Les auteurs expliquent que cette différence d'activité est liée aux poids moléculaires des peptides formés. En effet, le traitement des protéases induit la lyse de la chaîne protéique libérant des peptides qui peuvent être coupés par la suite jusqu'à obtenir des fractions peptidiques de bas poids moléculaires.

Le traitement de *S. chordalis* par Extraction Assistée par Enzyme par l'application d'enzymes de différentes spécificités peut expliquer en partie ces différences d'activités. Le traitement par les protéases a premièrement démontré une meilleure efficacité pour la solubilisation des composés de l'algue dans le milieu. Ceci induit la possibilité d'avoir une fraction de composés non dosés pouvant influencer l'activité. Il pourrait s'agir de polyphénols malgré que leur présence chez les algues rouges soit faible.

De plus, le traitement par les protéases permet d'augmenter la libération des composés intracellulaires par la déstructuration de la paroi en agissant sur les glycoprotéines. Ces enzymes ont la capacité de pouvoir lyser les liaisons peptidiques des protéines formant des peptides de bas poids moléculaires. L'application de carbohydrases comme la cellulase et les β -glucanases n'ont pas cette capacité de lyser les liaisons peptidiques. Ces enzymes agissent sur les sucres pariétaux tels que les carraghénanes ou l'amidon floridéen.

4. Conclusion

L'étude des procédés d'extraction et de leurs couplages dans un concept de bioraffinerie a permis d'identifier l'effet des procédés sur la matière première et les compatibilités pouvant apporter un intérêt à la valorisation de l'algue *S. chordalis*.

L'application de l'Extraction Assistée par Enzymes (EAE) a tout d'abord démontré une efficacité plus importante des enzymes de type protéases pour la solubilisation de la matière première. Comparée à de précédentes études, l'application d'une température d'hydrolyse inférieure entraîne une diminution de l'efficacité des enzymes et l'obtention de rendement moins important. Cette différence de rendement peut également être due à l'étape de dénaturation des enzymes à 85°C qui n'a pas été réalisée. Les cocktails enzymatiques sont coûteux et de nombreux projets de recherche s'intéressent à fixer ou développer des méthodes permettant de récupérer les enzymes en fin de procédés. De plus, les extraits hydrosolubles ont démontré des propriétés antioxydantes permettant de bloquer la formation des radicaux libres.

L'application de l'extraction par CO₂ pour la fraction lipidique de *S. chordalis* a permis d'obtenir un rendement de 1,4% avec ajout de co-solvant. Le rendement obtenu est faible du fait que les macroalgues rouges ne sont reconnues pour être des organismes accumulant des lipides. De plus, le rendement d'extraction est moins important que celui obtenu par l'extraction aux solvants organiques. Toutefois, dans une optique de développement industriel l'impact environnemental du CO₂ est beaucoup moins important.

La production d'extraits à partir des résidus de EAE et ScCO₂ par l'application de l'EAM a permis d'identifier l'impact du prétraitement de l'algue sur le rendement et la composition des carraghénanes. L'application de l'extraction par microondes est une étape de bioraffinage qui ne peut être située qu'en aval. L'application de température élevée proche des 100°C ne permet pas de conserver l'intégrité de certains composés d'intérêt tels que les protéines et le pigment. De ce fait la matière résiduelle restant en fin de traitement par EAM ne peut être valorisée dans un système en cascade.

L'analyse des rendements et de la composition des extraits de EAM a permis d'identifier l'impact des enzymes sur les carraghénanes. Le rendement en carraghénanes obtenus après prétraitement à

l'enzyme montre une diminution de 10 à 20%. Ceci est sûrement dû à la part de polysaccharides solubilisés lors du prétraitement. En revanche, la forte diminution du rendement obtenu suite au prétraitement par dioxyde de carbone, montre un effet négatif de ce couplage pour l'obtention des carraghénanes.

Partie III : Recherche de molécules anti-UV, isolement et purification par Chromatographie de Partage Centrifuge.

1. Introduction :

1.1. *Les Acides Aminés Mycosporine-like*

Les radiations UV sont reconnues pour engendrer des effets délétères chez les organismes exposés. Les rayonnements produits, notamment les rayons UV-B (280-320 nm), vont altérer directement l'ADN, l'ARN et les protéines contenus dans les cellules entraînant des perturbations du mécanisme physiologique tels que la photosynthèse pour les organismes photosynthétiques ou les biosynthèses (Smith et al. 1992 ; Buma et al., 1995 ; Franck et Foster 1997). Les rayonnements UV-B sont également reconnus pour être néfastes chez l'homme, leurs implications dans les mécanismes de mutagenèse et la formation de mélanome, de cancers de la peau sont prouvés depuis longtemps (Urbach, 1978). Les réactions oxydantes jouent également un rôle dans les maladies cutanées comme la formation de carcinome, le vieillissement de la peau et les réactions au stress oxydatif sur l'ADN. Le traitement de la peau par des molécules antioxydantes et par des molécules ayant la capacité de former un écran de protection face aux rayonnement UV-B sont d'un bénéfice important pour la prévention des risques de dommages cutanés (Tomaino et al., 2006).

Les Acides Aminés Mycosporine-like (de l'anglais Mycosporines-like Amino Acides, MAAs) sont reconnues pour agir comme filtres solaires chez les organismes marins qui les synthétisent ou chez les prédateurs directs de ces organismes (Karsten et Wiencke., 1999). Les Rhodophycées sont reconnues pour synthétiser des MAAs contrairement aux Chlorophycées et Phéophycées qui en contiennent à l'état de traces (Karsten, Sawall et Wiencke, 1998). De nombreuses études ont mis en évidence la présence de sept MAAs majeures chez les Rhodophycées que sont la mycosporine-glycine, la shinorine, le palythène, le palythanol, la palythine, l'astérina-330 et la porphyre-334.

Tableau XXXVII: Liste non exhaustive des travaux réalisés sur l'extraction et la détermination de la composition en Acides Aminés Mycosporine-like chez les Rhodophycées (1/2).

Acides Aminés Mycosporines-like	$\lambda_{\max}$	[M+1]	Espèces d'algues	Références
Mycosporine-glycine (a)	308	245, 2303	<i>Acanthophora specifera</i> ; <i>Chondria arinata</i> ; <i>Hypnea spinella</i> ; <i>Bostrychia moritzinia</i> ; <i>Bostrychia radicans</i> I ; <i>Grateloupia lanceola</i> ; <i>Porphyra columbina</i> ; <i>Curdiea racovitzae</i> ; <i>Desmarestia menziesii</i> , <i>Palmaria palmata</i> ; <i>Acanthophora spicifera</i> ; <i>Mazzaella laminarioides</i>	Karentz et al. 1991 ; Karsten, Sawall et Wiencke, 1998 ; Karsten et Wiencke 1999 ; Hoyer et al. 2001 ; Peinado et al. 2004 ; Huovinen et al. 2006 ; Yuan et al. 2009 ; Pessoa, 2012 ; Bedoux et al. 2014 ; Navarro, 2015 ; Rosic, Braun et Kvaskoff, 2015 ; Navarro, Figueroa et Korbee, 2017
Palythine	320	245,1138 (186, 197, 209, 230 m/z)	<i>Actinotrichia fragilis</i> ; <i>Acanthophora specifera</i> ; <i>Laurencia changii</i> ; <i>Laurencia cartilaginea</i> ; <i>Chondria arinata</i> ; <i>Gelidiella acerosa</i> ; <i>Gracilaria changii</i> ; <i>Gracilaria eucheumoides</i> ; <i>Gracilaria eucheumoides</i> ; <i>Gracilaria soliconia</i> ; <i>Hypnea spinella</i> ; <i>Scinaea boergensi</i> ; <i>Bostrychia calliptera</i> ; <i>Bostrychia montagnei</i> ; <i>Bostrychia pinnata</i> ; <i>Bostrychia radican</i> I ; <i>Bostrychia radican</i> II ; <i>Bostrychia tenella</i> ; <i>Caloglossa ogasawaraensis</i> ; <i>Stictosiphonia tangatensis</i> ; <i>Callithamnion gaudichaudii</i> ; <i>Ceranium</i> sp. ; <i>Gracilaria. Birdiae</i> ; <i>Gracilaria. Domingensis</i> ; <i>Gracilaria tenuistipitata</i> . <i>Chondrus crispus</i> ; <i>Palmaria palmata</i> ; <i>Grateloupia lanceola</i> ; <i>Porphyra columbina</i> ; <i>Curdiea racovitzae</i> ; <i>Chondrus ocellatus</i> ; <i>Acanthophora spicifera</i> ; <i>Mastocarpus stellatus</i> ; <i>Mazzaella laminarioides</i> ; <i>Gracilaria vermiculophylla</i>	Karsten, Sawall et Wiencke, 1998 ; Karsten et Wiencke 1999 ; Hoyer et al. 2001 ; Helbling et al. 2004 ; Franklin et al. 2001 ; Peinado et al. 2004 ; Huovinen et al. 2006 ; Yuan et al. 2009 ; Pessoa, 2012 ; Bedoux et al. 2014 ; Qing et al., 2015 ; Navarro, 2015 ; Rosic, Braun et Kvaskoff, 2015 ; Athukorala et al., 2016 ; Navarro, Figueroa et Korbee, 2017 ; Barceló-Villalobos et al., 2017
Asterina-330	330	289,1400 (186, 209, 230, 274 m/z)	<i>Actinotrichia fragilis</i> ; <i>Acanthophora specifera</i> ; <i>Gracilaria changii</i> ; <i>Gracilaria eucheumoides</i> ; <i>Gracilaria soliconia</i> ; <i>Laurencia changii</i> ; <i>Laurencia cartilaginea</i> ; <i>Bostrychia montagnei</i> ; <i>Bostrychia moritziana</i> ; <i>Bostrychia radican</i> II ; <i>Bostrychia simpliciuscula</i> ; <i>Caloglossa apomeiotica</i> ; <i>Caloglossa lepieurii</i> ; <i>Caloglossa stipitata</i> ; <i>Stictosiphonia hookeri</i> ; <i>Stictosiphonia tangatensis</i> ; <i>Gracilaria. Birdiae</i> ; <i>Gracilaria. Domingensis</i> ; <i>Gracilaria tenuistipitata</i> ; <i>Palmaria palmata</i> ; <i>Porphyra columbina</i> ; <i>Chondrus crispus</i> ; <i>Curdiea racovitzae</i> ; <i>Chondrus ocellatus</i> ; <i>Mastocarpus stellatus</i> ; <i>Mazzaella laminarioides</i> ; <i>Gracilaria vermiculophylla</i> .	Karsten, Sawall et Wiencke, 1998 ; Karsten et Wiencke 1999 ; Hoyer et al. 2001 ; Franklin et al. 2001 ; Kräbs et al. 2002 Peinado et al. 2004 ; Cardozo et al. 2009 ; Yuan et al. 2009 ; Pessoa, 2012 ; Bedoux et al. 2014 ; Qing et al., 2015 ; Navarro, 2015 ; Athukorala et al., 2016 ; Navarro, Figueroa et Korbee, 2017 ; Barceló-Villalobos et al., 2017

La présence de ces composés a été démontrée chez de nombreuses espèces d'algues rouges, comme indiqué dans le **Tableau XXXVII** qui présente une liste non exhaustive de différents travaux.

Depuis quelques années, la présence de nouvelles molécules a été rapportée. Parmi ces molécules, l'acide palythénique, l'usujirene, la palythine-serine-sulfate, la mycosporine-aurine, la palythine thréonine et le gadusol ont été caractérisés. Si l'on compare avec les travaux réalisés sur les cyanobactéries, les microalgues et d'autres organismes marins, de nouvelles MAAs restent à découvrir chez les Rhodophycées.

Ainsi, certaines MAAs ont été détectées chez certaines espèces d'algue rouges, mais les structures restent non élucidées. Les auteurs les ont donc nommés par leur masse exacte ou par leur maximum d'absorbance tel que M-337 (Gao et al., 2007) ; M-265 (Xu et Gao, 2010) ; M335/360 (Carreto et Carignan, 2011) et M-357 (Karsten, Sawall et Wiencke, 1998).

Les MAAs présentent beaucoup d'intérêts du fait des propriétés qui leurs sont conférées. De nombreuses études ont montré que ces molécules possèdent une capacité à bloquer la formation de radicaux libres, prévenir la formation d'érythèmes et sont photoprotectrice (Whitehead et Hedges, 2005 ; de la Caba et al. 2009 ; Cardozo et al. 2009). Un rôle d'osmorégulation pourrait également intervenir dans le processus de reproduction (Betaranayake et Rocher 1999).

Tableau XXXVIII: Tableau présentant une liste non exhaustive des travaux réalisés sur l'extraction et la détermination de la composition en Acides Aminés Mycosporine-like chez les Rhodophycées (2/2).

Acides Aminés Mycosporines-like	$\lambda_{\max}$	[M+1]	Espèces d'algues	Références
Palythinol	332	303,1298 (186, 230, 244, 288 m/z)	<i>Acanthophora specifera</i> ; <i>Chondria arinata</i> ; <i>Gelidiella acerosa</i> ; <i>Gracilaria changii</i> ; <i>Gracilaria eucheumoides</i> ; <i>Gracilaria soliconia</i> ; <i>Hypnea spinella</i> ; <i>Laurencia changii</i> ; <i>Laurencia cartilaginea</i> ; <i>Bostrychia calliptera</i> ; <i>Bostrychia montagnei</i> ; <i>Bostrychia moritziana</i> ; <i>Bostrychia radican I</i> ; <i>Bostrychia radican II</i> ; <i>Bostrychia simpliciuscula</i> ; <i>Bostrychia tenella</i> ; <i>Caloglossa leprieurii</i> ; <i>Stictosiphonia hookeri</i> ; <i>Gracilaria. Birdiae</i> ; <i>Gracilaria. Domingensis</i> ; <i>Gracilaria tenuistipitata</i> ; <i>Palmaria palmata</i> ; <i>Mastocarpus stellatus</i>	Karsten, Sawall et Wiencke, 1998 ; Karsten et Wiencke 1999 ; Yuan <i>et al.</i> 2009 ; Cardozo <i>et al.</i> , 2009 ; Pessoa, 2012 ; Bedoux <i>et al.</i> , 2014 ; Navarro 2015 ; Athukorala <i>et al.</i> , 2016
Shinorine	333	333,1298 (186, 230, 274, 303, 318 m/z)	<i>Porphyra umbilicalis</i> ; <i>Actinotrichia fragilis</i> ; <i>Asparagopsis taxiformis</i> ; <i>Chondria arinata</i> ; <i>Gelidiella acerosa</i> ; <i>Galaxaura oblongata</i> ; <i>Ganonema farinosa</i> ; <i>Gracilaria changii</i> ; <i>Gracilaria eucheumoides</i> ; <i>Gracilaria eucheumoides</i> ; <i>Gracilaria soliconia</i> ; <i>Hypnea spinella</i> ; <i>Scinaea boergensis</i> ; <i>Bostrychia montagnei</i> ; <i>Bostrychia moritziana</i> ; <i>Bostrychia simpliciuscula</i> ; <i>Bostrychia tenella</i> ; <i>Caloglossa leprieurii</i> ; <i>Caloglossa ogasawaraensis</i> ; <i>Caloglossa stipitata</i> ; <i>Stictosiphonia hookeri</i> ; <i>Callithamnion gaudichaudii</i> ; <i>Corallina officinalis Linnaeus</i> ; <i>Porphyra columbina</i> ; <i>Ceranum sp.</i> ; <i>Gracilaria. Birdiae</i> ; <i>Gracilaria. Domingensis</i> ; <i>Gracilaria tenuistipitata</i> ; <i>Chondrus yendoii</i> ; <i>Chondrus crispus</i> ; <i>Palmaria palmata</i> ; <i>Palmaria decipiens</i> ; <i>Gracilaria cornea</i> ; <i>Porphyra columbina</i> ; <i>Curdia racovitzae</i> ; <i>Phyllophora appendiculata</i> ; <i>Chondrus ocellatus</i> ; <i>Acanthophora spicifera</i> ; <i>Mastocarpus stellatus</i> ; <i>Mazzaella laminarioides</i> ; <i>Gracilaria vermiculophylla</i>	Tsujino <i>et al.</i> 1980 ; Karsten, Sawall et Wiencke, 1998 ; Sinha <i>et al.</i> 1998 ; Karsten et Wiencke 1999 ; Sinha <i>et al.</i> 2000 ; Hoyer <i>et al.</i> 2001 ; Franklin <i>et al.</i> 2001 ; Kräbs <i>et al.</i> 2002 ; Peinado <i>et al.</i> 2004 ; Helbling <i>et al.</i> , 2004 ; Yuan <i>et al.</i> 2009 ; Cardozo <i>et al.</i> 2009 ; Pessoa, 2012 ; Bedoux <i>et al.</i> , 2014 ; Qing <i>et al.</i> , 2015 ; Navarro, 2015 ; Rosic, Braun et Kvaskoff, 2015 ; Athukorala <i>et al.</i> , 2016 ; Navarro, Figueroa et Korbee, 2017 ; Barceló-Villalobos <i>et al.</i> , 2017

Porphyra-334	334	347,1449 (186, 227, 288, 303, 332 m/z)	<i>Porphyra umbilicalis</i> ; <i>Actinotrichia fragilis</i> ; <i>Acanthophora specifera</i> ; <i>Laurencia changii</i> ; <i>Laurencia cartilaginea</i> ; <i>Spyridia filamentosa</i> ; <i>Chondria arinata</i> ; <i>Gelidiella acerosa</i> ; <i>Galaxaura oblongata</i> ; <i>Ganonema farinosa</i> ; <i>Gracilaria changii</i> ; <i>Gracilaria eucheumoides</i> ; <i>Gracilaria soliconia</i> ; <i>Hypnea spinella</i> ; <i>Scinaea boergensi</i> ; <i>Bostrychia calliptera</i> ; <i>Bostrychia montagnei</i> ; <i>Bostrychia radican I</i> ; <i>Bostrychia radican II</i> ; <i>Bostrychia simpliciuscula</i> ; <i>Bostrychia tenella</i> ; <i>Caloglossa leprieurii</i> ; <i>Caloglossa ogasawaraensis</i> ; <i>Caloglossa stipitata</i> ; <i>Stictosiphonia hookeri</i> ; <i>Stictosiphonia tangatensis</i> ; <i>Callithamnion gaudichaudii</i> ; <i>Porphyra columbina</i> ; <i>Gracilaria. Birdiae</i> ; <i>Gracilaria. Domingensis</i> ; <i>Gracilaria tenuistipitata</i> ; <i>Porphyra sp.</i> ; <i>Porphyra. Columbina</i> ; <i>Curdiea racovitzae</i> ; <i>Palmaria decipiens</i> ; <i>Palmaria palmata</i> ; <i>Grateloupia lanceola</i> ; <i>Gracilaria cornea</i> ; <i>Desmarestia menziesii</i> ; <i>Acanthophora spicifera</i> ; <i>Mastocarpus stellatus</i> ; <i>Gracilaria vermiculophylla</i>	Karentz <i>et al.</i> 1991 ; Karsten, Sawall <i>et al.</i> 1998 ; Karsten <i>et al.</i> 1999 ; Conde, Churio <i>et al.</i> 2000 ; Sinha <i>et al.</i> 2000 ; Hoyer <i>et al.</i> 2001 ; Helbling <i>et al.</i> , 2004 ; Peinado <i>et al.</i> 2004 ; Huovinen <i>et al.</i> 2006 ; Yuan <i>et al.</i> 2009 ; Cardozo <i>et al.</i> 2009 ; Bedoux <i>et al.</i> 2014 ; Navarro, 2015 ; Rosic, Braun <i>et al.</i> 2015 ; Athukorala <i>et al.</i> , 2016 ; Barceló-Villalobos <i>et al.</i> , 2017
(E)-acide palthénique	335	329	<i>Solieria chordalis</i>	Carreto <i>et al.</i> 2011 ; Bedoux <i>et al.</i> , 2014 ; Navarro, 2015 ;
Palythene	360	285 ,3097	<i>Chondrus crispus</i> ; <i>Desmarestia menziesii</i> ; <i>Palmaria palmata</i> ; <i>Palmaria decipiens</i>	Karentz <i>et al.</i> 1991 ; Karsten <i>et al.</i> 1999 ; Franklin <i>et al.</i> 2001 ; Kräbs <i>et al.</i> 2002 ; Bedoux <i>et al.</i> 2014 ; Navarro, 2015 ;
Palythine-serine-sulfate	320	355	<i>Acanthophora spicifera</i>	Rosic, Braun <i>et al.</i> 2015
Mycosporine -taurine	315	296	<i>Acanthophora spicifera</i>	Rosic, Braun <i>et al.</i> 2015
Palythine-thréonine	318	289	<i>Acanthophora spicifera</i>	Rosic, Braun <i>et al.</i> 2015
Gadusol	296	205	<i>Acanthophora spicifera</i>	Rosic, Braun <i>et al.</i> 2015
Usujirène	356	285	<i>Mastocarpus stellatus</i> ; <i>Palmaria palmata</i> ; <i>Gracilariopsis tenuifrons</i>	Athukorala <i>et al.</i> , 2016 ; Torres <i>et al.</i> , 2016

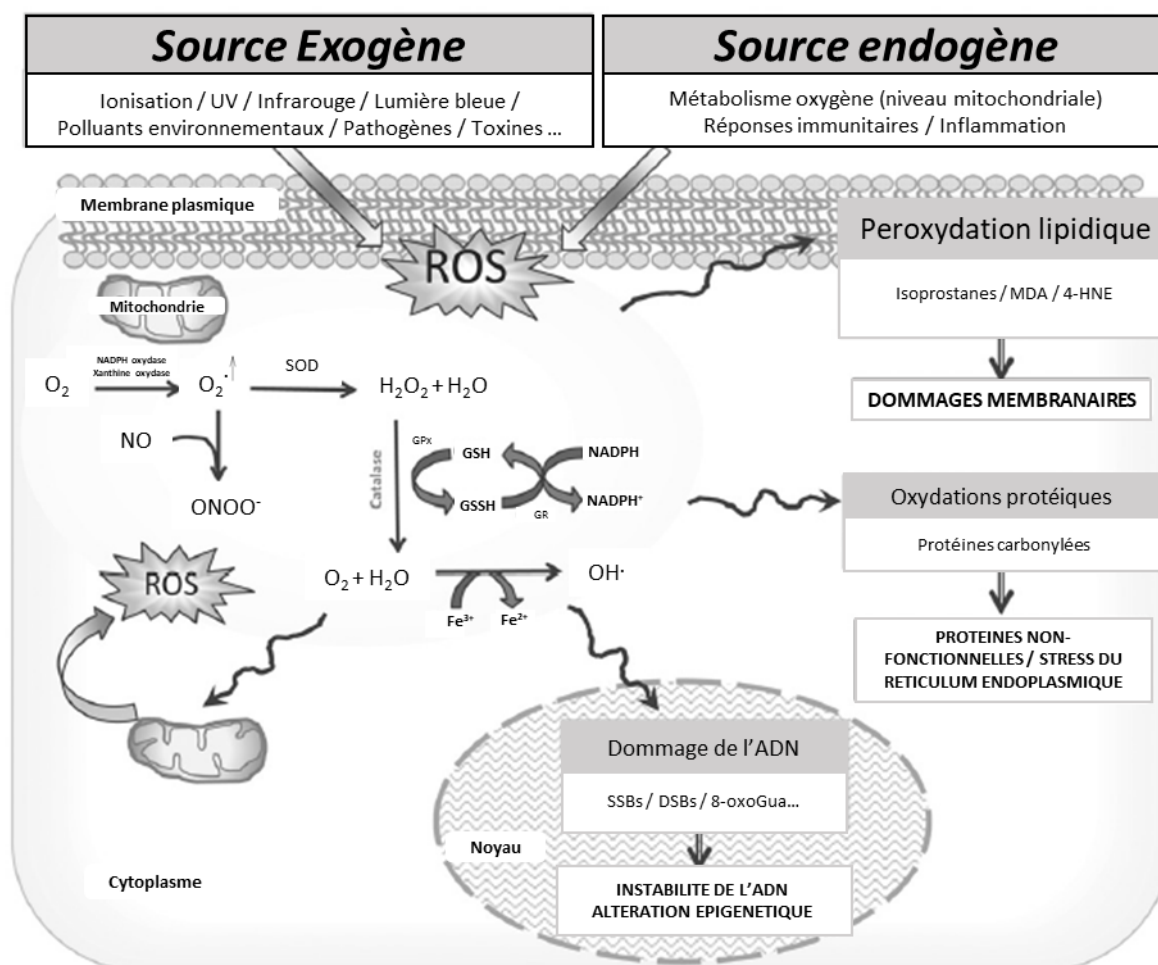


Figure 58 : Représentation des dommages cellulaires induits par les réactions en chaîne induit par les Dérivés Réactifs à l'Oxygène (**DRO**, de l'anglais Reactive Oxygen Species (ROS)). Les cellules de la peau sont continuellement exposées aux sources endogènes et exogènes intervenant dans la formation de **DRO**. Les cellules possèdent également des sources de DRO endogènes au travers de mitochondries et de certaines enzymes (**NADPH oxydase** et **xanthine oxydase**) mais possède également des mécanismes permettant de bloquer les DRO par la **SOD** qui catalyse la dismutation de superoxyde en peroxyde d'hydrogène. La catalyse du peroxyde d'hydrogène formant de l'eau et de l'oxygène. La glutathion peroxydase (**GPx**) qui réduit le peroxyde d'hydrogène et la **GSH** réduit qui est converti pour oxydé le glutathionne (**GSSG**) convertissant l' H_2O_2 et H_2O . Les mitochondries endommagées produisent plus de DRO formant un cercle vicieux. **SSBs** ; **DSBs** : Rupture de simple ou doubles brins ; **8-oxoGua** : 8-oxo-7,8-dihydroguanine ; **MDA** : Malondialdéhyde ; **4-HNE** : 4-hydroxi-2-nonenale (modifiée à partir de Berthon et al. 2017)

1.2. Les réactions oxydantes et le rayonnement UV, facteurs de vieillissement de la peau.

Le *stratum corneum*, partie supérieure de la peau, composant de l'épiderme prévient la déshydratation en jouant le rôle de barrière et permet de limiter la diffusion passive de l'eau (Cartlidge, 2000). Cette couche joue également un rôle contre l'irritation de la peau et prévient, par sa pigmentation, des dommages causés par le rayonnement UV (Wickett et Visscher, 2006). Sous la couche épidermique se trouve le derme. Le derme est une structure composée de tissus conjonctifs, de collagène et d'élastine. Elle inclue l'irrigation sanguine par la présence des vaisseaux et contient les glandes sudoripares, les nerfs et des fibroblastes. L'acide hyaluronique (AH) est un des composants majeurs du derme et il possède un rôle primordial dans l'hydratation de la peau par sa capacité de rétention (équivalent à 1000 fois son volume) et de réparation de la peau. Le vieillissement de la peau entraîne la dénaturation du collagène et de l'AH qui se traduit par l'apparition de ride et le relâchement de la peau.

Les effets extrinsèques intervenant sur le vieillissement de la peau sont principalement l'exposition aux rayonnements UV et l'irritation qui sont caractérisées par une détérioration de la matrice extracellulaire dermique et de la dysplasie de kératinocytes de l'épiderme (Kim *et al.* 2013). Le rayonnement UV est caractérisé par trois types de rayons UV-A, UV-B et UV-C différenciés par leur longueur d'onde, 320-400 nm, 280-320 nm et 200-280 nm respectivement. Les longueurs d'onde UV-A pénètrent à l'intérieur du derme entraînant le vieillissement de la peau. Le rayonnement UV-B est à l'origine de la formation de carcinomes et entraîne des brûlures de la peau très importante (mille fois plus rapide que les UV-A). Enfin, les UV-C sont bloqués par la couche d'ozone et semblent causer aucun trouble pour la peau (Gomez *et al.* 2009).

La peau possède naturellement des agents antioxydants permettant de bloquer la formation de dérivés réactifs à l'oxygène (DRO) et de limiter la déstabilisation cellulaire (Masaki, 2010). Cependant, la formation de DRO due à l'exposition au rayonnement UV peut ne plus être limitée naturellement entraînant un stress oxydant. La formation de radicaux libres aboutit à des dommages cellulaires importants sur les protéines, les lipides pariétaux et détériore l'ADN. La **Figure 58** schématise les dommages cellulaires liés aux DROs. La formation de DRO est à l'origine de la mortalité cellulaire via des mécanismes de nécrose et d'apoptose. Cette mortalité est notable par l'apparition de rides et le dessèchement de la peau mais est également à l'origine de troubles plus

graves avec l'apparition d'inflammation cutanée, de mélanomes et de cancer de la peau (Wang *et al.* 2013a,b).

1.3. Les objectifs de l'étude

L'objectif de cette partie est d'étudier la composition d'extraits anti-UV de *S. chordalis* obtenus par extraction à l'aide de solvants polaire ou apolaire. L'étude de la composition des extraits est basée sur l'identification des molécules détectées aux longueurs d'onde UV-A et UV-B. Afin de pouvoir identifier ces composés, deux méthodes de purifications ont été initiées la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) et de Chromatographie Liquide Préparative (Prep-LC). Elles ont permis d'obtenir différentes fractions selon la méthodologie décrite par la **Figure 59**. L'extrait polaire et les différentes fractions de l'extrait apolaire ont ensuite été analysés par spectrométrie de masse afin de déterminer la composition moléculaire. Ceci a permis d'identifier la présence de différentes MAAs dans chaque extrait. Une mise en place de stratégie de bioguidage a également été réalisée par évaluation et comparaison des activités biologiques des fractions purifiées obtenues.

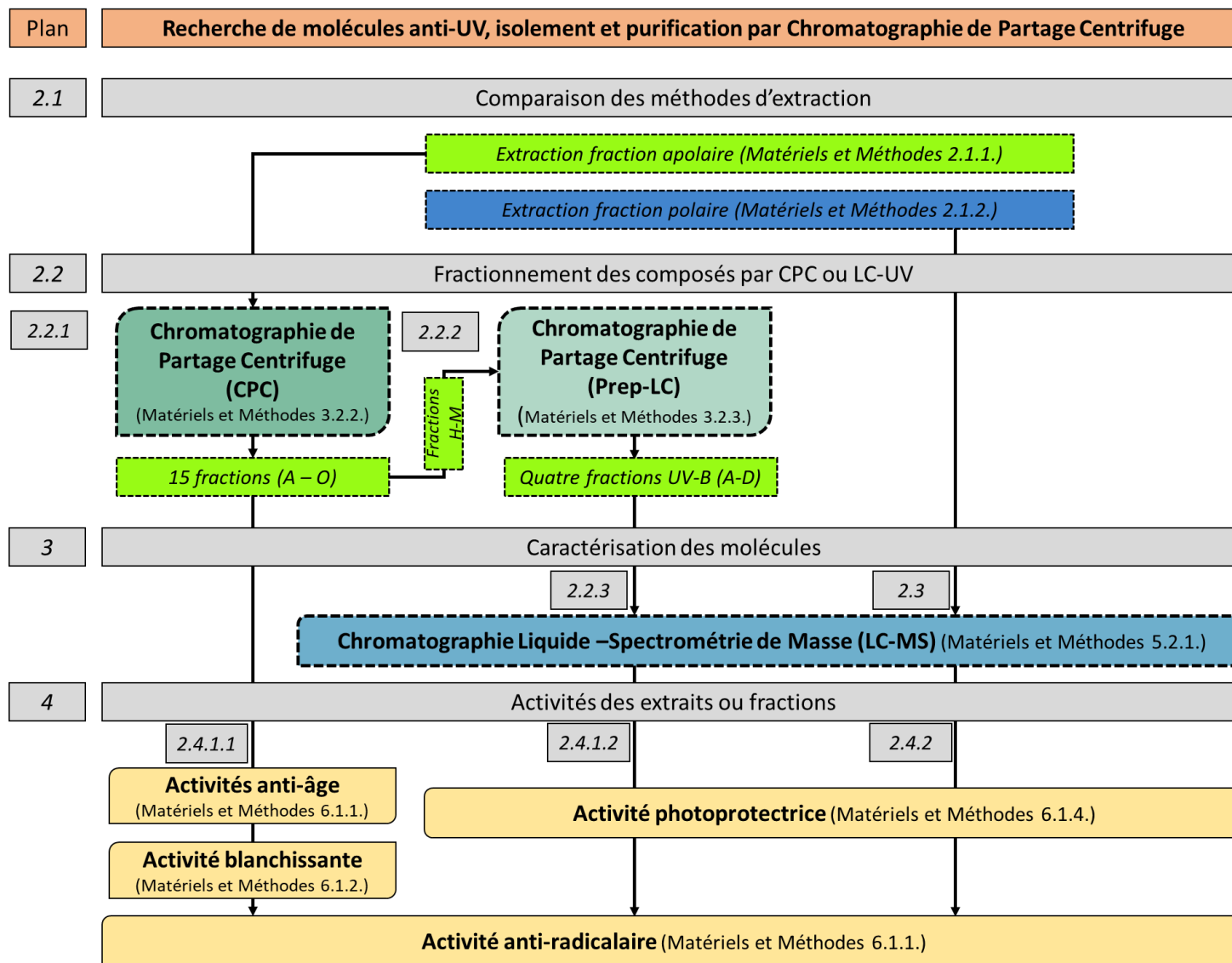


Figure 59: Plan d'étude de la partie 3 : Recherche de molécules anti-UV, isolement et purification par Chromatographie de Partage Centrifuge.

2. Résultats

2.1. Rendements d'extraction

Pour cette étude, deux méthodes d'extraction ont été réalisées dans le but d'obtenir des extraits polaires et apolaires contenant des composés MAAs. L'obtention de l'extrait apolaire a été réalisée en deux étapes. La première étape a consisté en une extraction solide/liquide sur la biomasse algale *S. chordalis* par macération dans du méthanol pur. Une deuxième étape d'extraction liquide/liquide (Acétate d'éthyle/eau, 50 :50 ; v/v) a permis de concentrer les composés apolaires dans l'acétate d'éthyle. Cet extrait est qualifié d'extrait apolaire (cf. **Matériels et Méthodes 2.1.1.**).

Une deuxième méthode d'extraction a été réalisée afin d'obtenir un extrait polaire de *S. chordalis*. Cet extrait a été obtenu par une étape d'extraction solide/liquide en faisant macérer la biomasse dans un mélange solvant éthanol/eau (70 :30, v/v) à 45°C pendant 2 heures. Cet extrait est qualifié d'extrait polaire (cf. **Matériels et Méthodes 2.1.2.**).

La méthode d'extraction par solvant apolaire présente un rendement de 21,5% après la première étape dans le méthanol. La deuxième étape de concentration dans l'acétate d'éthyle permet d'obtenir un rendement final de 2,0%. La fraction méthanolique semble composée majoritairement de sels insolubles dans l'acétate d'éthyle. En comparaison, l'extraction par voie polaire (éthanol/eau) permet d'obtenir un rendement d'extraction de 34,5% dont une partie importante est également du sel.

2.2. Fractionnement et caractérisation de l'extrait apolaire.

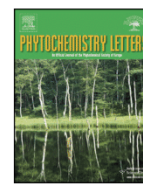
2.2.1. Fractionnement par Chromatographie de Partage Centrifuge.

L'extrait apolaire de *S. chordalis* a ensuite été fractionné par le développement et l'optimisation d'une méthode par Chromatographie Partage Centrifuge. Cette étape a permis de produire quinze fractions (nommées par les lettres A à O) à partir de l'extrait brut apolaire. Les résultats sont présentés ci-après dans la publication « Fractionation of UV-B absorbing compounds from *Solieria chordalis* by using Centrifugal Partition chromatography », *Phytochemistry Letters*, volume 20, p410-414.



Contents lists available at ScienceDirect

Phytochemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phytol

Fractionation of UV-B absorbing molecules and of free radical scavenging compounds from *Solieria chordalis* by using centrifugal partition chromatography

R. Boulho^{a,*}, J. Le Roux^b, C. Le Quémener^b, G. Audo^b, N. Bourgougnon^a, G. Bedoux^a

^a Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA3884, UBS, IUEM, F-56000 Vannes, France

^b ARMEN Instruments, 16 Rue Ampère, 56890 Saint-Avé, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 October 2016

Received in revised form 10 March 2017

Accepted 16 March 2017

Available online 22 March 2017

Keywords:

Solieria chordalis

Rhodophyceae

Centrifugal partition

Chromatography

UVB compounds

Antioxidant

ABSTRACT

Liquid-liquid chromatography can lead to the isolation of compounds or enrichment of fractions. To investigate the structural characteristics of antioxidants and UV-B absorbing molecules, a preparative centrifugal partition chromatography (CPC) method was developed to prepare enriched bioactive fractions from the red seaweed *Solieria chordalis* (Gigartinales, Solieriaceae). After a methanolic extraction of dried *Solieria chordalis* and liquid-liquid separation using ethyl acetate/water (v/v), the ethyl acetate phase was submitted to CPC using Arizona Y of the quaternary solvent system composed of *n*-heptane/ethyl acetate/methanol/water (19/1/19/1, v/v) in ascending mode. Among the fifteen collected fractions, three fractions gave up to 23.50% of DPPH radical scavenging activity. The CPC fractionation was monitored by HPLC and, four compounds exhibited UV-B absorbing capacity regarding their absorption at 310 nm.

© 2017 Phytochemical Society of Europe. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

During centuries, seaweeds have been used as a dietary supplement for health benefits and, more recently, they have been identified as a source of bioactive compounds for the development of new functional ingredients in the pharmaceutical, cosmetic and food industries. The study of this chemical diversity for pharmaceutical and cosmetic purposes has led to the discovery of new agents (El Gamal, 2010; Ioannou and Roussis, 2009; Kornprobst, 2005; Mayer, 2002; Mayer and Hamann, 2004; Mayer et al., 2009; Cardozo et al., 2007). Recently, photoprotective compounds isolated from seaweeds have been characterized and their function studied (Carreto and Carignan, 2011; Rastogi et al., 2010). *Solieria chordalis* has been observed in the Gulf of Morbihan (France) since 2005 and in the Sarzeau peninsula (Morbihan, France). The *S. chordalis* beaching represented between 4000 and 6000 t in 2008 and 2009 (Bedoux et al., 2014). In a previous study, the mycosporine-like amino acid (MAA), palythenic acid, was characterized for the first time in *S. chordalis* (Bedoux et al., 2014). Besides the MAAs, carotenoids or derived molecules and lipids, other UV-absorbing compounds still need to be elucidated

(Figuerola et al., 2003; Roleda et al., 2010). In addition, part of these compounds are produced in response to the generation of ROS and, they exhibit anti-ROS properties depending of their structures (Nakamura et al., 1996). Centrifugal partition chromatography (CPC) is a liquid-liquid chromatography using immiscible biphasic solvent systems. This technique is particularly suitable for the isolation of molecules from complex natural matrices on a large scale (Yoon et al., 2010; Becerra et al., 2015). Very recently, fucosterol has been recovered from the brown alga *Lessonia vadosa* (Becerra et al., 2015). To investigate the characteristics of antioxidants and UV-B absorbing compounds, a preparative CPC method to produce enriched bioactive fractions was developed.

2. Results and discussion

2.1. Extraction

The first step of solid-liquid methanolic extraction involved the maceration of the seaweed to extract compounds with a wide polarity range. The methanol extraction of 747.2 g of dry seaweed produced 160.7 g of dried extract corresponding to a yield of 21.5%. The second liquid-liquid extraction step using ethyl acetate/water solvent system permitted the concentration of non-polar compounds and the elimination of residual salts. 11.9 g among the 160.7 g of methanol extract was concentrated in the ethyl acetate

* Corresponding author.

E-mail address: romain.boulho@univ-ubs.fr (R. Boulho).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2017.03.010>

1874-3900/© 2017 Phytochemical Society of Europe. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

corresponding to 1.98% of the initial dry seaweed weight. The methanolic extraction from *S. chordalis* exhibited a higher yield compared to similar extraction realized from other red seaweed species. Yen et al. (2014) have used methanolic extraction to prepare antiproliferative extracts from *Solieria robusta*. The maceration of dry seaweed (500g) allowed the production of 17.34 g of crude extract corresponding to a yield of 3.4% (Yen et al., 2014). *Hypnea valentiae* and *Junia rubens* led to the yields of 6.54% and 5.32% respectively (Chakraborty et al., 2015). The nature of the species, growing step, biochemical composition, mechanical resistance, the biomass pretreatment and the drying influence the yield of extraction. In our experiment, seaweed was freeze dried improving the extraction yield.

2.2. CPC fractionation and TLC analysis

After preliminary tests of Arizona solvent system range by shake flask method, CPC experiment was performed by using the Arizona biphasic solvent system composed of *n*-heptane/ethyl acetate/methanol/water (19/1/19/1; v/v). Thin layer chromatography (TLC) revealed the molecular distribution in each collecting tubes. The tubes were pooled upon the similarity of the profiles resulting of HPLC-UV (200–400 nm) online registration and TLC. Finally, fifteen fractions labeled A to O and the extruding sample were produced (Fig. 1). This separation allowed the recovery of 1269 mg representing 88.62% of the injected sample. The TLC profiles showed compounds absorbing at 365 nm in fractions D and in fractions K–M with different retention factors upon each fraction. P-anisaldehyde sulfuric acid revelation is sensitive to most functional nucleophilic groups (phenols, lipids, amines, sugars, hydroxyls, etc.). The corresponding revealed compounds were mainly detected in fractions B–D and G–N with different retention factors upon the fractions. The radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]) reagent offers an approach for evaluating the antiradical potential of components. The fractions C–F and K to O showed colorless spots suggesting the presence of antiradical compounds. The HPLC-UV chromatograms registered from 200 to 400 nm during the CPC elution showed two highest signals between 45 min to 60 min (fractions I–K) and between 60 min to 80 min (fractions L–N) with common maximum absorption wavelength at 310 nm. The elution conditions corresponded to a K_d value of 2 and 3 for the first and the second group

of fractions, respectively. All these data showed antiradical and UV-B absorbing compounds in fractions L–N while the fractions I–K contained only UV-B absorbing compounds and fractions C–F antiradical compounds.

2.3. Antiradical activity of the CPC fractions

The DPPH[•] radical is a stable reagent and presents a maximum wavelength at 517 nm. Its reduction by antioxidant entails the production of the DPPHH reduced form. The radical scavenging activity of CPC fractions from *Solieria chordalis* are presented in Fig. 2 and expressed as the percentage of DPPHH reducing form produced by the fractions. The method was preliminary standardized by two synthetic inhibitors, Butylated hydroxyanisole (BHA) and Butylated hydroxytoluene (BHT) with an IC₅₀ measured at 38.3 μM and 61.7 μM respectively in the range value obtain by the standardize method (Sharma and Bhat, 2009). Two groups of fractions centered on fraction E (C–F) and on fraction L (K–N) delivered the highest antiradical activities ranging from 17.38% to 28.96% of inhibition. The best activities were obtained by the fractions F, L and N with a reducing percentage of 28.96, 24.52 and 23.53% respectively. These fractions showed a strong free radical scavenging activity compared with previous works. Kumar et al.

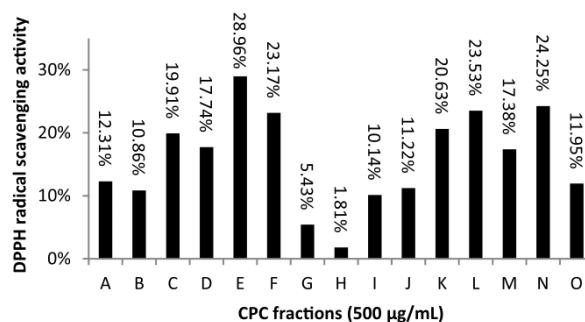


Fig. 2. Free radical scavenging activity of enriched fractions collected by CPC at concentration 500 μg/mL. The method was validated by the synthetic standard compounds BHA and BHT with the IC₅₀ obtained of 6.92 and 13.26 μg/mL respectively.

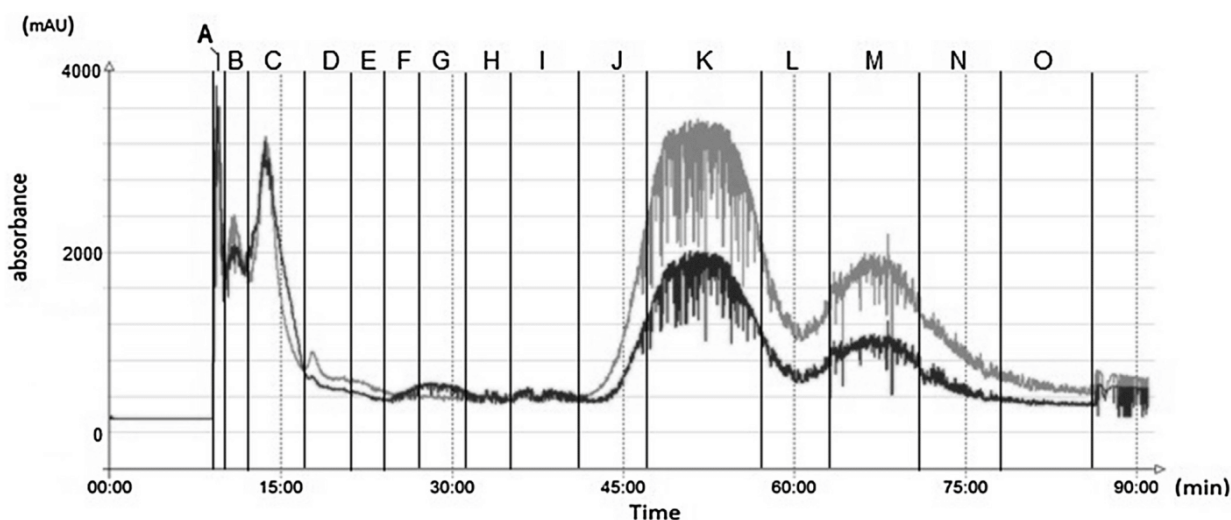


Fig. 1. CPC chromatogram with UV-DAD detection at 310 nm (black line) and the UV spectra 200–400 nm (grey line). The fraction collection was represented by the black lines and noted by letter from A to O.

(2008) have studied the antioxidant activity of different organic extracts obtained from *Kappaphycus alvarezii* collected in India. The results showed an IC_{50} of 3030, 4280 and 4760 $\mu\text{g/mL}$ after ethanol, methanol and water extractions, respectively. Chakraborty et al. (2015) have tested the potential antioxidant of methanol extracts from red seaweed species at 1000 $\mu\text{g/mL}$ with a radical inhibition of 15.40, 7.73 and 17.69% for *H. musciformis*, *H. Valentia*, and *J. rubens* respectively. A highest antiradical activity was found for *Gracilaria verrucosa*, *Gloisiphonia capillaris* and *Corallina pilulifera* with inhibition values ranging from 60 to 40% (Yan et al., 1998). Methanol extracts from brown seaweeds *Palmaria palmata* and *Ecklonia cava* exhibited radical scavenging activities with IC_{50} values of 12500 and 5490 $\mu\text{g/mL}$ (Yuan et al., 2005).

2.4. Analytical HPLC-UV of CPC fractions

To confirm the separation of UV-B (310 nm) absorbing compounds by CPC experiment, HPLC-UV chromatography of the fractions H–N was performed. The detection at 310 nm of four major compounds was shown (Fig. 3). These analyses showed two UVB absorbing compounds with retention times at 12.40 and 13.18 min (fractions I–L). The fractions K and L contained two different UVB absorbing compounds with retention times at 9.26 and 9.77 min. This second group of compounds is eluted in the fraction following the fraction L until the fraction N.

Our work describes a CPC fractionation for the production of UV-B absorbing and antiradical fractions. The antiradical capacity measurements confirmed the preliminary TLC analysis whereas

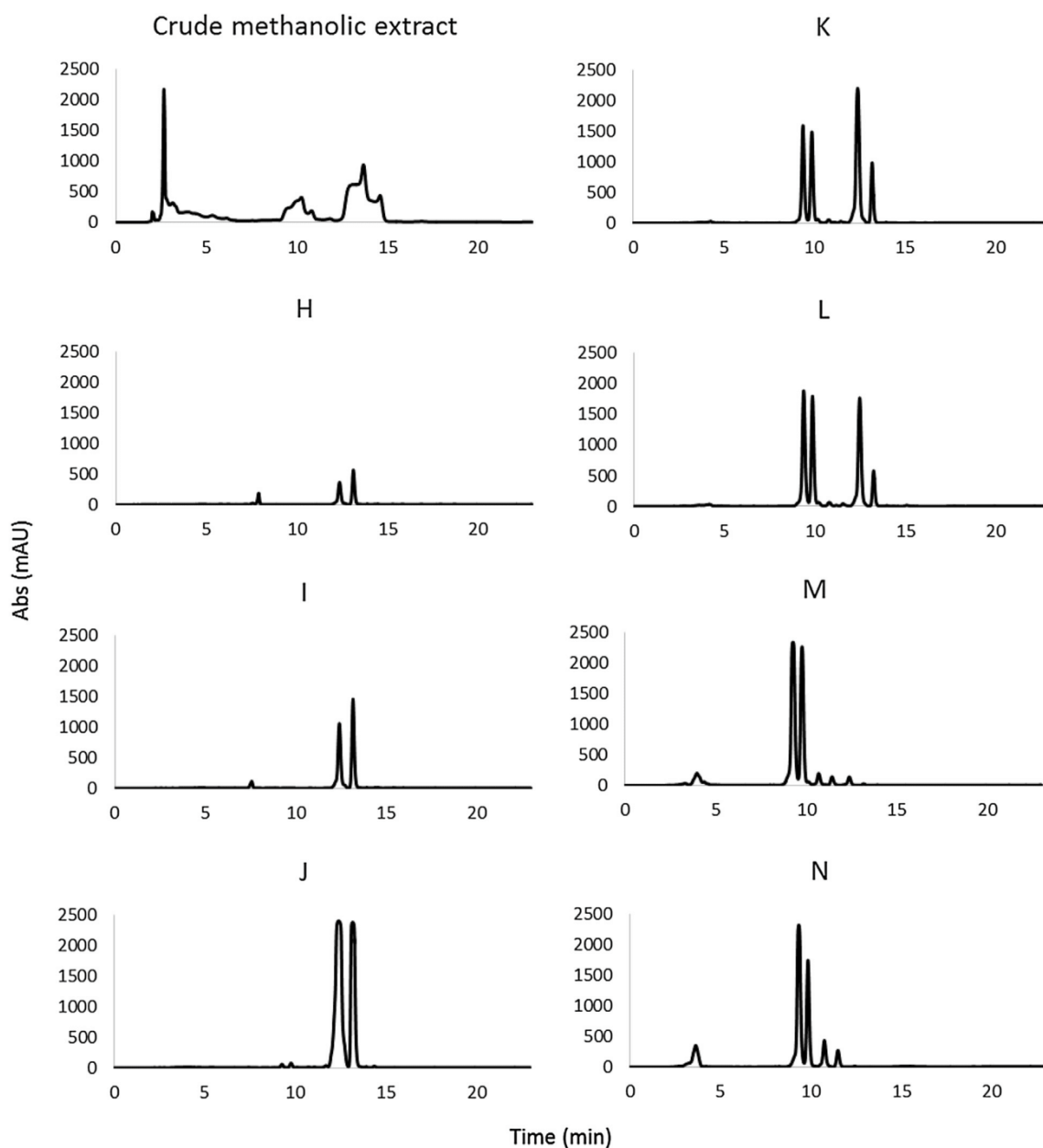


Fig. 3. HPLC-UV chromatogram of enriched CPC fractions (H–N) at wavelength 310 nm compared with the crude extract chromatogram.

the analytical HPLC profiles showed a separation of the UV-B absorbing compounds. These fractions are currently analyzed by MS and NMR to identify the structures. Preliminary data from mass spectrometry and NMR suggest nitrogen containing compounds which could belong to carotenoid or alkaloids derived compounds. The shift of retention times suggests the presence of two couples of isomers.

The separation of an ethyl acetate extract of the red seaweed *Solieria chordalis* was performed by using liquid-liquid chromatography. The enriched fractions obtained by centrifugal partition chromatography contained UV-B absorbing and free radical scavenging compounds. The HPLC profiles of the fifteen fractions enabled to detect four major UV-B absorbing compounds. These enriched fractions also had an advantageous anti-radical activity. However, the link between the antiradical activity and the presence of UV-B absorbing compounds remains to be investigated.

3. Experimental section

3.1. Raw material and sampling

Solieria chordalis was collected on the Saint Gildas de Rhuys beach (47°29'33.3"N 2°49'51.0"W) on the Morbihan coast, France during July 2015. After collection, the seaweed was washed with fresh water to remove salts, sand and epiphytes. Seaweeds were grinded and freeze dried.

3.2. Extraction

The extraction of *S. chordalis* was performed in two steps. First, a 10% (w/v) methanol solution of dry grinded raw material was prepared. The extraction was let to agitation in a reactor at ambient temperature regulated at 22 °C during 24 h. The solvent was separated and filtered through a Whatman filter paper before evaporation (35 °C, 120 bar). This extraction was repeated three times. The dry extract was submitted to a liquid/liquid extraction in a separating funnel. The biphasic solvent was composed by a mixture of ethyl acetate/water (1/1, v/v). After extraction, the two phases were separated and the upper phase was evaporated to concentrate the non-polar extract.

3.3. CPC solvent systems

The solvent system was composed of a biphasic system consisting in a quaternary mixture of solvents. The solvent ratio was selected according to the target compounds and this partition coefficient (K_d) (Foucault and Chevotot, 1998). Preliminary determination of the optimal solvent system was carried out by a shake flask method in a vial of 4 mL. Approximately 5 mg of the crude extract was added to the vial containing the solvent system tested. The sample was diluted in 1 mL of solvent system by a vigorous shaking to allow the distribution of the compounds between the two phases. To determine the solvent system adapted, the Arizona solvent system range was tested by dichotomy.

3.4. Thin layer chromatography

The solvent system upper and downer phases were analyzed on a TLC Alugram silica gel plates (SiO₂ F254, Macherey-Nagel GmbH & Co). A solvent mixture composed of chloroform/methanol (90:10, v/v) was used as TLC mobile phase. For the revelation, two plates were prepared simultaneously. One was revealed by UV exposition at 365 nm before spraying with a 1% sulfuric anisaldehyde solution (anisaldehyde/sulfuric acid/acetic acid/methanol/water, 1/2/10/40/50, v/v). A second plate was sprayed by a 0.1 mg/mL DPPH methanolic solution.

3.5. Fractionation and isolation by centrifugal partition chromatography

The CPC fractionation was conducted by a SCPC-250 apparatus provided by Armen Instrument (Saint-Avé, France) fitted with a rotor containing 1953 twin cells represented 250 mL of internal volume and a system with a volume of 20 mL. The apparatus also contained a gradient pump with a 250 mL/min maximum flow capacity and a 10 mL loop injection 6-ways valve. The fractionation was carried out at 22 °C with an Arizona biphasic solvent system (Y – *n*-heptane/ethyl acetate/methanol/water (19/1/19/1; v/v)) in isocratic ascending mode. The column was filled with the lower phase solvent system at 500 rpm and at a flow rate of 50 mL/min during ten minutes. After filling, the rotation speed was adjusted at 2000 rpm with a flow rate at 10 mL/min to equilibrate the column. The equilibrium was achieved at a stabilized pressure of 51 bar and with 65 mL of stationary phase displaced. *S. chordalis* methanol crude extract (m: 1.432 g) was diluted in 7.00 mL mix of upper phase (Φ_{Up}) and lower phase (Φ_{Low}) (1/1, v/v). After dilution, a filtration was carried out by a 0.45 μ m syringe filter 25 mm (VWR) before injection. Fractionation by Centrifugal Partition Chromatography was carried out while the fraction collection was set for 10 mL/fraction. After ninety minute of elution, the extrusion of the column was realized by changing the solvent way. The elution of 2.5 column volumes of lower phase was performed at 50 mL/min and allowed to release all the compounds fixed in the column. The UV signals were obtained by the UV detector schedule at wavelength 254, 280, 310 and 330 nm completed by a scan from 200 to 400 nm. After collection, the fractionation was controlled by TLC.

3.6. Analytical HPLC-DAD

The HPLC experiment was conducted using a Dionex UHPLC UltiMate 3000 Binary Analytical LC System equipped with a Macherey-Nagel C18ec column (250 × 4.6 mm, 5 μ m, Nucleodur 100-5), a DAD detector and an autosampler. The samples were prepared in Ethyl Acetate HPLC grade at a concentration of 5 mg/mL. A volume of 200 μ L of each sample was injected. The elution method was performed by a gradient composed of acetonitrile (ACN) HPLC-grade (A) and 0.1% acetic acid in water (B). The gradient started from 80% to 90% ACN during 23 min followed by an isocratic during 2 min at 90% ACN before equilibrium of the column at 80% ACN during 5 min. The chromatogram was recorded at 310 nm.

3.7. Antioxidant activity test

To determine the radical scavenging capacity of CPC fractions, the 1,1-Diphenyl-2-Picryl-Hydrazyl (DPPH) reagent was chosen following the method of Shimada with some modifications (Shimada et al., 1992). A 0.1 mg/mL of DPPH[•] solution (0.25 mM) was prepared daily in methanol store at 4 °C and protected of UV exposition. A standard solution of BHA and BHT and the fraction collected was prepared at concentration 1 mg/mL in methanol. The standard solution was diluted to obtain a scale of concentration from 2 to 50 μ g/mL and the samples solutions were diluted directly during the test at 500 μ g/mL. The solutions tested were added in the wells in triplicate by 100 μ L of total sample diluted by methanol completed by 100 μ L of DPPH[•] reagent. After stirring, the microplate was incubated at 40 °C during 30 min before the reading at 517 nm by a Thermo scientific Multiscan Go UV-vis apparatus. The results obtained for the standard was expressed by IC₅₀, the concentration necessary to reach 50% of radical scavenging activity. The activity of the CPC fractions was expressed

in percentage of reducing radical formation at 500 µg/mL of concentration.

% Radical scavenging activity determination by the equation:

$$\%_{\text{scavenging}} = [A_{\text{control}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}] \times 100$$

A_{control} : Absorbance of the positive control of reaction.

A_{sample} : Absorbance obtain by the mixture with the sample tested.

Acknowledgement

Region Bretagne and Morbihan departmental council.

References

- Becerra, M., Boutefnouchet, S., Córdoba, O., Vitorino, G.P., Brehu, L., Lamour, I., Laimay, F., Efstathiou, A., Smirlis, D., Michel, S., Kritsanida, M., Flores, M.L., Grougnet, R., 2015. Antileishmanial activity of fucosterol recovered from *Lessonia vadosa* Searles (Lessoniaceae) by SFE, PSE and CPC. *Phytochem. Lett.* 11, 418–423.
- Bedoux, G., Hardouin, K., Marty, C., Taupin, L., Vandanjon, L., Bourgougnon, N., 2014. Chemical characterization and photoprotective activity measurement of extracts from the red macroalgae *Solieria chordalis*. *Bot. Mar.* 57, 291–301.
- Cardozo, K.H.M., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcão, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., Campos, S., Torres, M.A., Souza, A.O., Colepicolo, P., Pinto, E., 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 146, 60–78.
- Carreto, J.L., Carignan, M.O., 2011. Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. chemical and ecological aspects. *Mar. Drugs* 9, 387–446.
- Chakraborty, K., Joseph, D., Praveen, N.K., 2015. Antioxidant activities and phenolic contents of three red seaweeds (division: rhodophyta) harvested from the Gulf of Mannar of Peninsular India. *J. Food Sci. Technol.* 52, 1924–1935.
- El Gamal, A.A., 2010. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharm. J.* 18, 1–25.
- Figueroa, F.L., Escassi, L., Pérez-Rodríguez, E., Korb, N., Giles, A.D., Johnsen, G., 2003. Effects of short-term irradiation on photoinhibition and accumulation of mycosporine-like amino acids in sun and shade species of the red algal genus *Porphyra*. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 69, 21–30.
- Foucault, A.P., Chevolut, L., 1998. Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. *J. Chromatogr. A* 808, 3–22.
- Ioannou, E., Roussis, V., 2009. *Natural Products from Seaweeds Plant-Derived Natural Products*. Springer, US, pp. 51–81.
- Kornprobst, J.M., 2005. Substances naturelles d'origine marine-chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologies: tome 1: Généralités, micro-organismes, algues: tome 2: Invertébrés, vertébrés. Tec & Doc Lavoisier.
- Kumar, K.S., Ganesan, K., Rao, P.V.S., 2008. Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty – an edible seaweed. *Food Chem.* 107, 289–295.
- Mayer, A.M.S., Hamann, M.T., 2004. Marine pharmacology in 2000: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Mar. Biotechnol.* 6, 37–52.
- Mayer, A.M.S., Rodríguez, A.D., Berlinck, R.G.S., Hamann, M.T., 2009. Marine pharmacology in 2005–6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotazoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1790, 283–308.
- Mayer, A.M.S., 2002. Current marine pharmacology contributions to new drug development in the biopharmaceutical industry. *Pharm. News* 9 (6), 479–482.
- Nakamura, T., Nagavama, K., Uchida, K., 1996. Antioxidant activity from the brown of phlorotannins isolated alga *Eisenia bicyclis*. *Fish. Sci.* 62, 923–926.
- Rastogi, R.P., Richa, Sinha, R.P., Singh, S.P., Häder, D.-P., 2010. Photoprotective compounds from marine organisms. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37, 537–558.
- Roleda, M.Y., Lütz-Meindl, U., Wiencke, C., Lütz, C., 2010. Physiological, biochemical, and ultrastructural responses of the green macroalga *Ulva fenestrata* to UV radiation. *Protoplasma* 243, 105–116.
- Sharma, O.P., Bhat, T.K., 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.* 113, 1202–1205.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., Nakamura, T., 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 40, 945–948.
- Yan, X., Nagata, T., Fan, X., 1998. Antioxidative activities in some common seaweeds. *Plant Foods Hum. Nutr.* 52, 253–262.
- Yen, Y.H., Farooqi, A.A., Li, K.T., Butt, G., Tang, J.Y., Wu, C.Y., Cheng, Y. Bin, Hou, M.F., Chang, H.W., 2014. Methanolic extracts of *Solieria robusta* inhibits proliferation of oral cancer ca9-22 cells via apoptosis and oxidative stress. *Molecules* 19, 18721–18732.
- Yoon, K.D., Chin, Y.-W., Kim, J., 2010. Centrifugal partition chromatography: application to natural products in 1994–2009. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 33, 1208–1254.
- Yuan, Y.V., Bone, D.E., Carrington, M.F., 2005. Antioxidant activity of dulce (*Palmaria palmata*) extract evaluated in vitro. *Food Chem.* 91, 485–494.

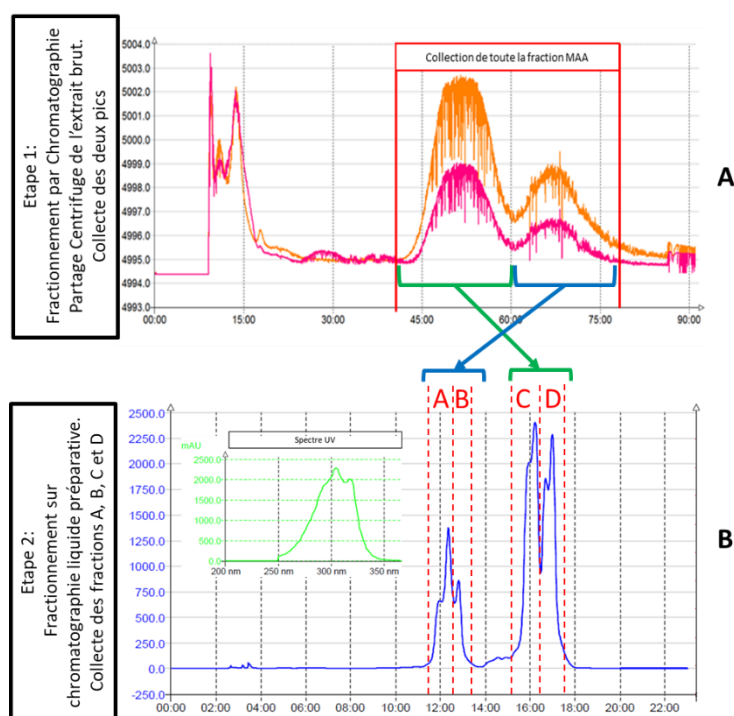


Figure 60: Schéma présentant le chromatogramme A de fractionnement par CPC (rose et orange) complété par une étape de purification par chromatographie liquide préparative (chromatogramme B) afin d'aboutir à l'obtention des fractions nommés A, B, C et D. Le spectre UV commun aux quatre fractions est intégré à la figure.

2.2.2.Purification des fractions CPC par Chromatographie Liquide Préparative

L'analyse HPLC-UV des fractions H à M obtenues par le fractionnement de l'extrait brut apolaire par CPC a montré la présence de composés absorbant dans la région UV-B. Afin de pouvoir poursuivre l'analyse des fractions et notamment de déterminer la composition des molécules UV-B, une étape de purification par Chromatographie Liquide Préparative a été réalisée. Le schéma de la **Figure 60** présente les chromatogrammes obtenus par les deux étapes.

Le chromatogramme obtenu par Chromatographie Partage Centrifuge présente deux pics importants détectés dans les longueurs d'onde UV-B. La première partie de l'étude a permis d'observer par l'analyse HPLC que ces deux pics correspondaient à au moins quatre composés co-élus.

Par CPC, une fraction commune aux deux signaux du chromatogramme a été collectée (réunissant les fractions H à M de la première partie de l'étude) afin de récupérer l'ensemble des quatre composés. L'échantillon collecté a ensuite été traité par Chromatographie Liquide Préparative afin de séparer les différents composés. Cette étape a permis de former les quatre fractions nommées dans la suite de l'étude A, B, C et D.

2.2.3.Caractérisation des fractions purifiées A, B, C et D.

Les quatre fractions produites à l'issue de l'étape de Chromatographie Liquide Préparative ont été analysées par Chromatographie Liquide Haute Performance couplé à un Spectromètre de Masse (**Matériels et méthodes 5.2.1**). Les chromatogrammes obtenus pour chaque fraction sont présentés dans les **Figure 61**, **Figure 62**, **Figure 63** et **Figure 64** correspondant aux fractions A, B, C et D respectivement.

Chaque **partie a** des figures 43 à 46 présente le chromatogramme UV à la longueur d'onde 310 nm et le couplage au détecteur de masse permet d'obtenir le chromatogramme correspondant au courant ionique total (TIC, de l'anglais total ion current). Les **parties b et c** correspondent au spectre de masse des pics annotés 1 et 2 dans le chromatogramme.

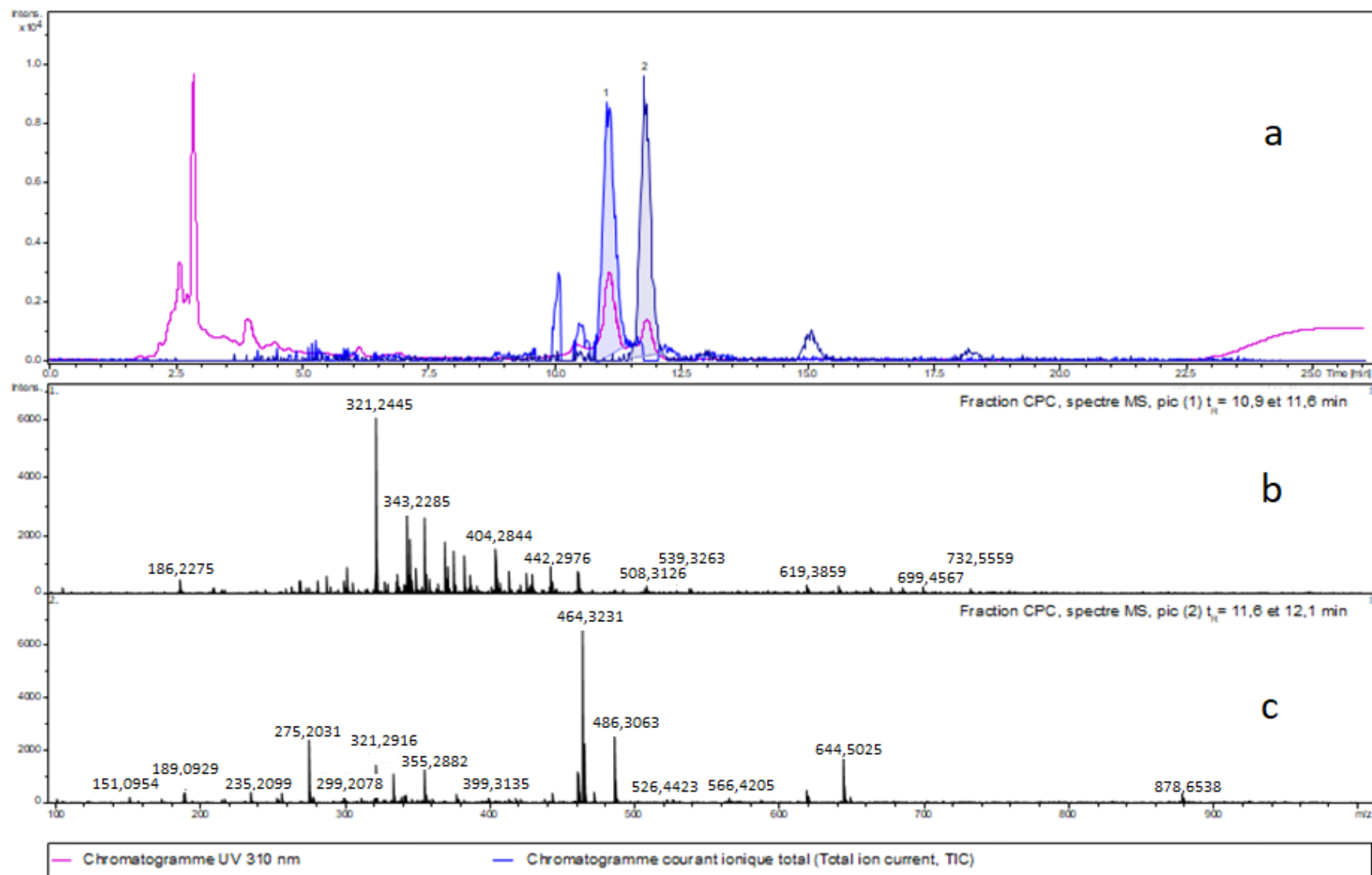


Figure 61 : (a) Chromatogramme de la fraction A avec détection à $\lambda_{max} = 310$ nm (rose). En bleue, apparaît le TIC (Total Ion Current). (b) Le spectre de masse du composé 1 ; (c) Le spectre de masse du composé 2.

La **Figure 61** correspondant à la **fraction A** présente deux signaux UV détectés à 11,3 min pour le premier et à 11,8 min pour le second. La superposition du TIC présente une allure identique avec deux composés aux mêmes temps de rétention. L'analyse du spectre de masse obtenu pour le pic annoté « 1 » montre la présence d'un ion $[M+H]^+$ à m/z 321,2445. D'autres ions sont présents parmi lesquels l'adduit sodium $[M+Na]^+$ à m/z 343,2285. Un ion est également détecté dans les plus petites masses à m/z 186,2275 pouvant être un fragment. D'autres ions sont observés aux m/z 404,2844 ; m/z 442,2976 ; m/z 508,3126 ; m/z 539,3263 ; m/z 619,3359 ; m/z 699,1567 et m/z 732,5559. L'analyse du spectre de masse du second pic annoté « 2 » montre la présence d'un ion $[M+H]^+$ à m/z 464,3231 et de l'adduit sodium $[M+Na]^+$ à m/z 486,3063. D'autres signaux sont détectés à m/z 275,2024 et m/z 189,0929. Dans les masses plus importantes on observe la présence d'un signal à m/z 644, 5025. La détection d'un signal à m/z 321,1916 que l'on retrouve dans le spectre du pic « 1 » est probablement due à la co-élution des deux composés.

L'analyse du chromatogramme de la **fraction B** présenté par la **Figure 62** montre deux pics correspondant à des composés élués à 11,2 min et 11,8 min. Le spectre de masse correspondant au(x) composé(s) du pic annoté « 1 » présente un ion $[M+H]^+$ à m/z 321,247 déjà détecté dans la fraction A. De même, le pic annoté « 2 » présente des ions à des m/z équivalents à ceux observés dans la fraction A. Les fractions CPC A et B semblent de composition similaire.

La **Figure 63** présente l'analyse de la **fraction C**. Deux composés absorbent à 310 nm et sont élués à 16,6 et 18,2 min. Le TIC ne révèle aucun autre composé dans cet intervalle d'élution. Le spectre de masse du pic annoté « 1 » présente un ion $[M+H]^+$ à m/z 623,4125. Les ions $[M+H]^+$ à m/z 301,2192, $[M+Na]^+$ à m/z 323,2015 et $[M+K]^+$ à m/z 339,1752 sont également détectés. Le pic « 2 » correspond à des ions $[M+H]^+$ à m/z 333,3028 et à l'adduit sodium $[M+Na]^+$ à m/z 355, 2850.

La **Figure 64** correspondant à la **fraction D**, caractérisée par un chromatogramme présente un pic d'élution intense à 17,7 min correspondant aux ions $[M+H]^+$ à m/z 392,3199 et $[M+H]^+$ à m/z 414,3019 avec la présence de l'adduit sodium $[M+Na]^+$ à m/z 436,2912. L'ion $[M+H]^+$ à m/z 805,6099 pourrait correspondre à l'assemblage des deux ions $[M+H]^+$ à m/z 392,3199 et $[M+H]^+$ à m/z 414,3019. Les ions $[M+H]^+$ à m/z 333,3028 et l'adduit sodium $[M+Na]^+$ à m/z 355,2863 sont également détectés dans la fraction D, ceux-ci ont aussi été mis en évidence dans la fraction C.

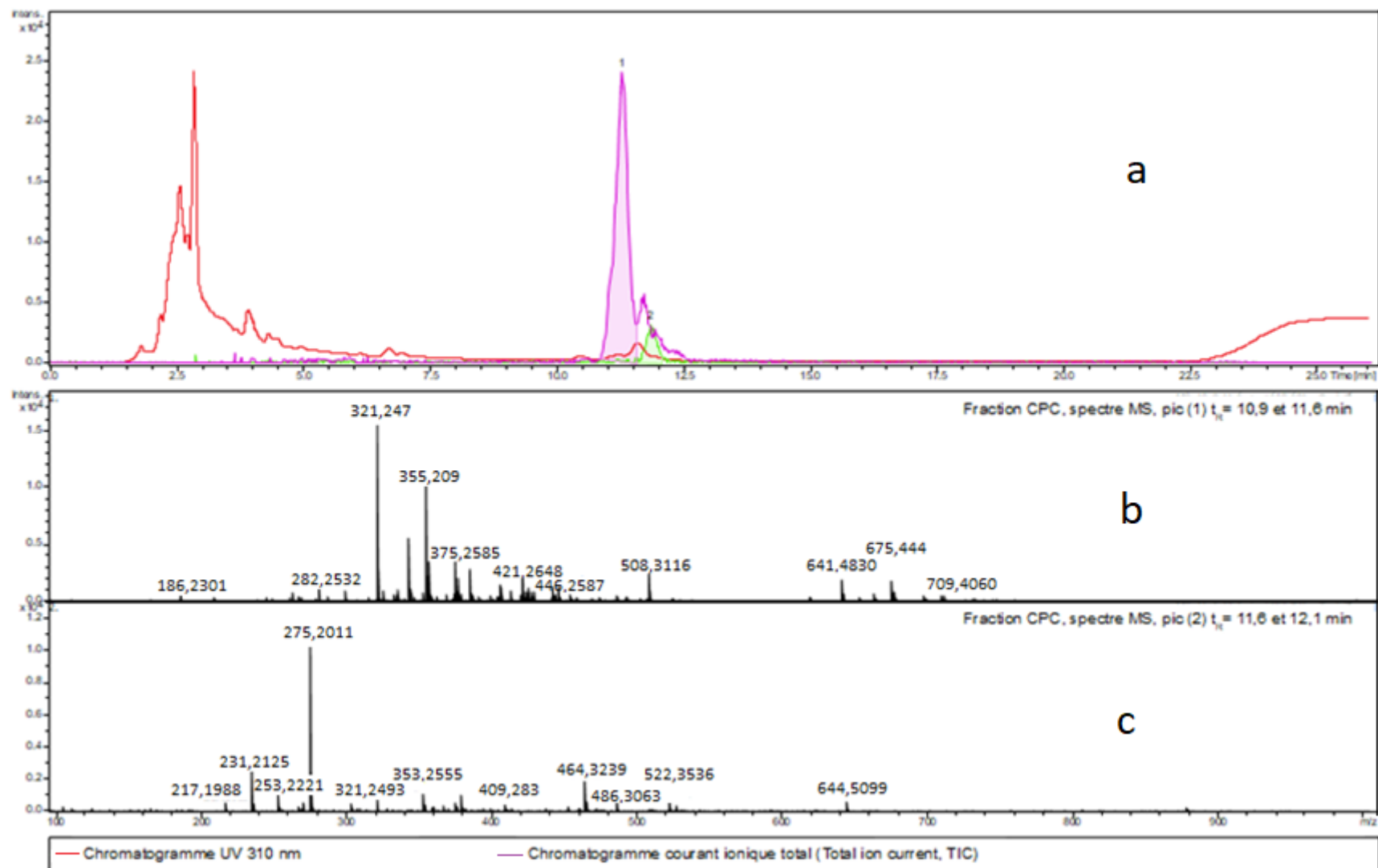


Figure 62 : (a) Chromatogramme de la fraction B avec détection à $\lambda_{max} = 310$ nm (rouge). En violet, apparaît le TIC (Total Ion Current). (b) Le spectre de masse du composé 1 ; (c) Le spectre de masse du composé 2.

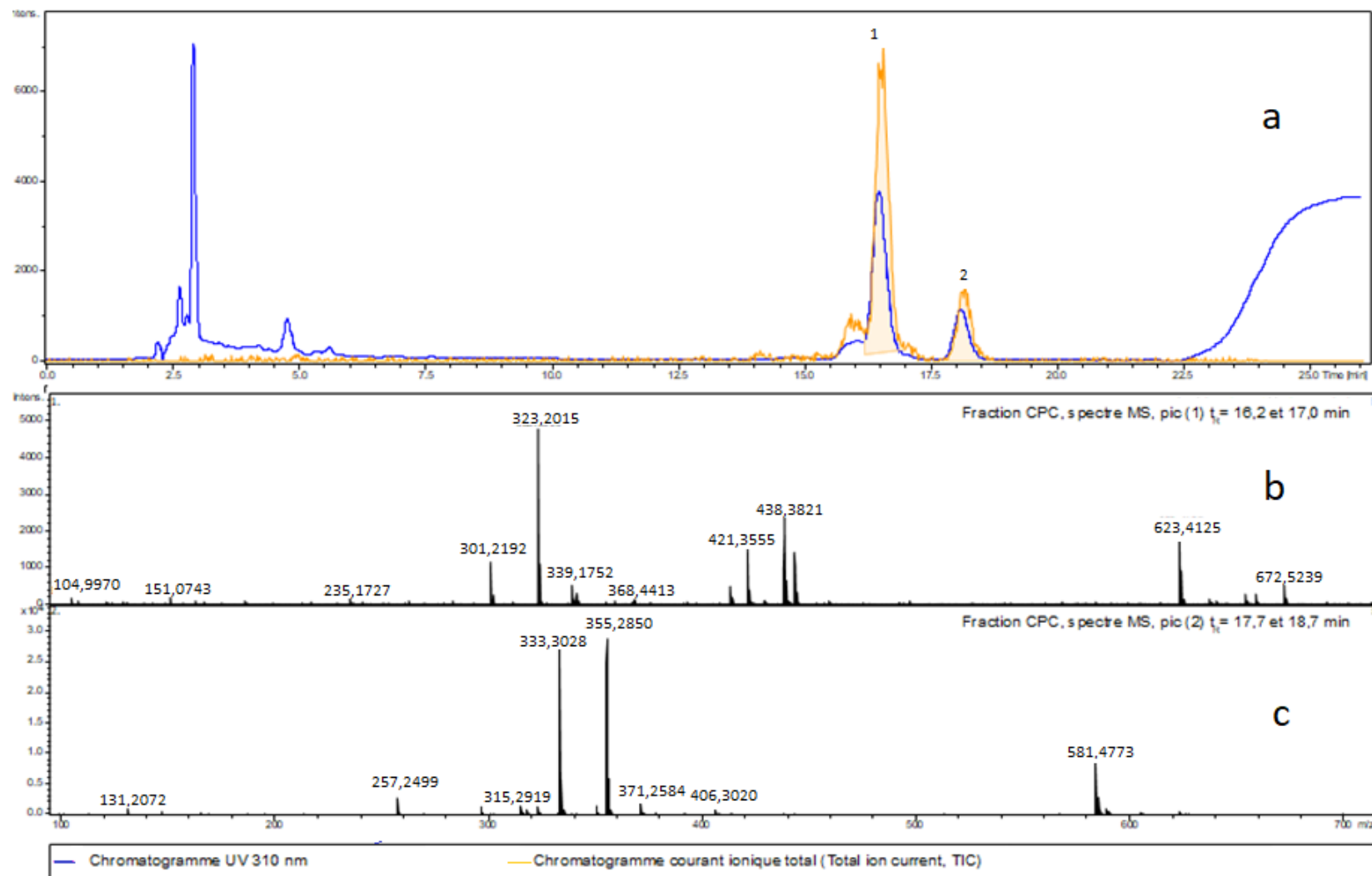


Figure 63: (a) Chromatogramme de la fraction C avec détection à $\lambda_{max} = 310$ nm (bleu). En orange, apparaît le TIC (Total Ion Current). (b) Le spectre de masse du composé 1 ; (c) Le spectre de masse du composé 2.

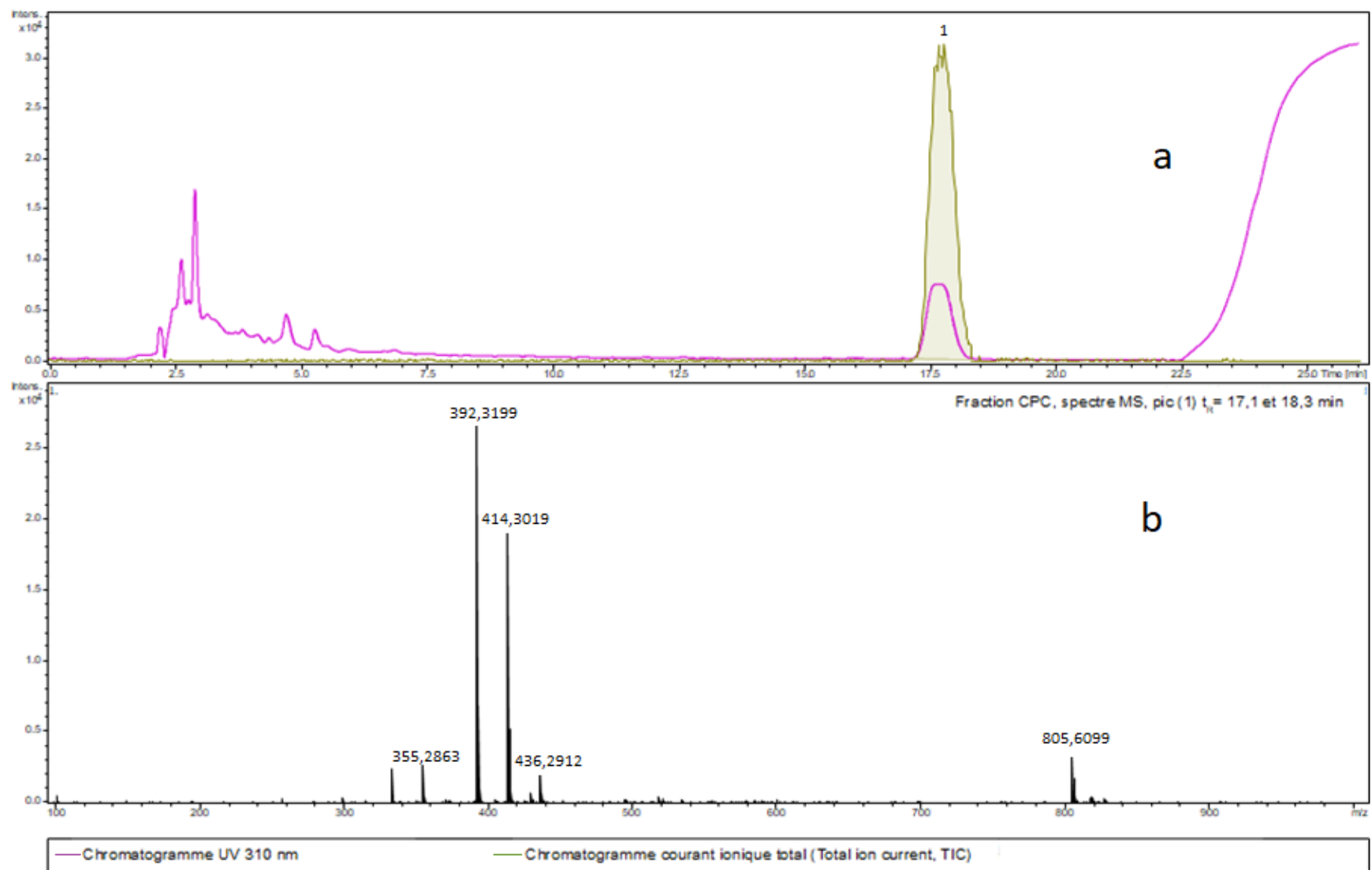


Figure 64: (a) Chromatogramme de la fraction D avec détection à $\lambda_{max} = 310$ nm (violet). En vert, apparaît le TIC (Total Ion Current). (b) Le spectre de masse du composé 1.

2.3. Caractérisation de l'extrait polaire

L'extrait polaire obtenu par extraction à l'éthanol à 70% a été analysé par LC-MS afin de d'identifier les molécules absorbant dans la zone UV-A et UV-B. L'analyse a permis d'enregistrer un chromatogramme à la longueur d'onde de 334 nm et le TIC.

Les spectres de masse obtenu pour cet extrait sont présentés par la **Figure 65**.

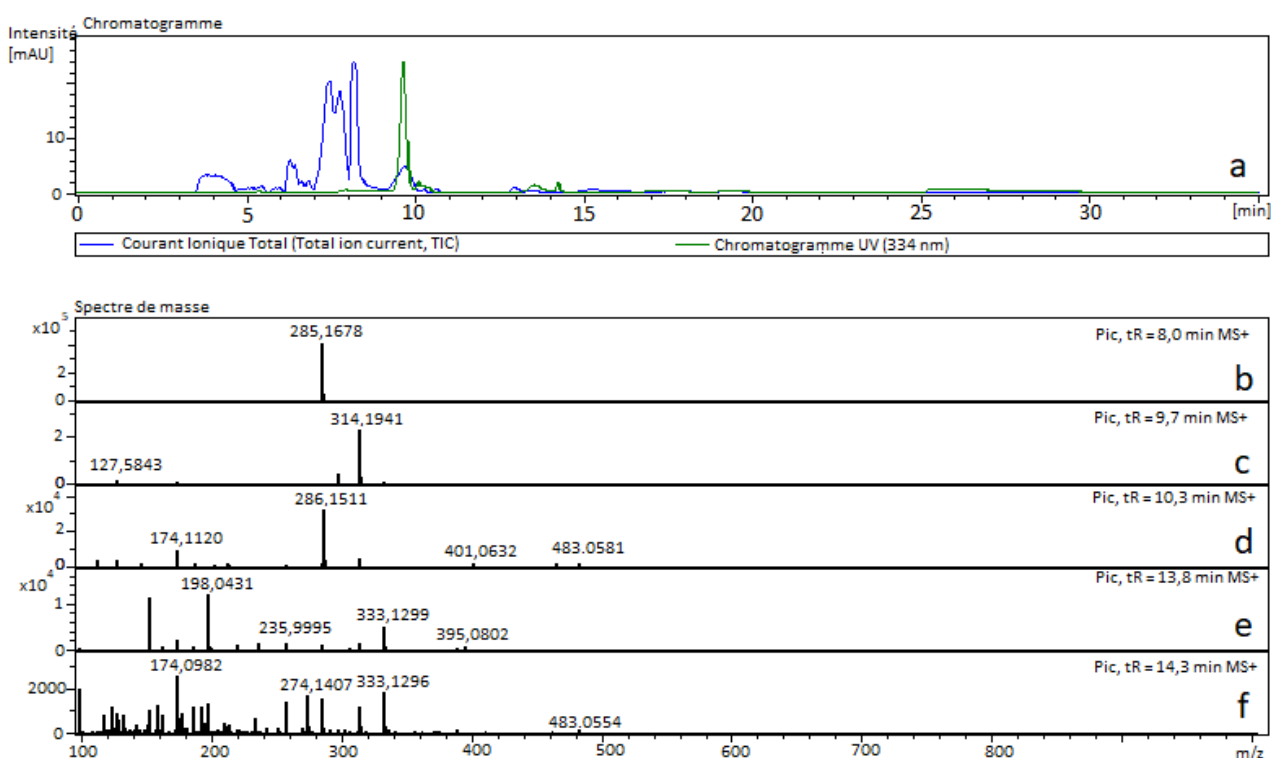


Figure 65: Spectre de masse de l'extrait polaire issu de l'algue *S. chordalis*. (a) Chromatogramme UV à 334 nm (vert) et le TIC (bleu) ; (b) spectre de masse du composé à 8,0 min ; (c) spectre de masse du composé à 9,7 min ; (d) spectre de masse du composé à 10,3 min ; (e) spectre de masse du composé à 13,8 min et (f) spectre de masse du composé à 14,3 min.

L'analyse à 334 nm montre la présence d'un signal intense à un temps de rétention de 9,7 min. Deux autres signaux de plus faibles intensités sont notables à 8 min et en 13 et 15 min. Le TIC montre des pics intenses non détectés à la longueur d'onde 334 nm.

L'analyse du spectre de masse (b) du signal à 8 minutes montre qu'un seul signal avec une masse $[M+H]^+$ à m/z 285,1678 est détecté.

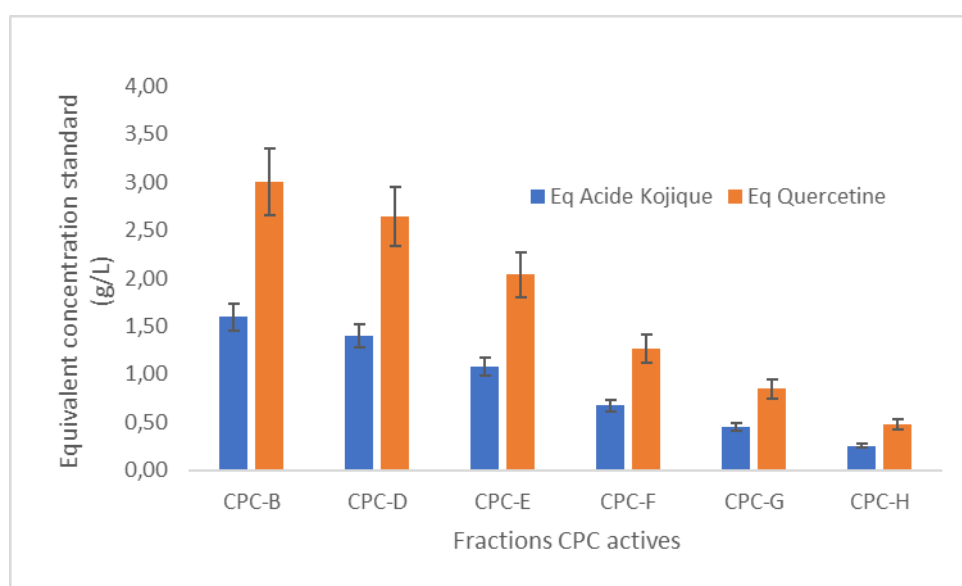


Figure 66: Histogramme présentant l'activité anti-tyrosinase de 6 fractions CPC (Partie III.2.2.1.). Les résultats exprimés en équivalent de l'activité des composés standards Acides Kojique (bleu) et Quercetine (orange). La concentration des fractions est de 10 g/L.

Le spectre de masse (**c**) observé à 9,7 min présente un autre signal pour un ion $[M+H]^+$ à m/z 314,1941 m/z et un fragment à m/z 127,5843.

L'analyse du spectre de masse (**d**) du signal UV observé à 10,3 min d'élution montre la présence d'un ion à une masse $[M+H]^+$ à m/z 286,1511.

Les spectres de masse (**e**) et (**f**) obtenus pour le pic élué entre 13,8 et 14,3 min présentent des ions $[M+H]^+$ à m/z 333, 1299 et m/z 198,0481 pour le premier et des ions $[M+H]^+$ de 333,1296 et m/z 174,0982 pour le second.

Ces résultats nous laissent penser que les fractions sont composées d'Acides Aminés Mycosporines-like.

2.4. Évaluation des activités biologiques

2.4.1. Analyse des fractions de l'extrait apolaire

2.4.1.1. Fractions obtenues par Chromatographie Partage Centrifuge

2.4.1.1.1. Évaluation de l'activité antiradicalaire

Le fractionnement de l'extrait apolaire par l'application d'une méthode CPC optimisée a permis dans un premier temps de fractionner l'extrait apolaire brut en différentes fractions (15 au total, **cf. Figure 2 de la publication p.363**). Ces fractions ont été soumises au test DPPH (**Matériel et méthodes 6.1.1**) pour déterminer l'activité antiradicalaire. Les résultats montrent que les quinze fractions testées présentent une capacité à inhiber la formation de radicaux libres variant de 2 à 29%. Le détail des résultats obtenus est décrit dans la publication présente dans le manuscrit à la page 363.

2.4.1.1.2. Évaluation de l'activité anti-tyrosinase

L'évaluation de l'activité anti-tyrosinase a été réalisée sur les différentes fractions (**Matériels et méthodes 6.1.3**). Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 66**. Les résultats sont exprimés en équivalent de standard d'inhibition, l'acide Kojique et la Quercétine.

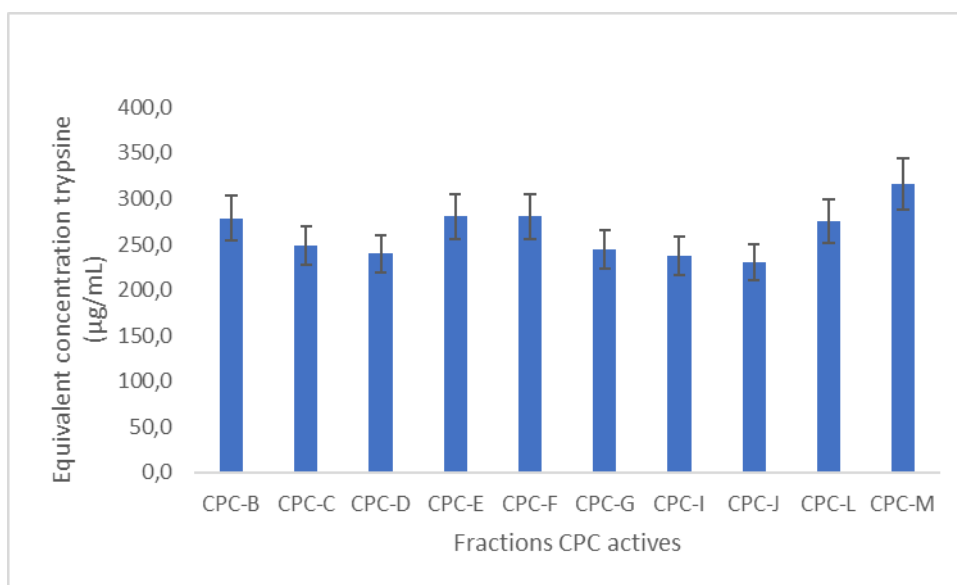


Figure 67: Histogramme présentant l'activité anti-âge des fractions obtenues par fractionnement de l'extrait méthanolique brut issu de la macroalgue *S. chordalis*. Les résultats sont exprimés en équivalent de trypsine, standard inhibiteur. La concentration des fractions est de 10 mg/mL.

Les deux standards présentent des valeurs CI_{50} de $31,3 \pm 2,8$ et $58,9 \pm 6,8$ mg/mL pour l'acide Kojique et la Quercétine respectivement. Chaque fraction a été testée à une concentration de 10 g/L. Les résultats sont exprimés en équivalent de concentration de standard, c'est-à-dire que l'inhibition obtenue par la fraction (10g/L) est équivalente à celle obtenue par une concentration de standard (exemple : une équivalence de 3g/L en quercétine signifie que l'activité de la fraction B (10g/L) = Quercétine (3g/L)). Les fractions I, J, K, L, M, N et O ne présentent pas d'activité anti-tyrosinase. La fraction B présente une activité anti-tyrosinase efficace avec respectivement une inhibition équivalente à 1,6 et 3,0 g/L d'Acide Kojique et de Quercétine.

2.4.1.1.3. Évaluation de l'activité anti-âge

L'évaluation de l'activité anti-âge a été déterminée par l'analyse de l'inhibition de l'activité de l'enzyme élastase. Les résultats obtenus exprimés en équivalence de l'activité de la trypsine (molécule standard de référence) sont présentés dans la **Figure 67**.

Les fractions B à G et I, J, L, et M à une concentration de 10 mg/mL présentent une activité inhibitrice équivalente à la solution de trypsine à une certaine concentration. La trypsine a permis de calibrer l'inhibition de l'élastase préalablement, elle présente une CI_{50} de $361,9 \pm 31,5$ µg/mL.

Les résultats obtenus pour les fractions CPC présentent une activité inhibitrice comprise entre 230,5 et 316,2 µg/mL d'équivalent trypsine. Suivant la courbe de calibration (**Matériels et méthodes 6.1.2**) cela équivaut à une inhibition comprise entre 1 et 30% d'inhibition. La **fraction M** présente l'activité inhibitrice la plus importante avec une réduction de 30% de la cinétique de formation de p-nitroaniline marqueur de l'activité de l'élastase.

2.4.1.2. Fractions purifiées par Chromatographie Liquide Préparative

2.4.1.2.1. Évaluation de l'activité antiradicalaire

L'évaluation de l'activité des fractions purifiées a été réalisée de manière à confirmer les résultats précédemment observés. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 68**.

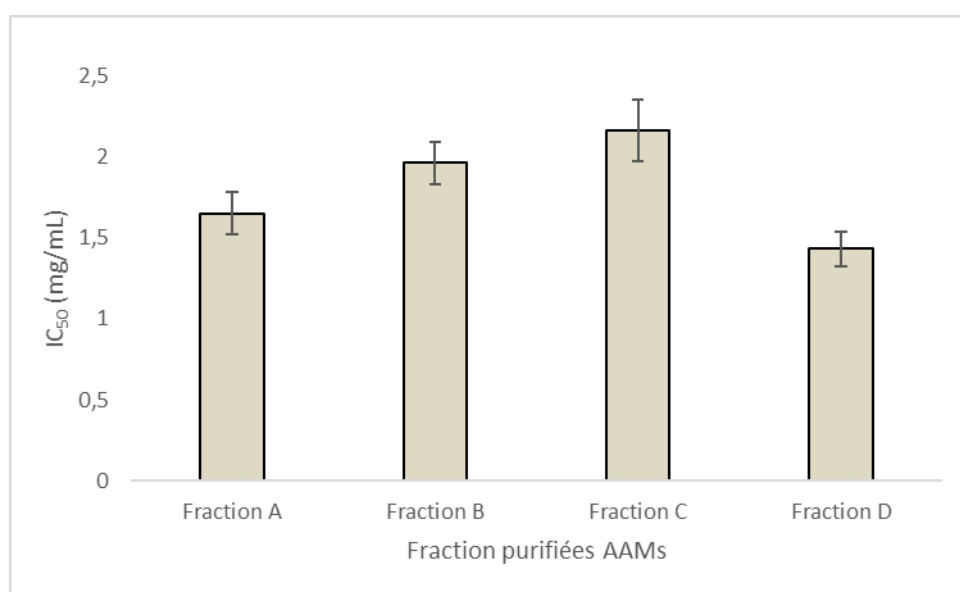


Figure 68 : Histogramme présentant l'activité antiradicalaire des fractions purifiées d'acide aminés mycosporines-like extraite de *S. chordalis*. Les résultats sont exprimés en IC_{50} qui correspond à la concentration permettant de réduire de 50% la formation de radicaux libre, cette concentration est exprimées en mg/mL.

Les fractions **A** et **B** correspondent aux fractions CPC L, M, N et les fractions **C** et **D** correspondent aux fractions CPC J, K et L (cf. **partie 2.2.1**). Les résultats A, B, C et D montrent des activités anti-radicalaires du même ordre de grandeur avec des CI_{50} qui varient de $1,4 \pm 0,1$ mg/mL à $2,2 \pm 0,2$ mg/mL.

2.4.1.2.2. Évaluation de l'activité photoprotectrice

Les activités photoprotectrices des différentes fractions purifiées d'acide aminés mycosporines-like ont été évaluées par exposition aux rayonnements UV-A (365 nm) et UV-B (312 nm). Ces activités sont évaluées par la mesure de la dénaturation de l'échantillon photoprotecteur face aux rayonnements (**Figure 69**) et par l'analyse de la vitesse de dégradation de la chlorophylle b (**Figure 70**). Ces courbes ont permis de déterminer le temps de demi-vie (**Matériels et méthodes 6.1.4.**) de la chlorophylle b (**Tableau XXXIX**).

L'ensemble des courbes de suivi de la dénaturation des fractions de CPC montre que l'absorbance à 310 nm diminue au cours du temps après exposition aux rayonnements UV-A et UV-B. Le rayonnement UV-A semble également entraîner une dénaturation plus importante des quatre fractions, ceci se confirme par la détermination du pourcentage de produit dénaturé au bout de 120 minutes où l'on observe une augmentation de 5 à 17 % de dénaturation supplémentaire lors de l'exposition aux UV-A. La fraction B semble la plus sensible aux rayonnements avec une dénaturation de 28 et 45% lors de l'exposition aux UV-B et UV-A respectivement. Cela démontre la sensibilité des composés aux rayonnements.

L'analyse de la dénaturation de la chlorophylle b lors de l'exposition aux rayonnements UV a démontré des vitesses de dénaturation exprimées en temps de demi-vie de $36,6 \pm 1,6$ et $39,9 \pm 1,9$ minutes pour l'exposition aux rayonnements UV-A et UV-B respectivement. La valeur de demi-vie exprime le temps que la chlorophylle met pour être dénaturée à 50%.

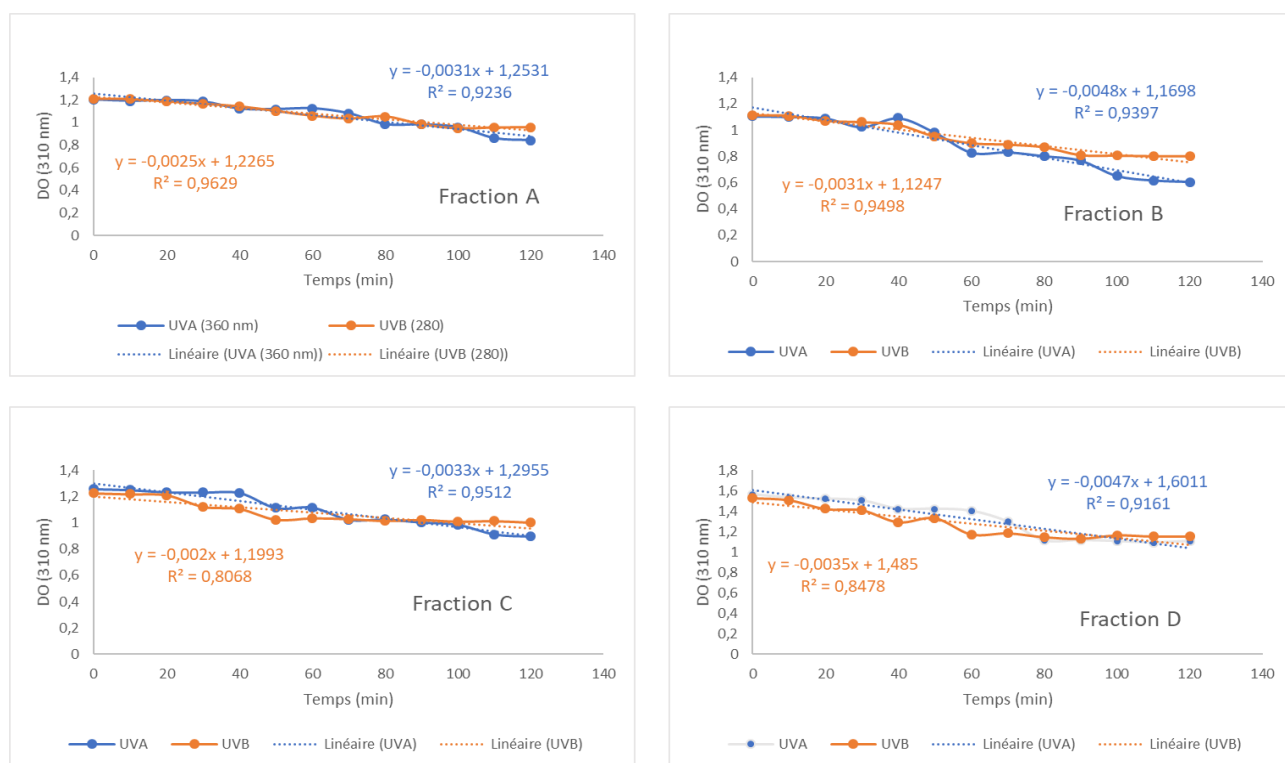


Figure 69 : Courbes de dégradation des fractions purifiées A, B, C et D des composés anti-UV soumis à l'exposition des UV-A (bleue) et des UV-B (orange).

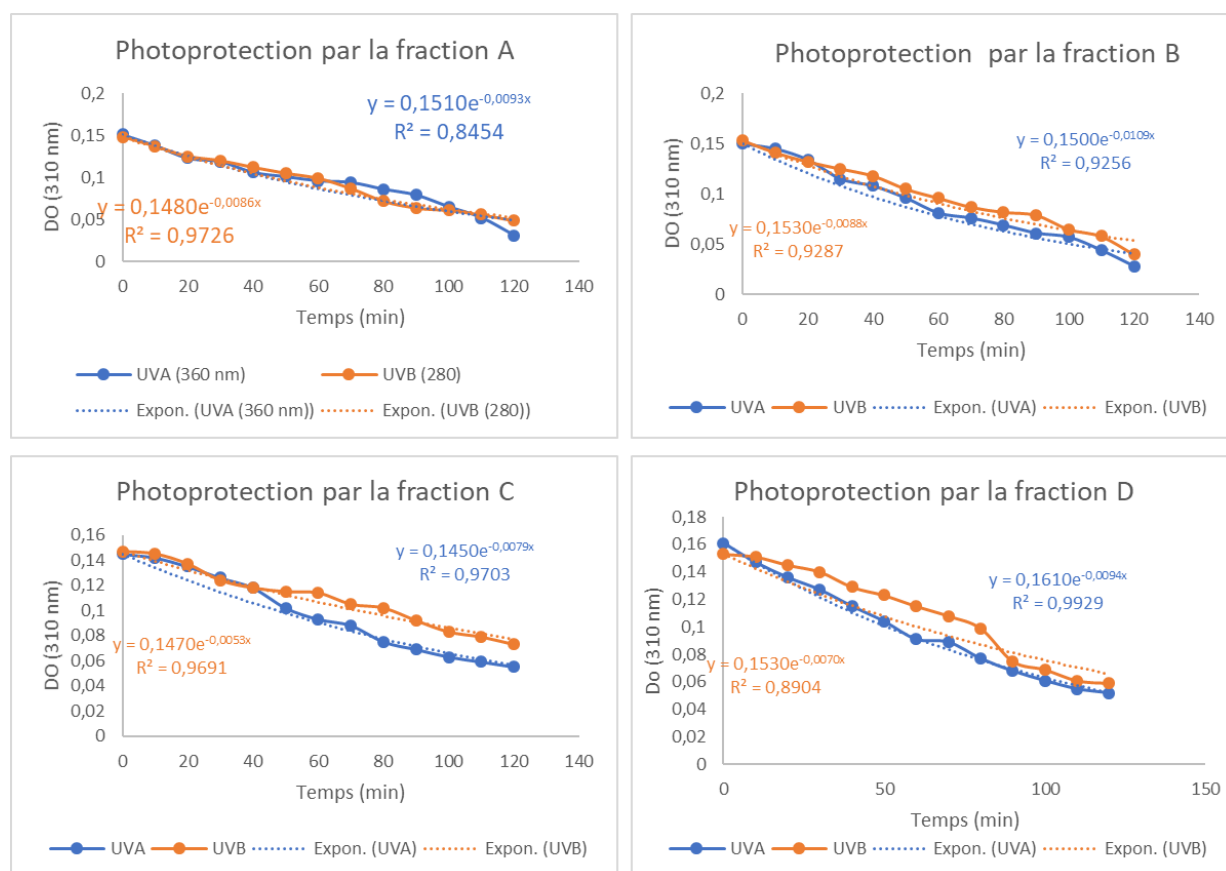


Figure 70 : Droites de dégradation de la chlorophylle b soumis aux rayonnements UV-A (bleue) et UV-B (orange) en présence des fractions purifiées jouant le rôle de filtre photoprotecteur.

Tableau XXXIX: Résultats déterminés à partir des courbes de dénaturations présentées dans les **Figure 69** et **Figure 70**. Les valeurs représentent le pourcentage de dénaturation des fractions purifiées au bout de 120 minutes d'exposition aux UV-A et aux UV-B. Les valeurs expriment également l'effet photoprotecteur de ces fractions (A,B,C et D) en déterminant le temps de demi-vie de la chlorophylle b.

Exposition UVA						
			Fraction CPC			
			Témoïn	A	B	C
Dénaturation Fraction CPC	à 120 min (%)	-	29,9 ± 2,3	45,2 ± 2,7	28,7 ± 1,4	29,2 ± 2,5
Temps de demi-vie chlorophylle	(min)	36,6 ± 1,6	74,5 ± 11,5	63,6 ± 4,7	87,7 ± 2,6	73,0 ± 1,6
Exposition UVB						
			Fraction CPC			
			Témoïn	A	B	C
Dénaturation Fraction CPC	à 120 min (%)	-	20,9 ± 0,9	27,9 ± 1,4	18,3 ± 3,5	24,5 ± 3,7
Temps de demi-vie chlorophylle	(min)	39,9 ± 1,9	80,6 ± 2,2	78,8± 5,6	130,8 ± 4,0	99,0 ± 10,9

L'application des fractions de CPC par superposition des deux microplaques, permettant de faire écran entre le rayonnement UV et la chlorophylle, a permis de déterminer l'effet photoprotecteur des différents échantillons. Lorsqu'on détermine la cinétique de dénaturation de la chlorophylle b, les résultats montrent que cette cinétique de dénaturation est ralentie par la présence des fractions. En effet, les fractions purifiées permettent d'augmenter le temps de demi-vie de 27 à 51 minutes face à l'exposition aux UV-A et de 39 à 91 minutes face à l'exposition aux UV-B. Les fractions purifiées semblent avoir un effet photoprotecteur plus important face aux rayonnements UV-B avec les meilleurs résultats obtenus pour la fraction C avec un temps de demi-vie atteignant les 130,8 ± 4,1 minutes. La fraction B semble présenter l'effet photoprotecteur le moins efficace face aux rayonnements UV.

Tableau XL : Évaluation de l'activité photoprotectrice de l'extrait polaire de *S. chordalis*. Les résultats présentent la demi-vie de la chlorophylle b exposée aux rayonnements UV-A et UV-B en présence ou non de l'extrait polaire comme filtre photoprotecteur.

	Évaluation de l'activité photoprotectrice			
	UVA		UVB	
	<i>Sans protection</i>	<i>Protection</i>	<i>Sans protection</i>	<i>Protection</i>
k	0,019	0,007	0,018	0,01
Tps 1/2 vie	36,6	99,0	39,9	69,3
% erreur	0,982	0,829	0,986	0,694
Écart-type	1,6	16,9	1,9	21,2
Temps de 1/2 vie <i>(min)</i>	36,6 ± 1,6	99,0 ± 16,9	39,9 ± 1,9	69,3 ± 21,2

2.4.2. Analyse de l'extrait polaire

2.4.2.1. Évaluation de l'activité antiradicalaire

L'évaluation de l'activité antiradicalaire de l'extrait polaire a été réalisée suivant la méthode au DPPH. La gamme de dilution a permis de déterminer une IC₅₀ de 319,7 ± 12,1 µg/mL.

2.4.2.2. Évaluation de l'activité photoprotectrice

L'évaluation de l'activité photoprotectrice de l'extrait polaire de *S. chordalis*. Ce test a permis de comparer la valeur obtenue pour la chlorophylle seule et la chlorophylle b avec l'échantillon comme filtre face aux rayonnements UV-A et UV-B. Le **Tableau XL** présente les résultats obtenus.

Les résultats présentent les paramètres de la cinétique de la dégradation définie par l'équation :

$$A_{(t)} = A_{(0)} \times e^{-kt}.$$

Le facteur k est obtenu par l'équation de la droite de dégradation de la chlorophylle obtenu par le suivi de l'absorbance en fonction du temps avec un % erreur.

Le facteur k permet de définir le temps de demi-vie de la chlorophylle avec ou sans protection par l'extrait polaire de *S. chordalis*. Ces paramètres ont permis de définir un temps de demi-vie de la chlorophylle de 99,0 ± 16,9 minutes lors de la protection par l'extrait polaire. Ceci équivaut à une augmentation du temps de vie de 1,7 fois (demi-vie de la chlorophylle de 36,6 ± 1,6 minutes sans protection) lors de l'exposition au rayonnement UV-A. Les résultats obtenus lors de l'exposition aux UV-B ont permis de définir un temps de demi-vie de 69,3 ± 21,2 minutes avec protection par rapport au 39,9 ± 1,9 minutes sans protection, soit une augmentation du temps de demi-vie de 73%.

3. Discussion

L'application de méthodes d'extraction par des systèmes solvants différents (méthanol puis concentré dans l'acétate d'éthyle et éthanol/eau 70/30) a permis d'obtenir des rendements d'extraction de respectivement de 21 et 34% ; d'isoler des composés anti-UV et de mettre en évidence des activités biologiques et physicochimiques.

3.1. Caractérisation des composés isolés dans les fractions apolaires (A, B, C et D) et l'extrait polaire.

L'extraction de *S. chordalis* par le méthanol (extrait apolaire) ou par le mélange éthanol/eau 70 :30 (extrait polaire) a permis d'isoler des fractions de compositions différentes montrant une capacité à absorber dans le domaine UV. Ces fractions ont démontré des activités biologiques et des propriétés physicochimiques.

Les **fractions A et B** semblent présenter des compositions similaires avec un ion à m/z 321.2445 (fraction A) et 321, 2470 (fraction B). L'ion $[M+H]^+$ à m/z 186,2275 (fraction A) et 186,2301 (fraction B) a été attribué à un fragment des MAAs présent chez la shinorine, porphyrine-334, palythène et la mycosporine-glycine (Whitehead, Karentz et Hedges, 2001). L'observation de ce fragment permet de formuler l'hypothèse de la présence d'un acide aminé mycosporine-like pouvant avoir une masse exacte de 320 Da. À notre connaissance, aucune MAA n'a été décrite avec une masse correspondante. L'ion $[M+H]^+$ à m/z 275,2031 (A) et 275,2011 (B) peut correspondre à la MAA Palythine sérine décrite par Agostino *et al.* (2016). D'autres ions sont détectés dans ces deux fractions (à m/z 464,3231 ; 464,3239 ; 644,5025 ; 644,5099) mais la structure chimique reste à décrire.

La **fraction C et D** contiennent un même composé dont l'ion $[M+H]^+$ est détecté à m/z 333,2038 (fraction C) et à m/z 333,3041 (fraction D) équivalent à la masse de 332 Da. La shinorine est caractérisée par cette masse mais également par une longueur d'onde maximale de 334 nm. Or, pour cette fraction le $\lambda_{\max}$ est de 304 nm. Un second composé détecté à m/z 301, 2192 ne correspond à aucun composé anti-UV décrit.

La **Fraction D** présente l'ion $[M+H]^+$ à m/z 805,6099 avec deux fragments à m/z 392,3199 et 414,3019. Cet ion présentant un m/z plus élevé, pourrait correspondre à une structure de MAAs plus complexe caractérisée comme un hybride qui absorbe dans la région 310 à 330 nm (Wada, Sakamoto et Matsugo, 2015).

L'**extrait apolaire** présente une composition différente avec la présence de la shinorine représenté par l'ion $[M+H]^+$ à m/z 333,1299. On suppose également la présence de la MAAs palythène ou la Usujirène par la détection de l'ion $[M+H]^+$ à m/z 285,1678 (Shukla *et al.* 2016). Cet extrait présente également l'ion $[M+H]^+$ à m/z 286,1511 m/z pouvant correspondre à la MAAs mycosporine glutamicol (285 Da) (Wada, Sakamoto et Matsugo, 2015). Un autre ion $[M+H]^+$ à m/z 314,1941 a été détecté mais il n'est pas décrit dans la littérature.

La caractérisation des composés détectés par une absorbance caractéristique dans la région UV-A et UV-B a permis de mettre en évidence la présence de MAAs. Ces composés n'ont pas été décrit chez *S. chordalis*. L'analyse a également permis de montrer la présence de composés dont la structure n'est pas décrite. Ces composés montrent des absorbances et des valeurs de masse caractéristiques des molécules type MAA.

3.2. Comparaison des activités biologiques et physico-chimiques

3.2.1. Comparaison des fractions CPC et des fractions purifiées par LC-Prep (fractions A, B, C et D).

Suite au premier fractionnement de l'extrait apolaire par CPC et l'obtention des 15 fractions, les activités antioxydante, anti-âge et anti-tyrosinase (blanchiment) ont été évaluées. Les résultats ont montré qu'une activité anti-tyrosinase a été observée sur six fractions (B, D, E, F G et H) à une concentration de 10 mg/mL.

Deux études ont démontré l'effet inhibiteur des extraits méthanoliques isolés des macroalgues rouges sur la tyrosinase. Par exemple, les extraits de *Euchema cottonii* et *Grateloupia lancifaria* (Rhodophycées) ont démontré respectivement des IC_{50} de 234 μ g/mL et 256 μ g/mL (Nguyen et Kim, 2012 ; Chang et Teo, 2016). Ces deux extraits présentent des activités plus élevées comparés

aux fractions de l'extrait apolaire de *S. chordalis* qui inhibent de 30% l'activité de la tyrosinase. L'activité anti-tyrosinase a été observée pour des extraits d'algues brunes et rattachée à la présence de composés phénoliques (Kang *et al.* 2004).

L'évaluation de l'activité anti-âge testée sur les fractions apolaires a démontré une action inhibitrice de l'élastase pour les fractions B à G, I, J, L et M. Comparées à la trypsine (standard), ces activités sont moins importantes. Ces résultats sont intéressants car l'activité anti-âge peut être liée à la présence des composés anti-UV présents dans les fractions J, L et M (qui correspondent aux fractions A, B, C et D avant LC-Prep).

Les extraits de *Cystoseira barbara* (Pheophycée, Fucales) montrent une activité anti-élastase très élevée avec un CI_{50} 0,04 $\mu\text{g/mL}$ (Bilgin Sokmen *et al.* 2016). Une autre étude a démontré le rôle des polysaccharides sulfatés (fucoïdanes) de *Saccharina latissima* (Phéophycée, Laminariales). Ces extraits montrent des activités anti-élastases avec des IC_{50} comprises entre 0,4 et 0,9 $\mu\text{g/mL}$. Cette activité est reliée à la composition en monosaccharides (Ehrig et Alban, 2015). Les extraits d'algues rouges semblent cependant être moins actifs, une étude a montré que les extraits (dichlorométhane/méthanol 50 :50) de *Corallina elongata*, *Chondrus crispus*, *Gelidium sesquipedale* et *Laurencia pinnatifida* (Rhodophycées) permettaient de réduire l'activité de l'élastase de 95% avec un extrait concentré à 7,2 g/L. Les extraits de *Chondria dasyphylla*, *Acrosorium venulosum*, *Hypnea musciformis*, *Gigartina pistillata*, *Palmaria palmata* et *Pterosiphonia complanata* montrent des activités inférieures comprises entre 50 et 90% d'inhibition (Oumaskour *et al.* 2013). Les auteurs ne mentionnent pas la composition des extraits.

La littérature décrit des effets des MAAs sur l'expression des gènes intervenant dans l'effet du vieillissement de la peau, notamment observée à partir des extraits contenant les mycosporine-glycine, porphyra-334 et shinorine. Cependant, il n'est également cité que le stress oxydant module l'activation de mécanisme intervenant sur l'expression de ces gènes (Suh *et al.* 2014). Les MAAs de *Chlamydomonas hedleyi* (Chlorophycées, Chlamydomonadales) ont démontré qu'ils sont des facteurs de modulation de l'expression des gènes PCOLCE, élastine et involucine intervenant dans le mécanisme de vieillissement (Oyamada *et al.* 2008).

L'évaluation de l'activité antiradicalaire de l'extrait apolaire et des différentes fractions A, B, C et D a été réalisée par la méthode DPPH. Les résultats montrent une activité inhibitrice de l'ensemble des échantillons. D'après la Fig. 1 de la publication, les fractions C à F et K à N démontrent

l'activité la plus importante. Le premier groupe de fractions (C à F) ne contient pas de composés anti-UV, l'activité est donc liée à la présence d'autres composés apolaires. En revanche, la série de fractions J, K, L et L, M, N correspond de manière respective aux fractions purifiées C, D et A, B. L'activité antiradicalaire des fractions CPC est également retrouvée chez les fractions purifiées A, B, C et D.

3.2.2. Comparaison des fractions apolaires A, B, C et D avec la fraction polaire.

La comparaison de l'activité antiradicalaire des fractions purifiées A, B, C et D absorbant dans la région UV-B (280 - 320 nm) à celle obtenue par l'extrait polaire absorbant dans les UV-A (320 - 360 nm) montre des efficacités significativement différentes. Les fractions A à D présentent des CI_{50} cinq fois plus importantes par rapport à l'extrait polaire. Cet extrait composé de MAAs absorbant dans la région UV-A présente une activité antiradicalaire évaluée à une CI_{50} de 319,7 $\mu\text{g/mL}$. Ces résultats démontrent une variabilité importante de l'activité antiradicalaire en fonction du type d'extrait, qui semble liée à sa composition.

Plusieurs études ont montré l'activité antiradicalaire des MAAs. [Suh et al. \(2014\)](#) ont déterminé l' IC_{50} de la mycosporine glycine (M-Gly), de porphyra-334 (P-334) et de la shinorine (SH). L'activité antiradicalaire des MAAs a été comparée à l'activité de l'acide ascorbique, CI_{50} 0,55 mg/mL. En comparaison, la M-Gly présente un CI_{50} de 1,03 mg/mL et la P-334 et SH une activité antiradicalaire modérée ([Suh et al. 2014](#)). [Cheewinhamrongrod et al. \(2016\)](#) ont également démontré l'activité antiradicalaire de plusieurs MAAs et mélange de MAAs. La mycosporine-2-glycine (M-2-Gly), la mycosporine-glycine (M-Gly) et le mélange porphyra-334, shinorine (P-334+SH) ont démontré des IC_{50} de 22,0 ; 43,0 et 3430,0 μM respectivement. Ces résultats confirment l'observation émise par [Suh et al. \(2014\)](#). Une autre étude a démontré l'activité antiradicalaire d'un mélange partiellement purifié de MAAs contenant la shinorine et la M-307 dont la structure n'est pas élucidée. Ce mélange de MAAs a démontré la capacité d'inhiber de 39% et 64% la formation de radicaux libres pour des concentrations de 0,83 et 1,6 mg/mL ([Rastogi et Incharoensakdi, 2014](#)). On peut estimer que l' IC_{50} est supérieur à 1 mg/mL. Cette différence d'activité peut être due au fait que la M-Gly est une MAAs oxo-carbonyl contrairement aux P-334 et SH qui sont des imino-MAAs avec un cycle cyclohexènimine. L'oxydation des molécules est accélérée par le processus de chauffage, car l'augmentation de la température est une source

d'énergie d'activation à la réaction (Suh *et al.* 2014). La différence de stabilité des molécules de par leur structure et leur sensibilité vis-à-vis du chauffage peut expliquer la différence d'activité. Cependant, les MAAs P-334 et SH présentent une activité antioxydante sur des substrats différents par l'inhibition de la peroxydation des lipides (Tao *et al.* 2008 ; Coba *et al.* 2009). Il a également été reporté que les MAAs glycosylées ont démontré une activité antiradicalaire importante (Matsui, 2011). La différence d'efficacité entre les MAAs pour l'inhibition de la formation de radicaux libres s'explique au niveau de la structure moléculaire. Les MAAs de type aminocyclohexenimine ont une capacité d'inhibition importante en milieu basique, contrairement aux types amino-cyclohexenones qui sont actives dans une large gamme de pH (Wada, Sakamoto et Matsugo, 2015). Dans le cas de P-334, le fait d'être switerionique et d'avoir un pKa de 5,7 ; lorsque la réaction se fait à pH 8,5 la MAA est sous sa forme chargée négativement et sa charge est neutre à pH 6 (Sivalingam, Ikawa et Nisizawa, 1976).

.

Enfin, l'extrait polaire riches en MAAs ainsi que les quatre fractions A à D ont été étudiées pour leur capacité à protéger la chlorophylle du rayonnement UV. L'extrait polaire semble démontrer une meilleure capacité à protéger du rayonnement UV-A. En comparaison, les fractions semi-purifiées de MAAs obtenues par fractionnement de l'extrait apolaire présentent une meilleure efficacité face aux rayonnements UV-B, notamment la fraction C. Ces observations semblent liées au spectre d'absorption des composés. En effet, les MAAs contenues dans l'extrait polaire présentent des maximums d'adsorption dans la région UV-A entre 330 et 360 nm avec une majorité à 334 nm. Les fractions A-D présentent des maximums d'adsorption situés entre 300 et 320 nm qui correspondent à la région UV-B. De plus, les échantillons semblent posséder une relative stabilité face aux rayonnements.

L'activité photoprotectrice des composés appartenant au groupe des Acides Aminés Mycosporine-like a été démontrée par plusieurs composés extraits de différents organismes marins. Conde, Churio et Previtali, (2000) ont isolé la molécule de Porphyra-334 afin de déterminer sa photostabilité.

L'évaluation de différents extraits de *S. chordalis* obtenus par l'application de différents solvants dans le but d'extraire les composés photoprotecteurs a été également menée. Les résultats montrent une variabilité de l'activité photoprotectrice en fonction du type d'extrait. Les valeurs de temps de demi-vie de la chlorophylle b varient de 3,0 à 121 minutes (Bedoux *et al.*, 2014).

Il a été décrit que les MAAs ont une capacité d'adsorption des longueurs d'onde UV-A et UV-B importante avec une émission de fluorescence faible et une capacité de photostabilité. Le caractère photostable des MAAs est directement lié à leur structure aminocyclohexenimine ou aminocyclohexenone. Cette structure est complétée par des substituants directement liée aux mécanismes métaboliques de l'algue ou de l'organisme les produisant. Dans les cas de substituants tels que les groupements amino et alcools directement liés au chromophore, leurs différenciations affectent seulement la longueur d'onde d'adsorption mais ne changent pas la photostabilité. Les autres substituants (acide, amine et alcool) liés à la chaîne latérale dépendent des voies de biosynthèse. Leurs positionnements n'affectent pas la photostabilité ni les propriétés du chromophore (Losantos, Sampedro et Churio 2015).

Les MAAs palythine, shinorine et porphyra-334 sont très efficaces pour la prévention de dimère de thymine qui joue un rôle important dans les dommages sur l'ADN. Ils démontrent la capacité à bloquer les UV. Le mécanisme de photoprotection est dû au transfert d'énergie entre le résidu thymine chargé et les MAAs et, par leur capacité de filtration des rayons. Des études ont d'ailleurs démontré la capacité de la P-334 à protéger les cellules des effets négatifs des rayons UV par le contrôle des réactions oxydatives de défense, la viabilité cellulaire et la réduction de l'apoptose (Misonou *et al.* 2003 ; Schmid *et al.* 2003).

4. Conclusion

La caractérisation de composés présents dans ces deux extraits a révélé la présence de molécules absorbantes dans la région UV. L'extraction par solvants polaires a mis en évidence la présence de composé absorbant dans la région UV-A (320 – 360 nm) dont certains paraissent appartenir à la famille des MAAs. Parmi ces molécules, certaines d'entre elles ont été identifiées comme la shinorine, la mycosporine-glutamicol, le palythène ou l'usujirène. D'autres composés n'ont pas été caractérisés.

L'extraction en conditions apolaires a démontré la présence de composés absorbant davantage dans la région UV-B (280 – 320 nm) avec notamment des maximums d'absorption entre 300 et 310 nm. La caractérisation de ces molécules a permis de mettre en évidence la présence de la molécule Palythine-sérine. D'autres composés présentant des masses de 300, 320 et 332 Da n'ont pu être caractérisés. De plus, la détection d'une molécule présentant une masse plus importante de 804 Da

lève l'hypothèse de la présence de structure complexe multichromophore récemment décrite (Nazifi *et al.* 2015).

L'étude des propriétés biologiques des extraits a permis de mettre en évidence la présence d'activités antioxydante, anti-âge, anti-tyrosinase et photoprotectrice. L'ensemble des fractions apolaires et polaires montrent des activités anti-radicalaires qui sont néanmoins plus élevées pour l'extrait polaire qui contient des MAAs. De plus, l'analyse des propriétés photoprotectrices des extraits a permis de démontrer une corrélation avec la présence de composés de type MAAs. L'ensemble de ses résultats démontrent les propriétés des MAAs. Elles interviennent dans la lutte contre les radicaux libres et la filtration des UV.

L'étude des activités anti-âge et anti-tyrosinase a permis de mettre en évidence la présence d'autres composés présents dans l'extrait apolaire pouvant être séparés des composés anti-UV par CPC et démontrant des propriétés intéressantes dans ces domaines.

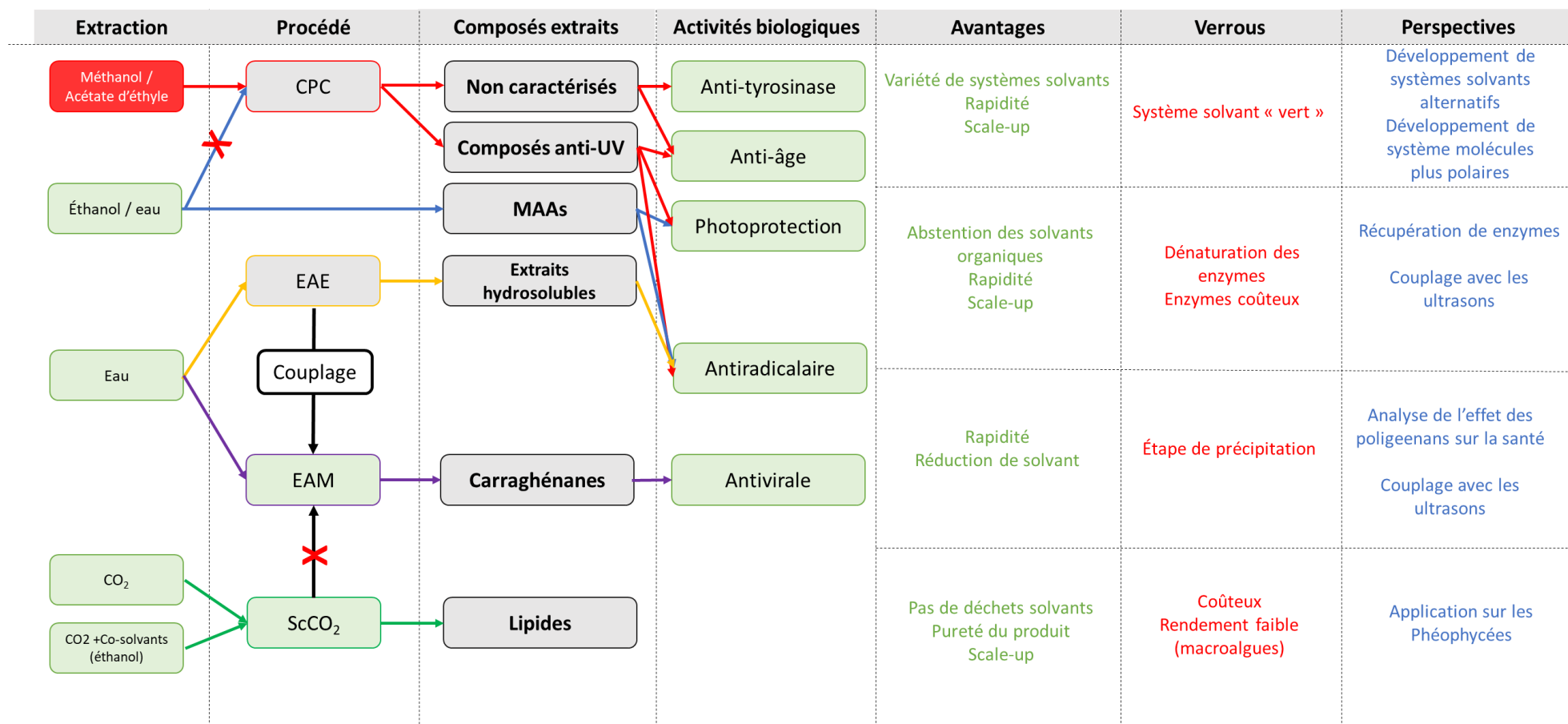


Figure 71: Schéma de synthèse de l'extraction de composés actifs de *Solieria chordalis* par l'application de différents procédés.

Conclusion Générale

Le marché des hydrocolloïdes de macroalgues représente actuellement une valeur globale d'environ 1,1 milliards de dollars dont la majeure partie dépend des pays d'Asie (Hurtado, Neish, & Critchley, 2015 ; Rhein-Knudsen, Ale et Meyer, 2015). Les agars et les carraghénanes issues des algues rouges sont principalement destinés aux domaines de l'agroalimentaire, de la pharmaceutique et des applications en biotechnologie. Les applications auxquelles sont liés les hydrocolloïdes sont majoritairement en relation avec les propriétés gélifiante, émulsifiante et épaississant. Toutes ses fonctions sont liées à propriétés rhéologiques dépendantes de la composition et la structure des polysaccharides. Depuis quelques années, de nouvelles applications en santé ont montré un intérêt pour les hydrocolloïdes algaux. La valeur des carraghénanes sur le marché est de 10500 dollars/Tonne mais ne présente pas une marge importante car le prix moyen des carraghénophytes est de 1400 dollars/Tonne (Nayar et Bott, 2014). La plus-value du produit est directement liée à son coût de production, à sa disponibilité et à ses propriétés. Cette plus-value nécessite un système de production optimisé, avec un coût énergétique et un impact environnemental réduit. C'est également dans ce sens que les nouvelles technologies se développent en essayant de trouver des alternatives aux procédés existants en améliorant la productivité, la qualité du produit et en conservant ou apportant de nouvelles propriétés.

La première partie de l'étude a portée sur l'optimisation de l'extraction des carraghénanes par l'application des micro-ondes en comparaison à la méthode d'extraction traditionnellement utilisée. Le procédé d'Extraction Assistée par Microondes est une technique peu décrite pour l'extraction des carraghénanes. La ligne directrice de l'étude a été d'analyser les paramètres influençant le rendement d'extraction des carraghénanes, d'analyser les propriétés antivirales de ces composés et d'identifier quel caractère biochimique influence l'activité. L'analyse structurale a permis d'observer que l'extrait est composé majoritairement d'iota-carraghénane. L'analyse de la composition biochimique montre que le traitement aux microondes influence la composition en sulfate et en 3,6 anhydrogalactose des polysaccharides différemment comparés à l'extraction conventionnelle.

Certains extraits obtenus ont démontré des activités anti-herpès comparables à la molécule standard d'Acyclovir avec des valeurs CE_{50} respectives de 3,3 à 8,8 $\mu\text{g/mL}$ et 3,2 $\mu\text{g/mL}$ pour la référence.

La recherche du temps d'action de l'extrait riche en 3,6 AG et sulfate et de bas poids moléculaire agit dans les premières étapes de l'infection et a une activité virucide. Cet extrait présente une composition relativement différente des carraghénanes extraits par la méthode conventionnelle avec une teneur en 3,6 anhydrogalactose et en sulfate plus importante. Le profil de poids moléculaire de cet extrait semble également différent avec la présence de bas poids moléculaire d'oligosaccharide plus important.

La deuxième partie de cette étude vient compléter la première. Elle avait pour objectif de déterminer des voies de valorisation de la biomasse *S. chordalis* permettant d'extraire plusieurs composés d'intérêt en jouant sur différents procédés d'extraction. L'idée générale mise en place dans cette partie est basée sur le concept de bioraffinage en cascade. L'objectif a été de cibler trois types de famille de composés pouvant être extraits de *S. chordalis*, la fraction de composés hydrosolubles pouvant être libérée par l'application de l'hydrolyse enzymatique ; la fraction lipidique pouvant être obtenue par l'extraction au CO₂ supercritique et la fraction de carraghénane obtenue par l'application des microondes.

L'application de l'hydrolyse enzymatique afin de solubiliser la matière première a permis de démontrer l'efficacité plus importante des protéases par rapport à β -glucanases et cellulases. Les extractions par les protéases ont démontré la capacité d'augmenter de 40% et 49% la quantité de matière solubilisée par rapport à une hydrolyse aqueuse. Les extraits hydrosolubles obtenus après séparation des résidus algaux ont démontré des activités antiradicalaires intéressantes avec des concentrations d'inhibitions CI₅₀ comprises entre 2,0 et 4,0 mg/mL comparables aux activités obtenues à partir d'autres espèces d'algues rouges. Dans la littérature, les résidus de biomasse non solubilisés ont été conservés afin d'en extraire les carraghénanes. L'extraction des carraghénanes par l'application des microondes a démontré des rendements inférieurs à ceux obtenus dans la première partie de l'étude. Toutefois, les rendements entre le témoin et les hydrolysats sont relativement similaires ce qui laisse supposer qu'une partie des polysaccharides a été solubilisée au cours de l'hydrolyse enzymatique.

En comparaison, une deuxième voie de valorisation a été étudiée en vue de l'extraction de la fraction lipidique de *S. chordalis* par CO₂ supercritique en amont du traitement par microondes sur les résidus. L'obtention de la fraction lipidique d'algues rouges par la méthode au CO₂ supercritique confirme les informations décrites dans la littérature qui démontre que les macroalgues ne contiennent qu'un faible taux de lipides. L'application d'une fraction de co-solvant (éthanol) permet

d'augmenter le rendement par 10 en atteignant un rendement global de 1,2%. Cette fraction lipidique démontre une composition majoritaire en lipides neutres. En comparaison, l'extrait obtenu sans co-solvant démontre une composition majoritaire de glycolipides.

Le résidu traité par le procédé en conditions supercritiques a ensuite été traité de manière à extraire les carraghénanes présents dans la matière. Le rendement d'extraction en carraghénane observé sur le résidu est très faible, il est 4 fois inférieures à celui obtenu sur le résidu prétraité par enzyme et plus de 5 fois plus faible que le rendement observé initialement dans la première partie. Ceci démontre l'effet du prétraitement sur les résidus, l'hypothèse d'une dégradation des carraghénanes lors du prétraitement est une piste à développer. Les carraghénanes sont reconnus pour être sensibles au pH acide ce qui entraîne des dégradations importantes des structures. Cette deuxième voie d'extraction en cascade semble ne pas être intéressante pour le développement d'une filière de valorisation. L'extraction des lipides par le CO₂ supercritique comportent des avantages au niveau de la qualité de l'extrait, de la rapidité, de la commodité du procédé et également pour son impact environnemental faible. Cependant, la mise en place de ce type de procédé demande un investissement conséquent dans la mesure où les rendements obtenus soient plus importants.

Au contraire, l'application de l'hydrolyse à 40°C semble démontrer des perspectives intéressantes dans le couplage de procédés d'extraction avec la possibilité de valoriser deux fractions d'intérêt de l'algue. Ces deux procédés (EAE et EAM) peuvent être couplés à d'autres procédés telle que l'application complémentaire des ultrasons connus pour son efficacité (Zeng *et al.* 2015 ; Le guillard *et al.* 2016).

La troisième partie de l'étude a été menée de manière indépendante des deux premières. L'objectif de l'étude étant de mettre en évidence la présence de molécules anti-UV par l'application de solvants polaire et apolaire sur l'algue *S. chordalis*. Quatre fractions ont été isolées et purifiées après fractionnement par système Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) et une purification par système de Chromatographie Liquide Préparative (Prep-LC). La caractérisation de ces fractions a mis en évidence la présence de cinq composés parmi lesquels quatre ne sont pas décrits dans la littérature. Tous ces composés ont démontré la présence d'un maximum d'adsorption dans la région UV-B.

Il s'agirait d'Acide Aminé Mycosporine-like (MAAs) décrit comme étant la Palythine sérine. Trois parmi les quatre composés présentent des masses du même ordre de grandeur (320, 332 et 300 Da)

et démontrent une absorbance maximale à 304 nm. La dernière molécule non caractérisée présente une masse plus importante de 805 Da, des molécules absorbant dans la même région UV ont été décrites comme possédant des structures multi chromophores avec des masses détectées à 880 et 1055 Da.

La caractérisation de l'extrait polaire a démontré la présence de composé de la famille des MAAs. Les molécules composant cet extrait montrent des maximums d'absorption dans la région UV-A (320-360 nm). Les composés caractérisés correspondent à la mycosporine glutamicol (285 Da), le palythène ou l'usujirène (284 Da) et la shinorine (332 Da). Un quatrième composé a été détecté mais n'est pas décrit dans la littérature avec une masse de 313 Da.

L'étude des propriétés biologiques de ces fractions a permis de mettre en évidence deux activités majeures. Les fractions apolaires composées de molécules absorbant dans la région UV-B démontrent des propriétés filtrantes face aux rayonnements UV-B élevée et une efficacité face aux UV-A moins importante. L'effet contraire est observé sur l'extrait polaire avec une efficacité plus importante vis-à-vis des rayonnements UV-A. Ceci démontre que l'algue développe des mécanismes de synthèse et de défense lui permettant de se protéger des effets néfastes des rayonnements UV. Les composés caractérisés ont été décrit comme des molécules issues des mécanismes de biosynthèse du shikimate.

En plus de cette activité photoprotectrice, les extraits apolaires et l'extrait polaire ont démontré des activités antiradicalaires importantes. Notamment l'extrait polaire qui démontre une activité 5 fois plus importante.

Cette étude demande à être poursuivie, il serait très intéressant de pouvoir définir la structure moléculaire des composés non caractérisés. De plus, le système de Chromatographie de Partage Centrifuge est un système éprouvé pour la purification de composés naturels. L'utilisation du système solvant Arizona Y contenant des solvants tel que le méthanol ne permet pas de pouvoir répondre au cahier des charges de la cosmétique et la pharmaceutique pour certaines applications. Le développement d'un système solvant alternatif auquel on substitue les solvants toxiques est une perspective intéressante pour ensuite produire une fraction enrichie de composé anti-UV-B. Les premiers essais de fractionnement de l'extrait polaire n'ont pas permis d'aboutir au développement d'une méthode CPC.

L'application de la Chromatographie de Partage Centrifuge dans le projet de bioraffinerie peut être intéressante, il permettrait de pouvoir isoler des composés de l'extrait hydrosoluble, tel que les pigments par exemple.

Les MAAs présent chez *S. chordalis* observé semble relativement faible (0,1% MS), cependant la caractérisation de nouvelles molécules est intéressante pour la poursuite du projet. Ces nouvelles molécules permettront d'étudier les mécanismes de biosynthèse de l'algue. De nombreux projets s'orientent vers l'algoculture et l'influence des facteurs environnementaux sur la production de molécules parmi lesquelles les MAAs.

Bibliographie



- Abd-Rahim, F.; Wasoh, H.; Zakaria, M.; Ariff, A.; Kapri, R.; Ramli, N.; Siew-Ling, L.** (2014), Production of highyield sugars from *Kappaphycus alvarezii* using combined methods of chemical et enzymatic hydrolysis. *Food Hydrocoll.*, 42, 309–315.
- Abu-Samra, A., Morris, J. S., & Koirtyohann, S. R.** (1975). Wet ashing of some biological samples in a microwave oven. *Analytical Chemistry*, 47(8), 1475-1477.
- Adams, N. L., & Shick, J. M.** (1996). Mycosporine- like Amino Acids Provide Protection Against Ultraviolet Radiation in Eggs of the Green Sea Urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Photochemistry et Photobiology*, 64(1), 149-158.
- Adhikari, U., Mateu, C. G., Chattopadhyay, K., Pujol, C. A., Damonte, E. B., & Ray, B.** (2006). Structure et antiviral activity of sulfated fucans from *Stoechospermum marginatum*. *Phytochemistry*, 67(22), 2474-2482.
- Agence Nationale de la Recherche** (2012), WinSeaFuel – Production de macroalgues en pleine mer pour une valorisation en biométhane et autres bioproduits.
- Agostino, P. M., Javalkote, V. S., Mazmouz, R., Pickford, R., Puranik, P. R., & Neilan, B. A.** (2016). Comparative profiling et discovery of novel glycosylated mycosporine-like amino acids in two strains of the cyanobacterium *Scytonema cf. crispum*. *Applied et environmental microbiology*, 82(19), 5951-5959.
- Ahn, C. B., Jeon, Y. J., Kang, D. S., Shin, T. S., & Jung, B. M.** (2004). Free radical scavenging activity of enzymatic extracts from a brown seaweed *Scytosiphon lomentaria* by electron spin resonance spectrometry. *Food Research International*, 37(3), 253-258.

- Algarra, P., Thomas, J. C., & Mousseau, A.** (1990). Phycobilisome heterogeneity in the red alga *Porphyra umbilicalis*. *Plant physiology*, 92(3), 570-576
- Ali-Nehari, A., Kim, S. B., Lee, Y. B., Lee, H. Y., & Chun, B. S.** (2012). Characterization of oil including astaxanthin extracted from krill (*Euphausia superba*) using supercritical carbon dioxide et organic solvent as comparative method. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 29(3), 329-336.
- Allen, V. G., Pond, K. R., Saker, K. E., Fontenot, J. P., Bagley, C. P., Ivy, R. L., ... & Ayad, J. Y.** (2001). Tasco: Influence of a brown seaweed on antioxidants in forages et livestock—A review. *Journal of Animal Science*, 79(E-Suppl), E21-E31
- Altenhofen da Silva M, Barbosa GH, Brito Codato C, Arjonilla deMattos LF, Gaspar Bastos R, Kieckbusch TG** (2016) Heterotrophic growth of green microalgae *Desmodesmus subspicatus* in ethanol distillation wastewater (vinasse) et lipid extraction with supercritical CO₂. *J Chem Technol Biotechnol* 92:573–579.
- Amsler, C. D.** (2008). Algal chemical ecology (Vol. 468). Berlin: Springer.
- Anastas, P., & Eghbali, N.** (2010). Green chemistry: principles et practice. *Chemical Society Reviews*, 39(1), 301-312.
- Antoniotti, S.** (2014). Tuning of essential oil properties by enzymatic treatment: towards sustainable processes for the generation of new fragrance ingredients. *Molecules*, 19(7), 9203-9214.
- Araki, C., Arai, K., & Hirase, S.** (1967). Studies on the chemical constitution of agar-agar. XXIII. Isolation of D-xylose, 6-O-methyl-D-galactose, 4-O-methyl-L-galactose et O-methylpentose. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 40(4), 959-962.

- Arpin, N.; Curt, R.; Favre-Bonvin, J.** Mycosporines: Review et new data concerning their structure. *Revue de Mycologie* 1979, 43, 247–257.
- Arthur, G. D., Stirk, W. A., Van Staden, J., & Scott, P.** (2003). Effect of a seaweed concentrate on the growth et yield of three varieties of *Capsicum annum*. *South African journal of botany*, 69(2), 207-211.
- 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.
- Athukorala, Y., Trang, S., Kwok, C., & Yuan, Y. V.** (2016). Antiproliferative et Antioxydant Activities et Mycosporine-Like Amino Acid Profiles of Wild-Harvested et Cultivated Edible Canadian Marine Red Macroalgae. *Molecules*, 21(1), 119.
- Atkins, E. D. T., Parker, K. D., & Preston, R. D.** (1969). The Helical Structure of the beta-1, 3-Linked Xylan in Some Siphonous Green Algae. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 173(1031), 209-221.
- Awasthi, A., & Trivedi, R. K.** (1997). A review on supercritical carbon dioxide extraction of natural products. *Chemical engineering world*, 32(10), 65-71.
- Awika, J. M., Rooney, L. W., Wu, X., Prior, R. L., & Cisneros-Zevallos, L.** (2003). Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) et sorghum products. *Journal of agricultural et food chemistry*, 51(23), 6657-6662



- Baba M, Snoeck R, Pauwels R, de Clercq E** (1988) Sulfated polysaccharides are potent et selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, et human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* 32:1742–1745.
- Balboa E, Moure A, Domínguez H** (2015), Valorization of *Sargassum muticum* biomass according to the biorefinery concept. *Mar Drugs* 13:3745
- Balskus, E. P., & Walsh, C. T.** (2010), The genetic et molecular basis for sunscreen biosynthesis in cyanobacteria. *Science*, 329(5999), 1653-1656.
- Betaranayake, W.M.; Bemis, J.E.; Bourne, D.J.** (1996), Ultraviolet absorbing pigments from the marine sponge *Dysidea herbacea*: Isolation et structure of a new mycosporine. *Comp. Biochem. Phys. C*, 115C, 281–286.
- Betaranayake, W. M., & Des Rocher, A.** (1999), Role of secondary metabolites et pigments in the epidermal tissues, ripe ovaries, viscera, gut contents et diet of the sea cucumber *Holothuria atra*. *Marine Biology*, 133(1), 163-169.
- Barceló-Villalobos, M., Figueroa, F. L., Korbee, N., Álvarez-Gómez, F., & Abreu, M. H.** (2017), Production of Mycosporine-Like Amino Acids from *Gracilaria vermiculophylla* (Rhodophyta) Cultured Through One Year in an Integrated Multi-trophic Aquaculture (IMTA) System. *Marine Biotechnology*, 1-9.
- Baweja, M., Singh, P. K., & Shukla, P.** (2016), Enzyme Technology, Functional Proteomics, et

Systems Biology Toward Unraveling Molecular Basis for Functionality et Interactions in Biotechnological Processes. In *Frontier Discoveries et Innovations in Interdisciplinary Microbiology* (pp. 207-212). *Springer India*.

Baweja, P., & Sahoo, D. (2015), Classification of Algae. In *The Algae World* (pp. 31-55). *Springer Netherlands*.

Bedoux, G., Hardouin, K., Marty, C., Taupin, L., Vetanjon, L., & Bourgougnon, N. (2014), Chemical characterization et photoprotective activity measurement of extracts from the red macroalga *Solieria chordalis*. *Botanica Marina*, 57(4), 291-301.

Bedoux, G., Caamal-Fuentes, E., Boulho, R., Marty, C., Bourgougnon, N., Freile-Pelegrin, Y., & Robledo, D. (2017), Antiviral et Cytotoxic Activities of Polysaccharides Extracted from Four Tropical Seaweed Species. *Natural Product Communication*, 12(6), 807-811.

Bellion, C., Briget, G., Prome, J. C., Welte, D., & Bociek, S. (1983), Identification et caractérisation des précurseurs biologiques des carraghénanes par spectroscopie de RMN-13C. *Carbohydrate research*, 119, 31-48.

Béress A, Wassermann O, Bruhn T, Béress L, Kraiselburd EN, Gonzales LV, de Motta GE, Chavez PJ (1993), A new procedure for the isolation of anti-HIV compounds (polysaccharides et polyphenols) from the marine alga *Fucus vesiculosus*. *J Nat Prod* 56:478–488.

Bernillon, J., Bouillant, M. L., Pittet, J. L., Favre-Bonvin, J., & Arpin, N. (1984), Mycosporine glutamine and related mycosporines in the fungus *Pyronema omphalodes*. *Phytochemistry*, 23(5), 1083-1087.

Bernillon, J.; Parussini, E.; Letoublon, R.; Favre-Bovin, J.; Arpin, N. (1990), Flavin-mediated photolysis of mycosporines. *Phytochemistry*, 29, 81–84.

- Berthod A.**, (2002), Ed. Elsevier Publishing Company, chap. 6, pp. 159-176.
- Berthod A.**, (2002), in *Countercurrent Chromatography: The Support-free Liquid Phase*, A. Berthod, C. L. Wilson, D. W. Wilson, G. Svehla, Eds. Elsevier Publishing Company, chap. 1, pp. 1-20
- Berthod, T. Maryutina, B. Spivakov, O. Shpigun, I. A. Sutherlet**, (2009), Countercurrent chromatography in analytical chemistry (IUPAC Technical Report). *Pure et Applied Chemistry* 81, 355-387.
- Berthod A.**, (2014), Comments on “Counter-current motion in counter-current chromatography” by Yoichiro Ito. *Journal of Chromatography A* 1372, 260-261
- Berthon, J. Y., Nachat-Kappes, R., Bey, M., Cadoret, J. P., Renimel, I., & Filaire, E.** (2017), Marine algae as attractive source to skin care. *Free Radical Research*, 51(6), 555-567.
- Besednova, N. N., Makarenkova, I. D., Zvyagintseva, T. N., Imbs, T. I., Somova, L. M., & Zaporozhets, T. S.** (2016), Antiviral activity et pathogenetic targets for seaweed sulfated polysaccharides in herpesvirus infections. *Biochemistry (Biokhimiya). Supplemental Series B, Biomedical Chemistry*, 10(1), 31.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J.** (1959), A rapid method of total lipid extraction et purification. *Canadian journal of biochemistry et physiology*, 37(8), 911-917.
- Blinks, L. R.** (1963), Chromatic transients et enhancement recorded by the glass electrode. *Photosynthetic Mechanisms of Green Plants*, 1145, 345.
- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G.** (1973), New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical biochemistry*, 54(2), 484-489.
- Bondu S, Cerantola S, Kervarec N, Deslandes E** (2009), Phytochemistry Impact of the salt stress

on the photosynthetic carbon flux et ¹³C-label distribution within floridoside et digeneaside in *Solieria chordalis*. *Phytochemistry* 70:173–184.

Bondu S, Deslandes E, Fabre M-S, Berthou C, Guangli Y (2010), Carrageenan from *Solieria chordalis* (Gigartinales): Structural analysis et immunological activities of the low molecular weight fractions. *Carbohydr Polym* 81:448–460.

Bondu, S., Bonnet, C., Gaubert, J., Deslandes, É., Turgeon, S. L., & Beaulieu, L. (2015), Bioassay-guided fractionation approach for determination of protein precursors of proteolytic bioactive metabolites from macroalgae. *Journal of applied phycology*, 27(5), 2059-2074.

Boudière, L., Michaud, M., Petroutsos, D., Rébeillé, F., Falconet, D., Bastien, O., & Block, M. A. (2014), Glycerolipids in photosynthesis: composition, synthesis et trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1837(4), 470-480.

Bouhlal R, Haslin C, Chermann JC, Collic-Jouault S, Singuin C, Simon G, Cerantola S, Riadi H, Bourgougnon N (2011), Antiviral activities of sulfated polysaccharides isolated from *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophyta, Gigartinales) et *Boergeseniella thuyoides* (Rhodophyta, Ceramiales). *Mar Drugs* 9:1187–1209.

Bouhlal, R., Riadi, H., & Bourgougnon, N. (2010), Antiviral activities of Morocco seaweeds extracts. *African Journal of Biotechnology*, 9, 7968-7975.

Bourgougnon, N., Lahaye, M., Chermann, J. C., & Kornprobst, J. M. (1993), Composition et antiviral activities of a sulfated polysaccharide from *Schizymenia dubyi* (Rhodophyta, Gigartinales). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 3(6), 1141-1146.

Bourgougnon, N., & Stiger-Pouvreau, V. (2011), Hetbook of marine macroalgae, biotechnology et applied phycology.

- Boussiba, S., & Richmond, A. E.** (1979), Isolation et characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*, 120(2), 155-159.
- Bretagne Développement Innovation** (2013), Etude de marché et d'opportunité économique relative au secteur de l'algue alimentaire en France, en Europe et à l'international.
- Bucar, F., Wube, A., & Schmid, M.** (2013), Natural product isolation—how to get from biological material to pure compounds. *Natural product reports*, 30(4), 525-545.
- Budarin, V. L., Zhao, Y., Gronnow, M. J., Shuttleworth, P. S., Breeden, S. W., Macquarrie, D. J., & Clark, J. H.** (2011), Microwave-mediated pyrolysis of macro-algae. *Green Chemistry*, 13(9), 2330-2333.
- 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), 1000148.
- Burlot, A. S.** (2016), 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 (Doctoral dissertation, Université de Bretagne Sud).
- Burtin, P.** (2003), Nutritional value of seaweeds. *Electronic journal of Environmental, Agricultural et Food chemistry*, 2(4), 498-503.
- Brunner, G.** (2009), Near critical et supercritical water. Part I. Hydrolytic et hydrothermal processes. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47(3), 373-381.



- Cáceres, P. J., Carlucci, M. J., Damonte, E. B., Matsuhira, B., & Zúñiga, E. A.** (2000), Carrageenans from Chilean samples of *Stenogramme interrupta* (Phyllophoraceae): structural analysis et biological activity. *Phytochemistry*, 53(1), 81-86.
- Camel, V.** (2001), Recent extraction techniques for solid matrices—supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction et microwave-assisted extraction: their potential et pitfalls. *Analyst*, 126(7), 1182-1193.
- Campadelli-Fiume, G., Amasio, M., Avitabile, E., Cerretani, A., Forghieri, C., Gianni, T., & Menotti, L.** (2007), The multipartite system that mediates entry of herpes simplex virus into the cell. *Reviews in medical virology*, 17(5), 313-326.
- Campo VL, Kawano DF, Silva DB da, Carvalho I** (2009), Carrageenans: Biological properties, chemical modifications et structural analysis - A review. *Carbohydr Polym* 77:167–180.
- Cardozo, K. H., Vessecchi, R., Galembeck, S. E., Guaratini, T., Gates, P. J., Pinto, E., ... & Colepicolo, P.** (2009), A Fragmentation study of di-acidic mycosporine-like amino acids in electrospray et nanospray mass spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(9), 1625-1631.
- Careri, M., Furlattini, L., Mangia, A., Musci, M., Anklam, E., Theobald, A., & Von Holst, C.** (2001), Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina Pacifica* algae: a chemometric approach. *Journal of Chromatography A*, 912(1), 61-71.
- Carignan, M.O.; Cardozo, K.H.M.; Oliveira-Silva, D.; Colepicolo, P.; Carreto, J.I.** (2009)

Palythine-threonine, a major novel mycosporine-like amino acid (MAA) isolated from the hermatypic coral *Pocillopora capitata*. *J. Photochem. Photobiol. B*, 94, 191–200.

Carlucci MJ, Pujol CA, Ciancia M, Nosedá MD, Matulewicz MC, Damonte EB, Cerezo AS

(1997) Antiherpetic et anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* et their cyclized derivatives: Correlation between structure et biological activity. *Int J Biol Macromol* 20:97–105.

Carlucci, M. J., Scolaro, L. A., & Damonte, E. B. (2002). Herpes simplex virus type 1 variants arising after selection with an antiviral carrageenan: lack of correlation between drug susceptibility et syn phenotype. *Journal of medical virology*, 68(1), 92-98.

Carreto, J.I., Carignan, M.O., (2011). Mycosporine-like amino acids: Relevant secondary metabolites. chemical et ecological aspects. *Mar. Drugs* 9, 387–446.

Carreto, J.I.; Carignan, M.O.; Montoya, N.G. A (2005) High-resolution reverse-phase liquid chromatography method for the analysis of mycosporine-like amino acids (MAAs) in marine organisms. *Marine Biology*, 146, 236–252.

Carrillo-Reyes, J., Barragán-Trinidad, M., & Buitrón, G. (2016). Biological pretreatments of microalgal biomass for gaseous biofuel production et the potential use of rumen microorganisms: A review. *Algal Research*, 18, 341-351.

Cartledge, P., (2000) The epidermal barrier. *Semin. Neonatol.* 5, 273–280.

Chang, V. S., & Teo, S. S. (2016). Evaluation of heavy metal, antioxidant et anti-tyrosinase activities of red seaweed (*Eucheuma cottonii*). *International Food Research Journal*, 23(6).

Charoensiddhi, S., Franco, C., Su, P., & Zhang, W. (2015). Improved antioxidant activities of brown seaweed *Ecklonia radiata* extracts prepared by microwave-assisted enzymatic

extraction. *Journal of applied phycology*, 27(5), 2049-2058.

Chattopadhyay, K., Ghosh, T., Pujol, C. A., Carlucci, M. J., Damonte, E. B., & Ray, B. (2008).

Polysaccharides from *Gracilaria corticata*: Sulfation, chemical characterization et anti-HSV activities. *International journal of biological macromolecules*, 43(4), 346-351.

Chattopadhyay, S., & Ghosh, G. K. (2006). Sulphur status in red et lateritic soils of Birbhum

district of West Bengal. *Indian Journal of fertilizers*, 2(2), 35.

Cheewinhamrongrod, V., Kageyama, H., Palaga, T., Takabe, T., & Waditee-Sirisattha, R.

(2016). DNA damage protecting et free radical scavenging properties of mycosporine-2-glycine from the Dead Sea cyanobacterium in A375 human melanoma cell lines. *Journal of Photochemistry et Photobiology B: Biology*, 164, 289-295.

Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: concept et

principles. *International journal of molecular sciences*, 13(7), 8615-8627.

Chemat, F., Rombaut, N., Meullemiestre, A., Turk, M., Perino, S., Fabiano-Tixier, A. S., &

Abert-Vian, M. (2017). Review of Green Food Processing techniques. Preservation, transformation, et extraction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*.

Chen, C. Y., & Chou, H. N. (2002). Screening of red algae filaments as a potential alternative

source of eicosapentaenoic acid. *Marine biotechnology*, 4(2), 189-192.

Cheung, P. C., Leung, A. Y., & Ang, P. O. (1998). Comparison of supercritical carbon dioxide et

soxhlet extraction of lipids from a brown seaweed, *Sargassum hemiphyllum* (Turn.) C. Ag. *Journal of agricultural et food chemistry*, 46(10), 4228-4232.

Cheung, P. C. (1999). Temperature et pressure effects on supercritical carbon dioxide extraction of

n-3 fatty acids from red seaweed. *Food Chemistry*, 65(3), 399-403.

- Choudhury, S., Sree, A., Mukherjee, S. C., Pattnaik, P., Bapuji, M.** (2005) In vitro antibacterial activity of extracts of selected marine algae et mangroves against fish pathogens. *Asian Fish. Sci.*, 18, 285–294.
- Cian, R. E., Martínez-Augustin, O., & Drago, S. R.** (2012). Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of *Porphyra columbina*. *Food research international*, 49(1), 364-372.
- Cian, R. E., Drago, S. R., de Medina, F. S., & Martínez-Augustin, O.** (2015). Proteins et carbohydrates from red seaweeds: evidence for beneficial effects on gut function et microbiota. *Marine drugs*, 13(8), 5358-5383.
- Cluzet, S., Torregrosa, C., Jacquet, C., Lafitte, C., Fournier, J., Mercier, L., ... & Dumas, B.** (2004). Gene expression profiling et protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* spp. *Plant, Cell & Environment*, 27(7), 917-928.
- Cockell, C. S.** (1998). Biological effects of high ultraviolet radiation on early Earth—a theoretical evaluation. *Journal of theoretical biology*, 193(4), 717-729.
- Collén, P. N., 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. *Journal of Biological Chemistry*, 286(49), 42063-42071.
- Collins, K. G., Fitzgerald, G. F., Stanton, C., & Ross, R. P.** (2016). Looking beyond the terrestrial: the potential of seaweed derived bioactives to treat non-communicable diseases. *Marine drugs*, 14(3), 60
- Conde, F. R., Churio, M. S., & Previtali, C. M.** (2000). The photoprotector mechanism of mycosporine-like amino acids. Excited-state properties et photostability of porphyra-334 in

aqueous solution. *Journal of Photochemistry et Photobiology B: Biology*, 56(2), 139-144.

Couto RM, Simões PC, Reis AD, Da Silva TL, Martins VH, Sánchez- Vicente Y (2010)

Supercritical fluid extraction of lipids from the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii*. *Eng Life Sci* 10: 158–164.

Craigie, J. S. et Wong, K. F. (1978). Carrageenan biosynthesis. *International seaweed symposium*.

Craigie, J. S. (1990). Cell walls. *Biology of the red algae*.

Culbertson, A., Jin, M., da Costa Sousa, L., Dale, B. E., & Balan, V. (2013). In-house cellulase

production from AFEX™ pretreated corn stover using *Trichoderma reesei* RUT C-30. *RSC Advances*, 3(48), 25960-25969.



Darcy-Vrillon B (1993) Nutritional aspects of the developing use of marine macroalgae for the human food industry. *Int J Food Sci Nutr* 44: S23–S35

da Silva RPFF, Rocha-Santos TAP, Duarte AC (2016) Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *Trends Anal Chem* 76:40–51

Daume, S., Long, B. M., & Crouch, P. (2003). Changes in amino acid content of an algal feed species (*Navicula* sp.) et their effect on growth et survival of juvenile abalone (*Haliotis rubra*). *Journal of applied phycology*, 15(2), 201-207.

De la Coba, F., Aguilera, J., Figueroa, F. L., De Gálvez, M. V., & Herrera, E. (2009).

Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae et one marine lichen. *Journal of Applied Phycology*, 21(2), 161-169.

- Del Valle, J. M., & Aguilera, J. M.** (1999). Revision: Extracción con CO₂ a alta presión. Fundamentos y aplicaciones en la industria de alimentos/Review: High pressure CO₂ extraction. Fundamentals et applications in the food industry. *Revista de Agaroquímica y Tecnología de Alimentos*, 5(1), 1-24.
- de SF-Tischer PC, Talarico LB, Nosedá MD, Guimarães SMPB, Damonte EB, Duarte MER** (2006) Chemical structure et antiviral activity of carrageenans from *Meristiella gelidium* against herpes simplex et dengue virus. *Carbohydr Polym* 63:459–465.
- de Souza Moretti, M. M., Bocchini-Martins, D. A., Nunes, C. D. C. C., Villena, M. A., Perrone, O. M., da Silva, R., Boscolo M. et Gomes, E.** (2014). Pretreatment of sugarcane bagasse with microwaves irradiation et its effects on the structure et on enzymatic hydrolysis. *Applied Energy*, 122, 189-195.
- De Reviers B.** (2003a). "Biologie et phylogénie des algues. Tome 1." *Belin*. 352 pp
- De Reviers B.** (2003b). "Biologie et phylogénie des algues. Tome 2." *Belin*. 256 pp.
- 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.
- Diogo JV., Novo SG, González MJ, Cíancía M, Bratanich AC** (2015) Antiviral activity of lambda-carrageenan prepared from red seaweed (*Gigartina skottsbergii*) against BoHV-1 et SuHV-1. *Res Vet Sci* 98:142–144.
- Domínguez-González, R., Moreda-Piñeiro, A., Bermejo-Barrera, A., & Bermejo-Barrera, P.** (2005). Application of ultrasound-assisted acid leaching procedures for major et trace elements determination in edible seaweed by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. *Talanta*, 66(4), 937-942.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PT, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars et related substances. *Anal Chem* 28:350–356. 4

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.

Dunlap, W. C., Chalker, B. E., Betaranayake, W. M., & Wu Won, J. J. (1998). Nature's sunscreen from the great barrier reef, Australia. *International journal of cosmetic science*, 20(1), 41-51.

Dunlap, W. C., & Shick, J. M. (1998). Ultraviolet radiation- absorbing mycosporine- like amino acids in coral reef organisms: A biochemical et environmental perspective. *Journal of Phycology*, 34(3), 418-430.



Egelkrout, E., McGaughey, K., Keener, T., Ferleman, A., Woodard, S., Devaiah, S., ... & Howard, J. (2013). Enhanced expression levels of cellulase enzymes using multiple transcription units. *BioEnergy Research*, 6(2), 699-710.

Ehrig, K., & Alban, S. (2014). Sulfated galactofucan from the brown alga *Saccharina latissima*—variability of yield, structural composition et bioactivity. *Marine drugs*, 13(1), 76-101.

Ekblad, M., Adamiak, B., Bergstrom, T., Johnstone, K. D., Karoli, T., Liu, L., Ferro V. et Trybala, E. (2010). A highly lipophilic sulfated tetrasaccharide glycoside related to muparfostat (PI-88) exhibits virucidal activity against herpes simplex virus. *Antiviral research*,

86(2), 196-203.

Elliott, A., Mundy, C. J., Gosselin, M., Poulin, M., Campbell, K., & Wang, F. (2015). Spring production of mycosporine-like amino acids et other UV-absorbing compounds in sea ice-associated algae communities in the Canadian Arctic. *Marine Ecology Progress Series*, 541, 91-104.

Eppink, M. H. M. (2015). Biorefinery: Recovery of Valuable Biomolecules. Wageningen University, Wageningen UR.

Estevez, J. M., Ciancia, M., & Cerezo, A. S. (2000). The system of low-molecularweight carrageenans et agaroids from the room-temperature-extracted fraction of *Kappaphycus alvarezii*. *Carbohydrate Research*, 325, 287e299.



Falshaw, R., Furneaux, R. H., Wong, H., Liao, M.-L., Bacic, A. et Chetrkrachang, S. (1996). Structural analysis of carrageenans from Burmese et Thai samples of *Catenella nipae*

Fan-Jie, Z., Zi-Xuan, Y., & Chiang, J. L. J. L. C. (1984). Isolation et characterization of R-phycocyanin from *Polysiphonia urceolata*. In *Eleventh International Seaweed Symposium* (pp. 594-596). Springer Netherlands.

Farnham, W. F., & Fletcher, R. L. (1976). The occurrence of a *Porphyrodiscus simulans* Batt. phase in the life history of *Ahnfeltia plicata* (Huds.) Fries. *British Phycological Journal*, 11(2), 183-190.

Fatahzadeh, M., & Schwartz, R. A. (2007). Human herpes simplex virus infections:

epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, et management. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 57(5), 737-763.

Fattori, M., Bulley, N. R., & Meisen, A. (1988). Carbon dioxide extraction of canola seed: oil solubility et effect of seed treatment. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65(6), 968-974.

Favre-Bonvin, J.; Arpin, N.; Brevard, C. (1976) Chemotaxonomic research on mushrooms. XXXI. Structure of mycosporine (P 310). *Can. J. Chem.*, 54, 1105–1113.

Favre-Bonvin, J.; Bernillon, J.; Salin, N.; Arpin, N. (1987) Biosynthesis of mycosporines: Mycosporine glutaminol in *Trichothecium roseum*. *Phytochemistry*, 26, 2509–2514.

Fayret, J.; Bernillon, J.; Bouillant, M.-L.; Favre-Bonvin, J.; Arpin, N (1981). Open et ring forms of mycosporin-2 from the ascomycete *Gnomonia leptostyla*. *Phytochemistry*, 20, 2709–2710.

Ferraces-Casais, P., Lage-Yusty, M. A., de Quirós, A. R. B., & López-Hernández, J. (2012). Evaluation of bioactive compounds in fresh edible seaweeds. *Food Analytical Methods*, 5(4), 828-834.

Fleurence, J. (1999). The enzymatic degradation of algal cell walls: a useful approach for improving protein accessibility?. *Journal of Applied Phycology*, 11(3), 313-314.

Fleurence, J., & Levine, I. (Eds.). (2016). Seaweed in health et disease prevention. *Academic Press*.

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) et in Culture. *Botanica Marina* 30: 315–322

- Figuerola, F.L., Escassi, L., Pérez-Rodríguez, E., Korb, N., Giles, A.D., Johnsen, G.,** (2003). Effects of short-term irradiation on photoinhibition et accumulation of mycosporine-like amino acids in sun et shade species of the red algal genus *Porphyra*. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 69, 21–30.
- Filisetti-Cozzi, T. M., & Carpita, N. C.** (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical biochemistry*, 197(1), 157-162.
- Foucault A. P.,** (1994). Preface of Centrifugal Partition Chromatography. Chromatographic Science Series (Taylor & Francis)
- Francavilla, M., Manara, P., Kamaterou, P., Monteleone, M., & Zabaniotou, A.** (2015). Cascade approach of red macroalgae *Gracilaria gracilis* sustainable valorization by extraction of phycobiliproteins et pyrolysis of residue. *Bioresource technology*, 184, 305-313.
- Franklin, L. A., Kräbs, G., & Kuhlenskamp, R.** (2001). Blue light et UV- A radiation control the synthesis of mycosporine- like amino acids in *Chondrus crispus* (Florideophyceae). *Journal of Phycology*, 37(2), 257-270.
- Freile-Pelegrín Y, Robledo D** (2008) Carrageenan of *Eucheuma isiforme* (Solieriaceae, Rhodophyta) from Nicaragua. *J Appl Phycol* 20:537–541.
- Fredericq, S., Freshwater, D. W., & Hommerset, M. H.** (1999). Observations on the phylogenetic systematics et biogeography of the Solieriaceae (Gigartinales, Rhodophyta) inferred from *rbcL* sequences et morphological evidence. In *Sixteenth International Seaweed Symposium* (pp. 25-38). Springer Netherlands.
- Friedenthal, M., Eha, K., Viitak, A., Lukas, A., & Siimer, E.** (2000). Effects of drying on the gel strength et cation mobility of furcellaran. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1(4), 275-279.



- Gabrielson, P. W.** (1982). Morphological studies of members of the tribe Agardhielleae (Solieriaceae, Rhodophyta) II. *Sarcodiotheca gaudichaudii* (Montagne) comb. nov. *Phycologia*, 21(1), 86-96.
- Gabrielson PW, Hommerset MH** (1982) The atlantic species of Solieria (Gigartinales, Rhodophyta): their morphology, distribution et affinities. *Journal of Phycology* 18: 31–45
- Gabrielson, P. W., & Kraft, G. T.** (1984). The marine algae of Lord Howe Island (NSW) the family Solieriaceae (Gigartinales, Rhodophyta). *Brunonia*, 7(2), 217-251.
- Ganzler, K., Salgo, A., & Valko, K.** (1986). Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography A*, 371, 299-306.
- Ganzler, K., & Salgo, A.** (1987). Microwave-extraction-a new method superseding traditional Soxhlet extraction. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 184(4), 274-276.
- Ganzler, K., Szinai, I., & Salgo, A.** (1990). Effective sample preparation method for extracting biologically active compounds from different matrices by a microwave technique. *Journal of chromatography A*, 520, 257-262.
- Gao, K., Guan, W., & Helbling, E. W.** (2007). Effects of solar ultraviolet radiation on photosynthesis of the marine red tide alga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Journal of Photochemistry et Photobiology B: Biology*, 86(2), 140-148.

- Garon-Lardière, S.** (2004). Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales)
- Gheda, S. F., El-Adawi, H. I., & El-Deeb, N. M.** (2016). Antiviral Profile of Brown et Red Seaweed Polysaccharides Against Hepatitis C Virus. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 15(3), 483.
- 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.
- Gerwick, W. H., & Whatley, G.** (1989). *Aplysia* sea hare assimilation of secondary metabolites from brown seaweed, *Styopodium zonale*. *Journal of chemical ecology*, 15(2), 677-683.
- Gertler, A., & Feinstein, G.** (1971). Inhibition of porcine elastase by turkey ovomucoid et chicken ovoinhibitor. *The FEBS Journal*, 20(4), 547-552.
- 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*). *Physiol Mol Plant Pathol* 84:19–27.
- 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* 19:2–15.
- Glazer, A. N.** (1994). Phycobiliproteins—a family of valuable, widely used fluorophores. *Journal of Applied Phycology*, 6(2), 105-112.
- Glazer, A. N., & Hixson, C. S.** (1977). Subunit structure et chromophore composition of rhodophytan phycoerythrins. *Porphyridium cruentum* B-phycoerythrin et b-phycoerythrin.

- Gomaa HHA, Elshoubaky GA** (2016) Antiviral activity of sulfated polysaccharides carrageenan from some marine seaweeds. *Int J Curr Pharm Rev Res* 7:34–42.
- Gomez, C.G., Pérez Lambrecht, M.V., Lozano, J.E., Rinaudo, M., Villar, M.A.,** (2009). Influence of the extraction-purification conditions on final properties of alginates obtained from brown algae (*Macrocystis pyrifera*). *Int. J. Biol. Macromol.* 44 (4), 365–371.
- Gonzalez, S., Alcaraz, M. V., Cuevas, J., Perez, M., Jaen, P., Alvarez-Mon, M., & Villarrubia, V. G.** (1999). An extract of the fern *Polypodium leucotomos* (Difur) modulates Th1/Th2 cytokines balance in vitro et appears to exhibit anti-angiogenic activities in vivo: pathogenic relationships et therapeutic implications. *Anticancer research*, 20(3A), 1567-1575.
- Goulard, F., Diouris, M., Deslandes, E. et Floc'h, J. Y.** (1999). Nucleotides, nucleoside sugars et UDP-glucose-4-epimerase activity in the iota-carrageenophytes *Solieria chordalis* et *Calliblepharis jubata* (Rhodophyceae). *European Journal of Phycology*. 34, 21-25
- Grant, W. S., Milner, G. B., Krasnowski, P., & Utter, F. M.** (1980). Use of biochemical genetic variants for identification of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) stocks in Cook Inlet, Alaska. *Canadian Journal of Fisheries et Aquatic Sciences*, 37(8), 1236-1247.
- Grant, P.T.; Middleton, C.; Plack, P.A.; Thomson, R.H.** (1985) The isolation of four aminocyclohexenimines (mycosporines) et a structurally related derivative of cyclohexane-1:3-dione (gadusol) from the brine shrimp, *Artemia*. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 80B, 755–759
- Greer, C. W., & Yaphe, W.** (1984). Characterization of hybrid (beta-kappa-gamma) carrageenan from *Eucheuma gelatinae* J. Agardh (Rhodophyta, Solieriaceae) using carrageenases, infrared et ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Botanica marina*, 27(10), 473-478.

Gretz, M. R., Aronson, J. M., & Sommerfeld, M. R. (1986). Cell wall composition of the conchocelis phases of *Bangia atropurpurea* et *Porphyra leucosticta* (Rhodophyta).

Grosso C, Valentão P, Ferreres F, Etrade PB (2015) Alternative et efficient extraction methods for marine-derived compounds. *Mar Drugs* 13:3182–3230

Gröniger, A., Sinha, R. P., Klisch, M., & Häder, D. P. (2000). Photoprotective compounds in cyanobacteria, phytoplankton et macroalgae—a database. *Journal of Photochemistry et Photobiology B: Biology*, 58(2), 115-122.

Guignard, J. L. (2000). *Biochimie végétale*, p.156.

Guiochon G., Felinger A., Shirazi D. G., Katti A. M., (2006), in *Fundamentals of Preparative et Nonlinear Chromatography*, Eds. Elsevier Science, chap. 1, pp. 1-18.



Ha, S. Y., Lee, Y., Kim, M. S., Kumar, K. S., & Shin, K. H. (2015). Seasonal Changes in Mycosporine-Like Amino Acid Production Rate with Respect to Natural Phytoplankton Species Composition. *Marine drugs*, 13(11), 6740-6758.

Hadigal, S., & Shukla, D. (2013). Exploiting herpes simplex virus entry for novel therapeutics. *Viruses*, 5(6), 1447-1465.

Hahn, T., Lang, S., Ulber, R., & Muffler, K. (2012). Novel procedures for the extraction of fucoidan from brown algae. *Process biochemistry*, 47(12), 1691-1698.

Hanefeld, U., Gardossi, L., & Magner, E. (2009). Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews*, 38(2), 453-468.

- Harden, E. A., Falshaw, R., Carnachan, S. M., Kern, E. R., Prichard, M. N.,** (2009) Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against herpes simplex virus. *Antiviral Res.*, 83, 282–289.
- Hardouin K, Burlot AS, Umami A, Tanniou A, Stiger-Pouvreau V, Widowati I, Bedoux G, Bourgougnon N** (2014) Biochemical et antiviral activities of enzymatic hydrolysates from different invasive French seaweeds. *J Appl Phycol* 26:1029–1042.
- Helbling, E. W., Barbieri, E. S., Sinha, R. P., Villafane, V. E., & Häder, D. P.** (2004). Dynamics of potentially protective compounds in Rhodophyta species from Patagonia (Argentina) exposed to solar radiation. *Journal of Photochemistry et Photobiology B: Biology*, 75(1), 63-71.
- Heo, S. J., Park, E. J., Lee, K. W., & Jeon, Y. J.** (2005). Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresource Technology*, 96(14), 1613-1623.
- Heldwein, E. E., & Krummenacher, C.** (2008). Entry of herpesviruses into mammalian cells. *Cellular et molecular life sciences*, 65(11), 1653-1668.
- Hernández-Herrera, R. M., Santacruz-Ruvalcaba, F., Ruiz-López, M. A., Norrie, J., & Hernández-Carmona, G.** (2014). Effect of liquid seaweed extracts on growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of applied phycology*, 26(1), 619-628.
- Herrero, M., & Ibáñez, E.** (2015). Green processes et sustainability: An overview on the extraction of high added-value products from seaweeds et microalgae. *The Journal of Supercritical Fluids*, 96, 211-216.
- Holdt, S. L., & Kraan, S.** (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications et legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 543-597.

- Hostettmann, K., Marston, A., & Hostettmann, M.** (1998). Special column chromatography. In Preparative Chromatography Techniques (pp. 33-49). Springer Berlin Heidelberg.
- Hostettmann K., Marston A., Hostettmann M.,** (1998) in Preparative Chromatography Techniques: Applications in Natural Product Isolation, K. Hostettmann, A. Marston, M. Hostettmann, Eds. Springer, chap. 3, pp. 15-32.
- Hostettmann, K., Marston, A., & Hostettmann, M.** (1998). Separation of Macromolecules. In Preparative Chromatography Techniques (pp. 202-216). Springer Berlin Heidelberg.
- Hoyer, K., Karsten, U., & Wiencke, C.** (2001). Inventory of UV-absorbin mycosporine-like amino acids in polar macroalgae et factors controlling their content. Occurrence, induction et physiological importance of UV-absorbing substances in polar macroalgae Vorkommen, Induktion und physiologische Bedeutung UV-absorbierender Substanzen in polaren Makroalgen, 40.
- Hudson, J. B., Kim, J. H., Lee, M. K., DeWreede, R. E., & Hong, Y. K.** (1998). Antiviral compounds in extracts of Korean seaweeds: Evidence for multiple activities. *Journal of Applied Phycology*, 10(5), 427-434.
- Huovinen, P., Matos, J., Pinto, I. S., & Figueroa, F. L.** (2006). The role of ammonium in photoprotection against high irradiance in the red alga *Grateloupia lanceola*. *Aquatic Botany*, 84(4), 308-316.
- Hupel, M., Poupart, N., & Gall, E. A.** (2011). Development of a new in vitro method to evaluate the photoprotective sunscreen activity of plant extracts against high UV-B radiation. *Talanta*, 86, 362-371.
- Hurtado, A. Q., Neish, I. C., & Critchley, A. T.** (2015). Developments in production technology

of Kappaphycus in the Philippines: more than four decades of farming. *Journal of applied phycology*, 27(5), 1945-1961.

J

Ioannou, E., & Roussis, V. (2009). Natural products from seaweeds. In *Plant-derived natural products* (pp. 51-81). Springer US.

Ismail, A., & Hong, T. S. (2002). Antioxidant activity of selected commercial seaweeds. *Malays J Nutr*, 8(2), 167-177.

Ito, S.; Hirata, Y. (1977) Isolation et structure of a mycosporine from the zoanthid *Palythoa tuberculosa*. *Tetrahedron Lett.*, 28, 2429–2430.

Ito Y., (2014) Counter-current motion in counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* 1372, 128-132.



- Jackson SG, McCandless EL** (1978) Simple, rapid, turbidometric determination of inorganic sulfate et/or protein. *Anal Biochem* 90:802–808.
- Jaime, L., Mendiola, J. A., Ibáñez, E., Martin-Álvarez, P. J., Cifuentes, A., Reglero, G., & Señoráns, F. J.** (2007). β -Carotene isomer composition of sub-et supercritical carbon dioxide extracts. Antioxidant activity measurement. *Journal of agricultural et food chemistry*, 55(26), 10585-10590.
- Jaques, L.B., Ballieux, R.E., Dietrich, C.P., Kavanagh, L.W.** (1968) A microelectrophoresis method for heparin. *Can J Physiol Pharmacol* 46:351–360.
- Jassie, L., Savesz, R., Kierstead, T., & Asty, E. H.** (1997). S. Matz in: HM Kingston, SJ Haswell (Eds.), *Microwave-Enhanced Chemistry, Fundamentals, Sample Preparations et Applications*.
- Jiao, G., Yu, G., Zhang, J., & Ewart, H. S.** (2011). Chemical structures et bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Marine drugs*, 9(2), 196-223.
- Jones, J. K. N.** (1950). 641. The structure of the mannan present in *Porphyra umbilicalis*. *Journal of the Chemical Society*, 3292-3295



- Kalasariya, H. S., Patel, R. V., Petya, K. Y., Jasrai, R. T., & Brahmbhatt, N. H.** (2016). A review on nutrition facets of seaweeds.
- Karma, N. C.** (2005) Interference of dust deposition on screening bio-filters using.
- Kamio, M.; Kicklighter, C.E.; Nguyen, L.; Germann, M.W.; Derby, C.D.** (2011) Isolation et structural elucidation of novel mycosporine-like amino acids as alarm cues in the defensive ink secretion of the sea hare *Aplysia colifornica*. *Helv. Chim. Acta*, 94, 1012–1018.
- Kang, H. S., Kim, H. R., Byun, D. S., Son, B. W., Nam, T. J., & Choi, J. S.** (2004). Tyrosinase inhibitors isolated from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera*. *Archives of pharmacal research*, 27(12), 1226.
- Karasneh, G. A., & Shukla, D.** (2011). Herpes simplex virus infects most cell types in vitro: clues to its success. *Virology journal*, 8(1), 481.
- Karentz, D., McEuen, F. S., Let, M. C., & Dunlap, W. C.** (1991). Survey of mycosporine-like amino acid compounds in Antarctic marine organisms: potential protection from ultraviolet exposure. *Marine Biology*, 108(1), 157-166.
- Karsten, U., Sawall, T., & Wiencke, C.** (1998). A survey of the distribution of UV- absorbing substances in tropical macroalgae. *Phycological Research*, 46(4), 271-279.
- Karsten, U., & Wiencke, C.** (1999). Factors controlling the formation of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in the marine red alga *Palmaria palmata* from Spitsbergen (Norway). *Journal of Plant Physiology*, 155(3), 407-415.

- Kaufmann, B., & Christen, P.** (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave- assisted extraction et pressurised solvent extraction. *Phytochemical analysis*, 13(2), 105-113.
- Khan R.S., Grigor J., Winger R., Win A.,** (2013) Functional food product development – opportunities et challenges for food manufacturers, *Trends in Food Science et Technology* 30 27–37.
- Kim, M.S., Oh, G.H., Kim, N.J., Hwang, J.K.,** (2013). Fucosterol inhibits matrix metalloproteinase expression et promotes type-1 procollagen production in UVB-induced HaCaT cells. *Photochem. Photobiol.* 89, 911–918.
- Kim, J. H., Huang, A. M., Bannister, K., Choi, T. J., Towers, G. H. N., DeWreede, R. E., et al. & Hong, Y. K.** (1997). Biological activities of seaweed extracts from British Columbia, Canada, et Korea.
- Kim, S.-Y., Kim, S. R., Oh, My.-J., Jung, S.-J., Kang, S. Y.,** (2011) In vitro antiviral activity of red alga, *Polysiphonia morrowii* extract et its bromophenols against fish pathogenic infectious hematopoietic necrosis virus et infectious pancreatic necrosis virus. *J. Microbiol.*, 49, 102–106.
- Klejdus, B., Lojková, L., Plaza, M., Šnóblová, M., & Štěrbová, D.** (2010). Hyphenated technique for the extraction et determination of isoflavones in algae: Ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(51), 7956-7965.
- Klisch, M., Sinha, R. P., Richter, P. R., & Häder, D. P.** (2001). Mycosporine-like amino acids (MAAs) protect against UV-B-induced damage in *Gyrodinium dorsum* Kofoid. *Journal of plant physiology*, 158(11), 1449-1454.

- Kloareg, B., & Quatrano, R. S.** (1988). Structure of the cell walls of marine algae et ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanography et Marine Biology: An annual review.*, 26, 259-315.
- Knutsen S, Myslabodski D, Larsen B, Usov A.** (1994) A modified system of nomenclature for red algal galactans. *Botanica Marina*, 37, 163-169.
- Ko, S. C., Lee, S. H., Ahn, G., Kim, K. N., Cha, S. H., Kim, S. K., ... & Jeon, Y. J.** (2012). Effect of enzyme-assisted extract of *Sargassum coreanum* on induction of apoptosis in HL-60 tumor cells. *Journal of applied phycology*, 24(4), 675-684.
- Kobayashi, J.; Nakamura, H.; Hirata, Y.** (1981) Isolation et structure of a UV-absorbing substance 337 from the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Tetrahedron Lett.*, 22, 3001–3002.
- Kolender, A. A., Pujol, C. A., Damonte, E. B., Matulewicz, M. C., & Cerezo, A. S.** (1997). The system of sulfated α -(1→3)-linked D-mannans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*: structures, antiherpetic et anticoagulant properties. *Carbohydrate research*, 304(1), 53-60.I. Antiviral activity. *Canadian journal of botany*, 75(10), 1656-1660.
- Kornprobst J-M** (2005) Substances naturelles d'origine marine: chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologies. *Tec & Doc Lavoisier*, Paris
- Kräbs, G., Bischof, K., Hanelt, D., Karsten, U., & Wiencke, C.** (2002). Wavelength-dependent induction of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in the red alga *Chondrus crispus* under natural solar radiation. *Journal of Experimental Marine Biology et Ecology*, 268(1), 69-82.
- Kumar, V.** (2005). Studies on the nutritional value of some decomposed seaweeds of Tuticorin coast.

Kumar, G., & Sahoo, D. (2011). Effect of seaweed liquid extract on growth et yield of *Triticum aestivum* var. Pusa Gold. *Journal of applied phycology*, 23(2), 251-255.

Kulshreshtha, G., Burlot, A. S., Marty, C., Critchley, A., Hafting, J., Bedoux, G., Bourgougnon, N. et Prithiviraj, B. (2015). Enzyme-assisted extraction of bioactive material from *Chondrus crispus* et *Codium fragile* et its effect on Herpes simplex virus (HSV-1). *Marine drugs*, 13(1), 558-580.

Kwon, O.; Kim, D.; Kim, S.; Jeong, G. (2016) Production of sugars from macro-algae *Gracilaria verrucosa* using combined process of citric acid-catalyzed pretreatment et enzymatic hydrolysis. *Algal Res.*, 13, 293–297.



Ladisch, M. R., Lin, K. W., Voloch, M., & Tsao, G. T. (1983). Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme et Microbial technology*, 5(2), 82-102.

Lahaye, M., & Vigouroux, J. (1992). Liquefaction of dulse (*Palmaria palmata* (L.) Kuntze) by a commercial enzyme preparation et a purified endo, β -1, 4-D-xylanase. *Journal of applied phycology*, 4(4), 329-337.

Lahaye, M. (2001). Developments on gelling algal galactans, their structure et physico-chemistry. *Journal of applied phycology*, 13(2), 173-184.

Lai V.M.-F., Lii C.-y., Hung W.-L, Lu T.-J., (2000) Kinetic compensation effect in depolymerisation of food polysaccharides, *Food Chemistry* 68(3) 319-325.

- Langlois M, Allard JP, Nugier F, Aymard M** (1986) A rapid et automated colorimetric assay for evaluating the sensitivity of herpes simplex strains to antiviral drugs. *J Biol Stet* 14:201–211.
- Lechat, H., Amat, M., Mazoyer, J., Gallant, D. J., Buléon, A., & Lahaye, M.** (1997). Cell wall composition of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta) partitioned by wet sieving. *Journal of applied phycology*, 9(6), 565.
- Lederer E.**, La renaissance de la méthode chromatographique de M. Tswett en 1931. *Journal of Chromatography A* 73, 361-366 (1972)
- Lee, J. C., Hou, M. F., Huang, H. W., Chang, F. R., Yeh, C. C., Tang, J. Y., & Chang, H. W.** (2013). Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, et anti-cancer properties. *Cancer Cell International*, 13(1), 55.
- Lee, J. I., Kim, I. H., & Nam, T. J.** (2017). Crude extract et solvent fractions of *Calystegia soldanella* induce G1 et S phase arrest of the cell cycle in HepG2 cells. *International journal of oncology*, 50(2), 414-420
- Le Guillard, C., Dumay, J., Donnay-Moreno, C., Bruzac, S., Ragon, J. Y., Fleurence, J., & Bergé, J. P.** (2015). Ultrasound-assisted extraction of R-phycoerythrin from *Grateloupia turuturu* with et without enzyme addition. *Algal Research*, 12, 522-528.
- Le Guillard, C., Bergé, J. P., Donnay-Moreno, C., Bruzac, S., Ragon, J. Y., Baron, R., Fleurence, J. et Dumay, J.** (2016). Soft liquefaction of the red seaweed *Grateloupia turuturu* by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis process. *Journal of applied phycology*, 28(4), 2575-2585.
- Leite, B.; Nicholson, R.L.** (1992) Mycosporine-alanine: A self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Exp. Mycol.*, 16, 76–86
- Lemoyne, F.; Bernillon, J.; Favre-Bonvin, J.; Bouillant, M.L.; Arpin, N.** (1985) Occurrence et

characteristics of amino alcohols et cyclohexenone. Components of fungal mycosporines. *Z. Naturforsch C*, 40C, 612–616.

Le Pogam, P., Legouin, B., Le Lamer, A. C., Boustie, J., & Rondeau, D. (2015). Analysis of the cyanolichen *Lichina pygmaea* metabolites using in situ DART- MS: from detection to thermochemistry of mycosporine serinol. *Journal of Mass Spectrometry*, 50(3), 454-462.

Li, Z., Wang, B., Zhang, Q., Qu, Y., Xu, H., & Li, G. (2012). Preparation et antioxidant property of extract et semipurified fractions of *Caulerpa racemosa*. *Journal of applied phycology*, 24(6), 1527-1536.

Lim, T. Y., Lim, Y. Y., & Yule, C. M. (2009). Evaluation of antioxidant, antibacterial et anti-tyrosinase activities of four *Macaranga* species. *Food Chemistry*, 114(2), 594-599.

Losantos, R., Sampedro, D., & Churio, M. S. (2015). Photochemistry et photophysics of mycosporine-like amino acids et gadusols, nature's ultraviolet screens. *Pure et Applied Chemistry*, 87(9-10), 979-996.

Lou, X., Janssen, H. G., & Cramers, C. A. (1996). Investigation of parameters affecting the on-line combination of supercritical fluid extraction with capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 750(1-2), 215-226.

Lunel, M. C., Arpin, N., & Favre-Bonvin, J. (1980). Structure de la normycosporine-glutamine, nouvelle substance isolée de *Pyronema omphalodes*. *Tetrahed. Lett*, 21, 4715-4716.



- Mancuso, S., Azzarello, E., Mugnai, S., & Briet, X.** (2006). Marine bioactive substances (IPA extract) improve foliar ion uptake et water stress tolerance in potted *Vitis vinifera* plants. *Advances in Horticultural Science*, 156-161.
- Mandal, P., Mateu, C. G., Chattopadhyay, K., Pujol, C. A., Damonte, E. B., & Ray, B.** (2007). Structural features et antiviral activity of sulphated fucans from the brown seaweed *Cystoseira indica*. *Antiviral Chemistry et Chemotherapy*, 18(3), 153-162.
- Masaki, H.**, (2010). Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. *J. Dermatol. Sci.* 58 (2), 85–90.
- Matsuhiro B., Zanolungo A.**, (1983), Colorimetric determination of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides from red seaweeds. *Carbon-hydr. Res.* 118 :276-279.
- Matsuhiro, B., Conte, A. F., Damonte, E. B., Kolender, A. A., Matulewicz, M. C., Mejías, E. G., ... & Zúñiga, E. A.** (2005). Structural analysis et antiviral activity of a sulfated galactan from the red seaweed *Schizymenia binderi* (Gigartinales, Rhodophyta). *Carbohydrate Research*, 340(15), 2392-2402.
- Matsui, K., Nazifi, E., Kunita, S., Wada, N., Matsugo, S., & Sakamoto, T.** (2011). Novel glycosylated mycosporine-like amino acids with radical scavenging activity from the cyanobacterium *Nostoc commune*. *Journal of Photochemistry et Photobiology B: Biology*, 105(1), 81-89.
- Mayanglambam, A., et Sahoo, D.** (2015) "Red Algae." *The Algae World*. Springer Netherlands,. 205-234
- Mayer, A.M.S., Rodríguez, A.D., Berlinck, R.G.S., Hamann, M.T.,** (2009). Marine pharmacology in 2005-6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant,

antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, et antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune et nervous syste. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1790: 283–308.

MacArtain, P., Gill, C. I., Brooks, M., Campbell, R., & Rowlet, I. R. (2007). Nutritional value of edible seaweeds. *Nutrition reviews*, 65(12), 535-543.

Macías- Sánchez, M. D., Mantell Serrano, C., Rodríguez Rodríguez, M., Martínez de la Ossa, E., Lubián, L. M., & Montero, O. (2008). Extraction of carotenoids et chlorophyll from microalgae with supercritical carbon dioxide et ethanol as cosolvent. *Journal of separation science*, 31(8), 1352-1362

Maciel, E., Leal, M. C., Lillebø, A. I., Domingues, P., Domingues, M. R., & Calado, R. (2016). Bioprospecting of marine macrophytes using MS-based lipidomics as a new approach. *Marine drugs*, 14(3), 49.

Magnusson, M., Yuen, A. K., Zhang, R., Wright, J. T., Taylor, R. B., Maschmeyer, T., & de Nys, R. (2017). A comparative assessment of microwave assisted (MAE) et conventional solid-liquid (SLE) techniques for the extraction of phloroglucinol from brown seaweed. *Algal Research*, 23, 28-36.

Marathe, S. J., Jadhav, S. B., Bankar, S. B., & Singhal, R. S. (2017). Enzyme-Assisted Extraction of Bioactives. In *Food Bioactives* (pp. 171-201). Springer International Publishing.

Marston A., Hostettmann K. (1991). Modern separation methods. *Natural Product Reports* 8, 391-413

McLaren C, Ellis MN, Hunter G (1983) A colorimetric assay for the measurement of the sensitivity of herpes simplex viruses to antiviral agents. *Antiviral Res* 3:223–234.

- Mendes, R. L., Nobre, B. P., Cardoso, M. T., Pereira, A. P., & Palavra, A. F.** (2003). Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorganica Chimica Acta*, 356, 328-334.
- Mendes RL, Reis AD, Palavra AF** (2006) Supercritical CO₂ extraction of γ -linolenic acid et other lipids from *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima*: comparison with organic solvent extraction. *Food Chem* 99:57–63.
- Mendis, E., & Kim, S. K.** (2011). Present et future prospects of seaweeds in developing functional foods. *Advances in food et nutrition research*, 64, 1-15.
- Merck, E.** (1980) Dyeing reagents for thin layer et paper chromatography. E. Merck,.
- Michalak, I., & Chojnacka, K.** (2015). Algae as production systems of bioactive compounds. *Engineering in Life Sciences*, 15(2), 160-176.
- Michalak, I., Tuhy, L., & Chojnacka, K.** (2015). Seaweed extract by microwave assisted extraction as plant growth biostimulant. *Open Chemistry*, 13(1).
- Michikawa, T., Inoue, M., Shimazu, T., Sawada, N., Iwasaki, M., Sasazuki, S., ... & Japan Public Health Center-based Prospective Study Group.** (2012). Seaweed consumption et the risk of thyroid cancer in women: the Japan Public Health Center-based Prospective Study. *European Journal of Cancer Prevention*, 21(3), 254-260.
- Misonou, T., Saitoh, J., Oshiba, S., Tokitomo, Y., Maegawa, M., Inoue, Y., ... & Sakurai, T.** (2003). UV-absorbing substance in the red alga *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) block thymine photodimer production. *Marine Biotechnology*, 5(2), 194-200.
- Mohamed, S., Hashim, S. N., & Rahman, H. A.** (2012). Seaweeds: a sustainable functional food for complementary et alternative therapy. *Trends in Food Science & Technology*, 23(2), 83-96.

- Mohamed, S. F., & Agili, F. A.** (2013). Antiviral sulphated polysaccharide from brown algae *Padina pavonia* characterization et structure elucidation. *Int J ChemTech Res*, 5, 1469-1476.
- Mollion, J., Moreau, S., & Christiaen, D.** (1986). Isolation of a new type of carrageenan from *Rissoella verruculosa* (Bert.) *J. Ag. Bot. Mar*, 29, 549-552.
- Montero, O., & Lubián, L. M.** (2003). Mycosporine-like amino acid (MAAs) production by *Heterocapsa* sp.(Dinophyceae) in indoor cultures. *Biomolecular engineering*, 20(4), 183-189.
- Morán-Santibañez, K., Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Robledo, D., Freile-Pelegrín, Y., Peña-Hernández, M. A., ... & Trejo-Avila, L. M.** (2016). Synergistic effects of sulfated polysaccharides from Mexican seaweeds against measles virus. *BioMed research international*, 2016.
- Montanha, J. A., Bourgougnon, N., Boustie, J., & Amoros, M.** (2009). Antiviral activity of carrageenans from marine red algae. *Lat Am J Pharm*, 28, 443-448.
- Mubarak M, Shaija A, Suchithra TV** (2015) A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. *Algal Res* 7:117–123
- Mukai, L. S., Craigie, J. S., & Brown, R. G.** (1981). Chemical composition et structure of the cell walls of the conchocelis et thallus phases of *Porphyra tenera* (Rhodophyceae). *Journal of Phycology*, 17(2), 192-198

W

Nakamura, E.; Kobayashi, J.; Abe, R. (1984) Mycosporin-Like Amino Acid. *JP Patent*

1984137450 A, 7 August.

- Nakamura, H.; Kobayashi, J.; Hirata, Y.** (1981) Isolation et structure of a 330 nm UV-absorbing substance, Asterina-330 from the starfish *Asterina pectinifera*. *Chem. Lett.*, 1413–1414.
- Nakayama, R., Tamura, Y., Kikuzaki, H., Nakatani, N., .** (1999) Antioxidant effect of the constituents of *Susabinori* (*Porphyra yezoensis*). *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76, 649–653.
- Naseri, A., Holdt, S. L., & Jacobsen, C.** (2016). Bioactive compounds in industrial red seaweed used in carrageenan production. In *22nd International Seaweed Symposium*.
- Navarro, D. A., & Stortz, C. A.** (2005). Microwave-assisted alkaline modification of red seaweed galactans. *Carbohydrate polymers*, 62(2), 187-191.
- Navarro DA, Flores ML, Stortz CA** (2007) Microwave-assisted desulfation of sulfated polysaccharides. *Carbohydr Polym* 69:742–747.
- Navarro, N. P.** (2015). Sunscreens of red algae from Patagonia: a biotechnological perspective. *Pure et Applied Chemistry*, 87(9-10), 953-960.
- Navarro, N. P., Figueroa, F. L., & Korbee, N.** (2017). Mycosporine-like amino acids vs carrageenan yield in *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales; Rhodophyta) under high et low UV solar irradiance. *Phycologia*, 56(5), 570-578.
- Nayar, S., & Bott, K.** (2014). Current status of global cultivated seaweed production et markets. *World Aquac*, 45, 32-37.
- Nazifi, E., Wada, N., Asano, T., Nishiuchi, T., Iwamuro, Y., Chinaka, S., ... & Sakamoto, T.** (2015). Characterization of the chemical diversity of glycosylated mycosporine-like amino acids in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Journal of Photochemistry et Photobiology B: Biology*, 142, 154-168.

- Necas, J., & Bartosikova, L.** (2013). Carrageenan: a review. *Veterinarni Medicina*, 58(6).
- Nesterova, M. V., Johnson, N. R., Stewart, T., Abrams, S., & Cho-Chung, Y. S.** (2005). CpG immunomer DNA enhances antisense protein kinase A RI α inhibition of multidrug-resistant colon carcinoma growth in nude mice: molecular basis for combinatorial therapy. *Clinical cancer research*, 11(16), 5950-5955.
- Neveu** (2016), Les échouages d'algues dans le Morbihan: quelles modalités de gestion et de valorisation?, Conseil général du Morbihan.
- Neveux N, Magnusson M, Maschmeyer T, Nys R, Paul NA** (2014) Comparing the potential production et value of high- energy liquid fuels et protein from marine et freshwater macroalgae. *GCB Bioenergy*.
- Nguyen, H., & Kim, S. M.** (2012). Antioxidative, anticholinesterase et antityrosinase activities of the red alga *Grateloupia lancifolia* extracts. *African Journal of Biotechnology*, 11(39), 9457-9467.
- Nicoué, E. E., Savard, S., & Belkacemi, K.** (2007). Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: extraction et identification. *Journal of agricultural et food chemistry*, 55(14), 5626-5635.
- Nobre, B. P., Villalobos, F., Barragan, B. E., Oliveira, A. C., Batista, A. P., Marques, P. A. S. S., ... & Gouveia, L.** (2013). A biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga—extraction of oils et pigments. Production of biohydrogen from the leftover biomass. *Bioresource technology*, 135, 128-136.
- Norziah, M. H., & Ching, C. Y.** (2000). Nutritional composition of edible seaweed *Gracilaria changgi*. *Food chemistry*, 68(1), 69-76.
- Norrie, J., Branson, T., & Keathley, P. E.** (2001). Marine plant extracts impact on grape yield et

quality. In *International Symposium on Foliar Nutrition of Perennial Fruit Plants* 594 (pp. 315-319).

Nyberg, K., Ekblad, M., Bergström, T., Freeman, C., Parish, C. R., Ferro, V., & Trybala, E. (2004). The low molecular weight heparan sulfate-mimetic, PI-88, inhibits cell-to-cell spread of herpes simplex virus. *Antiviral research*, 63(1), 15-24.



- Okuda, K., Oka, K., Onda, A., Kajiyoshi, K., Hiraoka, M., & Yanagisawa, K.** (2008). Hydrothermal fractional pretreatment of sea algae et its enhanced enzymatic hydrolysis. *Journal of chemical technology et biotechnology*, 83(6), 836-841.
- Olicard, C., Didier, Y., Marty, C., Bourgougnon, N., & Renault, T.** (2005). In vitro research of anti-HSV-1 activity in different extracts from Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Diseases of aquatic organisms*, 67(1-2), 141-147.
- Oumaskour, K., Boujaber, N., Etahiri, S., & Assobhei, O.** (2013). Anti-inflammatory et antimicrobial activities of twenty-three marine red algae from the coast of sidi bouzid (el jadida-morocco). *International Journal of Pharmacy et Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 145-149.
- Onuska, F. I., & Terry, K. A.** (1993). Extraction of pesticides from sediments using a microwave technique. *Chromatographia*, 36(1), 191-194.
- O'sullivan, A. C.** (1997). Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, 4(3), 173-207.
- Oyamada, C., Kaneniwa, M., Ebitani, K., Murata, M., & Ishihara, K.** (2008). Mycosporine-like amino acids extracted from scallop (*Patinopecten yessoensis*) ovaries: UV protection et growth stimulation activities on human cells. *Marine biotechnology*, 10(2), 141-150.



- Padula, M., & Boiteux, S.** (1999). Photodynamic DNA damage induced by phycocyanin et its repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian journal of medical et biological research*, 32(9), 1063-1071.
- Park, P. J., Shahidi, F., & Jeon, Y. J.** (2004). Antioxidant activities of enzymatic extracts from an edible seaweed *Sargassum horneri* using ESR spectrometry. *Journal of Food Lipids*, 11(1), 15-27.
- Patch, C. S., Tapsell, L. C., Williams, P. G., & Gordon, M.** (2006). Plant sterols as dietary adjuvants in the reduction of cardiovascular risk: theory et evidence. *Vascular health et risk management*, 2(2), 157.
- Patel, D., Dasgupta, S., Dey, S., Roja Ramani, Y., Ray, S., & Mazumder, B.** (2012). Nanostructured lipid carriers (NLC)-based gel for the topical delivery of aceclofenac: preparation, characterization, et in vivo evaluation. *Scientia pharmaceutica*, 80(3), 749-764.
- Patra, J. K., Kim, S. H., & Baek, K. H.** (2015). Antioxidant et Free Radical- Scavenging Potential of Essential Oil from *Enteromorpha linza* L. Prepared by Microwave- Assisted Hydrodistillation. *Journal of Food Biochemistry*, 39(1), 80-90.
- Patzek, T. W., & Pimentel, D.** (2005). Thermodynamics of energy production from biomass. *BPTS*, 24(5-6), 327-364.
- Peinado, N. K., Abdala Díaz, R. T., Figueroa, F. L., & Helbling, E. W.** (2004). Ammonium et UV radiation stimulate the accumulation of mycosporine-like amino acids in *Porphyra columbina* (Rhodophyta) from Patagonia, Argentina. *Journal of Phycology*, 40(2), 248-259.

- Pérez-López, P., Jeffries, C., Agathos, S. N., Feijoo, G., Rorrer, G., & Moreira, M. T.** (2016). Environmental life cycle optimization of essential terpene oils produced by the macroalga *Ochtodes secundiramea*. *Science of the Total Environment*, 542, 292-305.
- Peres, J. C. F., Retz de Carvalho, L., Gonçalves, E., Saggion Berian, L. O., D'arc Felicio, J.,** Evaluation of antifungal activity of seaweed extracts. *Ciênc. Agrotec.* 2012, 36, 294–299.
- Philpott, J., & Bradford, M.** (2006). Seaweed: Nature's Secret for. *Nutrition*, 2.
- Pessoa, M. F.** (2012). Harmful effects of UV radiation in algae et aquatic macrophytes-a review. *Emirates Journal of Food et Agriculture*, 24(6), 510.
- Pétrier, C., Gondrexon, N., & Boldo, P.** (2008). Ultrasons et sonochimie. Techniques de l'ingénieur. *Sciences fondamentales*, (AF6310).
- Pittet, J.L., Bouillant, M.L.; Bernillon, J.; Arpin, N.; Favre-Bonvin, J.** (1983) The presence of reduced-glutamine mycosporines, new molecules, in several Deuteromycetes. *Tetrahedron Lett.*, 24, 65–68.
- Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., Reina, G. G. B., Herrero, M., Señoráns, F. J., & Ibáñez, E.** (2010). Screening for bioactive compounds from algae. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 51(2), 450-455.
- Potin, P., Bouarab, K., Salaün, J. P., Pohnert, G., & Kloareg, B.** (2002). Biotic interactions of marine algae. *Current opinion in plant biology*, 5(4), 308-317.
- Prabha, V., Prakash, D. J., & Sudha, P. N.** (2013). Analysis of bioactive compounds et antimicrobial activity of marine algae *Kappaphycus alvarezii* using three solvent extracts. *International Journal of Pharmaceutical Sciences et Research*, 4(1), 306.
- Prokofjeva, M. M., Imbs, T. I., Shevchenko, N. M., Spirin, P. V., Horn, S., Fehse, B., ... &**

Prassolov, V. S. (2013). Fucoïdanes en tant que potentiels inhibiteurs de l'HIV-1. *Marine drugs*, 11(8), 3000-3014.

Pujol, C. A., Errea, M. I., Matulewicz, M. C., & Damonte, E. B. (1996). Activité antiherpétique de S1, un alga dérivé sulfaté galactane. *Phytotherapy Research*, 10(5), 410-413.

Punín Crespo, M. O., Cam, D., Gagni, S., Lombardi, N., & Lage Yusty, M. A. (2006). Extraction des hydrocarbures des échantillons d'algues marines par ultrason et micro-ondes assistée : une étude comparative. *Journal of chromatographic science*, 44(10), 615-618.

Q

Quitain, A. T., Kai, T., Sasaki, M., & Goto, M. (2013). Extraction supercritique du dioxyde de carbone de fucoxanthine de *Undaria pinnatifida*. *Journal of agricultural et food chemistry*, 61(24), 5792-5797.

R

Rai, L. C., & Mallick, N. (1998). Réponses algales à une irradiation ultraviolette-B accrue. *Proceeding Indian National Science Academy Part B*, 64, 125-146.

Rajendran A. (2012) Conception de la chromatographie supercritique préparative. *Journal of Chromatography A* 1250, 227-249.

Rapsomanikis, A., Sygkridou, D., Voutsinas, E., & Stathatos, E. (2016). Solides quasi-transparents

state dye-sensitized solar cells sensitized with naturally derived pigment extracted from red seaweed. *Current Applied Physics*, 16(6), 651-657.

Rastogi, R. P., & Incharoensakdi, A. (2014). UV radiation-induced biosynthesis, stability et antioxidant activity of mycosporine-like amino acids (MAAs) in a unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. CU2556. *Journal of Photochemistry et Photobiology B: Biology*, 130, 287-292.

Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., Korkmaz, A., Fuentes-Broto, L., Hardman, W. E., ... & Qi, W. (2013). A walnut-enriched diet reduces the growth of LNCaP human prostate cancer xenografts in nude mice. *Cancer investigation*, 31(6), 365-373.

Rey-Crespo, F., López-Alonso, M., & Mireta, M. (2014). The use of seaweed from the Galician coast as a mineral supplement in organic dairy cattle. *animal*, 8(4), 580-586.

Řezanka, T., Temina, M., Tolstikov, A. G., & Dembitsky, V. M. (2004). Natural microbial UV radiation filters—Mycosporine-like amino acids. *Folia microbiologica*, 49(4), 339-352.

Rhein-Knudsen, N., Ale, M. T., & Meyer, A. S. (2015). Seaweed hydrocolloid production: an update on enzyme assisted extraction et modification technologies. *Marine drugs*, 13(6), 3340-3359.

Rhein-Knudsen, N., Ale, M. T., Ajalloueian, F., Yu, L., & Meyer, A. S. (2017). Rheological properties of agar et carrageenan from Ghanaian red seaweeds. *Food Hydrocolloids*, 63, 50-58.

Rice, E. L. (1984). Chemical nature of allelopathic agents. *Allelopathy*. New York: Academic Press Inc, 267-291.

Richards, J. T., Kern, E. R., Glasgow, L. A., Overall, J. C. Jr., Deign, E. F., Hatch, M. T., (1978) Antiviral activity of extracts from marine algae. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 14, 24-30.

- Robal, M., Truus, K., Volobujeva, O., Mellikov, E., & Tuvikene, R.** (2017). Thermal stability of red algal galactans: Effect of molecular structure et counterions. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- Rodríguez MC, Merino ER, Pujol CA, Damonte EB, Cerezo AS, Matulewicz MC** (2005) Galactans from cystocarpic plants of the red seaweed *Callophyllis variegata* (Kallymeniaceae, Gigartinales). *Carbohydr Res* 340:2742–2751.
- Rodriguez, J. D., Royall, D., Daum, L. T., Kagan-Hallet, K., & Chambers, J. P.** (2005). Amplification of herpes simplex type 1 et human herpes type 5 viral DNA from formalin-fixed Alzheimer brain tissue. *Neuroscience letters*, 390(1), 37-41.
- Rodríguez-Jasso, R. M., Mussatto, S. I., Pastrana, L., Aguilar, C. N., & Teixeira, J. A.** (2010). Microwave-assisted extraction of sulfated fucans from brown seaweed et evaluation of fungal strains for enzymesactive production toward this class of polysaccharide. *Semana de Engenharia* 2010.
- Rodriguez-Jasso, R.M.,Mussatto, S. I., Pastrana, L., Aguilar, C. N. et al.** (2011) „Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed. *Carbohydr. Polym*, 86, 1137–1144.
- Rodrigues, D., Freitas, A. C., Pereira, L., Rocha-Santos, T. A., Vasconcelos, M. W., Roriz, M., ... & Duarte, A. C.** (2015). Chemical composition of red, brown et green macroalgae from Buarcos bay in Central West Coast of Portugal. *Food chemistry*, 183, 197-207.
- Roh, M. K., Uddin, M. S., & Chun, B. S.** (2008). Extraction of fucoxanthin et polyphenol from *Undaria pinnatifida* using supercritical carbon dioxide with co-solvent. *Biotechnology et Bioprocess Engineering*, 13(6), 724-729.
- Romarès-Hortas, V., Moreda-Piñeiro, A., Bermejo-Barrera, P.,** (2009) Microwave assisted

extraction of iodine et bromine from edible seaweed for inductively coupled plasma-mass spectrometry determination. *Talanta*, 79, 947–952.

Rosic, N. N., Braun, C., & Kvaskoff, D. (2015). Extraction et analysis of mycosporine-like amino acids in marine algae. *Natural Products From Marine Algae: Methods et Protocols*, 119-129.

Ross, A. B., Jones, J. M., Kubacki, M. L., & Bridgeman, T. (2008). Classification of macroalgae as fuel et its thermochemical behaviour. *Bioresource technology*, 99(14), 6494-6504.

Roullier, C.; Chollet-Krugler, M.; Pferschy-Wenzig, E.M.; Maillard, A.; Rechberger, G.N.; Legouin-Gargadennec, B.; Bauer, R.; Boustie, J. (2011) Characterization et identification of mycosporines-like compounds in cyanolichens. Isolation of mycosporine hydroxyglutamicol from *Nephroma laevigatum* Ach. *Phytochemistry*, 72, 1348–1357.

Roullier, C., Chollet-Krugler, M., Bernard, A., & Boustie, J. (2009). Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography as an efficient method for the purification of a mycosporine from a crude methanolic extract of *Lichina pygmaea*. *Journal of Chromatography B*, 877(22), 2067-2073.



Santos, M. G. M., Lagrota, M. H. C., Mireta, M. M. F. S., Yoneshigue-Valentin, Y., & Wigg, M. D. (1999). A screening for the antiviral effect of extracts from Brazilian marine algae against acyclovir resistant herpes simplex virus type 1. *Botanica marina*, 42(3), 227-230.

Santoyo, S., Plaza, M., Jaime, L., Ibañez, E., Reglero, G., & Señorans, J. (2011). Pressurized liquids as an alternative green process to extract antiviral agents from the edible seaweed

Himanthalia elongata. *Journal of applied phycology*, 23(5), 909-917.

Sanz- Pintos, N., Pérez- Jiménez, J., Buschmann, A. H., Vergara- Salinas, J. R., Pérez- Correa, J. R., & Saura- Calixto, F. (2017). Macromolecular Antioxidants et Dietary Fiber in Edible Seaweeds. *Journal of Food Science*, 82(2), 289-295.

Sarrade, S. (2015). La chimie d'une planète durable. Le Pommier.

Satish, L., Rameshkumar, R., Rathinapriya, P., Pandian, S., Rency, A. S., Sunitha, T., & Ramesh, M. (2015). Effect of seaweed liquid extracts et plant growth regulators on in vitro mass propagation of brinjal (*Solanum melongena* L.) through hypocotyl et leaf disc explants. *Journal of applied phycology*, 27(2), 993-1002.

Schmid, D., Schürch, C., Züllli, F., Nissen, H. P., & Prieur, H. (2003). Mycosporine-like amino acids: natural UV-screening compounds from red algae to protect the skin against photoaging. *SÖFW-journal*, 129(7), 38-42.

Scott R. P. W., (2003). in Book 12 - Preparative chromatography, C.-E. B. Series, Ed.

Sergeev, A. A., Demina, O. K., Pyankov, O. V., Pyankova, O. G., Agafonov, A. P., Kiselev, S. A., ... & Safatov, A. S. (2013). Infection of chickens caused by avian influenza virus A/H5N1 delivered by aerosol et other routes. *Transboundary et emerging diseases*, 60(2), 159-165.

Sekar, S., & Chetramohan, M. (2008). Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents et commercialization. *Journal of Applied Phycology*, 20(2), 113-136.

Sekikawa, I.; Kubota, C.; Hiraoki, T.; Tsujino, I. (1986) Isolation et structure of a 357 nm UV-absorbing substance, usujirene, from the red alga *Palmaria palmata* (L.) O. Kuntze. *Jpn. J. Phycol.*, 34, 185–188.

Senthilkumar, N., Kurinjimalar, C., Thangam, R., Suresh, V., Kavitha, G., Gunasekaran, P.,

- & Rengasamy, R.** (2013). Further studies et biological activities of macromolecular protein R-Phycoerythrin from *Portieria hornemannii*. *International journal of biological macromolecules*, 62, 107-116.
- Shang, Y. F., Kim, S. M., Lee, W. J., & Um, B. H.** (2011). Pressurized liquid method for fucoxanthin extraction from *Eisenia bicyclis* (Kjellman) Setchell. *Journal of bioscience et bioengineering*, 111(2), 237-241.
- Sharifuddin, Y., Chin, Y. X., Lim, P. E., & Phang, S. M.** (2015). Potential bioactive compounds from seaweed for diabetes management. *Marine drugs*, 13(8), 5447-5491.
- Sharma, H. S., Fleming, C., Selby, C., Rao, J. R., & Martin, T.** (2014). Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae et use of extracts for crop management to reduce abiotic et biotic stresses. *Journal of applied phycology*, 26(1), 465-490.
- Sheldon, R. A.** (2017). The E factor 25 years on: the rise of green chemistry et sustainability. *Green Chemistry*, 19(1), 18-43.
- Shick, J.M.; Dunlap, W.C.** (2002) Mycosporine-like amino acids et related gadusols: Biosynthesis, accumulation, et UV-protective functions in aquatic organisms. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 64, 223–262.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., Nakamurat, T.,** (1992). Antioxidative Properties of Xanthan on the Autoxidation of Soybean Oil in Cyclodextrin Emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 40, 945–948.
- Shukla, V., Kumari, R., Patel, D. K., & Upreti, D. K.** (2016). Characterization of the diversity of mycosporine-like amino acids in lichens from high altitude region of Himalaya. *Amino acids*, 48(1), 129-136.

- Smetacek, V., & Zingone, A.** (2013). Green et golden seaweed tides on the rise. *Nature*, 504(7478), 84.
- Smit, A. J.** (2004). Medicinal et pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. *Journal of applied phycology*, 16(4), 245-262
- Smith, D. B., Cook, W. H., & Neal, J. L.** (1954). Physical studies on carrageenin et carrageenin fractions. *Archives of biochemistry et biophysics*, 53(1), 192-204
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC** (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76–85.
- Sinha, R. P., Klisch, M., Gröniger, A., & Häder, D. P.** (1998). Ultraviolet-absorbing/screening substances in cyanobacteria, phytoplankton et macroalgae. *Journal of Photochemistry et Photobiology B: Biology*, 47(2-3), 83-94.
- Sinha, R. P., Klisch, M., Gröniger, A., & Häder, D. P.** (2000). Mycosporine-like amino acids in the marine red alga *Gracilaria cornea*—effects of UV et heat. *Environmental et Experimental Botany*, 43(1), 33-43.
- Singh, S.P.; Klisch, M.; Sinha, R.P.; Häder, D.-P.** (2008) Effects of abiotic stressors on synthesis of the mycosporine-like amino acid shinorine in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Photochem. Photobiol.*, 84, 1500–1505.
- Singh, A. K., Tripathi, A. C., Tewari, A., Chawla, V., & Saraf, S. K.** (2017). Design et microwave facilitated green synthesis of 2-[4-(3-carboxymethyl, methoxy carbonylmethyl)-2, 4-dioxo et 4-oxo-2-thioxo-thiazolidin-5-ylidenemethyl)-phenoxy]-2 et 3-methyl propionic acid ethyl ester derivatives: a novel structural class of antidyslipidemic agents. *Medicinal Chemistry Research*, 26(7), 1535-1549.

- Sivalingam, P. M., Ikawa, T., & Nisizawa, K.** (1976). Isolation et physico-chemical properties of a substance 334 from the red alga, *Porphyra yezoensis* Ueda. *Botanica Marina*, 19(1), 1-8.
- S'krovánková, S.** (2011). Seaweed vitamins as nutraceuticals. *Adv Food Nutr Res*, 64, 357-369.
- Soares, A. R., Robaina, M., Mendes, G. S., Silva, T. S., Gestinari, L., Pamplona, O. S., et al. & Romanos, M. T. V.** (2012). Antiviral activity of extracts from Brazilian seaweeds against herpes simplex virus. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(4), 714-723.
- Sousa, A. M., Alves, V. D., Morais, S., Delerue-Matos, C., & Gonçalves, M. P.** (2010). Agar extraction from integrated multitrophic aquacultured *Gracilaria vermiculophylla*: evaluation of a microwave-assisted process using response surface methodology. *Bioresource technology*, 101(9), 3258-3267.
- Spichtig, V., & Austin, S.** (2008). Determination of the low molecular weight fraction of food-grade carrageenans. *Journal of Chromatography B*, 861(1), 81-87.
- Sticher O.,** (2008), Natural product isolation. *Natural Product Reports* 25, 517-554
- Subhadra, B.** (2011). Algal biorefinery- based industry: an approach to address fuel et food insecurity for a carbon- smart world. *Journal of the Science of Food et Agriculture*, 91(1), 2-13.
- Sudhakar, M. P., Jagatheesan, A., Perumal, K., & Arunkumar, K.** (2015). Methods of phycobiliprotein extraction from *Gracilaria crassa* et its applications in food colourants. *Algal Research*, 8, 115-120.
- Suh, S. S., Hwang, J., Park, M., Seo, H. H., Kim, H. S., Lee, J. H., ... & Lee, T. K.** (2014). Anti-inflammation activities of mycosporine-like amino acids (MAAs) in response to UV radiation suggest potential anti-skin aging activity. *Marine drugs*, 12(10), 5174-5187.

Sutherlet I. A., (2007). Recent progress on the industrial scale-up of counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1151(1), 6-13.



Takano, S.; Nakanishi, A.; Uemura, D.; Hirata, Y. (1979) Isolation et structure of a 334 nm UV-absorbing substance, porphyra-334 from the red alga *Porphyra tenera* Kjellman. *Chem. Lett*, 4, 419–420

Takano, S.; Uemura, D.; Hirata, Y. (1978) Isolation et structure of two new amino acids, palythanol et palythene, from the Zoanthid *Palythoa tuberculosa*. *Tetrahedron Lett.*, 49, 4909–4912

Talarico, L. B., Zibetti, R. G., Faria, P. C., Scolaro, L. A., Duarte, M. E., Nosedá, M. D., ... & Damonte, E. B. (2004). Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsia* et *Cryptonemia crenulata*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 34(1), 63-71.

Tan, I.; Lee, K. (2016) Comparison of different process strategies for bioethanol production from *Eucheuma cottonii*: An economic study. *Bioresour. Technol.*, 199, 336–346.

Tanaka, Y., Sakaki, I., & Ohkubo, T. (2004). Extraction of phospholipids from salmon roe with supercritical carbon dioxide et an entrainer. *Journal of oleo science*, 53(9), 417-424.

- Tao, C., Sugawara, T., Maeda, S., Wang, X., & Hirata, T.** (2008). Antioxidative activities of a mycosporine- like amino acid, porphyra- 334. *Fisheries science*, 74(5), 1166-1172.
- Tavenec, M.** (2009). La gestion d'une problématique algale dans un secteur hautement touristique, la presqu'île de Rhuys. *Personal communication* 110p.
- Taylor G** (2008) Biofuels et the biorefinery concept. *Energy Policy* 36:4406–4409
- Teai, T.T.; Raharivelomanana, P.; Bianchini, J.P.; Faure, R.; Martin, P.M.V.;** (1997a) Cambon, A. Structure of two new iminomycosporines isolated from *Pocillopora eydouxi*. *Tetrahedron Lett.*, 38, 5799–5800.
- Tello-Irelet, C., Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., López, J., & Di Scala, K.** (2011). Influence of hot-air temperature on drying kinetics, functional properties, colour, phycobiliproteins, antioxidant capacity, texture et agar yield of alga *Gracilaria chilensis*. *LWT- Food Science et Technology*, 44(10), 2112-2118.
- Terme, N., Boulho, R., Kendel, M., Kucma, J. P., Wielgosz-Collin, G., Bourgougnon, N., & Bedoux, G.** (2017). Selective extraction of lipid classes from *Solieria chordalis* et *Sargassum muticum* using supercritical carbon dioxide et conventional solid–liquid methods. *Journal of Applied Phycology*, 1-7.
- Therkelsen, G. H.** (1993). Carrageenan. Industrial Gums, Polysaccharides et their Derivatives. *Academic Press, New York*, 145-180.
- Thrimawithana, T. R., Young, S., Dunstan, D. E., & Alany, R. G.** (2010). Texture et rheological characterization of kappa et iota carrageenan in the presence of counter ions. *Carbohydrate Polymers*, 82(1), 69-77.
- Thuéry, J.** (1992). Microwaves. Artech House Inc., Norwood.

Tierney, M. S., Smyth, T. J., Rai, D. K., Soler-Vila, A., Croft, A. K., & Brunton, N. (2013).

Enrichment of polyphenol contents et antioxidant activities of Irish brown macroalgae using food-friendly techniques based on polarity et molecular size. *Food chemistry*, 139(1), 753-761.

Trincone, A. (2017). Enzymatic Processes in Marine Biotechnology. *Marine drugs*, 15(4), 93.

Tsujino, I. (1980). Isolation et structure of a new amino acid, shinorine, from the red alga *Chondrus yendoi* Yamada et Mikami. *Bot Mar*, 23, 65-68.

Tsujino, I.; Yabe, K.; Sekikawa, I.; Hamanaka, N. (1978) Isolation et structure of a mycosporine from the red alga *Chondrus yendoi*. *Tetrahedron Lett.*, 19, 1401–1402

Tveter-Gallagher, E., Cheney, D. et Mathieson, A. C. (1981). Uptake et incorporation of ³⁵S into carrageenan among different strains of *Chondrus crispus*. *International seaweed symposium*

U

Uemura, D.; Katayama, C.; Wada, A.; Hirata, Y. (1980) Crystal et molecular structure of palythene possessing a novel 360 nm chromophore. *Chem. Lett.*, 755–756.

Université of Gothenburg & others (2013), Microalgae, a market analysis carried out as part of the interreg KASK IVA project: Blue technology for Sustainable Innovations.

Usov, A. I. (1998). Structural analysis of red seaweed galactans of agar et carrageenan groups. *Food Hydrocolloids*, 12(3), 301-308.

Usov A.I. (2011) Polysaccharides of the red algae, *Adv Carbohydr Chem Biochem*. 65:115-217.

Uy, S. F., Easteal, A. J., Farid, M. M., Keam, R. B., & Conner, G. T. (2005). Seaweed processing using industrial single-mode cavity microwave heating: a preliminary investigation.



- Vale, P.** (2015). Effects of light quality et nutrient availability on accumulation of mycosporine-like amino acids in *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Journal of Photochemistry et Photobiology B: Biology*, 143, 20-29.
- Valeix, P., Zarebska, M., Preziosi, P., Pelletier, B., & Galan, P.** (2002). Iodine Nutrition of French Adults Issued from the SU. VI. MAX Cohort. *Trace Elements in Man et Animals* 10, 486-487.
- Van De Velde F, Pereira L, Rollema HS** (2004) The revised NMR chemical shift data of carrageenans. *Carbohydr Res* 339:2309–2313.
- Van De Velde F, Rollema HS** (2008) High Resolution NMR of Carrageenans. *Mod Magn Reson* 1605–1610.
- Van Hal, J. W., Huijgen, W. J. J., & López-Contreras, A. M.** (2014). Opportunities et challenges for seaweed in the biobased economy. *Trends in biotechnology*, 32(5), 231-233.
- Vázquez, A. I. F., Sánchez, C. M. D., Delgado, N. G., Alfonso, A. M. S., Ortega, Y. S., Sánchez, H. C.,** (2011) Anti-inflammatory et analgesic activities of red seaweed *Dichotomaria obtusata*. *Brazilian J. Pharmac. Sci.*, 47, 111–118.
- Volkman, M.; Gorbushina, A.A.; Kedar, L.; Oren, A.** (2006) Structure of euhalothec-362, a novel red-shifted mycosporine-like amino acid, from a halophilic cyanobacterium

(*Euhalothece* sp.). *FEMS Microbiol. Lett.* 2006, 258, 50–54.

W

Wada, N., Sakamoto, T., & Matsugo, S. (2015). Mycosporine-like amino acids et their derivatives as natural antioxidants. *Antioxidants*, 4(3), 603-646

Waditee-Sirisattha, R., Kageyama, H., Sopun, W., Tanaka, Y., & Takabe, T. (2014). Identification et upregulation of biosynthetic genes required for accumulation of mycosporine-2-glycine under salt stress conditions in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Applied et environmental microbiology*, 80(5), 1763-1769.

Wang, T. (2009). Enhancing the quality of seafood products through new preservation techniques et seaweed-based antioxidants. Algal polyphenols as novel natural antioxidants.

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 et Technology*, 43(9), 1387-1393.

Wang, B., Tong, G. Z., Qu, Y. L., & Li, L. (2011). Microwave-assisted extraction et in vitro antioxidant evaluation of polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*. In *Applied Mechanics et Materials* (Vol. 79, pp. 204-209). *Trans Tech Publications*.

Wang, H.M., Chou, Y.T., Wen, Z.H., Wang, Z.R., Chen, C.H., Ho, M.L., (2013a). Novel biodegradable porous scaffold applied to skin regeneration. *PLoS One* 8 (6),e56330.

Wang, J., Jin, W., Hou, Y., Niu, X., Zhang, H., Zhang, Q., (2013b). Chemical composition et

moisture-absorption/retention ability of polysaccharides extracted from five algae. *Int. J. Biol. Macromol.* 57, 26–29.

Wixom R. L., (2001) in *Chromatography - A century of discovery 1900-2000.*, G. Meurant, Ed. (ElsevierScience,), chap. 1, pp. 1-38.

White, J.D.; Cammack, J.H.; Sakuma, K. (1989) The synthesis et absolute configuration of mycosporins. A novel application of the Staudinger reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 8970–8972.

Whitehead, K., Karentz, D., & Hedges, J. (2001). Mycosporine-like amino acids (MAAs) in phytoplankton, a herbivorous pteropod (*Limacina helicina*), et its pteropod predator (*Clione antarctica*) in McMurdo Bay, Antarctica. *Marine biology*, 139(5), 1013-1019.

Whitehead, K., & Hedges, J. I. (2005). Photodegradation et photosensitization of mycosporine-like amino acids. *Journal of Photochemistry et Photobiology B: Biology*, 80(2), 115-121.

Wickett, R.R., Visscher, M.O., (2006). Structure et function of the epidermal barrier. *Am. J. Infect. Control* 34, S98–S110.

Wijesinghe, W. A. J. P., 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. *Carbohydrate polymers*, 86(2), 917-921.

Wijesinghe, W. A. J. P., et 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.

Won, J.J.W.; Rideout, J.A.; Chalker, B.E. (1995) Isolation et structure of a novel mycosporine-like amino acid from the reef-building corals *Pocillopora damicornis* et *Stylophora pistillata*. *Tetrahedron Lett*, 36, 5255–5256.

Wong K, Cheung PC (2001) Influence of drying treatment on three Sargassum species: 1. Proximate composition, amino acid profile et some physico-chemical properties. *J Appl Phycol* 13:43–50.

Wu, P., Ma, G., Li, N., Deng, Q., Yin, Y., & Huang, R. (2015). Investigation of in vitro et in vivo antioxidant activities of flavonoids rich extract from the berries of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. *Food chemistry*, 173, 194-202.

X

Xiao, X., Si, X., Yuan, Z., Xu, X., & Li, G., (2012) Isolation of fucoxanthin from edible brown algae by microwave-assisted extraction coupled with high-speed counter current chromatography. *J. Sep. Sci.*, 35, 2313–2317.

Xiao, X. H., Yuan, Z. Q., & Li, G. K. (2013). Preparation of phytosterols et phytol from edible marine algae by microwave-assisted extraction et high-speed counter-current chromatography. *Separation et Purification Technology*, 104, 284-289.

Xu, J., & Gao, K. (2010). UV-A enhanced growth et UV-B induced positive effects in the recovery of photochemical yield in *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta). *Journal of Photochemistry et Photobiology B: Biology*, 100(3), 117-122.

Xu, J., & Gao, K. (2008). Growth, pigments, UV-absorbing compounds et agar yield of the economic red seaweed *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) grown at different depths in the coastal waters of the South China Sea. *Journal of Applied Phycology*, 20(5), 681-686.

Xu, B. J., & Chang, S. K. C. (2007). A comparative study on phenolic profiles et antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of food science*, 72(2).

Y

Yamada, H. (2000). Bioactive plant polysaccharides from Japanese et Chinese traditional herbal medicines. In *Proceedings-Phytochemical Society of Europe* (Vol. 44, pp. 15-24). Dordrecht; London; Kluwer Academic Publishers; 1998.

Yan, X., Nagata, T., Fan, X., (1998). Antioxidative activities in some common seaweeds. *Plant Foods Hum. Nutr.* 52, 253–262.

Ying, Z., Han, X., & Li, J. (2011). Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. *Food Chemistry*, 127(3), 1273-1279.

Young, H.; Patterson, V.J. (1982) A UV-protective compound from *Glomerella cingulata*. A mycosporine. *Phytochem.*, 21, 1075–1077.

Yuan Y, Macquarrie D (2015) Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from *Ascophyllum nodosum* et its antioxidant activity. *Carbohydr Polym* 129:101–107.

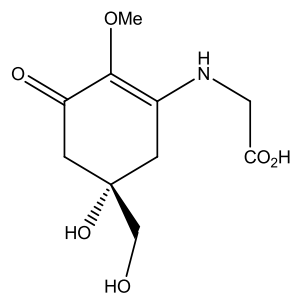
Yuan, Y. V., Westcott, N. D., Hu, C., & Kitts, D. D. (2009). Mycosporine-like amino acid composition of the edible red alga, *Palmaria palmata* (dulse) harvested from the west et east coasts of Grand Manan Islet, New Brunswick. *Food Chemistry*, 112(2), 321-328.



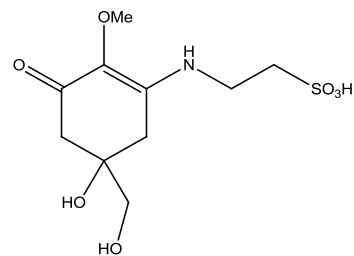
- Zaidul, I. S. M., Norulaini, N. N., Omar, A. M., & Smith, R. L.** (2006). Supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) extraction et fractionation of palm kernel oil from palm kernel as cocoa butter replacers blend. *Journal of Food Engineering*, 73(3), 210-216.
- Zhang, X., & Ervin, E. H.** (2004). Cytokinin-containing seaweed et humic acid extracts associated with creeping bentgrass leaf cytokinins et drought resistance. *Crop science*, 44(5), 1737-1745
- Zhang, X., & Ervin, E. H.** (2008). Impact of seaweed extract-based cytokinins et zeatin riboside on creeping bentgrass heat tolerance. *Crop Science*, 48(1), 364-370.
- Zubia, M., Freile-Pelegrín, Y., & Robledo, D.** (2014). Photosynthesis, pigment composition et antioxidant defences in the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta) under environmental stress. *Journal of applied phycology*, 26(5), 2001-2010.
- Zwenger, S.** (2008). Plant terpenoids: applications et future potentials. *Biotechnology et Molecular Biology Reviews*, 3(1), 1-7.

Annexes

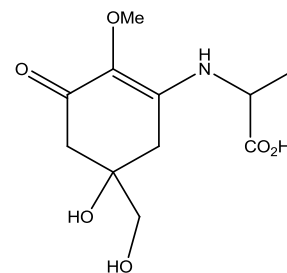
Acides aminés mycosporines-like mono-substitués



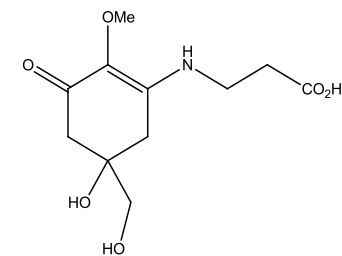
(a)



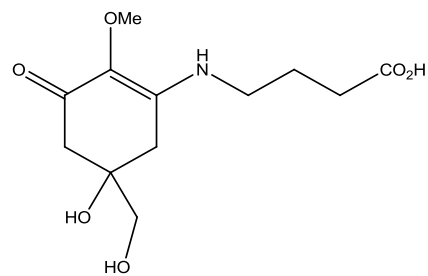
(b)



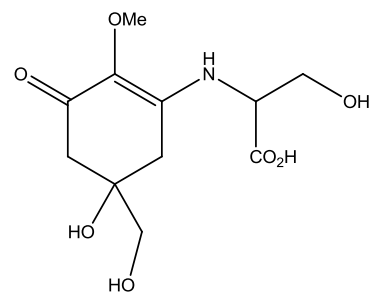
(c)



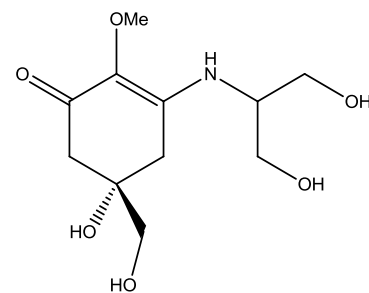
(d)



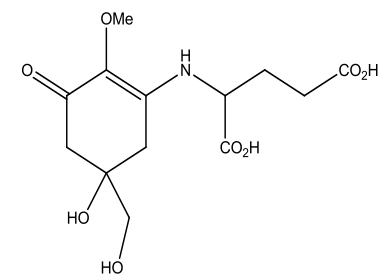
(e)



(f)

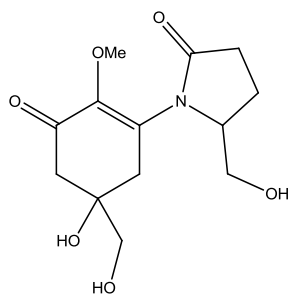


(g)

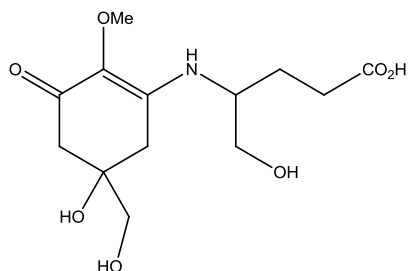


(h)

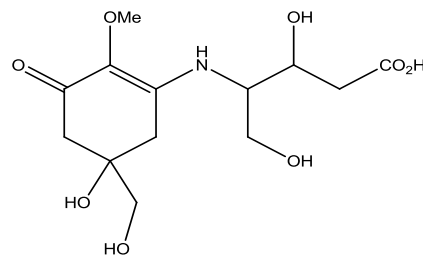
Acides aminés mycosporines-like mono-substitués (suite)



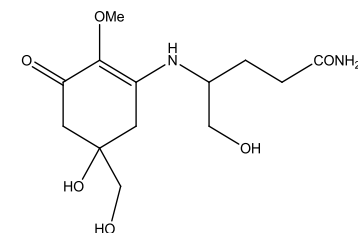
(i)



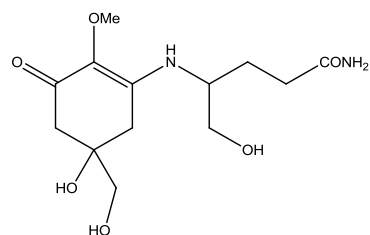
(j)



(k)

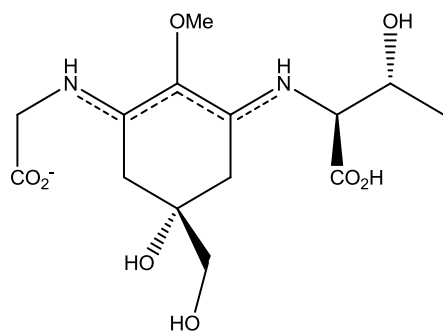


(l)

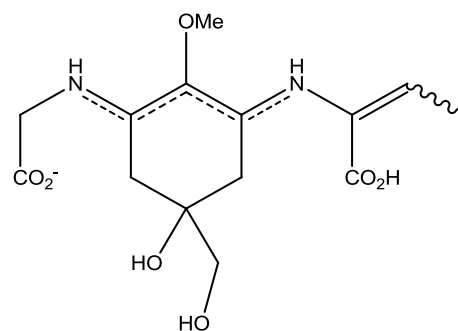


(m)

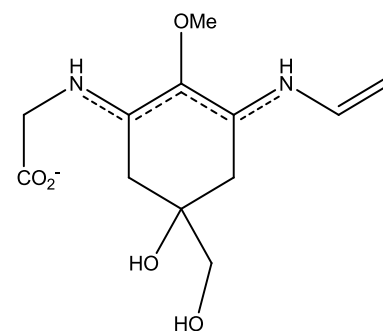
Acides aminés mycosporines-like di-substitués



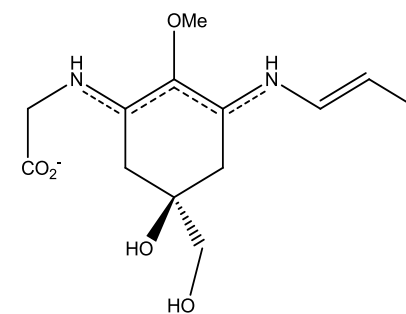
(n)



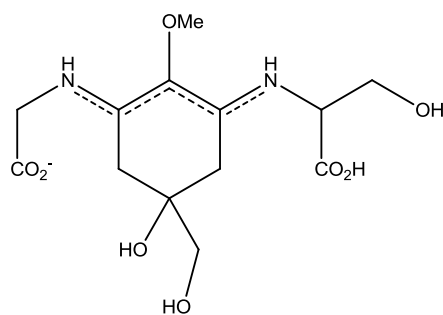
(o)



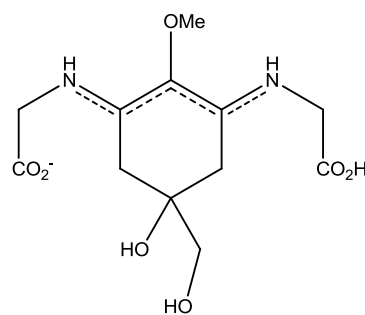
(p)



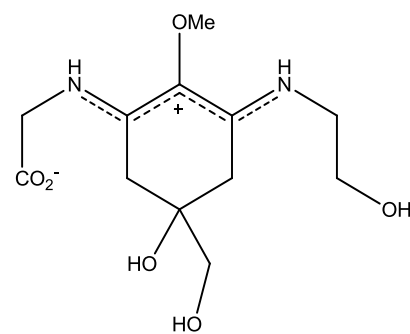
(q)



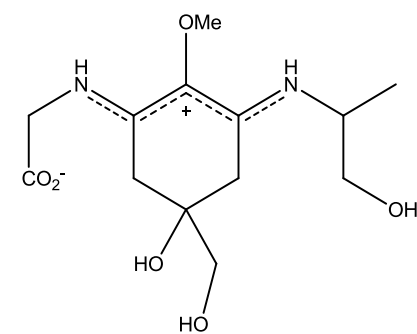
(r)



(s)

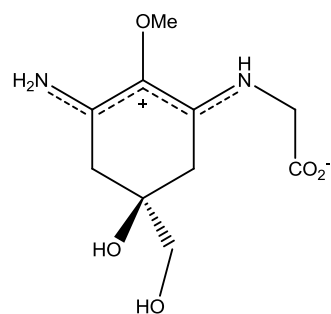


(t)

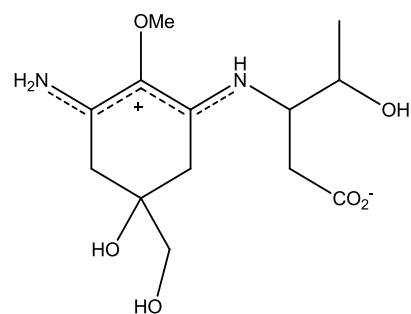


(u)

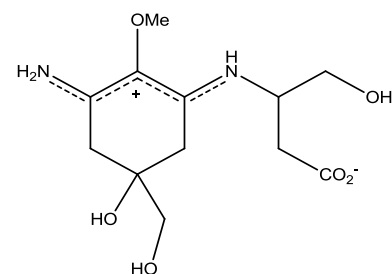
Acides aminés mycosporines-like di-substitués (suite)



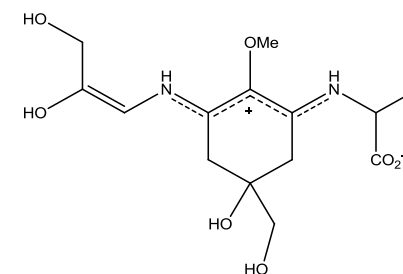
(v)



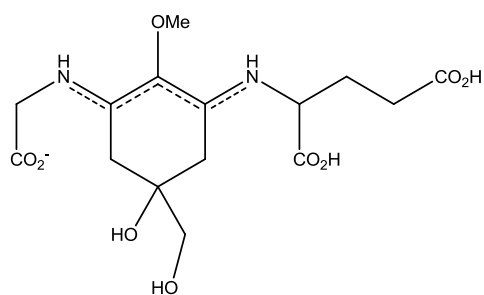
(w)



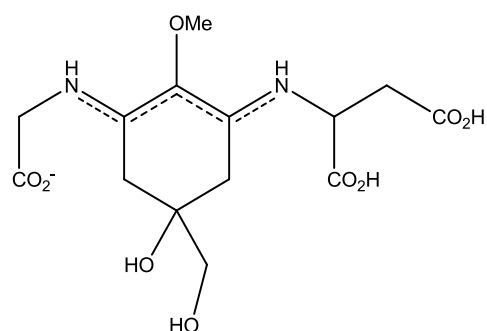
(x)



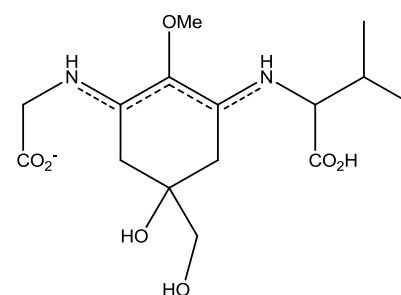
(y)



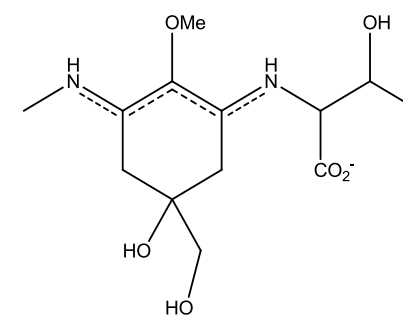
(z)



(aa)

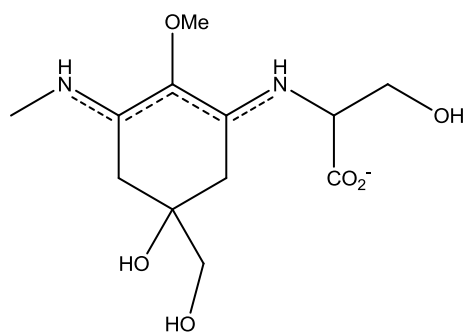


(ab)

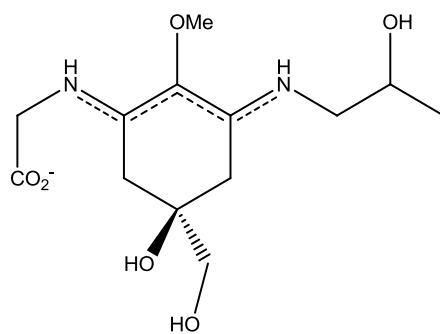


(ac)

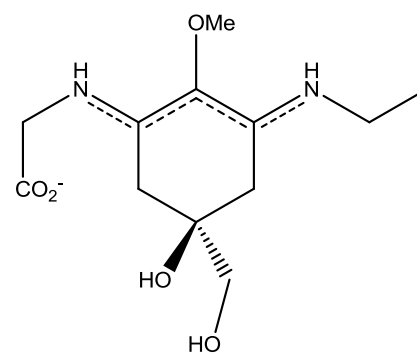
Acides aminés mycosporines-like di-substitués (suite)



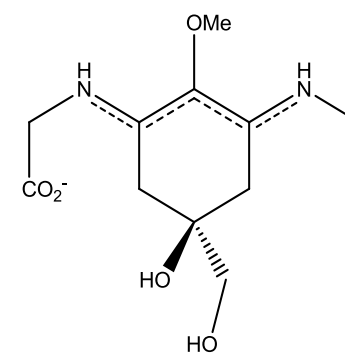
(ad)



(ae)



(af)



(ag)

Preparative separation of marine bioactive compounds by centrifugal partition chromatography



Seaweed *Solieria chordalis*: biogenouest.org

Romain BOULHO⁽¹⁾, Julie Le Roux⁽²⁾, Céline LE QUEMENER⁽²⁾, Grégoire AUDO⁽²⁾, Jean-Philippe KUCMA⁽³⁾, Nathalie BOURGOUGNON⁽¹⁾, Gilles BEDOUX⁽¹⁾

⁽¹⁾ Univ. Bretagne-Sud, EA 3884, LBCM, IUEM, F-56000 Vannes, France. ⁽²⁾ ARMEN Instrument 16, Rue Ampère, 56890 Saint-Avé, France. ⁽³⁾ NEWONAT 8bis, PA de l'Estuaire, 56190 Arzal, France.

Introduction

Marine algae from the French Brittany coasts constitute a significant and diverse natural production. Seaweeds are potentially excellent sources for the development of new functional ingredients for the food, pharmaceutical and cosmetic industries. Green chemistry follows the trend of obtaining a broad spectrum of compounds present at low concentration. Centrifugal Partition Chromatography allows for the fractionation of crude *S. chordalis* extract. This method is bioguided by the bioactivities (antioxidant and photoprotective) and chromatographic analyses (UV, MS) to optimize the purification by CPC-MS detection chain. The aims are to isolate and to identify the high value molecules.

Solieria chordalis

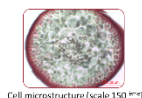
Classification

Phylum : Rhodophyta
Order : Gigartinales
Family : Solieriaceae

Red Seaweed

Present from Norway to Morocco

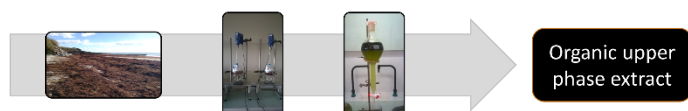
Locally proliferative in Atlantic coast of France



Objectives

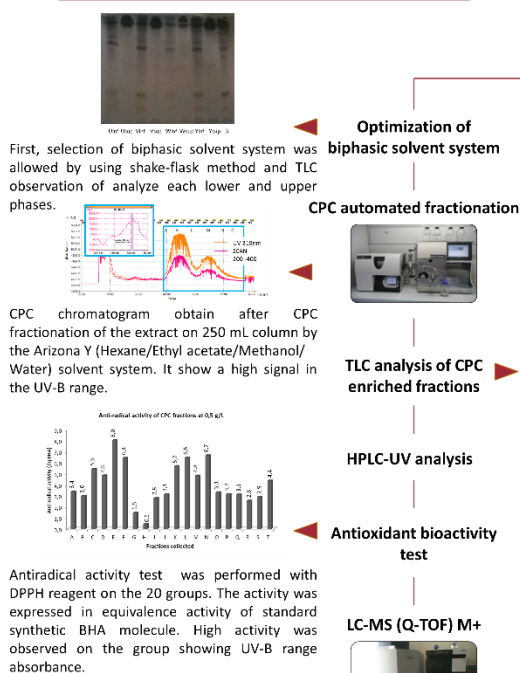
- Eco-extraction of seaweed bio compounds and purification by Centrifugal Partition Chromatographic system.
- Evaluation of antioxidant activity of enriched fractions.
- Optimization of purification process by an MS detection.

Extraction process

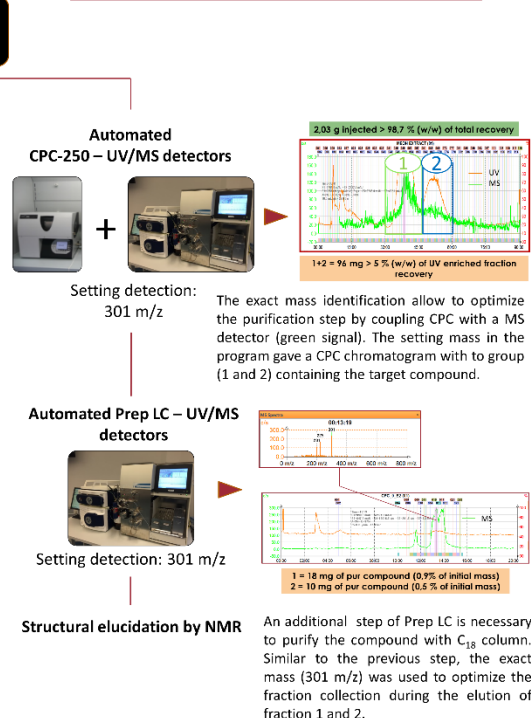


- Collect of fresh seaweed, fresh water washing and drying treatment
- MeOH extraction / freeze-dried seaweed (10:1 ; v/m)
- L/L Extraction : Ethyl acetate / Water (50:50 ; v/v)

Method optimization



Method improvement



The multi-step method optimization was allowed to detect a UV-absorbent compounds in the apolar upper phase mixture. The different analysis enable to bioguide the process of purification. The exact mass identification let to perform an other way of purification method improvement.

Future prospects:

This poster shows the method of bioassays-guided fractionation of *S. chordalis* organic solvent extracts by Centrifugal Partition Chromatography. The MS detection allows a direct identification and collection of the target compounds during the elution. The different fractions need an additional purification to concentrate the high value compounds. The bio-activity tests highlights antioxidant fractions. The characterization of these bio-molecules are still under investigation.



Centrifugal Partition Chromatography for Preparative Separation of Marine Bioactive Compounds



Romain BOULHO⁽¹⁾, Julie LE ROUX⁽²⁾, Céline LE QUEMENER⁽²⁾, Grégoire AUDO⁽²⁾, Jean-Philippe KUCMA⁽³⁾, Nathalie BOURGOUGNON⁽¹⁾, Gilles BEDOUX⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Univ. Bretagne-Sud, EA 3884, LBCM, IUEM, F-56000 Vannes, France. ⁽²⁾ ARMEN Instrument 16, Rue Ampère, 56890 Saint-Avé, France.

⁽³⁾ NEWONAT 8bis, PA de l'Estuaire, 56190 Arzal, France.

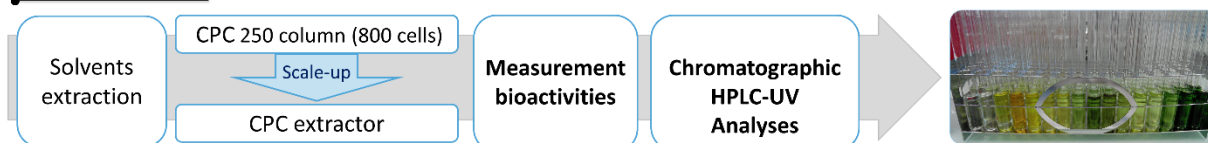
Introduction

Marine algae from the French Brittany coasts constitute a significant and diverse natural production. Seaweeds are potentially excellent sources for the development of new functional ingredients for food, pharmaceutical and cosmetic industries. Green chemistry follows the trend of obtaining a broad spectrum of compounds present at low concentrations. Centrifugal Partition Chromatography allows for the fractionation of crude *Solieria chordalis* (Gigartinales, Solieriaceae) organic extract. The aim of the study are the optimization of the separation is assessed by the bioactivities and chromatographic analysis. the isolation and the identification of high value molecules.

Objectives

- Eco-extraction of seaweed biocompounds and purification by Centrifugal Partition Chromatography.
- Assessed of fractions bioactivities.
- Identification of bioactive compounds by analytical chemistry.

Methods



Bioactivities

Antioxydant activities

The antiradical scavenging capacity of CPC fractions can be evaluated by the DPPH test. This microdilution method allows the valuation of the inhibition of free radicals formation and compare with standards (BHA and BHT). (Yuan et al, 2005).

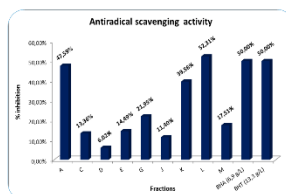


Figure: Antiradical CPC fractions (0,5g/L, CH₃OH)

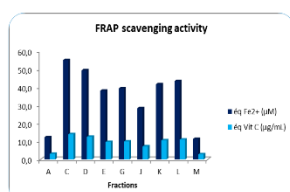


Figure: Antioxydant CPC fractions (0,25 g/L, in H₂O)

The Ferric Reducing Antioxidant of Plasma (FRAP) scavenging capacity of CPC fractions was obtained by a microdilution and is expressed in equivalent (éq) of standards. This method evaluate the electron capture capacity of fractions. The complementarity of this method show fractions with one or two capacities. (Kaushik et al, 2012).

Anti-whitening activities

The anti-whitening activity of CPC fractions was obtained by anti-tyrosinase activity test. This enzyme is at the origin of the biosynthesis of melanine. The fractions capacities are compared with the standard values for an inhibition fixed. (Chan et al, 2008 ; Lim et al, 2009).

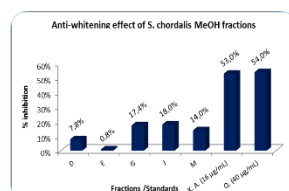


Figure: Anti-whitening CPC fractions (200 mg/L, H₂O)
Positive control: Kojic acid and Quercetin.

Chromatographic analysis

The CPC fractions of CH₃OH *S. chordalis* extract are studied by HPLC-UV. The fraction showed seven signals. Three compounds are isolated (at 3,1; 24,2 and 38 min retention time (rt)) and a group of compounds (at 55 at 70 min rt) is observed. The molecule present at 24,2 min rt, shows an interesting spectrum at UV-B wavelength (290 – 320 nm). Two maximum absorbances are observed (281 – 310 nm), it is similar of photoprotective UV-B bioactive compounds like Micosporine like Amino Acid (MAAs).

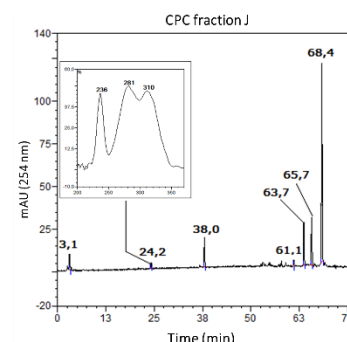


Figure: HPLC-UV analyse of CPC fraction J (1mg/mL) at 254 nm and their spectrum (200 – 600 nm).

Future prospects:

This poster shows the method of bioassays-guided fractionation of *S. chordalis* extracts by Centrifugal Partition Chromatography. The HPLC-UV analysis show different compositions between the fractions but they need an additional purification step to concentrate the high value compounds. The bio-activity tests highlights the anti-tyrosinase and antioxydant fractions. The characterization of these bio-molecules are still under investigation.



N° Ordre : 465